

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

**Pseudouridiini süntaasi TruA osalus mullabakter *Pseudomonas putida*
KT2440 mutatsiooniprotsessides**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Annabel Toom

Juhendajad PhD Signe Saumaa

PhD Heili Ilves

TARTU 2023

INFOLEHT

Pseudouridiini süntaasi TruA osalus mullabakter *Pseudomonas putida* KT2440 mutatsiooniprotsessides

Varasemalt on leitud seos tRNA antikoodoni läheduses paiknevate modifikatsioonide – pseudouridiinide ja mutatsioonisageduse vahel mullabakteris *Pseudomonas putida*. Näidati, et pseudouridiini süntaasi TruA kodeeriva *truA* aktiivsuse puudumisel on *P. putida* kasvavate rakkude mutatsioonide tekkesagedus tõusnud, kuid statsionaarses kasvufaasis olevates bakterites *truA* geeni puudumise mõju mutantide tekkesagedusele pole veel teada.

Käesolevas töös uurisin TruA puudumise mõju statsionaarse faasi mutatsioonisagedusele, kasutades selleks laktoosi kasutuselevõtul põhinevat testsüsteemi, mis võimaldab tuvastada β -galaktosidaasi geenis *lacZ* tekkivaid mutatsioone, mis võimaldavad spetsiaalsetel Lac-testertüvedel hakata kasutama laktoosi süsinikallikana. Töö tulemusena selgus, et kuigi *truA* puudumine ei tõstnud *P. putida* tüvedes statsionaarse faasi mutageneesi, täheldati võimalikku osalust raaminihkemutatsioonide tekkes.

Märksõnad: *truA*, pseudouridiin, mutatsioonisagedus, *Pseudomonas putida*, statsionaarne faas

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Pseudouridine synthase TruA participation in mutation processes of soil bacterium

***Pseudomonas putida* KT2440**

Previously it has been shown that there is a link between the mutation rate of *Pseudomonas putida* and pseudouridines located near the anticodon region of tRNAs. It has been shown that in the absence of pseudouridine synthase coding gene *truA* mutation rate of *P. putida* in growing cells was enhanced, but the impact in long-term stationary phase bacteria hasn't yet been shown.

Therefore, our main research goal was to find whether the mutation rate of *Pseudomonas putida* in stationary phase is affected by the deletion of the *truA* gene or not, using a test-system based on monitoring mutations in *lacZ* gene encoding for β -galactosidase, which turns *lac* tester strains from Lac⁻ to Lac⁺ phenotype. Our results with *lac* test-systems showed that whereas the lack of *truA* did not increase the stationary-phase mutagenesis in *P. putida* strains in examined conditions, possible involvement in generation of frame-shift mutations was observed.

Keywords: *truA*, pseudouridine, mutation rate, *Pseudomonas putida*, stationary phase

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Mutatsioonid, nende teke bakterirakkudes	7
1.1.1. Mutatsioonisagedus ja mutatsioonide tekkesagedust vähendavad mehhanismid bakteritel.....	8
1.2. Statsionaarse faasi mutatsioonide tekkemehhanismid.....	8
1.3. Testsüsteemid mutatsiooniprotsesside uurimiseks bakterites.....	9
1.3.1. Rifampitsiini resistentsuse tekkel põhinev testsüsteem ($Rif^R/rpoB$).....	9
1.3.2. Fenooli kasutuselevõtul põhinevad testsüsteemid mutatsiooniprotsesside uurimiseks mullabakteris <i>P. putida</i>	10
1.3.3. Statsionaarse faasi mutatsioonide uurimine <i>E. coli</i> tüves FC40.....	11
1.3.4. Teised laktoosi kasutuselevõtul põhinevad testsüsteemid.....	12
1.4. tRNA modifikatsioonid.....	15
1.5. tRNA modifikatsioon – pseudouridiin (Ψ)	16
1.5.1. Pseudouridiini süntaas TruA	17
2. EKSPERIMENTAALOSA	19
2.1. Töö eesmärgid.....	19
2.2. Materjal ja meetodika	19
2.2.1. Kasutatud bakteritüved, plasmiidid ja söötmed.....	19
2.2.2. Elektroporatsiooni jaoks kompetentsete bakterirakkude valmistamine ja elektroporatsioon	21
2.2.3. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR).....	21
2.2.4. Plasmiidse DNA eraldamine „Favorgen“ kitiga ja geelelektroforees	23
2.2.5. <i>truA</i> geeni deleteerimine <i>P. putida</i> KT2440 Lac-test tüvest	23
2.2.6. Sekveneerimine	24
2.2.7. <i>P. putida</i> rifampitsiini-resistentsete (Rif^R) mutantide tekkesageduse määramine $Rif^R/rpoB$ testsüsteemiga (fluktuatsiooni test)	25
2.2.8. <i>P. putida</i> Lac ⁺ revertantide tekkesageduse määramine laktoosi kasutuselevõtul põhineva testsüsteemiga	25
2.2.9. <i>P. putida</i> nälgiva populatsiooni elumuse määramine.....	26
2.2.10. Rekonstruktsioonikatse	27
2.2.11. Statistiline analüüs	27
2.3. Tulemused ja arutelu.....	27

2.3.1. Mutatsiooniprotsesside uurimiseks vajaliku <i>P. putida</i> KT2440 Lac-test Δ <i>truA</i> tüve konstrueerimine	28
2.3.2. Pseudouridiini süntaasi TruA kodeeriva <i>truA</i> geeni puudumise mõju <i>P. putida</i> eksponentsiaalse kasvufaasi rakkude mutatsioonisagedusele	28
2.3.3. Pseudouridiini süntaasi kodeeriva TruA geeni <i>truA</i> puudumise mõju uurimine <i>P. putida</i> mutatsioonisagedusele laktoosi kasutusele võtul põhineva testüsteemi näitel ...	30
2.3.3.1. Pseudouridiini süntaasi TruA kodeeriva <i>truA</i> geeni puudumise mõju mutatsioonisagedusele kasutades pKT_taclacZ*104GC testüsteemi	30
2.3.3.2. Pseudouridiini süntaasi TruA kodeeriva <i>truA</i> geeni puudumise mõju mutatsioonisagedusele kasutades pKT_taclacZ*107-1 testüsteemi	32
2.3.3.3. Pseudouridiini süntaasi TruA kodeeriva <i>truA</i> geeni puudumise mõju mutatsioonisagedusele kasutades pKT_taclacZ*109+2 testüsteemi.....	34
2.3.4. Pseudouridiini süntaasi TruA kodeeriva <i>truA</i> geeni puudumise mõju <i>P. putida</i> rakkude kasvukiirusele laktoosi minimaaltassil	36
2.3.4.1. Arutelu	36
KOKKUVÕTE	39
SUMMARY	41
TÄNUSÕNAD	43
KIRJANDUSE LOETELU.....	44
LIHTLITSENTS.....	53

KASUTATUD LÜHENDID

Amp – ampitsilliin

CAA – aminohapete hüdroolüsaat (*casamino acids*)

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

Glc – glükoos (*glycose*)

Gm – gentamütsiin

Km – kanamütsiin

Lac – laktoos

MMR – valepaardumise reparatsioon (*mismatch repair*)

Pen – penitsilliin

Phe – fenool

Pol – polümeraas

Rif – rifampitsiin

rRNA – ribosoomi RNA

snRNA – väike tuuma RNA (*small nuclear RNA*)

snoRNA – väike tuumakese RNA (*small nucleolar RNA*)

tRNA – transport RNA (*transfer RNA*)

wt – metsiktüvi (*wild type*)

Ψ – pseudouridiin

SISSEJUHATUS

Looduses olevad tingimused on mikroorganismidele enamasti ebasoodsad, mistõttu on nad suurema osa oma elutsüklist stressis. Keskkonnaga paremini kohastumiseks tekivad bakteritel mutatsioonid, mis aitavad kohaneda ja toime tulla. Kuna stressitingimustes ning kasvavates rakkudes tekivad mutatsioonid pisut erinevalt, siis on oluline uurida just statsionaarse faasi mutatsioone, mis aitavad mõista paremini looduslikes tingimustes elavate bakterite mutatsioonide tekkeprotsesse. Selleks on konstrueeritud nii meie laboris kui ka teiste laborite poolt mitmesuguseid testsüsteeme, mis annavad võimaluse uurida statsionaarse faasi mutatsioone ka süsinikunäljas olevates bakterites.

Pseudouridiinid on üheks enim levinuks modifikatsiooniks RNA-s ning selle olulisust on näidatud lugemisraami säilitamisel translatsiooni käigus, oksüdatiivse stressi ja temperatuurišoki talumisel (Kinghorn *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2019). Meie laboris on näidatud, et pseudouridiini süntaasi *truA* puudumisel tõuseb mutatsioonisagedus kasvavates *Pseudomonas putida* rakkudes neli korda (Tagel *et al.*, 2016). Küll aga statsionaarse faasi uurimiseks fenooli kasutuselevõtul põhinevat testsüsteemi kasutades oli Tagel *et al.* 2016. aasta artikli järgi mutantide tekkesagedus üllatavalt madal (Tagel *et al.*, 2016). Sellest johtuvalt tekkiski selle lõputöö jaoks idee ja vajadus uurida *P. putida* KT2440 *truA*-deletant tüve teistsuguse testsüsteemiga, mis aitaks selgitada TruA rolli statsionaarse kasvufaasi mutageneesis.

Käesoleva töö teoreetilises osas annan ülevaate bakterite statsionaarse faasi mutatsioonide tekkemehhanismidest, tRNA modifikatsioonidest ning pseudouridiinidest. Samuti kirjeldan tuntumaid mutatsiooniprotsesside uurimiseks kasutatavaid bakteriaalseid testsüsteeme. Minu praktilise töö eesmärgiks oli hinnata uudse laktoosi kasutuselevõtul baseeruva plasmiidse testsüsteemiga pseudouridiini süntaasi TruA mõju *P. putida* statsionaarse faasi rakkude mutatsiooniprotsessidele.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Mutatsioonid, nende teke bakterirakkudes

Mikroorganismidel käib looduses pidevalt võitlus ellujäämise üle. Lisaks toitainetele konkureerivatele teistele organismidele muudab keskkonna ebasoodsaks vale temperatuur, erinevad pH ja osmolaarsuse tingimused, kahjulikud ühendid, mis kõik tekitavad bakterites stressi (Nyström, 2004). Sellises keskkonnas on bakterid sunnitud kasvama aeglasemalt või ei suuda nad üldse kasvada. Hakkavad kuhjuma ka DNA kahjustused, mis tekivad vigaderohke DNA sünteesi tagajärjel. DNA reparatsioonisüsteemide efektiivsus langeb, mis annab omakorda aluse mutatsioonide tekkeks. Mutatsioonide all mõistetakse organismi geneetilise materjali – DNA või RNA – edasikanduvaid ja säilivaid muutuseid. Neid saab jagada tekkimise põhjuste järgi kas iseeneslikeks ehk spontaanseteks mutatsioonideks, aga ka indutseeritud mutatsioonideks, mille puhul on mutatsioon mõne mutageeni poolt esile kutsutud. (Hershberg, 2015; Vincent & Uphoff, 2020)

Spontaansed mutatsioonid leiavad aset eelkõige DNA replikatsioonivigadest tulenevalt, mis on põhjustatud vigade parandamata jätmisest DNA reparatsioonimehhanismide poolt. Replikatiivne DNA polümeraas teeb DNA replikatsiooni käigus vigu, lisades sünteesitavasse DNA ahelasse kas vale lämmastikaluse, viies DNA ahelasse liigseid nukleotiide või jättes mõne nukleotiidi ahelasse viimata. Juhuslikud mutatsioonid leiavad aset sagedusega 1 mutatsioon 10^5 – 10^8 DNA sünteesi kohta (Torii *et al.*, 2003) ning 80 aastat tagasi pakkusid Luria ja Delbrück, et spontaansed mutatsioonid võiksid olla mikroobide mitmekesisuse liikumapanevaks jõuks, mistõttu peetakse mutatsioone ka evolutsiooni koha pealt oluliseks (Luria & Delbrück, 1943).

Indutseeritud mutatsioonid seevastu tekivad just kindla faktori – mutageenide mõju tagajärjel. Sellisteks faktoriteks võib pidada UV-kiirgust ja teisi füüsikalisi mutageene, bioloogilisi (viirused, toksiinid, transposoonid), keemilisi mutageene (alküülivad ühendid, antibiootikumid). Leidub ka olukordi, kui lämmastikaluste asemel lülitatakse DNA ahelasse N-aluste analoogsed ühendid, näiteks 5-bromouratsiil (5-Br-U), mis on tümiini (T) analoog ning paardub oma keto vormis adeniiniga (A) (Janion *et al.*, 1987). Samuti võib mutageenset toimet esineda nukleotiidide oksüdatsiooniproduktidel, seda on täheldatud guaniinist tekkinud 8-oxoG paardumisel adeniiniga. Guaniini oksüdeerimisprotsessi produkt tekitab G:C → T:A transversioone (Michaels & Miller, 1992).

1.1.1. Mutatsioonisagedus ja mutatsioonide tekkesagedust vähendavad mehhanismid bakteritel

Mutatsioonide tekkesagedust bakterites soodustavad kõik sellised tegurid, mis on eelnevalt mainitud, mis bakterile ei sobi või sunnivad mikroorganismi tegema parandusi oma geneetilises materjalis, kasutades selleks spetsialiseeritud DNA polümeraase IV ja V, mille puhul DNA sünteesis vigade sisse jätmise sagedus võrreldes teiste polümeraasidega on tunduvalt suurem (Goodman, 2002; Layton & Foster, 2003). Mõned tekkivatest mutatsioonidest võivad olla ka edaspidi bakterile kasulikud. Sellised on näiteks antibiootikumide vastu tekkinud resistentsuse mutatsioonid või muudatus mõne eelnevalt allasurutud geeni ekspressioonirajas, mis osutub bakterile ellujäämise või konkurentsi osas oluliseks (Watford & Warrington, 2023).

Küll aga on selliseid mutatsioone, mis on neutraalsed või bakterile pigem negatiivse efektiga, mistõttu peavad bakterid keskkonnas paremini toime tulemiseks kahjulikud mutatsioonid ära likvideerima. Mutatsioonisagedust saab vähendada kas mutatsiooni tagasipööramisega, supressormutatsioonidega (näidatud *E. coli*'s geeni *mutT* mutaatoritel, Tröbner & Piechocki, 1984) või horisontaalse geeniülekanne kaudu sobimatu mutatsioonijärgse alleeli välja vahetamisega eelneva vastu (Denamur *et al.*, 2000). Lisaks on leitud, et kui MMR ehk valepaardumise reparatsiooni mehhanismi ensüümide MutS ja MutL, (MutH) hulka tõsta, siis mutatsioonide tekkesagedus langes, mis viitab MMR mehhanismi olulisusele mutatsioonide ära hoidmisel (Galán *et al.*, 2007).

1.2. Statsionaarse faasi mutatsioonide tekkemehhanismid

Statsionaarse faasi mutatsioonid annavad bakteripopulatsioonile võimaluse geneetilisel tasemel kohastuda, et ellu jääda ja funktsioneerida sellistes keskkonnatingimustes, mis pole neile tavapärased või on pidevas muutumises (P. L. Foster, 1999). Statsionaarse faasi mutatsioonide tekkele aitavad kaasa ebatäpne DNA süntees ja mitmed DNA kahjustused (Kivisaar, 2003). Vastusena DNA kahjustustele nälgivates rakkudes suureneb vigasid tegevate DNA polümeraaside IV ja V osakaal DNA replikatsioonil ning DNA sünteesil vigade juurde tekkimisel ei suuda DNA reparatsioonisüsteemid neid enam piisavalt hästi parandada (Goodman, 2002; Tegova *et al.*, 2004).

Statsionaarse faasi mutatsioone on nimetatud ka stress-indutseeritud mutatsioonideks või adaptiivseteks mutatsioonideks (P. L. Foster, 1999). Looduslike mutaatortüvede mutatsioonisagedus on pidevalt kõrge ning nad on välja selekteerinud olukorras, kus bakteritel on vaja elus püsimiseks lakkamatult muutuvate keskkonnatingimustega kohaneda. Nende olemasolu näitab samuti, et suurenenud mutatsioonisagedus kiirendab bakterite

mitmekesisustumist ja evolutsiooni (Denamur & Matic, 2006). Mutaatoritel on tavaliselt DNA reparatsiooni läbi viivad ensüümid inaktiveerunud. Mutatsioonitaseme üles või alla reguleerimine sõltub bakteril antud keskkonnaga kohastumiseks vajaminevate mutatsioonide arvust, bakteripopulatsiooni suurusest, mutaatoralleelide dominantsusest, konkurentsist, migratsioonist ja keskkonna mitmekesisusest (Denamur & Matic, 2006).

Mutatsioonisagedus võib suureneka ka ajutiselt, stressivastuste tekkimise käigus, võimaldades enimkohastunud variantide teket (P. L. Foster, 2005). Taolised stressivastused on näiteks SOS vastus, mille kutsuvad esile kahjustatud DNA-l tekkinud ssDNA regioonid (Galhardo *et al.*, 2007); üldine stressivastus, mida kontrollib RNA polümeraasi sigma faktor RpoS (Hengge-Aronis, 2002); aminohapete näljast tingitud „poomisvastus“ (*stringent response*), mida vahendab guanosiintetrafosfaat (ppGpp) ning millega kaasnev aminohapete biosünteesi geenide aktivatsioon võib olla aluseks järgmiste mutatsioonide tekkele (Braeken *et al.*, 2006; P. L. Foster, 1999, 2007); ja „kuuma-šoki vastus“ (*heat-shock response*). Kõik eelnimetatud stressivastused mõjutavad rohkelt vigu tegevate DNA polümeraaside IV ja V geenide avaldumist (P. L. Foster, 2007; Galhardo *et al.*, 2007; Hengge-Aronis, 2002).

Statsionaarse faasi mutatsiooniprotsesside uurimiseks on konstrueeritud erisuguseid testsüsteeme, mida saab nälgivates bakterites kasutada. Nendest räägin lähemalt järgmises alapeatükis.

1.3. Testsüsteemid mutatsiooniprotsesside uurimiseks bakterites

Mutatsioonide tekkimise ja mutatsioonisageduse uurimiseks bakterites on välja töötatud mitmeid testsüsteeme. Bakterite seas on üheks levinuimaks mudelorganismiks *E. coli*, mistõttu leidub palju just selle bakteriliigi järgi kujundatud testsüsteeme, uurimaks mutatsiooniprotsesside käiku. Üha enam on testsüsteeme hakatud konstrueerima ka teistele bakteritele, sealjuures mullabakterile *P. putida*. Järgnevalt olen toonud välja tuntumad ja ka antud töös kasutatud testsüsteemid.

1.3.1. Rifampitsiini resistentsuse tekkel põhinev testsüsteem (Rif^R/*rpoB*)

Spontaansete mutatsioonide uurimiseks bakterite eksponentsiaalse kasvu faasis on laialt kasutusel rifampitsiini resistentsuse tekkel põhinev testsüsteem. Rifampitsiin (Rif) on antibiootikum, mis RNA polümeraasi β -subühikule seondumisel inhibeerib füüsiliselt RNA sünteesi elongatsiooni faasi. Sellest tulenevalt on pärsitud ka translatsiooni ehk valgusünteesi läbiviimine (Campbell *et al.*, 2001). Mõni juhuslikult aset leidnud asendusmutatsioon β -subühiku geenis *rpoB* muudab RNA polümeraasi konformatsioon sedasi, et rifampitsiini

seandumine on edaspidi takistatud. Sel juhul toimub selliseid mutatsioone kandvate bakterirakkude kasv edasi ka rifampitsiini sisaldavatel söötmeplaatidel, kuna see antibiootikum ei saa nende geeniekspressiooni alla suruda (Garibyan *et al.*, 2003). Rifampitsiini resistentsusel põhinevat testsüsteemi on mutatsioonide tekkesageduse väljaselgitamiseks kasutanud ka T. Jatsenko oma 2010. aasta artiklis kirjeldatud katsetes *P. putida* PaW85 tüve kohta (Jatsenko *et al.*, 2010). Nad leidsid, et bakterile *P. putida* annab rifampitsiini sisaldaval söötmel kasvamiseks võimaluse eri tüüpi mutatsioonid, mis omakorda võivad erineda pisut selle poolest, kui kiiresti kolooniad seda antibiootikumi sisaldava tardsöötme tassi peale ilmuda suudavad (Jatsenko *et al.*, 2010).

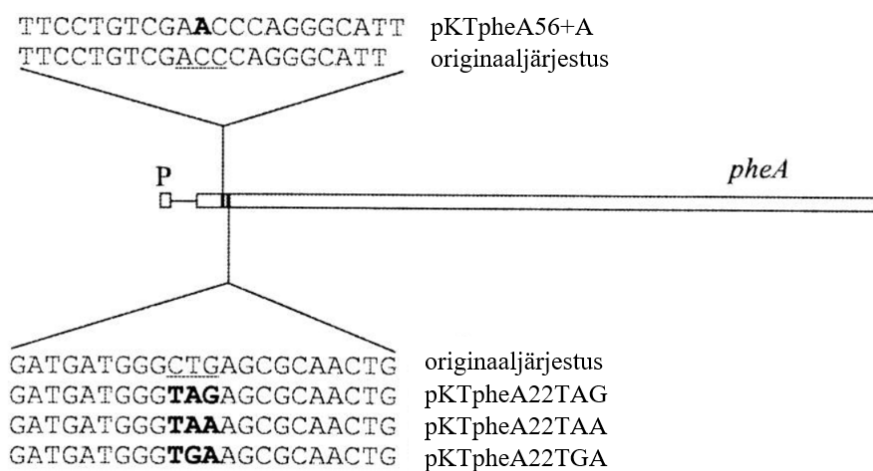
Rifampitsiini resistentsusel mutantidel põhineva testsüsteemi puhul tuleb silmas pidada seda, et kuigi Rif^R mutantide arvu põhjal saab ülevaate bakteritüve üldisest mutatsioonisagedusest, siis mutantide lugemine piirdub kasvava rakukultuuri ehk enne plaatimist tekkinud mutantidega. Seda seetõttu, et tegemist on letaalsel selektsioonil põhineva testsüsteemiga, mistõttu need bakterid, kellel eelnevalt *rpoB* geenis mutatsioone tekkinud pole, rifampitsiini tassidel ellu jääda ja kasvada ei suuda (Campbell *et al.*, 2001; Jatsenko *et al.*, 2010).

1.3.2. Fenooli kasutuselevõtul põhinevad testsüsteemid mutatsiooniprotsesside uurimiseks mullabakteris *P. putida*

P. putida rakkudes statsionaarse faasi mutatsioonide uurimiseks on konstrueeritud nii plasmiidseid kui ka kromosomaalseid fenooli kasutamisel põhinevaid testsüsteeme ning mõlemad neist lubavad mutatsioonide tekkimisel kasutada süsinikuallikana ainult fenooli.

Üks põhiline plasmiidne fenooli kasutuselevõtul põhinev testsüsteem seisneb plasmidi viidud muudetud fenooli monooksügenaasi geeni *pheA* funktsionaalsuse taastamisel asendusmutatsiooniga. Seda saab kasutada nii kasvavates kui nälgivates rakkudes mutatsioonide tekkesageduse jälgimiseks (Tegova *et al.*, 2004). Testsüsteem sisaldab pKT240 plasmidi viidud *pheA* geeni, kus 22. positsioonis olev leutsiini (Leu-22) kodeeriv koodon CTG on asendatud translatsiooni stoppkoodoniga TAG, TAA või TGA (Tegova *et al.*, 2004). Lisaks loodi testsüsteem 1-nukleotiidsete deletsioonide uurimiseks, mis põhineb samuti fenooli monooksügenaasi geeni (*pheA*) kodeeriva järjestuse muutmisel. *pheA* geeni 5' otsas asuvasse treoniini (Thr-56) kodeerivasse koodonisse ACC tekitati +1 raaminihe, inserteerides sinna juurde ühe A nukleotiidi. Selline mutatsiooniga *pheA* geen (*pheA56+A*) viidi vektorplasmidi pKT240 – saadi testerplasmiid pKT*pheA56+A* (Tegova *et al.*, 2004). Mõlema testsüsteemi puhul ei suuda plasmidi sisaldavad rakud enne fenooli süsinikuallikana kasutada, kui bakterid taastavad *pheA* algse funktsionaalsuse kas stoppkoodoni asendamisel leutsiini kodeeriva

järjestusega (pKTpheA22*) või 1-nukleotiidses deletsioonis algse lugemisraami taastamisel (pKTpheA56+A) (joonis 1).



Joonis 1. *P. putida* fenooli kasutuselevõtul põhinev testsüsteem, mis võimaldab jälgida 1-nt deletsioonide (plasmiid pKTpheA56+A) või erinevate stoppkoodonite elimineerumise kaudu asendusmutatsioonide teket (pKTpheA22TAG, pKTpheA22TAA ja pKTpheA22TGA). Joonisel on näidatud originaalne järjestus ja mutatsiooniga variandid. Testsüsteem on konstrueeritud fenooli monooksügenaasi geeni (*pheA*) kodeeriva järjestuse muutmisega. *pheA* geeni tekitati ühe A nukleotiidi insertioonina +1 raaminihe (märgitud mustalt) aminohapet treoniin (Thr-56) kodeerivasse koodonisse ACC (originaalsel järjestusel alla joonitud). Asendusmutatsioonide isoleerimiseks mõeldud testsüsteem konstrueeriti aminohapet leutsiin (Leu-22) kodeeriva koodoni CTG (originaalsel järjestusel alla joonitud) asendamisega TAG, TAA või TGA stoppkoodoni vastu (märgitud mustalt). Transkriptsioon *pheA* geenilt on initsieeritud konstitutiivselt töötavalt promotorigilt (tähistatud P-ga). Joonis on võetud ja muudetud artiklist Tegova *et al.*, 2004.

Plasmiidsete testsüsteemide abil kirjeldatud mutatsiooniprotsesse ei saa üks-üheselt kromosoomis toimuvale üle kanda, kuna plasmidi replikatsioonis võivad osa võtta teistsugused valgud võrreldes kromosoomiga. Sellest tulenevalt tekkis vajadus kromosomaalsete testsüsteemide järele. Kromosomaalsetest fenooli kasutuselevõtul põhinevatest testsüsteemidest on konstrueeritud pheA+C testsüsteem, mis on sarnane eelnevalt kirjeldatud plasmiidsele testsüsteemile (pKTpheA56+A) – on tekitatud 1+ raaminihe, viies 3 C nukleotiidi kordusjärjestusse lisaks ühe C nukleotiidi, rikkudes sellega *pheA* geeni funktsionaalsust ning mis taastub reverteerumisel (Juurik *et al.*, 2012). Teiseks kromosomaalseks fenooli kasutamisel baseeruvaks testsüsteemiks on phe-lacI testsüsteem, millega saab detekteerida nii lacI repressorit inhibeerivaid kui ka lac operaatori sidumiskohti kaotavaid mutatsioone (Juurik *et al.*, 2012). Mõlemat kromosomaalset testsüsteemi saab rakendada kromosoomi erinevates kohtades, uurimaks mutatsioonide tekkesagedust Phe⁺ revertantide tekkimisega.

1.3.3. Statsionaarse faasi mutatsioonide uurimine *E. coli* tüves FC40

Statsionaarse faasi mutatsioone on uuritud *E. coli* tüves FC40 (Cairns & Foster, 1991; P. L. Foster & Trimarchi, 1995). Bakteril *E. coli* on kromosomaalne β-galaktosidaasi kodeeriv *lacZ*

geen. FC40 tüve konstrueerimisel on *lacZ* geeni asemel viidud *lac* alleel F' plasmiidiga bakterisse. *Lac* alleeli puhul on tegemist *lacI-lacZ* liitjärjestusega (Cupples & Miller, 1988). *E. coli* FC40 tüve konstrueerimisel läks *lacI* geeni ja *lacZ* geeni järjestuste liitmisel teatud osa mõlematest geenidest ja operonist (terve *lac* operoni promotori P_{lac} ja LacI seandumiseks vajalik operon *lacO*) kaduma, kuid tekkinud liitjärjestus võimaldas siiski laktoosi metaboliseerida. Seda juhul, kui eelnevalt *lacI* geeni (laktoosi operoni transkribeerimist inhibeeriva geeni) kodeerivasse järjestusse tekitatud +1 raaminihkemutatsiooniga mittefunktsionaalseks muudetud *lacZ* alleel reverteerub ja uuesti funktsionaalsuse saavutab (P. L. Foster & Trimarchi, 1995).

E. coli FC40 ei ole võimeline laktoosi metaboliseerima (Lac⁻), kuid laktoosi kasutamisevõime saab esile tulla siis (Lac⁺), kui laktoos on ainsaks süsinikuallikaks sealses keskkonnas ning kui *lacZ* geeni lugemisraam on taastunud. Sellest tulenevalt on FC40 tüve palju kasutatud statsionaarse faasi mutatsioonide uurimiseks, seda eelkõige tekkemehhanismide seisukohast. Laktoosi minimaaltassile FC40 rakkude plaatimisel ilmuvad kahe päevaga Lac⁺ kolooniad, kiirusega 1 koloonia 10⁷ raku kohta päevas (P. L. Foster, 1999).

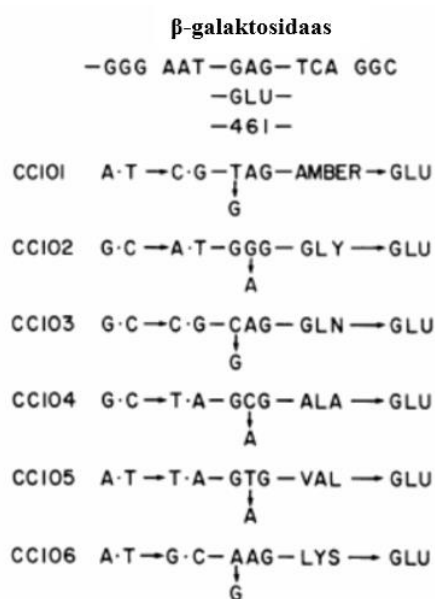
Kahel esimesel päeval üles kasvanud kolooniates on mutatsioonid tekkinud juhuslikult, kasvavas kultuuris, enne bakterirakkude selektiivsöötmele plaatimist. Valdaval osal (90-95%) Lac⁺ revertantidel on mutatsioonid tekkinud aga süsinikunälja tingimustes, siis kui nad on plaaditud ainsa süsinikallikaga – laktoosiga minimaalsöötmetassidele (P. L. Foster & Trimarchi, 1994). Tegemist oli selektiivsöötmele plaatimise järgsete, mittekasvavate ehk nälgivate rakkudega (P. L. Foster, 2007). Lac⁺ mutante ei teki, kui rakke on inkubeeritud ilma süsinikuallikata söötmel, ent laktoosi lisades ilmuvad mutandid peatselt. Seetõttu oli algselt põhjust arvata, et mutatsioonide tekkeks on kindlasti mingisugust süsinikallikat (laktoosi) vaja. Lihtsalt baktereid näljutades ei suunata neid mutatsioone tekitama nii, et neist saaksid tekkida Lac⁺ revertandid (Cairns & Foster, 1991).

1.3.4. Teised laktoosi kasutuselevõtul põhinevad testsüsteemid

Lisaks *E. coli* tüve FC40 tüvel arendatud testsüsteemile, mis põhineb *lacI-lacZ* liitjärjestuses just *lacI* järjestuses oleval mutatsioonil, on konstrueeritud ka selliseid *E. coli* tüvesid, kuhu on sisse viidud vastav nukleotiidi asendus või raaminihe just *lacZ* geeni, tekitades niiviisi Lac⁻ mutante algsest P90C [*ara* Δ(*lac proB*)_{xiii}] tüvest (Cupples & Miller, 1989).

Asendusmutatsioonide detekteerimiseks on konstrueeritud kuus *E. coli* tüve CC101-CC106, millest igal tüvel esineb erinev punktmutatsioon *lacZ* geeni 461. positsioonis asuvas koodonis (GAG) (**joonis 2**). See koodon on oluline just glutamiinhappe kodeerimiseks. CC101-CC106

tüvede puhul on tegemist Lac⁻ tüvedega, nad ei suuda laktoosi süsinikuallikana kasutada. Juhul, kui tekib reverteeruv mutatsioon lacZ geeni vastavasse muudetud järjestusse ehk Lac⁺ fenotüüp, siis saab taastuda β-galaktosidaasi ensüümi töö, kuna glutamiinhappe koodon on korrektne. Glutamiinhape 461 asub β-galaktosidaasi aktiivtsentris, mistõttu on selle koodoni õigsus tähtis katalüütilise aktiivsuse saavutamiseks. Vale koodoni ja sellest tulenevalt teise aminohappe olemasolu korral on ensüüm inaktiivne. Samuti on eelnimetatud kuus tüve sellised P90C [*ara* Δ(*lacproB*)_{XIII}] tüve derivaadid, mille enda kromosoomis *lac* operon puudub, kuid esineb F' plasmiidis (F'*laIZproB*⁺ episoomis) (Cupples & Miller, 1989).



Joonis 2. *E. coli lacZ* geeni 461. positsiooni sisse viidud koodoni muutused. Kuuel tüvel CC101-CC106 on *lacZ* geeni 461. koodon erinevalt modifitseeritud. Joonisel on näha igale tüvele omane asendusmutatsioon (ka mutatsioonile omane aminohappeline muutus), mis on algse GAG koodoni taastamiseks vajalik. Laktoosil kasvamist võimaldavad just need mutatsioonid, mis taastavad mutantidel glutamiinhappe koodoni β-galaktosidaasi geeni 461. positsioonis. Joonis on esitatud muudetud kujul artiklist Cupples & Miller, 1989.

E. coli tüved CC107-CC111 on samuti tüve P90C derivaadid ning kannavad sarnaselt CC101-CC106 tüvedele F'*laIZproB*⁺ episoomi, kuid need konkreetsed tüved on konstrueeritud raaminihkemutatsioonide tuvastamiseks ning nad sisaldavad kas ühesuguste nukleotiidide (A või G) või GC kahenukleotiidseid kordusjärjestusi, mis omakorda soodustavad raaminihkemutatsioonide teket, seda kas aluspaari lisamise või aluspaaride kadumise kaudu. (Cupples *et al.*, 1990). Tüvede CC107-CC111 mutatsioonid on näidatud ka **joonistel 3 ja 4.**

```

TGG TCG CTG GGG AAT (1) GAA TCA GGC CAC GCC GCT
461
AAT CAC GAC GCG CTG TAT CGC TGG ATC AAA TCT

CTC GAT CCT TCC CGC CCG GTG CAG TAT GAA GGC
(2)
GGC GGA GCC GAC ACC ACG GCC ACC GAT ATT ATT
TGC CCG ATG TAC GCG (3) CGC GTG GAT GAA GAC CAG
503
CCC TTC CCG GCT GTG CCG AAA TGG TCC ATC AAA
(4)
AAA TGG CTT

```

Joonis 3. *E. coli lacZ* geeni järjestuses paiknevate mutatsioonide asukohad. Numbriga 1 on tähistatud β -galaktosidaasi aktiivtsentri glutamiinhape-461 koodon, mida on muudetud CC101-CC106 tüvede konstrueerimisel, kasutatuna asendusmutatsioonide detekteerimisel. Numbriga 2, 3 ja 4 tähistatud positsioonid näitavad neid kohti, mida muudeti, et saada CC107-CC111 tüved, mida kasutati raaminihkemutatsioonide testimiseks. Joonis esitatud Cupples *et al.*, 1990. aasta artiklist

TÜVI	JÄRJESTUS (SAIT)	TAASTAMINE
CC107	⁽²⁾ GGC GGC <u>GGA</u> GCC GGC GGG <u>GGG</u> CC GGC GGG <u>GGG</u> GCC	METSIKTÜVI MUTATSIOONIGA TAASTATUD +1G
CC108	GGC GGC <u>GGA</u> GCC GGG GGG <u>CGG</u> AGC C GGG GGC <u>GGA</u> GCC	METSIKTÜVI MUTATSIOONIGA TAASTATUD -1G
CC109	⁽³⁾ TAC GCG <u>CGC</u> GTG TAC GCG <u>CGC</u> GCG TG TAC GCG <u>CGC</u> GTG	METSIKTÜVI MUTATSIOONIGA TAASTATUD -2 CG
CC110	⁽⁴⁾ ATC AAA <u>AAA</u> TGG ATA AAA <u>AAT</u> GG ATA AAA <u>AAA</u> TGG	METSIKTÜVI MUTATSIOONIGA TAASTATUD +1A
CC111	ATC AAA <u>AAA</u> TGG ATC AAA <u>AAA</u> ATG G ATC AAA <u>AAA</u> TGG	METSIKTÜVI MUTATSIOONIGA TAASTATUD -1A

Joonis 4. Raaminihkemutatsioone detekteerivate *E. coli* tüvede CC107-CC111 *lacZ* geeni muudetud järjestused. Tüvedes CC107 ja CC108 on *lacZ* geeni järjestust muudetud number 2 tähistatud positsioonis (ka joonisel nr 2.), tüves CC109 on mutatsiooni positsioon tähistatud number 3-ga ja CC110-CC111 mutatsiooni positsioon tähistatud number 4-ga. Lac⁺ revertandid tekivad tüvedes CC107-CC108 vastavalt ühe guaniini (G) nukleotiidi insertiooni või deletsiooniga, tüves CC109 kahenukleotiidilise (CG) deletsiooni korral ning tüvedes CC110-CC111 ühe adeniini (A) nukleotiidi insertiooni või deletsiooniga. Joonis esitatud muudetult Cupples *et al.*, 1990. aasta artiklist.

Eelpoolmainitud Lac⁺ revertantide tekkimisel põhinevat testsüsteemi saab edukalt kasutada küll vastavate *E. coli* tüvede puhul, ent mitte sellistes bakterites, mis ei suuda laktoosi metaboliseerida. Meie labori uurimisobjekt mullabakter *P. putida* ei suuda laktoosi süsinikuallikana kasutada, sest *P. putida*'s funktsioneeriv laktoosi metabolismirada puudub ehk *P. putida* laktoosi ja ka maltoosi erinevalt *E. coli*'st lagundada ei suuda (Löwe *et al.*, 2020).. Selleks, et laktoosil põhinevat testsüsteemi *P. putida*'s statsionaarses faasis mutatsioonitekete uurimiseks kasutada, on Tanel Ilmjärv modifitseerinud *P. putida* KT2440 tüve nii, et ta suudaks transportida laktoosi bakterirakkudesse (lisatud genoomi *E. coli* tüvest MG1655 pärinev *lacY*

geen) ning lagundada galaktoosi glükoosiks (lisatud genoomi sama *E. coli* tüve genoomist pärinev *galETKM* operon). Saadud laktoosi lagundamisvõimelised tüved nimetan edaspidi Lac-test tüvedeks. Lac⁺ revertantide tekkesageduse uurimiseks on kasutatud eelnevalt muudetud, kas asendus- või raaminihkemutatsiooniga *lacZ* geeni, mis viiakse testerplasmidi koosseisus *P. putida* Lac-test Lac⁻ tüvesse. Sarnaselt Cupples *et al.*, 1990 ja Cupples & Miller, 1989 artiklites *E. coli* testsüsteemidele (**joonised 1-3**) uuritakse *P. putida* mutatsioonide tekkesagedust asendus- ja raaminihkemutatsioonide reverteerumist, millega taastub ka *lacZ* geeni funktsionaalsus.

1.4. tRNA modifikatsioonid

tRNA-s leidub mitmeid modifikatsioone, mis on konserveerunud positsiooniga kõigis elu domäänides, aga ka varieeruvate positsioonidega modifikatsioone (Tuorto & Lyko, 2016). Kui mõelda bakteritele, siis nendes on 10% tRNA nukleotiididest modifitseeritud ning *E. coli* genoomis on nende modifikatsioonide läbiviivate ensüümide kodeerivate geenide osakaal ligi 1,3%, mis viitab tRNA modifikatsioonide olulisusele (Björk & Hagervall, 2014).

Nukleotiidsed modifikatsioonid on põhiliselt koondunud kahte piirkonda, mida näeb tRNA kolmemõõtmelise struktuuri pealt: antikoodon ligu ning T- ja D-ligu ühinemiskohta (Lorenz *et al.*, 2017). Üheks levinuimaks modifikatsiooniks on pseudouridiinide (Ψ-de) esinemine tRNA-s. Osade pseudouridiinide positsioonid on konserveerunud. Näiteks tRNA D-õlas Ψ13, ligu Ψ38, antikoodonõlas Ψ39 ja T-õlas Ψ55 (Charette & Gray, 2000; Motorin & Helm, 2010), mis viitab sellele, et tegemist on modifikatsioonidega positsioonides, mis omavad läbivat tähtsust erinevates elu domäänides.

Samas suurema osa modifikatsioonide puudumisel ei vähene tRNA-de võime aminohappeid kanda (Hall *et al.*, 1989). Sellistel nukleotiididel on teistsugune konformatsioon ja sellest tulenevalt on erinev ka tRNA-de aminoatsüleerimise kineetika, kui neil on modifitseerimata nukleotiidid (Sampson & Uhlenbeck, 1988). Ka Hall *et al.*, 1989 artiklis näidatakse, et kui modifitseerimata nukleotiidid asuvad tRNA positsioonides 34 ja 37, siis suureneb valede aminohapete valimise tõenäosus aminoatsüleerimisel. Lisaks on näidatud ka teatud tRNA modifikatsioonide, nagu näiteks antikoodoni kõrval positsioonis 37 asuv 1-metüülguanosiini puudumise korral raaminihke teket, mis viitab lugemisraami hoidmise sõltuvusele tRNA modifikatsioonist (Björk *et al.*, 1989).

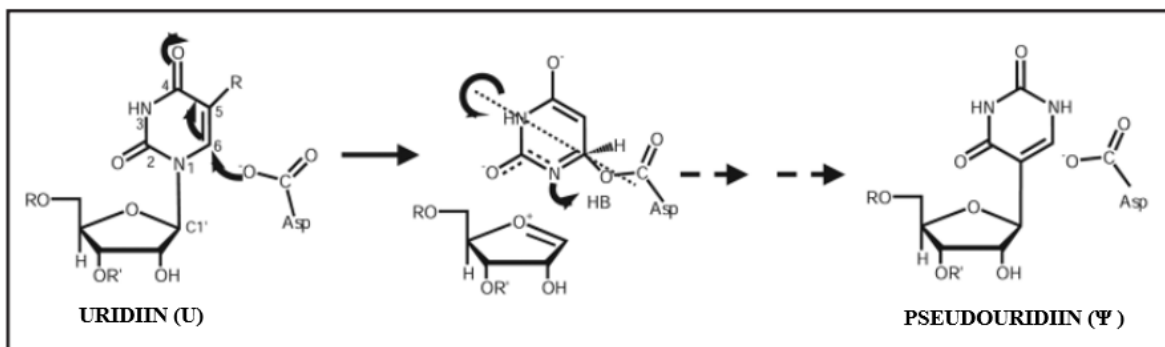
1.5. tRNA modifikatsioon – pseudouridiin (Ψ)

Pseudouridiinide olemasolu kirjeldasid esmakordselt 1951. aastal Cohn'i ja Volkin (Cohn & Volkin, 1951). Ψ -i leidub igas elu domäänis. Tegemist on uridiini 5-ribosüül isomeeriga (Charette & Gray, 2000). Ψ leidub mitmetes erinevates tRNA-des, isegi on näidatud ühe tRNA mitmes positsioonis (Björk & Hagervall, 2014). Lisaks tRNA-le on pseudouridiine leitud ka teistes translatsioonil vajaminevates RNA-des: rRNA-s ja mRNA-s, aga ka snRNA-s ja snoRNA-s (Charette & Gray, 2000). Pseudouridiini leidub RNA-des kõige rohkem ning seetõttu peetakse Ψ -i tihtipeale ka „viiendaks nukleotiidiks“ (F. Davis & Allen, 1957).

Pseudouridiini süntaas (Ψ süntaas) muudab kindla positsiooni uridiini pseudouridiiniks (uridiini C1'-C5 glükosiid-isomeeriks) (Hur *et al.*, 2006). Selle reaktsiooni käigus katkestatakse C1'-N1 glükosiidne side, uratsiilalus keeratakse pool ringi ehk 180 kraadi ümber C6-N3 telje, pärast mida sünteesitakse uus C1'-C5 glükosüülside (**joonis 5**) (Arluison *et al.*, 1998; Dong *et al.*, 2006). Antud isomerisatsioonireaktsiooni toimumiseks on vajalik aspartaati sisaldav katalüütiline tsester, mis on omane kõikidele pseudouridiinide süntaasidele (Del Campo *et al.*, 2001) ning mis on nukleofiiliks selles reaktsioonis (Spenkuch *et al.*, 2014). Tegemist on konserveerunud katalüüsi reaktsioonimehhanismiga, kuid sellegi poolest on süntaaside märklaua ehk substraadi ära tundmine struktuuriti ja järjestuseti varieeruv (Hamma & Ferré-D'Amaré, 2006; Hur *et al.*, 2006).

Pseudouridiinid aitavad läbi üksteise peal olevate aluspaaride vahelise „kleepumise“ ehk aluspaaride stakkumise (ingl k *stacking*) suurenemisele kaasa ka RNA-de jäikusele ja stabiilsusele (D. R. Davis, 1995; D. R. Davis *et al.*, 1998). Sellest tulenevalt on neil suur roll bakterite temperatuuritaluvusele. Viimatimainitud temperatuuritaluvust on näidatud tRNA-de võrdluses, kus ühel tRNA-l ($tRNA^{Lys}$) vastav modifikatsioon positsioonis 39 puudus ning teisel oli seal positsioonis Ψ olemas. Ψ modifikatsiooniga tRNA molekulil oli 5°C võrra kõrgem sulamistemperatuur, mis viitab stabiilsemale tRNA struktuurile (Durant & Davis, 1999). tRNA modifikatsiooni Ψ -i mõju kuumataluvusele on kirjeldatud ka *E. coli*'s, kust oli deleteeritud *truB* geen ehk pseudouridiini süntaasi TruB kodeeriv järjestus. TruB vastutab positsioonil 55 Ψ -i sünteesimise eest ning selle modifikatsiooni puudumisel märgati rakkude elumuse vähenemist järsul temperatuuri tõstmisel optimaalselt temperatuurilt 50°C-le (Kinghorn *et al.*, 2002). Pseudouridiinid on bakteritele tähtsaks tRNA modifikatsiooniks ka stressitingimustes. Pseudouridiini süntaasi TruA kodeeriva geeni *truA* transkriptsiooni suurenemist on näidatud *Salmonella enterica*'l siis, kui bakter kogeb oksüdatiivset stressi ning *truA* geeni puudumisel on stressitaluvus võrreldes metsiktüve rakkudega tunduvalt langenud (Yang *et al.*, 2019).

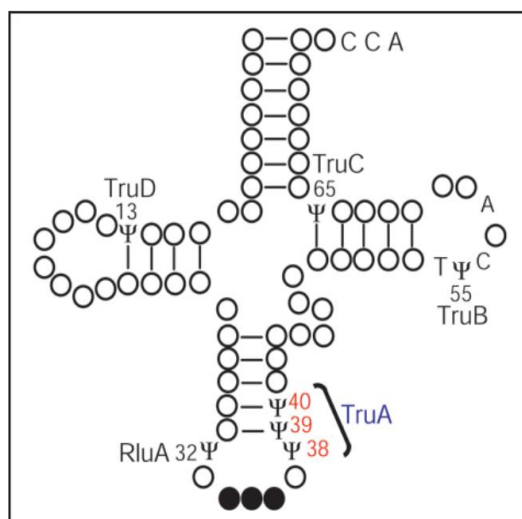
Samuti on pseudouridiinide sünteesi puudumine mõjutanud teatud mikroorganismide kasvukiirust. Näiteks, kui *Saccharomyces cerevisiae*'l puudusid Ψ -d tRNA positsioonides 38 ja 39, siis kasvas pärm kasvas tunduvalt aeglasemalt (Lecointe *et al.*, 1998). Eelnevalt välja toodu põhjal võib oletada, et pseudouridiinide modifikatsioonid tRNA-s on bakterite jaoks vajalikud, seda eelkõige stressiga toime tulemiseks, aga ka translatsiooni korrektsuse tagamiseks.



Joonis 5. Uridiini isomerisatsioonireaktsioon pseudouridiiniks. Reaktsiooni käigus katkestatakse C1'-N1 glükosiidne side, uratsiilalus keeratakse pool ringi ehk 180 kraadi ümber C6-N3 telje ning sünteesitakse uus C1'-C5 glükosüülside. Uridiini isomeeri ehk pseudouridiini eeliseks uridiini ees on lisa vesiniksideme doonori olemasolu (N1 positsioonis). (Arluison *et al.*, 1998; Hamma & Ferré-D'Amaré, 2006) Näha on ka aktiivtsentris asuva aspartaadi osalus protsessis. Joonis on võetud ja muudetud Dong *et al.* 2006 artiklist.

1.5.1. Pseudouridiini süntaas TruA

TruA on pseudouridiini süntaas, mis kuulub pseudouridiinide süntaaside II klassi, olles ainus omasugune Ψ süntaas bakteril *E. coli*. TruA on homodimeerne ning tunneb ära terve tRNA, samas kui ülejäänud perekondade Ψ süntaasid on monomeersed ning suudavad tuvastada ainult tRNA antikoodoni „juuksenõela“ struktuuri (P. G. Foster *et al.*, 2000). TruA pole spetsiifiline ühe kindla uridiini suhtes, vaid kindla tRNA piirkonna suhtes. TruA võib muuta mitut tRNA ühes saidis lähestikku paiknevat uridiini (P. G. Foster *et al.*, 2000) ja seda eelkõige ka seetõttu, et TruA aktiivtsenter on tavapärasest suurem (Kammen *et al.*, 1988). Täpsemalt – TruA modifitseerib tRNA antikoodoni lähedases regioonis (n-ö juuksenõelas) positsioonil 38 kuni 40 olevad uridiinid pseudouridiinideks (**joonis 6**) (Dong *et al.*, 2006; Hamma & Ferré-D'Amaré, 2006).



Joonis 6. Skemaatiline joonis bakteri tRNA sekundaarstruktuurist, millel on näidatud osade pseudouridiinide süntaaside TruA, TruB, TruC (kuulub RluA perekonda), RluA ja TruD modifikatsiooni positsioonid. TruA modifikatsiooni positsioonid 38-40 on märgitud punaselt. Joonis on võetud Dong *et al.*, 2006 artiklist.

TruA olulisust on näidatud varem nii mudelorganismil *E. coli*, *S. enterica*'l, aga ka *P. putida* puhul. Bakteritel *E. coli* ja *S. enterica* *Typhimurium* on TruA puudumisel täheldatud aeglasemat kasvukiirust (Lewis & Ames, 1972; Tsui *et al.*, 1991). Lisaks on *S. enterica*'l leitud, et TruA on oluline oksüdatiivse stressiga toimetulekuks ja virulentsuseks. Nimelt oksüdatiivse stressi korral jõuavad *S. enterica* metsiktüübi rakud aktiivsesse paljunemisfaasi e *log*-faasi 2. tunnil ning statsionaarsesse faasi 6 tunniga, aga sama tüve *truA*-defektsed mutandid jõuavad *log*-faasi alles 10. tunnil (Yang *et al.*, 2019).

Tulles tagasi mullabakteri *P. putida* juurde, siis selles bakteris on näidatud *truA* geeni puudumisel algse tüvega võrrelduna kasvavates rakkudes spontaansete mutatsioonide tekkesageduse neljakordset suurenemist (Tagel *et al.*, 2016). Lisaks on Tagel *et al.*, 2021. aasta artiklis näidatud ka *truA* puudumise mõju stressivastusele, kasutades erinevaid kemikaale stressi indutseerimiseks (tetratsükliin, ampitsilliin, 4-nitrokinoliin-1-oksiid), ning leiti, et pseudouridiinide olemasolu on oluline bakteri stressitaluvusele. Küll aga kui Tagel *et al.* 2016. uurisid *truA* puudumise mõju statsionaarses faasis, kasutades selleks fenooli kasutuselevõtul baseeruvat testsüsteemi, oli mutantide tekkesagedus väga madal ning kahtlustati *truA*-deletandi fenoolitundlikkust (Tagel *et al.*, 2016). Seetõttu tekkis uurimisgrupis vajadus kasutada mingit teist alternatiivset testsüsteemi, et hinnata TruA mõju *P. putida* statsionaarse faasi mutatsiooniprotsessidele.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Selle bakalaureusetöö eesmärgiks on välja selgitada, pseudouridiini süntaasi TruA osalus mutatsiooniprotsessides, eelkõige TruA mõju statsionaarse kasvufaasi mutantide tekkesagedusele. Selleks tuli esmalt konstrueerida *Pseudomonas putida* KT2440 Lac-test tüvest *truA*-puudulik derivaat ning mutantide tekkesagedust hinnata kahe testsüsteemiga: rifampitsiini resistentsusel põhineva kromosomaalse Rif^R testsüsteemi ning laktoosi revertantide tekkel baseeruva Lac⁺ testsüsteemiga.

Antud töös kasutati Lac⁺ testerplasmide, milles on *lacZ* geen rikutud kas raaminihke mutatsiooniga (*lacZ**107-1 ja *lacZ**109+2) või asendusmutatsiooniga (*lacZ**104GC) ning millede abil saab jälgida laktoosi revertantide teket *P. putida* KT2440 Lac-test tüvedes.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Kasutatud bakteritüved, plasmiidid ja söötmed

Täissöötmena kasutasin LB söödet (Miller, 1992) ja minimaalsöödet M9 baasil (Adams, 1959). Minimaalsöötmesse lisasin lisaks 10 x M9-le (lõppkontsentratsioon söötmes 1 x M9) ka mikroelementide lahust 2,5 ml/l, aminohapete hüdrolysaati CAA (*casamino acids*) lõppkontsentratsiooniga 0,2% koos täiendava L-trüptofaaniga (20 µg/ml). Süsinikuallikana kasutasin glükoosi (Glc) lõppkontsentratsiooniga 0,2% või laktoosi (Lac) lõppkontsentratsiooniga 0,2%. Tardsöötme saamiseks lisati agarit 15 g/l. Plasmiidide ja bakteritüvede seleksiooniks kasutasin järgmisi antibiootikume: ampitsilliin (Amp; 100 µg/ml), kanamütsiini (Km; 50 µg/ml), gentamütsiin (Gm 10 µg/ml), rifampitsiini (Rif; 100 µg/ml) ja penitsilliini (Pen; 2000 µg/ml). *P. putida* rakke kasvasin temperatuuril 30°C ja *E. coli* tüvesid temperatuuril 37°C. Vedelsöötmes kasvatamiseks aereerisin kultuure loksutil, 180 pöördega minutis.

Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid on toodud järgnevas tabelis 1.

Tabel 1. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid.

BAKTERITÜVI	ISELOOMUSTUS	ALLIKAS
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (f80 lacZΔM15) recA1 endA1 hsdR17 thi- 1 gyrA96 relA1</i>	(Miller, 1992)
<i>Pseudomonas putida</i>		

KT2440	Metsiktüvi, täielikult sekveneeritud, kasutatud taustrakkudena mutantide selekteerimisel	P. Nikeli labor, Taani
KT2440 Lac-test	KT2440 derivaat, mis on konstrueeritud laktoosi kasutamise rajal põhineva testsüsteemi kasutamiseks. On sisse viidud <i>lacY</i> geen ja <i>galETKM</i> operon, mida kontrollib Pgc promootor.	Tanel Ilmjärv, avaldamata
KT2440 Lac-test $\Delta truA$	KT2440 Lac-test derivaat, kust on deleteeritud geen <i>truA</i>	Käesolev töö
KT2440 Lac-test + pKT_taclacZ*104CG	KT2440 Lac-test derivaat, kuhu on sisse viidud pKT_taclacZ*104CG plasmiid	Käesolev töö
KT2440 Lac-test + pKT_taclacZ*107-1	KT2440 Lac-test derivaat, kuhu on sisse viidud pKT_taclacZ*107-1 plasmiid	Käesolev töö
KT2440 Lac-test + pKT_taclacZ*109+2	KT2440 Lac-test derivaat, kuhu on sisse viidud pKT_taclacZ*109+2 plasmiid	Käesolev töö
KT2440 Lac-test $\Delta truA$ + pKT_taclacZ*104CG	KT2440 Lac-test $\Delta truA$ derivaat, kuhu on sisse viidud pKT_taclacZ*104CG plasmiid	Käesolev töö
KT2440 Lac-test $\Delta truA$ + pKT_taclacZ*107-1	KT2440 Lac-test $\Delta truA$ derivaat, kuhu on sisse viidud pKT_taclacZ*107-1 plasmiid	Käesolev töö
KT2440 Lac-test $\Delta truA$ + pKT_taclacZ*109+2	KT2440 Lac-test $\Delta truA$ derivaat, kuhu on sisse viidud pKT_taclacZ*109+2 plasmiid	Käesolev töö
PLASMIID		
pEMG	I-SceI restriksioonisaite ja multikloonimisjärjestust sisaldav suitsiidplasmiid, Km ^R , lacZ α	(Martínez-García <i>et al.</i> , 2011)
pEMG / $\Delta truA$	pEMG plasmiid, kuhu on kloonitud EcoRI ja BamHI fragmendina geeni <i>truA</i> eelse ja järgse ala liitfragment, Km ^R	(Tagel <i>et al.</i> , 2016)
pSW (I-secI)	I-SceI nukleaasi ekspresseeriv plasmiid, Amp ^R	(Wong & Mekalanos, 2000)
pKT_taclacZ	Tac promootoriga testvektor, <i>bla</i> geeniga	Hõrak & Kivisaar avaldamata
pKT_taclacZ*104GC	pKTlacZ plasmiid, milles on muudetud <i>lacZ</i> geeni ees Tac-promootor ning mis on konstrueeritud vastavalt Milleri tüvele CC104 (Cupples & Miller, 1989), <i>bla</i> geeniga	Rita Hõrak, avaldamata
pKT_taclacZ*107-1	pKTlacZ plasmiid, milles on muudetud <i>lacZ</i> geeni ees Tac-promootor ning mis on konstrueeritud vastavalt Milleri tüvele CC107 (Cupples & Miller, 1989), <i>bla</i> geeniga	Rita Hõrak, avaldamata

pKT_taclacZ*109+2	pKTlacZ plasmiid, milles on muudetud <i>lacZ</i> geeni ees Tac-promootor ning mis on konstrueeritud vastavalt Milleri tüvele CC109 (Cupples & Miller, 1989), <i>bla</i> geeniga	Rita Hõrak, avaldamata
pKT240	Kloonimisvektor, <i>bla</i> geeniga, Amp ^R , Km ^R	(M. Bagdasarian <i>et al.</i> , 1983)

2.2.2. Elektroporatsiooni jaoks kompetentsete bakterirakkude valmistamine ja elektroporatsioon

Elektroporatsiooni jaoks kompetentsete *P. putida* bakterirakkude saamiseks kasvasin *P. putida* tüvesid üleöö 30 °C juures loksutil 2 ml LB vedelsöötmes. Kõigi *P. putida* tüvede puhul võtsin 500 µl bakterikultuuri ja tsentrifuugisin rakud söötimest põhja 45 sekundi vältel „Eppendorf“ firma lauatsentrifuugiga „Mini Spin“ ja eemaldas supernatandi. Seejärel pesin *P. putida* rakke 2 korda 1 ml-s 300 mM sahharoosilahusega. Valmis kompetentsed rakud suspendeerisin 200 µl-s 300mM sahharoosi lahuses.

E. coli elektroporatsiooni jaoks kompetentsete rakkude saamiseks kasvasin rakke üleöö 5 ml-s LB vedelsöötmes. Lahjendasin seejärel üleöökultuuri värskesse LB vedelsöötmesse optilise tiheduseni 0,1 (OD₅₈₀) ning kasvasin rakke loksutil veel umbes kaks tundi optilise tiheduseni A₅₈₀=0,6-0,8. Siis tsentrifuugisin kogu rakukultuuri kokku „Eppendorf“ firma lauatsentrifuugiga „Mini Spin“ ning pesin kolm korda 1 ml 10% glütseroolilahuses. Lõpuks suspendeerisin rakud üles 100 µl-s 10% glütseroolilahuses. Rakke hoidsin terve protseduuri vältel jääl.

Elektroporatsiooniks lisisin *E. coli* või *P. putida* rakkudele ~100 ng plasmiidset DNA-d ja pipeteerisin rakud elektroporatsiooniküveti. Elektroporatsiooni teostasid „BioRad“ elektroporaatoriga „*E. coli* Pulser“ pingel 2500 V. Pärast elektroporatsiooni lisisin rakkudele 1 ml LB-söödet ning kasvasin rakke ligikaudu tund aega, *P. putida* rakke temperatuuril 30°C ja *E. coli* rakke 37°C juures. Seejärel tsentrifuugisin rakud söötimest põhja, eemaldas suurema osa supernatandist ja suspendeerisin rakud alles jäänud ligi 100 µl LB-söötmes ning plaatisin selektiivtassidele.

2.2.3. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

Polümeraasi ahelreaktsiooni ehk soovitud DNA piirkonna mitmekordistamise reaktsiooni kasutasin valmis tehtud konstruktid ja konstrueeritud bakteritüvede õigsuse kontrolliks. Kasutatud reaktsiooni maht oli 20 µl. Reaktsioon toimus 1 x DreamTaq *Green buffer* PCR-i puhvris, mis sisaldas juba ka MgCl₂. Reaktsioonisegule lisisin veel 0,2 mM dNTP-d, 0,5 U

Juhan Sedmani laboris puhastatud Taq DNA polümeraasi, 10 pmol praimereid (**tabel 2**), isoleeritud DNA-d või bakterirakke ning autoklaavitud milli Q vett, lõppmahuni 20 µl. PCR-i teostasin firma „Eppendorf“ vapo.protect PCR-i masinaga, kasutades järgmisi tingimusi: eelkuumutus 96°C juures 3 minutit, denaturatsioon temperatuuril 96°C 30 sekundit, praimeri seondumine 54°-56°C 30 sekundit kuni 1 minut, sõltuvalt praimeri nukleotiidisaldusest ja pikkusest, ning DNA süntees toimus temperatuuril 72 °C 30 sekundit kuni 2 minutit, sõltuvalt amplifitseeritava ala pikkusest. Reaktsioon toimus kokku 30 tsükli.

Tabel 2. Töös kasutatud praimerid

NIMI	JÄRJESTUS	SEONDUMISKOHT
prtac	5'-AATTAATCATCGGCTCGTATAA-3'	Komplementaarne tac-promootoriga, suunaga tac-promootori kontrolli all olevale geenile
lacZseq	5'-GGGGGATGTGCTGCAA-3'	Komplementaarne <i>lacZ</i> geeni kodeeriva alaga positsioonides 83-98 nukleotiidi geeni algusest
pKTpvu	5'-AACAGCGATCGCGTATTTTCG-3'	Komplementaarne <i>Km</i> geeniga positsioonides 424-443
pKTBamup	5'-CCCTCATTCGTGCGCTCT-3'	Komplementaarne pEST1332 kodeeriva ahelaga 455 nt enne <i>Amp</i> geeni
lacZVan	5'-TTATGACCGTCCGCAAAGCA-3'	Komplementaarne <i>lacZ</i> geeni kodeeriva alaga positsioonides 1655-1674 nukleotiidi geeni algusest
KT2440 Lac-test <i>ΔtruA</i> konstrukti ja vaheetappide kontrollimiseks		
truAeesEcoRI	5'-ACGAATTCTGTCGTTGGAAGACGATTCG-3'	Komplementaarne PP_1993 (<i>LysM</i>) kodeeriva ahelaga 480 nt enne <i>truA</i> geeni
trpFBHI	5'-AGGATCCACGCCCGGTACATAGGTGTC-3'	Komplementaarne <i>trpF</i> geeni kodeeriva alaga 442 nt enne <i>truA</i> geeni
pSW-F (Forward)	5'-GGACGCTTCGCTGAAAATA-3'	Komplementaarne plasmiidis pSW(I-SceI) oleva järjestusega suunaga multikloneerimisjärjestus e poole
pSW-R (Reverse)	5'-AACGTCGTGACTGGGAAAAC-3'	Komplementaarne plasmiidis pSW(I-SceI) oleva järjestusega,

		suunaga multikloneerimisjärjestuse poole
truAalgHIII	5'-TATAAGCTTATGCTCTTGGACATCATCGA-3'	Komplementaarne <i>truA</i> geeniga positsioonides 1-20 nukleotiidi geeni algusest
truAloppSal	5'-TATGTCGACTCAGTCTGCCAACGCCTC-3'	Komplementaarne <i>truA</i> geeniga positsioonides 843-861 nukleotiidi geeni lõpus

2.2.4. Plasmiidse DNA eraldamine „Favorgen“ kitiga ja geelelektroforees

Plasmiidse DNA eraldamiseks kasutasin „Favorgen“ kitti ja järgisin tootja protokollit. PCR produktide kontrollimiseks kasutasin geelelektroforeesi, milleks lisasin DNA proovile foreesivärvi (0,04% broomfenoolsinise lahuse 50%-lises glütseroolis) 20 µl proovi kohta 2 µl. Proovid kandsin horisontaalsele 1%-sele agarosgeelile 1 x TAE puhvril (puhver sisaldab 50 mM Tris-atsetaati, 1 mM EDTA; pH 8,2). Agarosgeel sisaldas etiidumbromiidi 0.4 µg/ml. DNA fragmentide pikkuse määramiseks kasutasime firma ThermoFisher Scientific ZipRuler Express DNA ladder 2 markerit. Elektroforeesi viisin läbi toatemperatuuril, pingel 120-130 V. Geelipildi visualiseerisin ultraviolettvalguses Uvitec Cambridge Uvidoc HD6 masinaga.

2.2.5. *truA* geeni deleteerimine *P. putida* KT2440 Lac-test tüvest

Selleks, et konstrueerida KT2440 Lac-test $\Delta truA$ tüvi, kasutasin eelnevalt Tagel *et al.*, 2016 poolt konstrueeritud pEMG/ $\Delta truA$ plasmidi. Viisin pEMG/ $\Delta truA$ elektroporatsiooniga kompetentsetesse *P. putida* KT2440 Lac-test tüve rakkudesse ning kus moodustunud kointegraadiga rakke selekteerisin Km sisaldaval söötmel. Kointegraadi olemasolu kontrollisin lisaks PCR-ga, selleks kasutasin primereid truAeesEcoRI ja trpFBHI. Järgmisena viisin elektroporatsiooni abil rakkudesse I-SceI nukleaasi kodeeriva plasmidi pSW (I-SceI), kasutades selektsiooniks Pen sisaldavat LB-söödet. I-SceI nukleaasi indutseerimist pSW(I-SceI) plasmiidilt on vaja, et tekiks kaheaahelised lõiked I-SceI restriksioonisaitides kromosoomi integreerunud pEMG/ $\Delta truA$ plasmidis. Selleks kasvasin rakke üleöö 30°C loksutil 5 ml LB-vedelsöötmes. Söötmele lisasin 1,5 mM meta-toluaati, mis on I-SceI promootori induktor. Katkete tekkimise järel toimub homoloogiline rekombinatsioon $\Delta truA$ fragmendi ja kromosoomis olevate *truA* geeni eelse või *truA* geeni järgse ala vahel. Pärast homoloogilise rekombinatsiooni toimumist ei suuda tüved enam Km-l kasvada ja teatud juhtudel nendest tüvedest deleteerub ka *truA* geen. Selleks, et olla kindel homoloogilise rekombinatsiooni toimumises ja plasmidi välja rekombineerumises, tegin üleöö kultuurist 10

⁵ lahjendused ning plaatin LB tassile. Kui kolooniad olid üles kasvanud, siis tegin paralleelkülvid LB ja LB-Km selektsioonitassidele, mille puhul osutusid õigeks need tüved, mis kanamütsiini-sisaldaval söötmel kasvada ei suutnud. Lisaks kontrollisin Km-tundlikes kolooniates *truA* geeni deleteerumist PCR-ga, selleks kasutasin praimereid *truA*esEcoRI ja *trpFBHI*. Seejärel vabastasin deletsioonitüve pSW(I-SceI) plasmiidist, kasvatades baktereid antibiootikumita 5 ml LB vedelsöötmes, tõstes üleöö LB-s kasvanud kultuurist 30 µl uude 5 ml LB vedelsöötmesse ning tehes seda kahel korral, et pSW(I-SceI) plasmiid elimineeruks. Siis tegin viimasel korral üleöö kultuurist 10⁻⁵ lahjenduse ning plaatin LB tassile. pSW(I-SceI) kadumist kontrollisin tekkinud kolooniate paralleelkülviga LB ja LB-Pen tassidele. Pen-tundlike kolooniaid kontrollisin uuesti PCR-ga, et välja selgitada plasmidi eemaldumine. Selleks kasutasin praimereid pSW-F ja pSW-R, mis annavad produkti ainult siis, kui pSW(I-SceI) plasmiid on olemas. Konstrueeritud tüvesid kontrollisin ka sekveneerimisega.

2.2.6. Sekveneerimine

Selleks, et kontrollida, kas *truA* geen KT2440 Lac-test tüve kromosoomis on ikka deleteerunud kasutasin II põlvkonna sekveneerimist. Kõigepealt eemaldas PCR reaktsioonisegust vabad praimerid ja nukleotiidid. Selleks töötlesin produkte *Thermo Scientific* 1 U/µl aluselise fosfataasiga FastAP ja 2,5 U/µl eksonukleasiga ExoI. Reaktsiooni segu maht oli 10 µl. Reaktsioon toimus 30 minutit 37°C juures ning seejärel inaktiveeriti 15 minuti jooksul 80°C juures ensüümid. Sekveneerimiseks valmistasin proovid ette kitiga „*Big Dye Terminator v3,1 Cycle Sequencing Kit*“ (*Applied Biosystem*). Reaktsiooni võtsin 1 µl eelnevalt kirjeldatud töötluste produkti ning praimeritena kasutasin *truA*esEcoRI (*forward*) ja *trpFBHI* (*reverse*) 1,6 pmol ühe reaktsiooni kohta. Vastava reaktsiooniseguga viisin läbi terminatsioonireaktsiooni, milleks kasutasin 30-tsüklilist programmi: 15 sekundit 95°C, 15 sekundit 50°C, 45 sekundit 60°C. Seejärel sadestasin proovid. Selleks lisasin proovidele 2 µl dekstraani ja 30 µl -20°C 96° etanooli, hoidsin proove -20°C juures 20 min. Siis tsentrifugeisin proove „Eppendorf“ firma mikrotsentrifuugiga 20 min maksimumpööretel (12000 x g). Eemaldas vedeliku ning lisasin 100 µl 75° etanooli, tsentrifugeisin 5 minutit ning kordasin viimast etappi. Järgnevalt eemaldas kogu liigse vedeliku proovidelt ning lisasin 10 µl 70% formamiidi. DNA järjestuste määramiseks kasutasime TÜ Genoomika Instituudi tuumiklabori sekveneerimisteenust ja saadud järjestusi analüüsisime esmalt programmiga BioEdit ja seejärel kasutasin programmi *UniProt ClustalO*.

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

Spontaansete mutatsioonide tekkesageduse *P. putida* eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudes arvutasime kasutades Rif^R/*rpoB* testsüsteemi ehk rifampitsiini resistentsete mutantide tekkesageduse järgi (Campbell *et al.*, 2001). Katse läbiviimiseks kasvasin bakteritüvesid hilise logaritmilise kasvufaasini (~6 tundi 30°C juures loksutil) M9-glükoos-CAA söötmes, pärast mida tegin kultuuridest 10⁻⁵ lahjendused värskesse M9-glükoos-CAA söötmesse ning jagasin 2,35 ml kaupa kultuurid katseklaasidesse laiali. Edasi kasvasin baktereid 30°C juures loksutil. Pärast 20 h möödumist plaatisin 500 µl igast kultuurist LB tardsöötmega rifampitsiini (100 µg/ml) sisaldavatele tassidele. Inkubeerisin tase 30°C termostaadis kaks päeva, lugedes tekkinud Rif^R kolooniaid 24 ja 48 tunni möödudes (Jatsenko *et al.*, 2010). Kasutasin seda meetodit nii KT2440 Lac-test ja selle Δ *truA* derivaadi spontaansete mutantide tekkesageduse võrdlemiseks, kui ka samade tüvede derivaate, kuhu olid lisatud ka järgmised plasmiidid: pKT_taclacZ, pKT_taclacZ*104GC, pKT_taclacZ*107-1, pKT_taclacZ*109+2 ja pKT240.

Bakterite üldise elumuse määramiseks tegin 1 x M9 puhvrise lahjendusterea, pärast mida teostasin tilkkülvid 10 µl mahus LB tassidele. Tasse inkubeerisin 30°C termostaadis üleöö ning 24 – 48 tunni jooksul loendasin tekkinud kolooniad. Tekkinud kolooniate arvu põhjal leidsin elusrakkude hulga 1 ml-s üleöökultuuris kolooniaid moodustava ühikuna (CFU – *colony forming unit*). Rif^R mutantide tekkesageduse leidsin, kui jagasin selektiivsöötmel üles kasvanud Rif^R kolooniate arvu kultuuri elusrakkude arvuga (ml kohta), mida näitab ka valem:

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

2.2.8. *P. putida* Lac⁺ revertantide tekkesageduse määramine laktoosi kasutuselevõtul põhineva testsüsteemiga

P. putida laktoosi sisaldaval minimaalsöötmel tekkivate Lac⁺ revertantide tekkesageduse leidsin uudset lac-testsüsteemi rakendades. Selleks oli eelnevalt Tanel Ilmjärv konstrueerinud vastavad KT2440 Lac-test tüved (Lac⁻), et seda testsüsteemi kasutada saaks (genoomi viidud *lacY galETKM*) (Tabel 1). Enne katsete algust valmistasin kõigepealt õiged tüved (+pKT_taclacZ, +pKT_taclacZ*104GC, +pKT_taclacZ*107-1, +pKT_taclacZ*109+2, pKT240) ehk viisin elektroporatsiooni jaoks kompetentsetesse *P. putida* KT2440 Lac-test (*wt*) ja selle Δ *truA* derivaati (mõlemad Lac⁻) elektroporatsiooniga sisse vastavad testerplasmiidid (pKT_taclacZ*104GC, pKT_taclacZ*107-1 ja pKT_taclacZ*109+2). Lisaks eelnevalt mainitud tüvedele kasutasin ka kontrolltüvesid, kuhu positiivse kontrollina oli viidud pKT_taclacZ plasmiid ning negatiivse kontrollina pKT240. Plasmiidide olemasolu vastavates

bakteritüvedes kontrollisime praimeritega lacZseq ja prtac (nende plasmiidide puhul, mis sisaldasid tac promootorit), primereid pKTBamup ja pKTpvu plasmiiidi pKT240 kontrolliks (Tabel 2).

Eksperimendi läbiviimiseks inokuleerisin kõigepealt 1 ml M9-glükoos-CAA söötmesse saadud tüved (kokku 10 – viis *wt* ja viis $\Delta truA$ tüve) koos plasmiiidi selektsiooniks vajaliku penitsilliiniga (1500 $\mu\text{g/ml}$) ja kasvasin 30°C juures loksutil hilise logaritmilise kasvufaasini (~ 6 tundi). Seejärel tegin värskesse M9-glükoos-CAA söötmesse 10^{-5} vahelahjendused ning jagasin kultuurid 2,35 ml kaupa katseklaasidesse ning kasvasime rakke 30°C juures loksutil 18-20 tundi. Lisaks panin üleöö kasvama ka 2,75 ml kaupa n-ö taustarakud, milleks oli KT2440 metsiktüvi. Pärast 20 tunni möödumist plaatisin 500 μl kontrolltüvesid (sisaldasid plasmiiide pKT_taclacZ ja pKT240) ning +pKT_taclacZ*104GC (asendusmutatsiooniga) tüvesid laktoosi minimaalsöötmele (0,2% laktoos), teiste testerplasmiididega tüvesid (+pKT_taclacZ*107-1 ja +pKT_taclacZ*109+2 – raaminihkemutatsioonidega) plaatisin 10 μl ~20 tundi kasvanud testertüve kultuurist 10x lahjendust koos 240 μl taustrakkudega. Taustaks kasutasin tüve KT2440 rakke, mis on vajalikud selleks, et kõikides katsetes oleks rakke selektiivtassidel võrdsel hulgal. Lac⁺ revertantide akumulereerumist 30 °C termostaadis laktoos-minimaalsöötmega tassidele jälgisin 10 päeva jooksul peale plaatimist. Kasvavas kultuuris plaatimise eelselt tekkinud Lac⁺ revertandid ilmusid laktoosi tassidel nähtavale algtüve KT2440 Lac-test puhul teisel päeval, ent $\Delta truA$ puhul kolmandal päeval peale plaatimist. Hilisematel päevadel laktoositassidele ilmunud Lac⁺ revertantidel olid mutatsioonid tekkinud juba süsinikallika nälja tingimustes selektiivsöötmele plaaditud rakkudes.

2.2.9. *P. putida* nälgiva populatsiooni elumuse määramine

P. putida süsinikallika näljas olevate bakterirakkude elumust sain nälgisperioodi jooksul hinnata, määrates CFU (*Colony Forming Units*) ehk kolooniaid moodustavate rakkude arvukuse nendelt laktoosi minimaalsöötmetassidelt, millel jälgisime laktoosil kasvavate kolooniate ehk Lac⁺ revertantide teket. Selleks lõikasin tassidelt 1 ml pipetiotsiku suure avausega (mis on 1/100 kogu tassi pindalast) ilma märgatavate kolooniateta agaritükid, suspendeerisin rakud agarilt lahti 1 ml-s 1 x M9 lahuses. Seejärel tegin lahjendusterea, panin sobivate lahjenduste tilgad LB-Pen söötmetassidele ning inkubeerisin tase üleöö 30°C juures. Järgmisel päeval lugesi tekkinud kolooniad kokku ning arvutasin tehtud lahjenduste abil agaritükil olevate elusrakkude arvu, millest tuletasin omakorda kogu elusrakkude arvu laktoosi minimaaltassidel, kasutades selle alusena tassi ja agaritüki pindala suhet. Lac⁺ revertantide tekkesageduse arvutasin 10^9 CFU/ml kohta.

2.2.10. Rekonstruktsioonikatse

Selleks, et selgitada välja, mitu päeva võtab aega Lac⁺ revertantide kolooniate nähtavale tulemine selektiivsöötmetel erinevate nälgimispäevade lõikes läbi taustrakkude kihi, võtsin esimeste kolooniate esile tulemise päeva (KT2440 Lac-test *wt* tüvel 2. päev, Δ *truA* tüvel 3. päev), 6. päeva ja 10. päeva Lac⁺ kolooniate massi ning külvasin neid M9-glc-CAA vedelsöötmesse ja aereerisin kultuure katseklaasides üleöö 30°C juures loksutil (180rpm). Järgnevalt tegin üleöö kasvanud kultuuridest lahjenduste rea ning plaatisin Lac⁺ kultuure 10⁻⁴ lahjendusest 5 µl koos taustarakkudega (KT2440, 250 µl) laktoosi sisaldavale minimaaltassile. Jälginis järgnevate päevade jooksul kolooniate ilmumist laktoos-minimaalsöötmega tassidele.

2.2.11. Statistiline analüüs

Mutatsioonisageduste analüüsimisel Studenti T-testi andmehulkade statistilise erinevuse leidmiseks. Graafikud koostasid kasutades Microsoft Excelit.

2.3. Tulemused ja arutelu

Bakterid oma looduslikus elukeskkonnas on enamasti statsionaarses faasis, kuna elukeskkond ei võimalda piiramatu kasvu sellistes ebasoodsates tingimustes. Taolistes stressitingimustes toimub bakterite kiire evolutsioneerumine ning ülekaalu saavutavad paremini kohastunud mutandid. Looduslikes keskkondades elavate bakterite evolutsioneerumise mehhanismide paremaks mõistmiseks on oluline teada, millised faktorid mõjutavad mutatsioonide tekkesagedust. Meie labori üheks uurimissuunaks on olnud mullabakter *P. putida* mutatsioonide tekkepõhjuste ja protsesside uurimine. Selleks, et sügavamalt mutatsiooniprotsesse analüüsida ja uudseid mutatsioonide teket mõjutavaid geene leida kasutasid Tagel *et al.*, 2016 uutset moodust mutatsioonide tekkesageduse hindamiseks *P. putida* (aga ka *P. aeruginosa*) üksikkolooniate tasemel ehk papillide teket bakterikoloonia pinnale (Tagel *et al.*, 2016). Kombineerides seda meetodit transposoonmutageneesiga oli võimalik tuvastada mitmeid mutatsioonide tekkesagedusi mõjutavaid uusi geene, nende seas pseudouridiini süntaas *truA* (Tagel *et al.*, 2016). Antud töös leiti ka, et *truA* geeni kaotamine genoomist mõjutab spontaanse mutageneesi toimumist kasvavates rakkudes, kuid nälgivates rakkudes fenooli kasutusele võtmisel põhineva testsüsteemiga ei olnud statsionaarses faasis võimalik mutatsioonisagedust kirjeldada (Tagel *et al.*, 2016). See tingis vajaduse leida alternatiivne võimalus statsionaarses faasis toimuvate mutatsioonide tekkesageduse hindamiseks. Käesolevas töös on uuritud statsionaarse kasvufaasi mutatsioonide tekkesagedust *P. putida* rakkudes laktoosi kasutuselevõtul põhineva testsüsteemiga. Kuna *P. putida* genoomis

puuduvad laktoosi kui süsinikallikana kasutamiseks olulised geenid, siis selleks, et antud testsüsteemi rakendada on laboris konstrueeritud spetsiaalne nn. laktoosi lagundamisvõimekusega *P. putida* tüvi. *truA* puudumise mõju mutatsioonide tekkesageduse uurimiseks laktoosi kasutuselevõtul põhineva testsüsteemi abil elimineerisin esmalt antud tüvest *truA* geeni. Järgnevalt kirjeldan *truA*-deletant tüve konstrueerimist ning eksponentsiaalse ja statsionaarse kasvufaasi mutatsioonisageduste uurimiseks tehtud katsete tulemusi ja analüüsin neid.

2.3.1. Mutatsiooniprotsesside uurimiseks vajaliku *P. putida* KT2440 Lac-test Δ *truA* tüve konstrueerimine

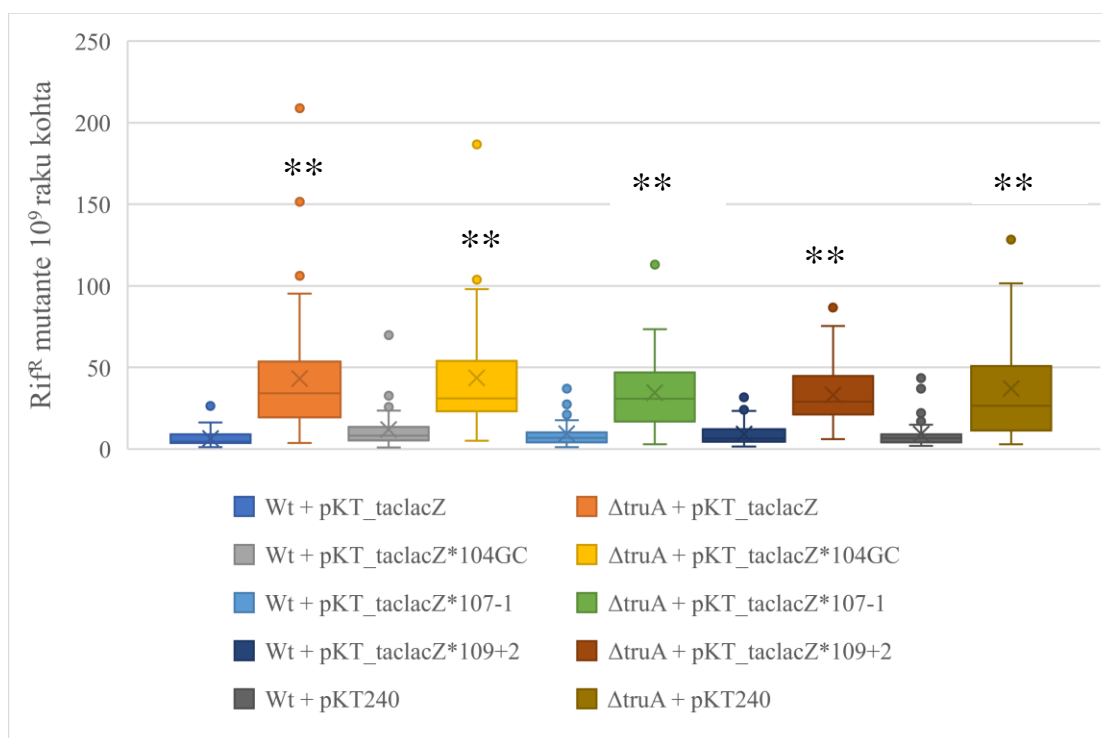
Laktoosi kasutusele võtmisel põhineva testsüsteemi kasutamiseks on Tanel Ilmjärv eelnevalt konstrueerinud *P. putida* KT2440 tüve, millel on kromosoomis galaktoosi lagundamisraja geenid *galETKM* ja laktoosi transportimiseks vajalik *lacY*. Seda tüve nimetame KT2440 Lac-test tüveks ning tegemist on selles töös kasutatud algtüvega (KT2440 Lac-test *wt*). Selleks, et uurida *truA* geeni puudumise mõju mutatsioonisagedusele bakteris, konstrueerisin esmalt KT2440 Lac-test Δ *truA* tüve. Mutatsiooniprotsesside uurimiseks kasutatud tüve konstrueerimist on täpsemalt kirjeldatud antud töö metoodika alapeatükis 2.2.5. Saadud KT2440 Lac-test Δ *truA* tüvi ja algtüvi KT2440 Lac-test (*wt*) olid selle uurimuse käigus kasutusel ning nendega tehtud katsete tulemusi olen lahti seletanud järgmistes alapeatükkides.

2.3.2. Pseudouridiini süntaasi TruA kodeeriva *truA* geeni puudumise mõju *P. putida* eksponentsiaalse kasvufaasi rakkude mutatsioonisagedusele

Selleks, et uurida, kuidas mõjutab *truA* puudumine eksponentsiaalses faasis olevates rakkudes minu konstrueeritud *P. putida* KT2440 Lac-test Δ *truA* tüve spontaansete mutatsioonide tekkesagedust, kasutasin Rif^R/*rpoB* testsüsteemi. Selle testsüsteemi korral loendatakse 24 – 48 tunni jooksul spetsiaalsel rifampitsiini sisaldaval LB tardsöötmele tekkivaid kolooniaid ja arvutatakse Rif^R mutantide tekkesagedus üldise elusrakkude hulga kohta („Materjal ja metoodika“ 2.2.7). Katsetes võrdlesin *P. putida* KT2440 Lac-test algtüve (*wt*) ja selle töö raames konstrueeritud pseudouridiini süntaasi deletsioonitüve Δ *truA* eksponentsiaalse kasvufaasi mutatsioonisagedusi nendes tüvedes, millel on lisaks plasmidsed Lac⁺ reverteerumist mõõtvad testerplasmiidid juba sisse viidud (pKT_taclacZ*104GC, pKT_taclacZ*107-1, pKT_taclacZ*109+2), positiivse kontrolli jaoks mõeldud pKT_taclacZ või negatiivse kontrolli jaoks mõeldud pKT240 plasmiid.

P. putida PaW85 *truA*-deletant tüvedes oli spontaansete mutantide tekkesagedus võrreldes algtüvega ligikaudu neli korda kõrgem, mida näitas Tagel *et al.* oma 2021. aasta artiklis

kajastatud tulemustes. Selleks, et veenduda ka testerplasmiidide sisse viimisel sama tendentsi olemasolus, määrasime spontaansete mutantide tekkesageduse antud bakteritüvedega, kasutades eelpoolkirjeldatud Rif^R/*rpoB* testsüsteemi. Tulemustest selgus, et tõepoolest oli deletsioonitüve $\Delta truA$ Rif^R mutantide tekkesagedus võrreldes algtüvega KT2440 Lac-test oluliselt kõrgem (keskmiselt 4,3 korda) (joonis 7). Kõige suurem erinevus Rif^R mutantide tekkesageduses oli $\Delta truA$ tüves KT2440 Lac-test pKT_taclacZ plasmiidiga, kui mutatsioonisagedus oli ~6,6 korda kõrgem algtüve KT2440 Lac-test mutantide tekkesagedusest. Plasmidi pKT240 kandvatest tüvedest oli $\Delta truA$ tüve mutatsioonisagedus ~4 korda kõrgem algtüve omast. Testerplasmide (pKT_taclacZ*104GC, pKT_taclacZ*107-1, pKT_taclacZ*109+2) kandvatel bakteritüvedel oli Rif^R mutantide tekkesagedus *truA* puudumisel ~3,6 korda kõrgem võrreldes algtüvega KT2440 Lac-test. Erinevaid testerplasmide sisaldavate bakteritüvede endi vahel statistiliselt olulist erinevust ei esinenud. Seega võib kinnitada, et *truA* puudumine mõjutab *P. putida* kasvavate rakkude mutageneesi, *truA*-deletant tüvede mutatsioonisagedus on võrreldes algtüvega (*wt*) ligikaudu neli korda kõrgem ning seega antud töö tulemused korreleeruvad varem saadud tulemustega (Tagel *et al.*, 2021).



Joonis 7. Spontaansete Rif^R (rifampitsiini resistentsete) mutantide tekkesagedus 1×10^9 elusraku kohta *P. putida* KT2440 Lac-test algtüvede (*wt*) ja *P. putida* KT2440 Lac-test $\Delta truA$ deletsioonitüvede koos plasmiididega eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudes. Kõrvuti on pandud algtüve ja $\Delta truA$ tüve tulemused. Joonisel on esitatud viie sõltumatu katse tulemus, iga tüve kohta kuni 50 tassi, kus rist näitab mutatsioonisageduse keskmist, kasti sisse mahub 50% tulemustest ning seal sees olev horisontaalne joon tähistab mediaanväärtust, vurrud näitavad tulemuste väärtuste ülemist ja alumist piiri, võõrväärtused ehk „väljalöögid“ on esitatud punktadena, kasti ülemine äär – ülemine kvartiil (75% tulemustest jääb

selle alla), kasti alumine äär – alumine kvartiil (25% tulemustest jääb selle alla). Tulemusi on analüüsitud kasutades Student T-testi. Kahe tüve tulemuste erinevus on statistiliselt oluline, ** tähistab p-väärtust <<0.001.

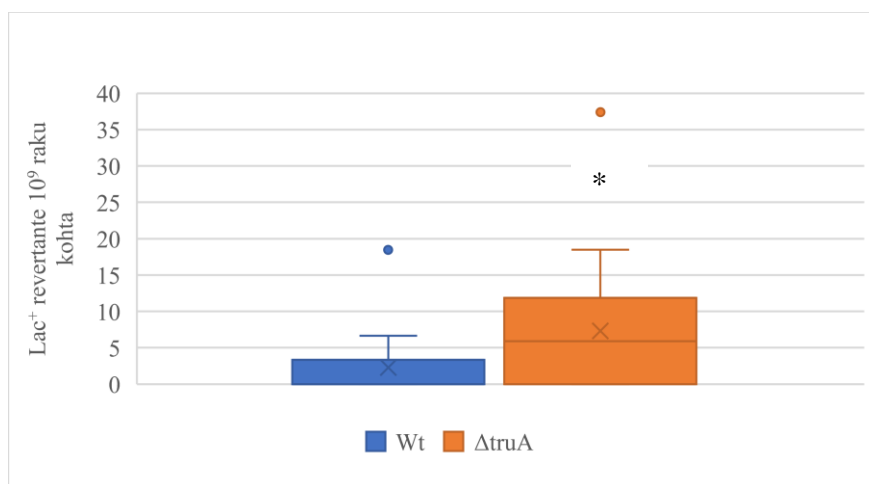
2.3.3. Pseudouridiini süntaasi kodeeriva *TruA* geeni *truA* puudumise mõju uurimine *P. putida* mutatsioonisagedusele laktoosi kasutusele võtul põhineva testüsteemi näitel

Pseudouridiini süntaasi kodeeriva *truA* geeni puudumise mõju statsionaarse faasi mutantide tekkesagedusele on jäänud siiani ebaselgeks. Vastavalt varasemalt Tagel *et al.*, 2016 toodud tulemustele osutus fenooli kasutuselevõtul põhinev testsüsteem statsionaarse faasi mutatsioonisageduse hindamiseks ebasobivaks. Seega, statsionaarse faasi mutatsioonide tekkesageduse uurimiseks kasutasin antud töös uudset plasmiidset laktoosi revertantide tekkel põhinevat testsüsteemi. Antud testsüsteem on hea selle poolest, et see võimaldab uurida katse vältel korraga nii eksponentsiaalses kasvufaasis kui ka statsionaarses kasvufaasis olevate bakterite mutatsioonisagedust. Laktoosi kasutuselevõtul põhineva testsüsteemi jaoks on vajalik kasutada sellist *P. putida* tüve, mille genoomi on modifitseeritud laktoosi lagundamise jaoks oluliste ensüümide geenid lisamisega, milleks on galaktoosi lagundamisraja geenid *galETKM* ja laktoosi transportimiseks vajalik *lacY*. Selleks, et tuvastada mutatsioonisagedust, on laboris konstrueeritud spetsiaalsed testerplasmiidid, milles on laktoosi lagundamiseks olulise β -galaktosidaasi kodeeriva geeni *lacZ* järjestust modifitseeritud kas asendusmutatsiooni või erinevate raaminihkemutatsioonide sisseviimise teel. Nende testerplasmiididega mõõtsin spontaansete asendus- ja raaminihkemutatsioonide teket nii kasvavates kui ka nälgivates *P. putida* KT2440 Lac-test tüve rakkudes, milles oli *truA* geen kas olemas (*wt*) või deleteeritud ($\Delta*truA*$). Asendusmutatsiooni tekkesageduse hindamiseks kasutasin testerplasmidi pKT_taclacZ*104GC ning raaminihkemutatsiooni tekkesageduse määramiseks testerplasmide pKT_taclacZ*107-1 (ühenukleotiidne) ning pKT_taclacZ*109+2 (kahenukleotiidne). Järgnevalt kirjeldan saadud tulemusi iga testerplasmidi kohta eraldi.

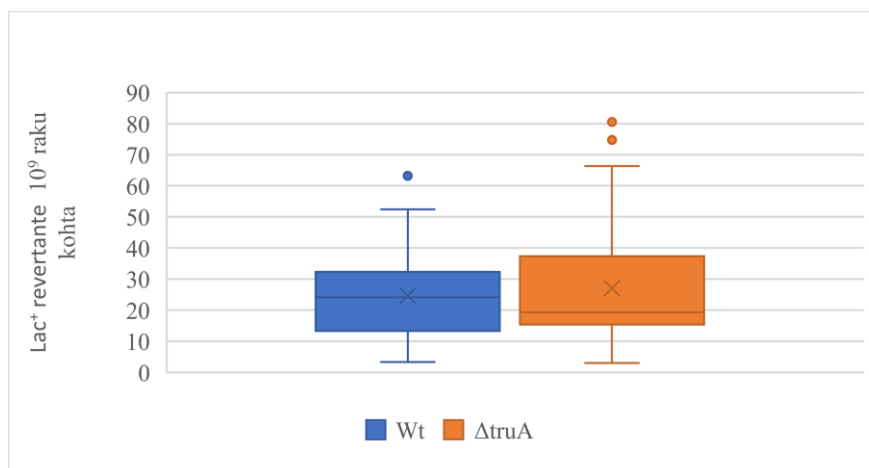
2.3.3.1. Pseudouridiini süntaasi *TruA* kodeeriva *truA* geeni puudumise mõju mutatsioonisagedusele kasutades pKT_taclacZ*104GC testsüsteemi

Pseudouridiini süntaasi puudumise mõju mutatsioonisagedusele laktoosi kasutusele võtmise testsüsteemi kaasabil uurisin esmalt kasutades testerplasmidi pKT_taclacZ*104GC. Antud testsüsteemiga saab määrata ka kasvavate rakkude mutatsioonisagedust algtüvel *P. putida* KT2440 Lac-test teisel akumulatsioonipäeval ja *P. putida* KT2440 Lac-test $\Delta*truA*$ puhul kolmandal akumulatsioonipäeval laktoosi ainsa süsinikallikana sisaldavale selektiivtassidele ilmunud kolooniate arvukuse alusel. Kolooniate tekkimist laktoosi sisaldavatele selektiivtassidele jälgisime 10 päeva jooksul. Akumulatsioonikatses asendusmutatsioon β -

galaktosidaasi geeni *lacZ* 104. positsioonis A:T → C:G vastu näitas tüvede-vahelist erinevust eelkõige kasvava faasi rakkudes (**joonis 8**). Kui algtüvele *P. putida* KT2440 Lac-test testerplasmidi pKT_taclacZ*104GC lisades jäi mutatsioonisagedus keskmiselt 2,3 mutatsiooni tekkele 10^9 raku kohta, siis KT2440 Lac-test $\Delta truA$ tüvel jäi keskmine mutatsioonide teke 18 mutatsiooni 10^9 raku kohta, mis on ligikaudu 7,8-kordne erinevus. Statsionaarse faasi mutatsioonide tekkesagedused on toodud **joonisel 9**, kus on võrreldud 3./4. – 10. päeva (kolmandast päevast alates *wt*-l ja neljandast päevast $\Delta truA$ tüvel) laktoosi revertantide tekkesagedusi ning on näha, et algse tüve (*wt*) ja $\Delta truA$ tüve vahel märkimisväärset arvulist (~1,09x) ega statistilist erinevust pole.



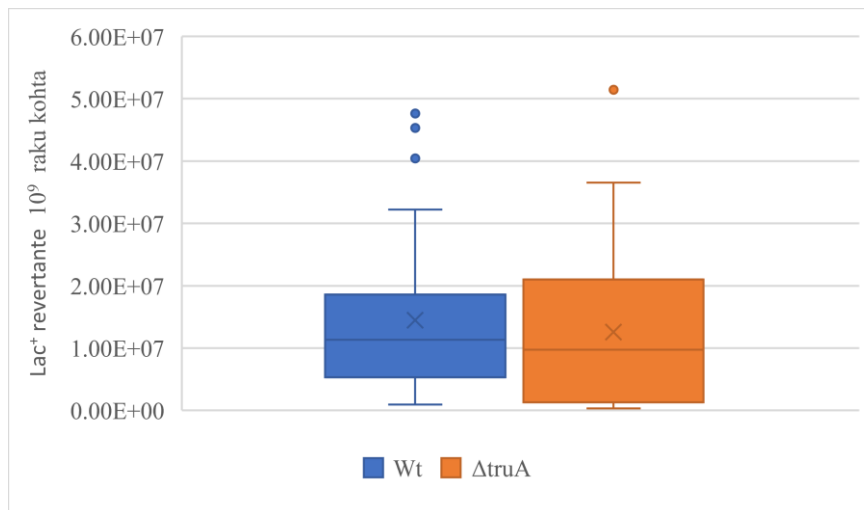
Joonis 8. Kasvava kultuuri Lac⁺ (laktoosi) revertantide tekkesagedus 1×10^9 elusraku kohta võrdluses *P. putida* algtüvi KT2440 Lac-test pKTtaclacZ*104GC (*wt*) ja $\Delta truA$ deletsioonitüvi KT2440 Lac-test $\Delta truA$ pKTtaclacZ*104GC ($\Delta truA$). Joonisel on esitatud vähemalt kolme sõltumatu katse tulemus, mõlema tüve kohta kuni 30 tassi. Algtüve (*wt*) revertandid hakkasid tekkima katse 2. päevast, $\Delta truA$ deletsioonitüve revertandid katse 3. päevast. Joonisel on näha kasvavas kultuuris tekkinud revertantide tekkesagedust (2. päev *wt* ja 3. päev $\Delta truA$). Joonisel rist näitab mutatsioonisageduse keskmist, kasti sisse mahub 50% tulemustest ning seal sees olev horisontaalne joon tähistab mediaanväärtust, vurrud näitavad tulemuste väärtuste ülemist ja alumist piiri, võõrväärtused ehk „väljalöögid“ on esitatud punktadena, kasti ülemine äär – ülemine kvartiil (75% tulemustest jääb selle alla), kasti alumine äär – alumine kvartiil (25% tulemustest jääb selle alla). Tulemusi on analüüsitud kasutades Student T-testi. Kahe tüve tulemuste erinevus on statistiliselt oluline, * tähistab selles töös $p < 0.01$.



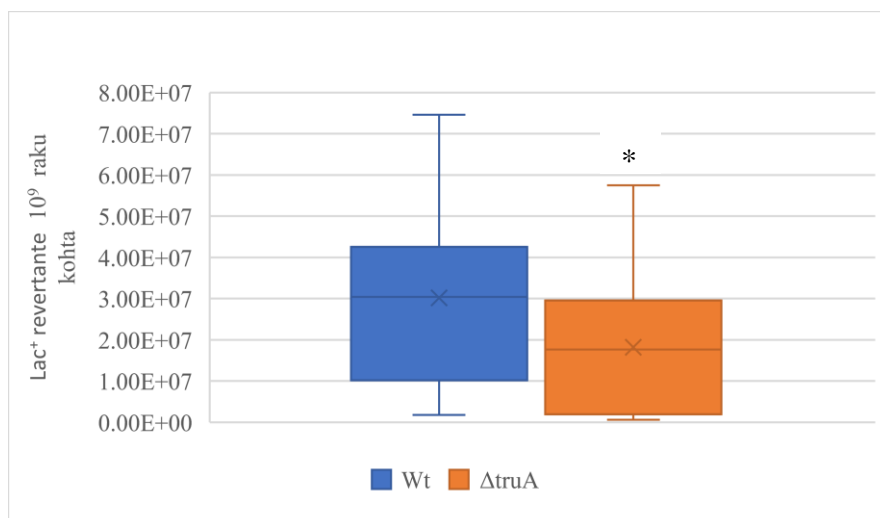
Joonis 9. Lac⁺ (laktoosi) revertantide tekkesagedus 1 x 10⁹ elusraku kohta võrdluses *P. putida* KT2440 Lac-test algtüvi pKTtaclacZ*104GC (*wt*) ja *truA* deletsioontüvi KT2440 Lac-testΔ*truA* pKTtaclacZ*104GC (Δ*truA*). Joonisel on esitatud vähemalt kolme sõltumatu katse tulemus, mõlema tüve kohta kuni 30 tassi. Joonisel on näha statsionaarses faasis ehk 3./4.-10. päeva jooksul tekkinud revertantide tekkesagedused (3. päevast alates *wt* ja 4. päevast alates Δ*truA*). Joonisel rist näitab mutatsioonisageduse keskmist, kasti sisse mahub 50% tulemustest ning seal sees olev horisontaalne joon tähistab mediaanväärtust, vurrud näitavad tulemuste väärtuste ülemist ja alumist piiri, võõrväärtused ehk „väljalöögid“ on esitatud punktadena, kasti ülemine äär – ülemine kvartiil (75% tulemustest jääb selle alla), kasti alumine äär – alumine kvartiil (25% tulemustest jääb selle alla). Tulemusi on analüüsitud kasutades Student T-testi.

2.3.3.2. Pseudouridiini süntaasi TruA kodeeriva *truA* geeni puudumise mõju mutatsioonisagedusele kasutades pKT_taclacZ*107-1 testsüsteemi

Pseudouridiini süntaasi *truA* puudumise mõju mutatsioonisagedusele laktoosi kasutusele võtmise testsüsteemi kaasabil uurisin järgnevalt raaminihke mutatsioonide teket kahte erinevat testerplasmidi kasutades. Esmalt uurisin Lac⁺ revertantide teket testerplasmidi pKT_taclacZ*107-1 abil. Antud testsüsteemiga saab määrata kasvavate rakkude mutatsioonisagedust algtüvel *P. putida* KT2440 Lac-test teisel akumulatsioonipäeval ja *P. putida* KT2440 Lac-test Δ*truA* puhul kolmandal akumulatsioonipäeval laktoosi ainsa süsinikallikana sisaldavale selektiivtassidele ilmunud kolooniate arvukuse alusel. Kolooniate tekkimist laktoosi sisaldavatele selektiivtassidele jälgisime plaatimisjärgselt 10 päeva jooksul (statsionaarses kasvufaasis tekkinud mutatsioonide tagajärjel ilmunud mutandid). Katset kordasime vähemalt 3 korda ja korraga oli katses igast tüvest vähemalt 10 paralleelkultuuri. Erinevalt asendusmutatsioonide tekkesagedust mõõtvast testerplasmidi pKT_taclacZ*104GC sisaldavate algtüve KT2440 Lac-test ja selle *truA* deletsioontüvega saadud tulemustest näeme **joonisel 10** toodud tulemustes, et raaminihete teket *lacZ* geeni positsioonis 107 mõõtvast pKT_taclacZ107-1 testsüsteemiga oli kasvava kultuuri Lac⁺ revertantide tekkesagedus laktoosi minimaaltassidele võrreldav algtüvega. Statsionaarse faasi Lac⁺ revertantide teke *truA* puudumisel jäi aga madalamaks algtüve puhul saadud tulemustest (**joonis 11**). Algtüvel KT2440 Lac-test pKT_taclacZ*107-1 (*wt*) on Lac⁺ revertantide tekkesagedus ~1,66 korda kõrgem võrreldes Δ*truA* tüvega ning tegemist on statistiliselt olulise erinevusega. Need tulemused näitavad, et raaminihete tekkesagedus antud testsüsteemi rakendades ei olnud *truA* puudumisest mõjutatud.



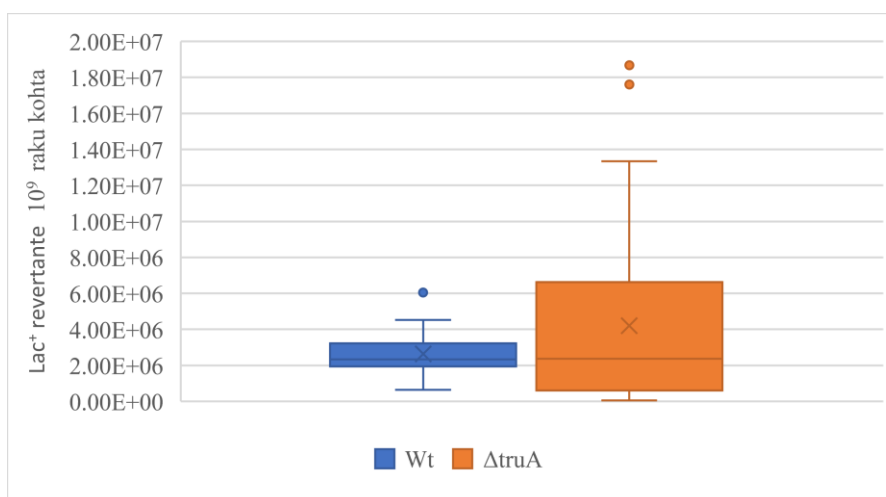
Joonis 10. Kasvava kultuuri Lac⁺ (laktoosi) revertantide tekkesagedus 1 x 10⁹ elusraku kohta võrdluses *P. putida* algtüvi KT2440 Lac-test pKT_taclacZ*107-1 (*wt*) ja $\Delta truA$ deletsioonitüvi KT2440 Lac-test $\Delta truA$ pKT_taclacZ*107-1 ($\Delta truA$). Joonisel on esitatud vähemalt kolme sõltumatu katse tulemus, mõlema tüve kohta kuni 30 tassi. Algtüve (*wt*) revertandid hakkasid tekkima katse 2. päevast, $\Delta truA$ deletsioonitüve revertandid katse 3. päevast. Joonisel on näha kasvavas kultuuris tekkinud revertantide tekkesagedust (2. päev *wt* ja 3. päev $\Delta truA$). Joonisel rist näitab mutatsioonisageduse keskmist, kasti sisse mahub 50% tulemustest ning seal sees olev horisontaalne joon tähistab mediaanväärtust, vurrud näitavad tulemuste väärtuste ülemist ja alumist piiri, võõrväärtused ehk „väljalöögid“ on esitatud punktidenä, kasti ülemine äär – ülemine kvartiil (75% tulemustest jääb selle alla), kasti alumine äär – alumine kvartiil (25% tulemustest jääb selle alla).



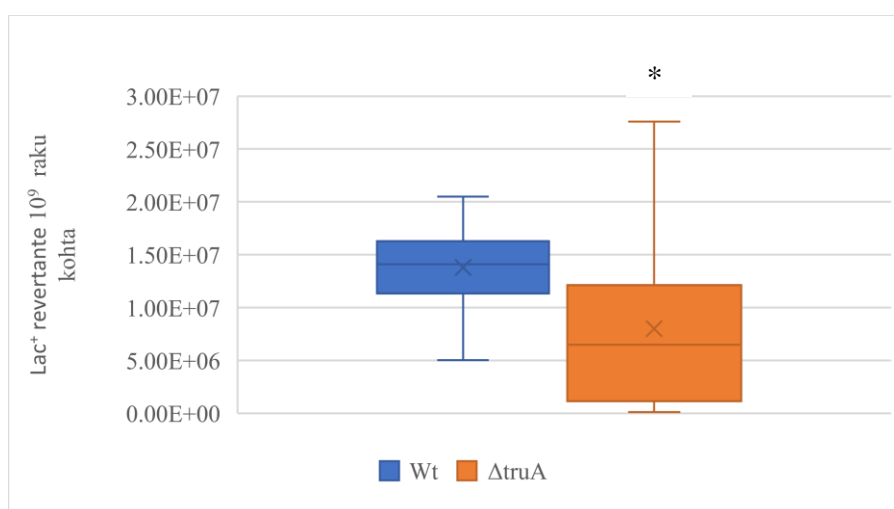
Joonis 11. Lac⁺ (laktoosi) revertantide tekkesagedus 1 x 10⁹ elusraku kohta võrdluses *P. putida* KT2440 Lac-test algtüvi pKT_taclacZ*107-1 (*wt*) ja *truA* deletsioonitüvi KT2440 Lac-test $\Delta truA$ pKT_taclacZ*107-1 ($\Delta truA$). Joonisel on esitatud vähemalt kolme sõltumatu katse tulemus, mõlema tüve kohta kuni 30 tassi. Joonisel on näha statsionaarses faasis ehk 3./4.-10. päeva jooksul tekkinud revertantide tekkesagedused (3. päevast alates *wt* ja 4. päevast alates $\Delta truA$). Joonisel rist näitab mutatsioonisageduse keskmist, kasti sisse mahub 50% tulemustest ning seal sees olev horisontaalne joon tähistab mediaanväärtust, vurrud näitavad tulemuste väärtuste ülemist ja alumist piiri, võõrväärtused ehk „väljalöögid“ on esitatud punktidenä, kasti ülemine äär – ülemine kvartiil (75% tulemustest jääb selle alla), kasti alumine äär – alumine kvartiil (25% tulemustest jääb selle alla). Tulemusi on analüüsitud kasutades Student T-testi. Kahe tüve tulemuste erinevus on statistiliselt oluline, * tähistab selles töös $p < 0.01$.

2.3.3.3. Pseudouridiini süntaasi TruA kodeeriva *truA* geeni puudumise mõju mutatsioonisagedusele kasutades pKT_taclacZ*109+2 testsüsteemi

Pseudouridiini süntaasi puudumise mõju mutatsioonisagedusele laktoosi kasutusele võtmise testsüsteemidest viimasena uurisin veel Lac⁺ revertantide teket raaminihkeid mõõtvate testerplasmidi pKT_taclacZ*109+2 abil. Sarnaselt eelpooltoodule saab antud testsüsteemiga määrata kasvavate rakkude mutatsioonisagedust algtüvel *P. putida* KT2440 Lac-test teisel akumulatsioonipäeval ja *P. putida* KT2440 Lac-test $\Delta truA$ puhul kolmandal akumulatsioonipäeval laktoosi ainsa süsinikallikana sisaldavale selektiivtassidele ilmunud kolooniate arvukuse alusel. Kolooniade tekkimist laktoosi sisaldavatele selektiivtassidele jälgisime plaatimisjärgselt 10 päeva jooksul (statsionaarses faasis tekkinud mutatsioonide tagajärjel ilmunud mutandid). Katset kordasime vähemalt 3 korda ja korraga oli katses igast tüvest vähemalt 10 paralleelkultuuri. Sarnaselt eelpoolkirjeldatud tulemustele, kus Lac⁺ revertantide teket jälgiti raaminihete toimumise järgi *lacZ* geeni positsioonis 107 oli ka *lacZ* geeni 109 positsioonis (+CG) raaminihete teket mõõtvate testerplasmidiga saadud tulemustest näha, et kasvava kultuuri Lac⁺ revertantide tekkesagedus laktoosi minimaaltassidele oli võrreldav algtüvega (joonis 12)., Kuigi kasvava kultuuri rakkude Lac⁺ revertantide tekkesagedus oli $\Delta truA$ deletsioonitüves ~1,8 korda kõrgem kui algtüves polnud see statistiliselt oluliselt erinev. Statsionaarses faasis tekkinud Lac⁺ revertantide võrdlusest antud testsüsteemiga on näha, et sarnaselt *lacZ* geeni positsioonis 107-1 raaminihkeid mõõtvate testsüsteemiga saadud tulemustele (**joonis 12**) on algtüvel KT2440 Lac-test pKT_taclacZ*109+2 (*wt*) on ~1,73 korda kõrgem laktoosi revertantide tekkesagedus võrreldes $\Delta truA$ tüvega ning tegemist on statistiliselt olulise erinevusega (**joonis 13**). Need tulemused antud testsüsteemi rakendamisel näitavad, et Lac⁺ revertantide teke pole *truA* puudumisest mõjutatud. Statsionaarse faasi mutatsioonide teke oli *truA*-deletant tüves isegi madalam kui algtüvel saadud tulemused. Kuna *truA* puudumisel väheneb *P. putida* raaminihkemutatsioonide teke, siis see viitab, et TruA võiks olla oluline raaminihkemutatsioonide tekkimiseks nälgivates *P. putida* rakkudes.



Joonis 12. Kasvava kultuuri Lac⁺ (laktoosi) revertantide tekkesagedus 1×10^9 elusraku kohta võrdluses *P. putida* algtüvi KT2440 Lac-test pKT_taclacZ*109+2 (*wt*) ja $\Delta truA$ deletsioonitüvi KT2440 Lac-test $\Delta truA$ pKT_taclacZ*109+2 ($\Delta truA$). Joonisel on esitatud vähemalt kolme sõltumatu katse tulemus, mõlema tüve kohta kuni 30 tassi. Algtüve (*wt*) revertandid hakkasid tekkima katse 2. päevast, $\Delta truA$ deletsioonitüve revertandid katse 3. päevast. Joonisel on näha kasvavas kultuuris tekkinud revertantide tekkesagedust (2. päev *wt* ja 3. päev $\Delta truA$). Joonisel rist näitab mutatsioonisageduse keskmist, kasti sisse mahub 50% tulemustest ning seal sees olev horisontaalne joon tähistab mediaanväärtust, vurrud näitavad tulemuste väärtuste ülemist ja alumist piiri, võõrväärtused ehk „väljalöögid“ on esitatud punktadena, kasti ülemine äär – ülemine kvartiil (75% tulemustest jääb selle alla), kasti alumine äär – alumine kvartiil (25% tulemustest jääb selle alla).



Joonis 13. Lac⁺ (laktoosi) revertantide tekkesagedus 1×10^9 elusraku kohta võrdluses *P. putida* KT2440 Lac-test algtüvi pKT_taclacZ*109+2 (*wt*) ja *truA* deletsioonitüvi KT2440 Lac-test $\Delta truA$ pKT_taclacZ*109+2 ($\Delta truA$). Joonisel on esitatud vähemalt kolme sõltumatu katse tulemus, mõlema tüve kohta kuni 30 tassi. Joonisel on näha statsionaarses faasis ehk 3./4.-10. päeva jooksul tekkinud revertantide tekkesagedused (3. päevast alates *wt* ja 4. päevast alates $\Delta truA$). Joonisel rist näitab mutatsioonisageduse keskmist, kasti sisse mahub 50% tulemustest ning seal sees olev horisontaalne joon tähistab mediaanväärtust, vurrud näitavad tulemuste väärtuste ülemist ja alumist piiri, võõrväärtused ehk „väljalöögid“ on esitatud punktadena, kasti ülemine äär – ülemine kvartiil (75% tulemustest jääb selle alla), kasti alumine äär – alumine kvartiil (25% tulemustest jääb selle alla). Tulemusi on analüüsitud kasutades Student T-testi. Kahe tüve tulemuste erinevus on statistiliselt oluline, * tähistab selles töös $p < 0.01$.

2.3.4. Pseudouridiini süntaasi TruA kodeeriva *truA* geeni puudumise mõju *P. putida* rakkude kasvukiirusele laktoosi minimaaltassil

Varasemalt on täheldatud, et *truA* geeni puudumisel teatud bakterites kasvavad need bakterirakud aeglasemalt, nii on näiteks bakterites *E. coli* ja *S. (enterica) Typhimurium* (Chang *et al.*, 1971; Connolly & Winkler, 1989). Ka selles töös toodud katsete tulemused viitavad sellele, et *truA* puudumisel esineb kasvuaeglustus. Nii laktoosi revertantide tekkel põhinevat testsüsteemi kasutades kui ka Lac⁺ revertantide rekonstruktsioonikatses ilmnes, et *P. putida* *truA*-defektsetel tüvedel läheb kauem aega, et kasvama hakata. Selleks, et uurida kui mitu päeva läheb aega Lac⁺ revertantidel, et ilmuda läbi taustrakkude kihi, tegin rekonstruktsioonikatses („Materjal ja meetodika“ 2.2.10), kus me ennistasin tingimused, milles Lac⁺ revertante selekteerisin. Lac⁺ revertantide rekonstruktsioonikatses võtsin algtüve ja *truA*-deletant tüve laktoosi akumulatsioonikatses tekkinud kolooniaid 2. päevast algtüvel ja 3. päevast *truA*-deletandil, mõlemal tüvel lisaks ka 6. päevast ja 10. päevast ja segasin taustrakkudega KT2440 ning plaatisin laktoosi minimaalsöötmele. Järgnevalt jälgisin, millal ilmuvad kolooniad tassidele. Nägin, et laktoosi minimaalsöötmele uuesti plaadituna ilmuvad kolooniad tassidele päevase nihkega. Kui algtüvel ilmusid kolooniad laktoosi selektiivtassidele teisel päeval plaatimisjärgselt, siis *truA* puudumisel ilmusid esimesed kolooniad kolmandal päeval peale laktoosi sisaldavale selektiivsöötmele plaatimist. Seega antud tulemused kinnitavad eelpooltoodut, et *truA* puudumisel on kolooniate teke selektiivsöötmele aeglasem.

2.3.4.1. Arutelu

Käesolevas töös konstrueerisin *P. putida* KT2440 Lac-test $\Delta truA$ tüve, et uurida laktoosi revertantide tekkel põhineva testsüsteemi abil eelkõige statsionaarse faasi spontaanse mutageneesi toimumist pseudouridiini süntaasi TruA puudumisel. Varasemad tulemused kasvava kultuuri mutatsioonisageduste võrdlemisel Rif^R/*rpoB* testsüsteemi kasutades näitasid *P. putida* PaW85 *wt* ja $\Delta truA$ tüve võrdluses, et $\Delta truA$ tüve mutatsioonisagedus oli ligikaudu neli korda kõrgem (Tagel *et al.*, 2021). Ka antud töö katsete tulemused Lac-testertüvedega näitasid, et $\Delta truA$ tüve mutantide tekkesagedus on keskmiselt 4,3 korda kõrgem kui algtüvel *P. putida* KT2440 Lac-test. Seega saab öelda, et rifampitsiini resistentsete mutantidel põhineva testsüsteemi kohaselt on näha olulist mutatsioonide tekkesageduse tõusu *truA* geeni puudumisel kasvavates rakkudes.

Lisaks kasutasin uudset laktoosi revertantidel põhinevat testsüsteemi, mis võimaldas jälgida mutatsioonide teket nii kasvavates rakkudes kui ka nälgivates rakkudes. Laktoosi kasutuselevõtul baseeruva testsüsteemiga tekkisid teiseks akumulatsioonipäevaks algtüvel

KT2440 Lac-test ja kolmandaks päevaks deletsioontüvel KT2440 Lac-test $\Delta truA$ sellised Lac⁺ revertandid, mis tekkisid plaatimiseelselt ehk kasvavas rakukultuuris toimunud mutatsioonide tagajärjel. Seetõttu saab ka eksponentsiaalse faasi rakkude mutatsioonisageduste paremaks kirjeldamiseks Rif^R/*rpoB* testsüsteemi tulemusi võrrelda laktoosi kasutuselevõtul põhineva testsüsteemi tulemustega. Rif^R/*rpoB* testsüsteem mõõdab kromosomaalseid mutatsioone ning *rpoB* geenis võib tekkida mitmeid asendusmutatsioone. Samas Lac⁺ revertantide tekkimine põhineb plasmiididel ning tekitatakse ainult ühes kohas kindel asendusmutatsioon (või raaminihkemutatsioon).

Kui rifampitsiini resistentsete mutantide tekkel põhinevat testsüsteemi kasutades oli kõikide testerplasmiididega (pKT_taclacZ*104GC, pKT_taclacZ*107-1, pKT_taclacZ*109+2) *P. putida* KT2440 Lac-test $\Delta truA$ -deletant tüvede mutatsioonide tekkesagedus ~3,6 korda kõrgem algtüvede *P. putida* KT2440 Lac-test omast, siis Lac⁺ revertantide tekkimisel baseeruva testsüsteemi korral oli erinevus testerplasmiiditi erinev – asendusmutatsiooni tuvastava plasmiidiga pKT_taclacZ*104GC $\Delta truA$ -deletant tüve kasvaval kultuuril oli 7,8 korda kõrgem mutantide tekkesageduseg kui algtüvel *P. putida* KT2440 Lac-test. Samas aga raaminihkemutatsioonide testerplasmiididega pKT_taclacZ*107-1 ja pKT_taclacZ*109+2 oli eksponentsiaalse faasi mutantide tekke erinevus väiksem – pKT_taclacZ*107-1 plasmidi puhul erinevus algtüve ja deletsioontüve vahel praktiliselt puudus ning pKT_taclacZ*109+2 plasmiidiga oli *P. putida* KT2440 Lac-test $\Delta truA$ tüvel 1,8 korda kõrgem mutatsioonisagedus kui algtüvel.

Seega saab öelda, et asendusmutatsiooni detekteeriva pKT_taclacZ*104GC testerplasmiidiga tüvede korral on näha suuremat mutatsioonisageduste erinevust deletsioontüve ja algtüve Lac⁺ revertantide tekkes kui Rif resistentsete mutantide tekkel. Samuti korreleerub minu konstrueeritud *truA* Lac-testertüvede asendusmutatsioonide tekkesagedus kasvavas rakukultuuris varasemalt publitseeritud Rif^R/*rpoB* testsüsteemi tulemustega (Tagel *et al.*, 2021).

Samas kui raaminihkemutatsioone detekteerivate testerplasmiididega pKT_taclacZ*107-1 ja pKT_taclacZ*109+2 tüvede korral kasvavas faasis olid laktoosi kasutuselevõtul põhinevat testsüsteemi kasutades deletsioontüve KT2440 Lac-test $\Delta truA$ ja algtüve KT2440 Lac-test mutatsioonisagedused sarnased, kuid Rif^R/*rpoB* testsüsteemiga esines siiski tüvede-vaheline erinevus. Sellest võib järeldada, et eksponentsiaalses faasis võiksid potentsiaalselt aset leida rohkem asendusmutatsioonid, kuna just nende mutatsioone tekkesagedus on kasvava faasi deletsioontüve KT2440 Lac-test $\Delta truA$ rakkudes kõrgem. Lisaks on kasvavas faasis laktoosi revertantide tekkel põhineva testsüsteemiga näha paremini *truA* puudumise mõju asendusmutatsioonidele.

Laktoosi kasutuselevõtul põhinevat testsüsteemi kasutades algtüve *P. putida* KT2440 Lac-test pKT_taclacZ*104GC ja *P. putida* KT2440 Lac-test *truA*-deletant pKT_taclacZ*104GC tüve võrdlusest võib eeldada, et statsionaarses faasis asendusmutatsioonide teket pseudouridiini süntaasi TruA kodeeriva *truA* geeni puudumine oluliselt ei mõjuta. Samas raaminihete tekkesagedus mõlema töös kasutatud testerplasmiidiga Lac-tüvede võrdluses näitas, et *truA* puudumine just vähendab mutatsioonisagedust nälgivates rakkudes, kuna erilist pseudouridiini süntaasi TruA geeni puudumisest tulenevat mutatsioonisageduse tõusu ei tuvastanud. Pigem jäigi mutatsioonisagedus deletsioonitüvel *P. putida* KT2440 Lac-test $\Delta truA$ mõlema raaminihkemutatsiooniga algtüve *P. putida* KT2440 Lac-test (*wt*) mutatsioonisagedusele alla ligikaudu 1,7 korda ning tegemist on statistiliselt olulise vahega. See tulemus viitab TruA osalusele raaminihkemutatsioonide.

Eelmisi tulemusi kokku võttes saab öelda, et statsionaarse faasi spontaanset mutageneesi pseudouridiini süntaasi TruA puudumine suures pildis ei mõjuta. Huvitaval kombel TruA puudumine isegi natuke vähendab *P. putida* raaminihkemutatsioonide teket nagu täheldasin testerplasmiididega pKT_taclacZ*107-1 (vt. **joonis 11**) ja pKT_taclacZ*109+2 (vt. **joonis 13**). Antud töö tulemused korreleeruvad varem saadud tulemustega, kui oli kasutatud fenooli kasutuselevõtul põhinevat testsüsteemi (Tagel *et al.*, 2016). Ka Lac⁺ revertantide tekkel põhinev testsüsteem näitas, et pseudouridiini süntaas TruA puudumisel pole asendusmutatsioonide teke statsionaarse faasi *P. putida* rakkudes mõjutatud. Kuid üllataval kombel täheldasin, et TruA puudumine vähendab 1,73 korda *P. putida* raaminihkemutatsioonide teket testerplasmiidis pKT_taclacZ*109+2 (**joonis 13**). See tulemus viitab TruA võimalikule osalusele raaminihkemutatsioonide tekkes *P. putida* nälgivates rakkudes. Kuna varasemalt pole *truA* deletsioonitüvel statsionaarse faasi raaminihkeid vaadatud, siis vajaks TruA roll *P. putida* statsionaarse faasi raaminihete tekkes täiendavat uurimist.

KOKKUVÕTE

Looduses peavad bakterid toime tulema erinevate stressirohkete keskkonnatingimustega. Stressitingimustele vastusena suureneb mutatsioonide tekkesagedus ning sobivate mutatsioonide ilmnemise korral võivad bakterid saavutada parema kohasuse. Selliste mutatsioonide puhul on tegemist statsionaarse faasi mutatsioonidega ning meie uurimisgrupis pannaksegi rõhku statsionaarse faasi mutatsioonide tekkemehhanismide uurimisele mullabakteris *Pseudomonas putida*.

Oma töö praktilises osas uurisin mutatsiooniprotsesse pseudouridiini süntaasi TruA puudumisel *P. putida* süsinikunäljas olevates statsionaarse faasi rakkudes, kasutades selleks uudset laktoosi kasutuselevõtul põhinevat plasmiidset testsüsteemi. Varasemalt on näidatud, et pseudouridiini süntaasi TruA puudumine tõstab *P. putida* kasvavate rakkude mutatsioonide tekkesagedust. Selleks, et uurida *truA* mõju nälgivate rakkude mutatsioonide tekkele, konstrueerisin eelnevalt *truA*-deletsioontüve *P. putida* KT2440 Lac-test tüvest, mis on meie laboris konstrueeritud spetsiaalne nn. laktoosi lagundamisvõimekusega *P. putida* tüvi.

Käesoleva töö tulemused saab kokku võtta järgnevalt:

1. Konstrueerisin *P. putida* KT2440 Lac-test $\Delta truA$ tüve, mida sain kasutada nii kasvavates rakkudes kui statsionaarses faasis tekkivate mutantide tekkesageduse määramiseks.
2. Spontaansete Rif^R mutantide tekkesagedus oli *truA* puudumisel testerplasmide sisaldavatel (pKT_taclacZ*104GC, pKT_taclacZ*107-1, pKT_taclacZ*109+2) *P. putida* KT2440 Lac-test tüvedel ligikaudu 4 korda kõrgem võrreldes algtüvega KT2440 Lac-test.
3. Laktoosi revertantide tekkel põhinevate testsüsteemide kasutamisel ilmnis, et kasvavas kultuuris tekkivate mutantide tekkesagedus oli *truA* puudumisest mõjutatud ainult pKT_taclacZ*104GC testerplasmidi sisaldavates tüvedes. KT2440 Lac-test $\Delta truA$ tüve revertantide tekkesagedus oli ligikaudu 7,8 korda kõrgem võrreldes algtüve KT2440 Lac-test mutatsioonisagedusega.
4. Laktoosi revertantide tekkel põhinevaid raaminihkeid detekteerivaid testsüsteeme kasutades oli statsionaarses faasis tekkivate mutantide tekkesagedus *truA*-deletant tüves madalam kui algtüves KT2440 Lac-test, mis viitab TruA võimalikule osalusele antud mutatsioonide tekkes *P. putida* nälgivates rakkudes. Statistiliselt oluline erinevus esines mõlema raaminihkemutatsiooni sisaldava testerplasmiidiga tüvede vahel (pKT_taclacZ*107-1 ja pKT_taclacZ*109+2), deletsioontüve KT2440 Lac-test $\Delta truA$

Lac⁺ revertantide tekkesagedus oli mõlemal juhul ligikaudu 1,7 korda madalam kui algtüve KT2440 Lac-test Lac⁺ revertantide tekkesagedus.

5. Eelnevatest tulemustest saab järeldada, et kui *truA* deletsioon mõjutab asendusmutatsioonide teket ainult eksponentsiaalses kasvufaasis olevates rakkudes, siis Lac-raaminihkeid detekteerivate plasmiidsete testüsteemide rakendamisel ilmnenu algtüvest madalam mutantide tekkesagedus viitab võimalikule TruA osalusele antud mutatsioonide tekkes *P. putida* statsionaarse faasi rakkudes.
6. Eelnevalt mainitud testsüsteeme kasutades ja laktoosil rekonstruktsioonikatset tehes ilmnes, et KT2440 Lac-test $\Delta truA$ tüvel läheb kuskil päeva võrra kauem aega.

Pseudouridine synthase TruA participation in mutation processes of soil bacterium *Pseudomonas putida* KT2440

SUMMARY

Annabel Toom

In nature, bacteria are to cope with various stressful environmental conditions. In response to stress conditions, the mutation rate in bacteria increases, and if appropriate mutations occur, bacteria can achieve better fitness. In case of such mutations, we are dealing with stationary phase mutations, and in our research group, emphasis is placed on the study of the mechanisms of the formation of stationary phase mutations in the soil bacterium *Pseudomonas putida*.

In the practical part of my work, I studied mutational processes in the absence of pseudouridine synthase TruA in carbon-starved stationary phase cells of *P. putida* using a novel plasmid test-system based on lactose introduction. The absence of the pseudouridine synthase TruA has previously been shown to increase the mutation rate in growing cells of *P. putida*. To study the effect of *truA* on the development of mutations in starved cells, I previously constructed a *truA*-deletion strain from *P. putida* KT2440 Lac-test strain, which is a special strain of *P. putida* that is capable of degrading lactose.

The results of this work can be summarized as follows:

1. I constructed a $\Delta truA$ strain of *P. putida* KT2440 Lac-test strain, which I could use to determine the frequency of mutants arising both in growing cells and in the stationary phase cells.
2. In the absence of *truA*, the frequency of spontaneous Rif^R mutants in *P. putida* KT2440 Lac-test strains containing tester plasmids (pKT_taclacZ*104GC, pKT_taclacZ*107-1, pKT_taclacZ*109+2) was approximately 4 times higher compared to the original strain KT2440 Lac-test.
3. When using test-systems based on the formation of lactose revertants, it appeared that the mutation rate in the growing culture was affected by the absence of *truA* only in strains containing the pKT_taclacZ*104GC tester plasmid. The frequency of revertants in the KT2440 Lac-test $\Delta truA$ strain was approximately 7,8 times higher than the mutation rate of the original KT2440 Lac-test strain.

4. Using test-systems that detect frameshifts based on the formation of lactose revertants, the frequency of mutants arising in the stationary phase was lower in the *truA*-deletant strain than in the original strain KT2440 Lac test, which suggests the possible involvement of TruA in the development of these mutations in starved cells of *P. putida*. There was a statistically significant difference between the strains with both frameshift mutation containing tester plasmids (pKT_taclacZ*107-1 and pKT_taclacZ*109+2), the frequency of Lac⁺ revertants within the deletion strain KT2440 Lac-test $\Delta truA$ was approximately 1,7 times lower than the frequency of Lac⁺ revertants that within the original strain KT2440 Lac-test.

5. From the previous results, it can be concluded that if the deletion of *truA* affects the formation of base substitution mutations only in cells of the exponential growth phase, then the lower frequency of mutants compared to the original strain, which occurred when applying plasmid test-systems that detect Lac-frameshifts, indicates the possible participation of TruA in the formation of these mutations in stationary phase cells of *P. putida*.

6. Using the previously mentioned test-systems and performing a reconstruction experiment on lactose, it appeared that the KT2440 Lac-test $\Delta truA$ strain takes about a day longer.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma juhendajat Signet juhendamise, toetamise ja abistamise eest ning muidugi kannatlikkuse eest. Tänan veel ka oma kaasjuhendajat Heilit, kes aitas samuti mind oma nõu ja jõuga. Lisaks tänan ka teisi üle-ruumi laborikaaslasi, kes ei jätnud mind hätta ka pisemate murede korral! Loomulikult ka tänu ja austus kõigile, kes seda tööd on lugenud ja kommenteerinud – ka teie osalus on väga märkimisväärne. Aitäh!

KIRJANDUSE LOETELU

- Adams, M. H. (1959). *Bacteriophages*. Interscience Publishers Inc. N. Y.
- Arluison, V., Hountondji, C., Robert, B., & Grosjean, H. (1998). Transfer RNA-pseudouridine synthetase Pus1 of *Saccharomyces cerevisiae* contains one atom of zinc essential for its native conformation and tRNA recognition. *Biochemistry*, *37*(20), 7268–7276. <https://doi.org/10.1021/bi972671o>
- Bagdasarian, M., Amann, E., Lurz, R., Rückert, B., & Bagdasarian, M. (1983). Activity of the hybrid trp-lac (tac) promoter of *Escherichia coli* in *Pseudomonas putida*. Construction of broad-host-range, controlled-expression vectors. *Gene*, *26*(2–3), 273–282. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(83\)90197-x](https://doi.org/10.1016/0378-1119(83)90197-x)
- Björk, G. R., & Hagervall, T. G. (2014). Transfer RNA Modification: Presence, Synthesis, and Function. *EcoSal Plus*, *6*(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0007-2013>
- Björk, G. R., Wikström, P. M., & Byström, A. S. (1989). Prevention of translational frameshifting by the modified nucleoside 1-methylguanosine. *Science (New York, N.Y.)*, *244*(4907), 986–989. <https://doi.org/10.1126/science.2471265>
- Braeken, K., Moris, M., Daniels, R., Vanderleyden, J., & Michiels, J. (2006). New horizons for (p)ppGpp in bacterial and plant physiology. *Trends in Microbiology*, *14*(1), 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.11.006>
- Cairns, J., & Foster, P. L. (1991). Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli*. *Genetics*, *128*(4), 695–701. <https://doi.org/10.1093/genetics/128.4.695>
- Campbell, E. A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A., & Darst, S. A. (2001). Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase. *Cell*, *104*(6), 901–912. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00286-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00286-0)
- Chang, G. W., Roth, J. R., & Ames, B. N. (1971). Histidine regulation in *Salmonella typhimurium*. 8. Mutations of the hisT gene. *Journal of Bacteriology*, *108*(1), 410–414. <https://doi.org/10.1128/jb.108.1.410-414.1971>

- Charette, M., & Gray, M. W. (2000). Pseudouridine in RNA: what, where, how, and why. *IUBMB Life*, 49(5), 341–351. <https://doi.org/10.1080/152165400410182>
- Cohn, W. E., & Volkin, E. (1951). Nucleoside-5'-Phosphates from Ribonucleic Acid. *Nature*, 167(4247), 483–484. <https://doi.org/10.1038/167483a0>
- Connolly, D. M., & Winkler, M. E. (1989). Genetic and physiological relationships among the miaA gene, 2-methylthio-N⁶-(delta 2-isopentenyl)-adenosine tRNA modification, and spontaneous mutagenesis in Escherichia coli K-12. *Journal of Bacteriology*, 171(6), 3233–3246. <https://doi.org/10.1128/jb.171.6.3233-3246.1989>
- Cupples, C. G., Cabrera, M., Cruz, C., & Miller, J. H. (1990). A set of lacZ mutations in Escherichia coli that allow rapid detection of specific frameshift mutations. *Genetics*, 125(2), 275–280. <https://doi.org/10.1093/genetics/125.2.275>
- Cupples, C. G., & Miller, J. H. (1988). Effects of amino acid substitutions at the active site in Escherichia coli beta-galactosidase. *Genetics*, 120(3), 637–644. <https://doi.org/10.1093/genetics/120.3.637>
- Cupples, C. G., & Miller, J. H. (1989). A set of lacZ mutations in Escherichia coli that allow rapid detection of each of the six base substitutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(14), 5345–5349. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.14.5345>
- Davis, D. R. (1995). Stabilization of RNA stacking by pseudouridine. *Nucleic Acids Research*, 23(24), 5020–5026. <https://doi.org/10.1093/nar/23.24.5020>
- Davis, D. R., Veltri, C. A., & Nielsen, L. (1998). An RNA model system for investigation of pseudouridine stabilization of the codon-anticodon interaction in tRNA^{Lys}, tRNA^{His} and tRNA^{Tyr}. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 15(6), 1121–1132. <https://doi.org/10.1080/07391102.1998.10509006>

- Davis, F., & Allen, F. (1957). Ribonucleic acids from yeast which contain a fifth nucleotide. *The Journal of Biological Chemistry*, 227, 907–915. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)70770-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)70770-9)
- Del Campo, M., Kaya, Y., & Ofengand, J. (2001). Identification and site of action of the remaining four putative pseudouridine synthases in *Escherichia coli*. *RNA (New York, N.Y.)*, 7(11), 1603–1615.
- Denamur, E., Lecointre, G., Darlu, P., Tenaillon, O., Acquaviva, C., Sayada, C., Sunjevaric, I., Rothstein, R., Elion, J., Taddei, F., Radman, M., & Matic, I. (2000). Evolutionary implications of the frequent horizontal transfer of mismatch repair genes. *Cell*, 103(5), 711–721. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00175-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00175-6)
- Denamur, E., & Matic, I. (2006). Evolution of mutation rates in bacteria. *Molecular Microbiology*, 60(4), 820–827. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05150.x>
- Dong, X., Bessho, Y., Shibata, R., Nishimoto, M., Shirouzu, M., Kuramitsu, S., & Yokoyama, S. (2006). Crystal Structure of the tRNA Pseudouridine Synthase TruA from *Thermus Thermophilus* HB8. *RNA Biology*, 3(3), 115–121. <https://doi.org/10.4161/rna.3.3.3286>
- Durant, P. C., & Davis, D. R. (1999). Stabilization of the anticodon stem-loop of tRNA^{Lys},3 by an A+-C base-pair and by pseudouridine. *Journal of Molecular Biology*, 285(1), 115–131. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2297>
- Foster, P. G., Huang, L., Santi, D. V., & Stroud, R. M. (2000). The structural basis for tRNA recognition and pseudouridine formation by pseudouridine synthase I. *Nature Structural Biology*, 7(1), 23–27. <https://doi.org/10.1038/71219>
- Foster, P. L. (1999). Mechanisms of stationary phase mutation: A decade of adaptive mutation. *Annual Review of Genetics*, 33, 57–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.33.1.57>
- Foster, P. L. (2005). Stress responses and genetic variation in bacteria. *Mutation Research*, 569(1–2), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.07.017>

- Foster, P. L. (2007). Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 42(5), 373–397. <https://doi.org/10.1080/10409230701648494>
- Foster, P. L., & Trimarchi, J. M. (1994). Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli* by simple base deletions in homopolymeric runs. *Science (New York, N.Y.)*, 265(5170), 407–409. <https://doi.org/10.1126/science.8023164>
- Foster, P. L., & Trimarchi, J. M. (1995). Adaptive reversion of an episomal frameshift mutation in *Escherichia coli* requires conjugal functions but not actual conjugation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(12), 5487–5490. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5487>
- Galán, J.-C., Turrientes, M.-C., Baquero, M.-R., Rodríguez-Alcayna, M., Martínez-Amado, J., Martínez, J.-L., & Baquero, F. (2007). Mutation rate is reduced by increased dosage of mutL gene in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiology Letters*, 275(2), 263–269. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00902.x>
- Galhardo, R. S., Hastings, P. J., & Rosenberg, S. M. (2007). Mutation as a stress response and the regulation of evolvability. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 42(5), 399–435. <https://doi.org/10.1080/10409230701648502>
- Gariyban, L., Huang, T., Kim, M., Wolff, E., Nguyen, A., Nguyen, T., Diep, A., Hu, K., Iverson, A., Yang, H., & Miller, J. H. (2003). Use of the rpoB gene to determine the specificity of base substitution mutations on the *Escherichia coli* chromosome. *DNA Repair*, 2(5), 593–608. [https://doi.org/10.1016/s1568-7864\(03\)00024-7](https://doi.org/10.1016/s1568-7864(03)00024-7)
- Goodman, M. F. (2002). Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 17–50. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.083101.124707>
- Hall, K. B., Sampson, J. R., Uhlenbeck, O. C., & Redfield, A. G. (1989). Structure of an unmodified tRNA molecule. *Biochemistry*, 28(14), 5794–5801. <https://doi.org/10.1021/bi00440a014>

- Hamma, T., & Ferré-D'Amaré, A. R. (2006). Pseudouridine Synthases. *Chemistry & Biology*, 13(11), 1125–1135. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.09.009>
- Hengge-Aronis, R. (2002). Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 66(3), 373–395, table of contents. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.373-395.2002>
- Hershberg, R. (2015). Mutation—The Engine of Evolution: Studying Mutation and Its Role in the Evolution of Bacteria. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(9), a018077. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018077>
- Hur, S., Stroud, R. M., & Finer-Moore, J. (2006). Substrate recognition by RNA 5-methyluridine methyltransferases and pseudouridine synthases: A structural perspective. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(51), 38969–38973. <https://doi.org/10.1074/jbc.R600034200>
- Janion, C., Bebenek, K., & Plewako, S. (1987). Are Escherichia coli dam⁻ as compared to dam⁺ hypermutable by base analogs? *Acta Biochimica Polonica*, 34(2), 183–193.
- Jatsenko, T., Tover, A., Tegova, R., & Kivisaar, M. (2010). Molecular characterization of Rif(r) mutations in Pseudomonas aeruginosa and Pseudomonas putida. *Mutation Research*, 683(1–2), 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.10.015>
- Juurik, T., Ilves, H., Teras, R., Ilmjärv, T., Tavita, K., Ukkivi, K., Teppo, A., Mikkil, K., & Kivisaar, M. (2012). Mutation frequency and spectrum of mutations vary at different chromosomal positions of Pseudomonas putida. *PLoS One*, 7(10), e48511. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048511>
- Kammen, H. O., Marvel, C. C., Hardy, L., & Penhoet, E. E. (1988). Purification, structure, and properties of Escherichia coli tRNA pseudouridine synthase I. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(5), 2255–2263.

- Kinghorn, S. M., O'Byrne, C. P., Booth, I. R., & Stansfield, I. (2002). Physiological analysis of the role of truB in Escherichia coli: A role for tRNA modification in extreme temperature resistance. *Microbiology (Reading, England)*, *148*(Pt 11), 3511–3520. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-11-3511>
- Kivisaar, M. (2003). Stationary phase mutagenesis: Mechanisms that accelerate adaptation of microbial populations under environmental stress. *Environmental Microbiology*, *5*(10), 814–827. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00488.x>
- Layton, J. C., & Foster, P. L. (2003). Error-prone DNA polymerase IV is controlled by the stress-response sigma factor, RpoS, in Escherichia coli. *Molecular Microbiology*, *50*(2), 549–561. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03704.x>
- Lecoite, F., Simos, G., Sauer, A., Hurt, E. C., Motorin, Y., & Grosjean, H. (1998). Characterization of Yeast Protein Deg1 as Pseudouridine Synthase (Pus3) Catalyzing the Formation of Ψ38 and Ψ39 in tRNA Anticodon Loop*. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(3), 1316–1323. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.3.1316>
- Lewis, J. A., & Ames, B. N. (1972). Histidine regulation in Salmonella typhimurium. XI. The percentage of transfer RNA His charged in vivo and its relation to the repression of the histidine operon. *Journal of Molecular Biology*, *66*(1), 131–142. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(72\)80011-1](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(72)80011-1)
- Lorenz, C., Lünse, C. E., & Mörl, M. (2017). tRNA Modifications: Impact on Structure and Thermal Adaptation. *Biomolecules*, *7*(2). <https://doi.org/10.3390/biom7020035>
- Löwe, H., Sinner, P., Kremling, A., & Pflüger-Grau, K. (2020). Engineering sucrose metabolism in Pseudomonas putida highlights the importance of porins. *Microbial Biotechnology*, *13*(1), 97–106. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13283>
- Luria, S. E., & Delbrück, M. (1943). Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics*, *28*(6), 491–511. <https://doi.org/10.1093/genetics/28.6.491>

- Martínez-García, E., Calles, B., Arévalo-Rodríguez, M., & de Lorenzo, V. (2011). pBAM1: An all-synthetic genetic tool for analysis and construction of complex bacterial phenotypes. *BMC Microbiology*, *11*(1), 38. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-38>
- Michaels, M. L., & Miller, J. H. (1992). The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine). *Journal of Bacteriology*, *174*(20), 6321–6325. <https://doi.org/10.1128/jb.174.20.6321-6325.1992>
- Miller, J. H. (1992). *A short course in bacterial genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Motorin, Y., & Helm, M. (2010). tRNA stabilization by modified nucleotides. *Biochemistry*, *49*(24), 4934–4944. <https://doi.org/10.1021/bi100408z>
- Nyström, T. (2004). Stationary-phase physiology. *Annual Review of Microbiology*, *58*, 161–181. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123818>
- Sampson, J. R., & Uhlenbeck, O. C. (1988). Biochemical and physical characterization of an unmodified yeast phenylalanine transfer RNA transcribed in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*(4), 1033–1037. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.4.1033>
- Spenkuch, F., Motorin, Y., & Helm, M. (2014). Pseudouridine: Still mysterious, but never a fake (uridine)! *RNA Biology*, *11*(12), 1540–1554. <https://doi.org/10.4161/15476286.2014.992278>
- Tagel, M., Ilves, H., Leppik, M., Jürgenstein, K., Remme, J., & Kivisaar, M. (2021). Pseudouridines of tRNA Anticodon Stem-Loop Have Unexpected Role in Mutagenesis in *Pseudomonas* sp. *Microorganisms*, *9*(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010025>

- Tagel, M., Tavita, K., Hõrak, R., Kivisaar, M., & Ilves, H. (2016). A novel papillation assay for the identification of genes affecting mutation rate in *Pseudomonas putida* and other pseudomonads. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 790, 41–55. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2016.06.002>
- Tegova, R., Tover, A., Tarassova, K., Tark, M., & Kivisaar, M. (2004). Involvement of error-prone DNA polymerase IV in stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, 186(9), 2735–2744. <https://doi.org/10.1128/JB.186.9.2735-2744.2004>
- Torii, N., Nozaki, T., Masutani, M., Nakagama, H., Sugiyama, T., Saito, D., Asaka, M., Sugimura, T., & Miki, K. (2003). Spontaneous mutations in the *Helicobacter pylori* rpsL gene. *Mutation Research*, 535(2), 141–145. [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(02\)00292-9](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(02)00292-9)
- Tröbner, W., & Piechocki, R. (1984). Selection against hypermutability in *Escherichia coli* during long term evolution. *Molecular & General Genetics : MGG*, 198(2), 177–178. <https://doi.org/10.1007/BF00328720>
- Tsui, H. C., Arps, P. J., Connolly, D. M., & Winkler, M. E. (1991). Absence of hisT-mediated tRNA pseudouridylation results in a uracil requirement that interferes with *Escherichia coli* K-12 cell division. *Journal of Bacteriology*, 173(22), 7395–7400. <https://doi.org/10.1128/jb.173.22.7395-7400.1991>
- Tuorto, F., & Lyko, F. (2016). Genome recoding by tRNA modifications. *Open Biology*, 6(12). <https://doi.org/10.1098/rsob.160287>
- Vincent, M. S., & Uphoff, S. (2020). Bacterial phenotypic heterogeneity in DNA repair and mutagenesis. *Biochemical Society Transactions*, 48(2), 451–462. <https://doi.org/10.1042/BST20190364>
- Watford, S., & Warrington, S. J. (2023). *Bacterial DNA Mutations*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459274/>

Wong, S. M., & Mekalanos, J. J. (2000). Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(18), 10191–10196.

<https://doi.org/10.1073/pnas.97.18.10191>

Yang, X., Wang, J., Feng, Z., Zhang, X., Wang, X., & Wu, Q. (2019). Relation of the pdxB-usg-truA-dedA Operon and the truA Gene to the Intracellular Survival of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2).

<https://doi.org/10.3390/ijms20020380>

LIHTLITSENTS

Mina, Annabel Toom

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

Pseudouridiini süntaasi TruA osalus mullabakter *Pseudomonas putida* KT2440 mutatsiooniprotsessides,

(lõputöö pealkiri)

mille juhendajateks on PhD Signe Saumaa ja PhD Heili Ilves

(juhendaja nimi)

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

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Annabel Toom

29.05.2023