

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
GENEETIKA ÕPPETOOL

**Mutantide tekkesagedust suurendavad geenid bakteris *Pseudomonas putida***

Bakalaureusetöö

Lõputöö maht (12 EAP)

Valeria Sidorenko

Juhendajad Ph.D. Maia Kivisaar, M.Sc. Kärt Ukkivi

TARTU 2017

## INFOLEHT

### **Mutantide tekkesagedust suurendavad geenid bakteris *Pseudomonas putida***

Bakterite loomulikus elukeskkonnas puutuvad nad pidevalt kokku eri liiki stressoritega. Need faktorid (nt. kemikaalid, kiirgus) kahjustavad DNA struktuuri. DNA kahjustuste korral replikatsioon peatub ning juhul, kui kahjustust ei parandata õigeaegselt, võib see raku jaoks olla letaalne. DNA vigu võivad teiktada näiteks replikatsiooni läbiviiv DNA polümeraas, DNA ja RNA omavahelised kokkupõrked, viguderohked DNA polümeraasid jm. Sellistes tingimustes ellujäämiseks on bakteritel mitmeid DNA vigu parandaivaid mehhanisme. Kuid siiski võivad vead jääda parandamata, mille tulemusena kinnistuvad need järgmise replikatsioonitsükli jooksul mutatsioonina DNA järjestuses. Käesolevas töös on püütud tuvastada gene *Pseudomonas putida* bakteris, mis osalevad mutantide tekkesageduse suurendamises ja seeläbi soodustavad bakterite evolutsioneerumist.

Märksõnad: pseudomonas, mutatsioonid, transposoonmutagenees, Rif, papillid

CERCS: B220 Geneetika, tsütogeneetika

### **Genes inducing mutant frequency in bacterium *Pseudomonas putida***

Bacteria in their natural habitat are constantly exposed to different stress causing agents. These agents (e.g. chemicals, radiation) damage the structure of DNA. When the damage occurs replication is stalled and if the damage is not repaired timely the impact of it can be lethal for the cell. Errors in DNA may be caused by replicational DNA polymerases, by collisions of DNA and RNA polymerases, by error-prone DNA polymerases et cetera. To remove the errors and survive bacteria have many DNA repair mechanisms. However, some errors are left unrepaired which may lead to formation of mutations during the next replication cycle. The aim of this work is to identify genes in *Pseudomonas putida* that participate in induction of mutant frequency and thereby contribute to evolution.

Keywords: pseudomonas, mutations, transposon mutagenesis, Rif, papillae

CERCS: B220 Genetics, cytogenetics

# SISUKORD

<b>KASUTATUD LÜHENDID .....</b>	<b>5</b>
<b>SISSEJUHATUS .....</b>	<b>6</b>
<b>KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Mutatsioonid.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Mutatsioonide tüübid .....</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Mutatsioonide tekkemehhanismid .....</b>	<b>8</b>
1.3.1 DNA polümeraasi vead.....	9
1.3.2 Transkriptsiooniga seotud mutagenees .....	9
1.3.3 SOS vastus .....	11
<b>1.4 Adaptiivne ehk statsionaarse faasi mutagenees .....</b>	<b>13</b>
<b>2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Töö eesmärk .....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Materjal ja meetodika .....</b>	<b>16</b>
2.2.1 Töös kasutatud bakteritüved, söötmed ja plasmiidid.....	16
2.2.2 Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon .....	17
2.2.3 Bakterite konjugatsioon ja transposoonmutagenees .....	17
2.2.4 Madala mutantide tekkesagedusega <i>P. putida</i> tüvede selekteerimine .....	18
2.2.5 <i>P. putida</i> Rif-resistentsete mutantide tekkesageduse määramine .....	19
2.2.6 Rif minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni määramine.....	19
2.2.7 ARB – PCR ja DNA sekveneerimine .....	20
2.2.8 Gelelektroforees .....	21
2.2.9 Statistika.....	22
2.2.10 <i>P. putida</i> ja <i>E. coli</i> PstC valkude virtuaalne analüüs .....	22
<b>2.3 Tulemused ja arutelu .....</b>	<b>23</b>
2.3.1 Tn5TAG testsüsteem ja primaarne selektsioon tuvastamiseks madala mutantide tekkesagedusega <i>P. putida</i> tüvesid .....	23
2.3.2 Madala mutantide tekkesagedusega tüvede sekundaarne selekteerimine.....	24
2.3.3 Madala mutantide tekkesagedusega transposoonmutantide testimine Rif <sup>R</sup> spontaansete mutantide tekkesageduse mõõtmise teel .....	25

2.3.4 Madalat mutatsioonisagedust põhjustavate mini-Tn5 insertioonide asukoha määramine ning inaktiveeritud geenide tuvastamine, iseloomustus ning roll mutatsioonide tekitamises .....	27
2.3.4.1 Geen <i>trxA</i> .....	27
2.3.4.2 Geen <i>PP5328</i> .....	28
2.3.5 Üldhinnang saadud tulemustele ning perspektiivid .....	31
<b>KOKKUVÕTE</b> .....	<b>33</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>35</b>
<b>KIRJANDUSE LOETELU</b> .....	<b>37</b>
<b>LIHTLITSENTS</b> .....	<b>45</b>

## KASUTATUD LÜHENDID

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

**CFU** – kolooniaid moodustavate rakkude arv (*colony forming unit*)

**DNAP** – DNA polümeraas

**Glc** – glükoos

**Km** – kanamütsiin

**LB** – lüsogeenne puljong/sööde (*lysogenic broth*)

**MBR** – mutageenne katkete parandamine (*mutagenic break repair*)

**MMR** – valepaardumisreparatsioon (*mismatch repair*)

**NER** – nukleotiidide väljalõike reparatsioon (*nucleotide excision repair*)

**Phe** – fenool

**P<sub>i</sub>** – anorgaaniline fosfaat

**Rif** – rifampitsiin

**ROS** – reaktiivsed hapnikuühendid (*reactive oxygen species*)

**RNAP** – RNA polümeraas

**TCRF** – transkriptsiooniseoseline reparatsiooni faktor (*transcription-repair coupling factor*)

**TCR** – transkriptsiooniseoseline reparatsioon (*transcription-coupled repair*)

**TLS** – kahjustatud DNA süntees (*translesion DNA synthesis*)

## SISSEJUHATUS

Mutatsioon on muutus DNA nukleotiidses järjestuses. Mutatsioonide tüüpe on mitmeid. Paljud punktmutatsioonid on asendusmutatsioonid, mis asendavad üht nukleotiidi teisega. On ka raaminihkemutatsioone, mis tekivad ühe või mitme nukleotiidi insertiooni või deletsiooni tulemusena. Need mutatsioonid võivad muuta geeni lugemisraami, mille tulemusena võivad valku lisanduda valed aminohapped või muutub selle pikkus. Selle tulemusena võib tekkida kas valesi funktsioneeriv või mittefunktsionaalne valk.

Mutatsioonide tekkepõhjusi on mitmeid ning need võivad tekkida nii spontaanselt välistegurite mõjuta raku elutegevuse käigus kui ka indutseeritult. Näiteks võib vigu võib tekitada DNA polümeraasi poolt läbi viidav replikatsioon, DNA ja RNA polümeraaside vahelised kokkupõrked, transkriptsiooniseoseline reparatsiooni faktor Mfd jm. Vältimaks mutatsioonide akumulereerumist on bakterites olevate reparatsioonisüsteemide ülesandeks eemaldada paljusid potentsiaalseid mutageenseid muutusi DNA kaksikahelas. Kuid vaatamata nendele mehhanismidele tekib siiski vigu, mis võivad DNA-s järgmise replikatsiooni käigus mutatsioonidena kinnistuda.

Mutatsioonide teket soodustab pidevalt muutuv keskkond, milles bakter viibib. Selle tagajärjel pidurdub nende jagunemine ning kasv. Sellistes rakkudes toimub statsionaarse faasi ehk adaptiivne mutagenees, mille käigus võib bakterite mutatsioonisagedus suurened (Cairns jt., 1988). Mutageneesi mehhanismid on olulised bakterite evolutsioneerumise seisukohast, kuna üldise mutatsioonisageduse suurenemisega bakteripopulatsioonis, suureneb ka tõenäosus antud keskkonnatingimuste suhtes kohasemate variantide tekkeks, mis jäävad ellu ja paljunevad edukamalt (Hall, 1998; Kivisaar, 2003, 2010). Näiteks võib mutatsioonide tulemusena suurened bakterite metaboolne aktiivsus, tekkida resistentsus erinevatele antibiootikumidele või suurened bakterite virulentsus (Han jt., 2008; Petrosino jt., 2009; Wright, 2000). Bakterites toimivad mutageneesi mehhanismid kehtivad ka inimese rakkudes, mis võivad põhjustada näiteks vähi progresseerumist ning resistentsust antibiootikumravimitele. Seetõttu ongi vaja uurida bakterite mutatsioonilisi protsesse, et mõista nende evolutsioneerumist ja patogeensuse teket ning mõista mutatsioonilisi protsesse üldiselt.

Käesoleva töö eesmärgiks oli leida bakteris *Pseudomonas putida* geene, mis osalevad mutantide tekkesageduse suurendamises ja seeläbi soodustavad bakterite evolutsioneerumist.

# KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Mutatsioonid

Mutatsioon on muutus organismi DNA nukleotiidses järjestuses, millega võib kaasneda fenotüübiline muutus. Termin "mutatsioon" võttis esimesena kasutusele hollandi bioloog Hugo de Vries ja see on tuletatud ladinakeelsest sõnast tähendusega "muutama" (Heimans, 1962). Juhul kui vigu DNA ahelast ei eemaldata ega parandata, kinnistuvad need järgmise DNA replikatsioonitsükli jooksul mutatsioonidena. Mutatsioone võib tekkida mõne füüsilise või keemilise mutageeni toimel (indutseeritud mutatsioonid) kui ka tavatingimustes bakteri elutegevuse käigus (spontaanselt).

Mutatsiooni tüüpe ning nende tekkemehhanisme on erinevaid. Tekkinud mutatsioonid võivad olla kas kasulikud (soodustavad kohastumist), kahjulikud (vähendavad kohastumist või põhjustavad letaalsust) või neutraalsed (väga väike või mitte mingi mõju kohastumisele). Vältimaks kahjulike mutatsioonide akumulierumist on bakterites geneetilise materjali terviklikkuse tagamiseks mitmeid erinevaid DNA kahjustusi parandavaid või ära hoidvaid süsteeme. Järgnevates peatükkides kirjeldatakse täpsemalt mutatsioonide tüüpe ning nende tekkemehhanisme.

## 1.2 Mutatsioonide tüübid

Mutatsiooni tagajärjel võib DNA järjestus muutuda mitmel viisil. Mutatsioonidel on erinev mõju organismile sõltuvalt sellest, kas nad tekivad ja kas nad muudavad geeni produkti, kas RNA või valgus, funktsiooni. Kui mutatsioon tekib geenis, siis võib see geeni funktsiooni häirida. Põhilised mutatsioonide liigid on:

- Asendus- ehk punktmutatsioonid – üks nukleotiid DNA-s asendub teisega
  - Transitsioon – puriin (adeniin; guaniin) asendatakse teise puriiniga või pürimidiin (tümiin; tsütosiin; RNA puhul ka uratsiil tümiini asemel) asendatakse teise pürimidiiniga.
  - Transversioon – puriin asendub pürimidiiniga või vastupidi.

Asendusmutatsioone võib vastavalt nende toimele jaotada:

- Missenssmutatsioon – muudatus ühes DNA aluspaaris, mille tulemusena geeni poolt kodeeritud valgus üks aminohape asendatakse teisega. Põhjustab uue aminohappe lülitumise polüpeptiidi.

- Nonsenssmutatsioon – muutus DNA järjestuses, mille tulemusena sünteesitakse lühem lõpetamata valguprodukt. Nonsenssmutatsioon tekib juhul, kui DNA järjestusse tekib enneaegne stoppkoodon. Stoppkoodonid ei kodeeri aminohapet vaid valgusünteesi terminatsiooni signaali, mistõttu on enneaegse stoppkoodoni tagajärjeks valesti funktsioneeriv või mittefunktsionaalne valk.
  - Vaikiv ehk sünonüümne mutatsioon – mutatsioon DNA-s, mis ei muuda üldse või märkimisväärselt organismi fenotüüpi. Juhul kui mutatsioon tekib geenis, siis kodeerib muteerunud koodon sama või sarnaste omadustega aminohapet.
- Raaminihke mutatsioonid – seda tüüpi mutatsioon tekib siis, kui DNA aluste lisandumine või eemaldamine muudab geeni lugemisraami, mille tulemusena muutub alates mutatsioonikohast valgu aminohappeline järjestus. Raaminihke mutatsioone põhjustavad:
    - Insertioonid – muutub DNA aluspaaride arv ühe või mitme nukleotiidi lisandumisel esialgsesse ahelasse. Selle tulemusena muutub insertiooni kohast lugemisraam (kui ei ole tegemist just 3, 6, jne. nukleotiidi lisandumisega). Lisaks valgu aminohappeline järjestus muutumisele muutub ka translatsiooni stoppkoodoni asukoht, mistõttu sünteesitakse algsest lühem või pikem valk.
    - Deletsioonid – muutub DNA aluspaaride arv nukleotiidide kadumise tõttu DNA-st. Väikese deletsiooni tulemusena võib kustuda üks või mitu aluspaari geenist, samal ajal kui suuremad deletsioonid võivad põhjustada terve geeni või mitme naabergeeni kadumise. Sarnaselt insertioonidele võib ühe või mitme aluspaari deletsioon põhjustada muutusi lugemisraamis ning stoppkoodoni asukohas.
  - Inversioonid – kui DNA on korruga kahest kohast katkenud, siis mõnikord võib regioon kahe katkestuse vahel ümber pöörduda 180° kraadi piirkonna taasühinemisel kaksikahelaga. Inversiooni tulemusena ei muutu geneetilise materjali kogus.

### 1.3 Mutatsioonide tekkemehhanismid

Mutatsioonid võivad tekkida nii indutseeritult kui ka spontaanselt välistegurite mõjuta raku elutegevuse käigus. Bakterirakus olevate reparatsioonisüsteemide ülesandeks on eemaldada paljusid potentsiaalseid mutageenseid muutusi DNA kaksikahelas. Vaatamata nendele

mehhanismidele tekib siiski vigu, mis võivad mutatsioonidena kinnistuda. Spontaansete mutatsioonide tekkepõhjusti on mitmeid, näiteks vead DNA replikatsioonil, parandamata jäänud DNA kahjustused jm. Järgnevates alapeatükkides on täpsemalt kirjeldatud mehhanisme, mis tekitavad mutatsioone.

### 1.3.1 DNA polümeraasi vead

Bakterites on peamiseks DNA replikatsiooni läbiviivaks ensüümiks DNA polümeraas III (DNAP III) holoensüüm (Moras ja Argos, 1990). See polümeraas sisaldab  $\epsilon$  subühikut, mis vastutab DNA replikatsiooni käigus valesti paardunud nukleotiidide eemaldamise eest (Crow ja McHenry, 1978).  $\epsilon$  subühik skanneerib pidevalt sünteesitavat DNA ahelat ja juhul kui leitakse ahelasse valesti sünteesitud nukleotiid, eemaldatakse see tänu  $3' \rightarrow 5'$  eksonukleaassele aktiivsusele (*proofreading*) (Livingston ja Richardsons, 1975). Seega kontrollib DNAP õige nukleotiidi valikut ning parandab enda tehtud vigu tänu *proofreading*'u aktiivsusele.

Hoolimata valesti lisatud nukleotiidide eemaldamisest teeb DNAP siiski replikatsioonil vigu. DNA polümeraasi poolt tehtavateks vigadeks võivad olla aluste asendusmutatsioonid, mis tekivad, kui polümeraas ei tuvasta replitseeritavas ahelas alust ära. Veel üks vigadest, mida DNAP teeb, on insertsioonid. Need tekivad siis, kui polümeraas libiseb DNA ahelal tagasi. Samuti tekivad ka deletsioonid, kui DNAP libiseb nukleotiididest üle. *E. coli* rakkudes tekib deletsioone  $2,2 \times 10^{-5}$  genoomi kohta ühe generatsiooni jooksul (Lee jt., 2016). Insertsioonide ja deletsioonide teket võib põhjustada see, kui replitseeritav DNA sisaldab lühikesi kordusjärjestusi, mis võivad põhjustada replikatsiooni libisemist, milles matriitsahel ja selle koopia nihutavad nende suhtelist asendit ja mille tõttu osa ahelast on kopeeritud kas kaks korda või hoopis välja jäetud. Viguera jt. on välja pakkunud järgmise DNAP libisemise mudeli: 1) DNAP replitseerib otsekordusjärjestust (*direct repeat*); 2) DNAP peatub ja lahkub äsja sünteesitud ahelalt; 3) see ahel eemaldub matriitsist ning taasühineb teise komplementaarse otsekordusjärjestusega; 4) DNAP ühineb uuesti sünteesitava ahelaga ning replikatsioon jätkub (Viguera jt., 2001).

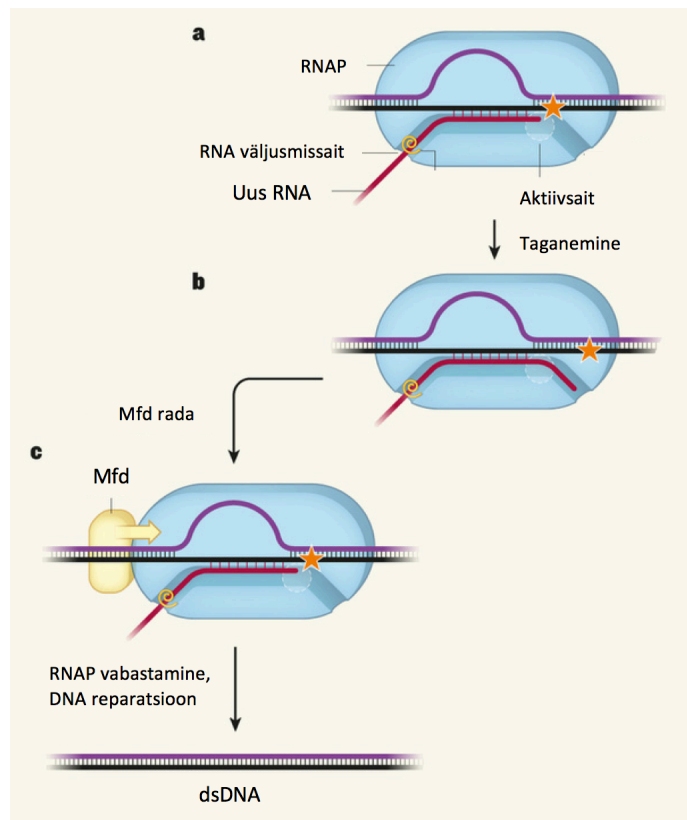
### 1.3.2 Transkriptsiooniga seotud mutagenees

Transkriptsiooni ajal harutatakse transkribeeritav DNA kaksikahel lahti. ssDNA on aga palju kättesaadavam DNA-d kahjustavatele ühenditele, millede hulka kuuluvad ka rakus elutegevuse käigus tekkivad ühendid (Bremer ja Dennis, 1987; Coulondre jt., 1978). Kuna bakterites toimuvad DNA replikatsioon ja transkriptsioon samaaegselt, siis sagedased replikatsiooni ning

transkriptsiooni läbiviivate ensüümkomplekside omavahelised kokkupõrked on vältimatud (Brewer, 1988; Davies ja Nomura, 1972). On nähtud, et aktiivselt transkribeeritavates DNA regioonides on mutatsioonide tekkesagedus suurenenud (Aguilera, 2002). Transkriptsiooniga seotud mutageneesi on nähtud bakteri *Escherichia coli* puhul nii kromosomaalses kui ka plasmiidises DNA-s (Beletskii ja Bhagwat, 2001). Ka bakteris *Pseudomonas putida* on näidatud, et transkriptsiooni taseme tõustes suureneb mutatsioonide tekkesagedus (Juurik jt., 2012).

Vigu DNA-s võib tuvastada ka transkribeeriv RNA polümeraas (RNAP). Jõudes veani transkribeeritavas ahelas, RNA polümeraas peatub selle kohal, varjates esialgu DNA reparatsiooni valkude eest viga, kuid initsieerib transkriptsiooniga seotud reparatsiooni (TCR – *transcription-coupled repair*) toimumist nukleotiidi väljalõike reparatsiooniraja (NER – *nucleotide excision repair*) kaudu (Selby ja Sancar, 1993). DNA-l peatunud RNAP tunneb ära transkriptsiooniga seotud reparatsiooni faktor (TRCF, *transcription-repair coupling factor*) Mfd (*Mutation frequency decline*) (Selby jt., 1991), mis seondub RNAP-ga ja ‘‘lükab’’ selle DNA ahelalt maha ning suunab kahjustusele NER raja valgud (Savery, 2007). Transkriptsiooniga seotud reparatsiooni rada on kujutatud joonisel 1. Näiteks bakteris *E. coli* on nähtud, et transkribeeritavast DNA ahelast eemaldatakse vead kiiremini (Mellon ja Hanawalt, 1989).

Kuigi Mfd on oluline valk DNA kahjustuste parandamises ja seeläbi mutatsioonisageduse vähendamises, on siiski nähtud, et Mfd osaleb ka mutatsioonide tekitamises bakterites nagu *Bacillus cereus* ning *Campylobacter jejuni* (Guillemet jt., 2016; Han jt., 2008). Siiski on TCR osalust mutatsiooniprotsessides veel vähe uuritud.



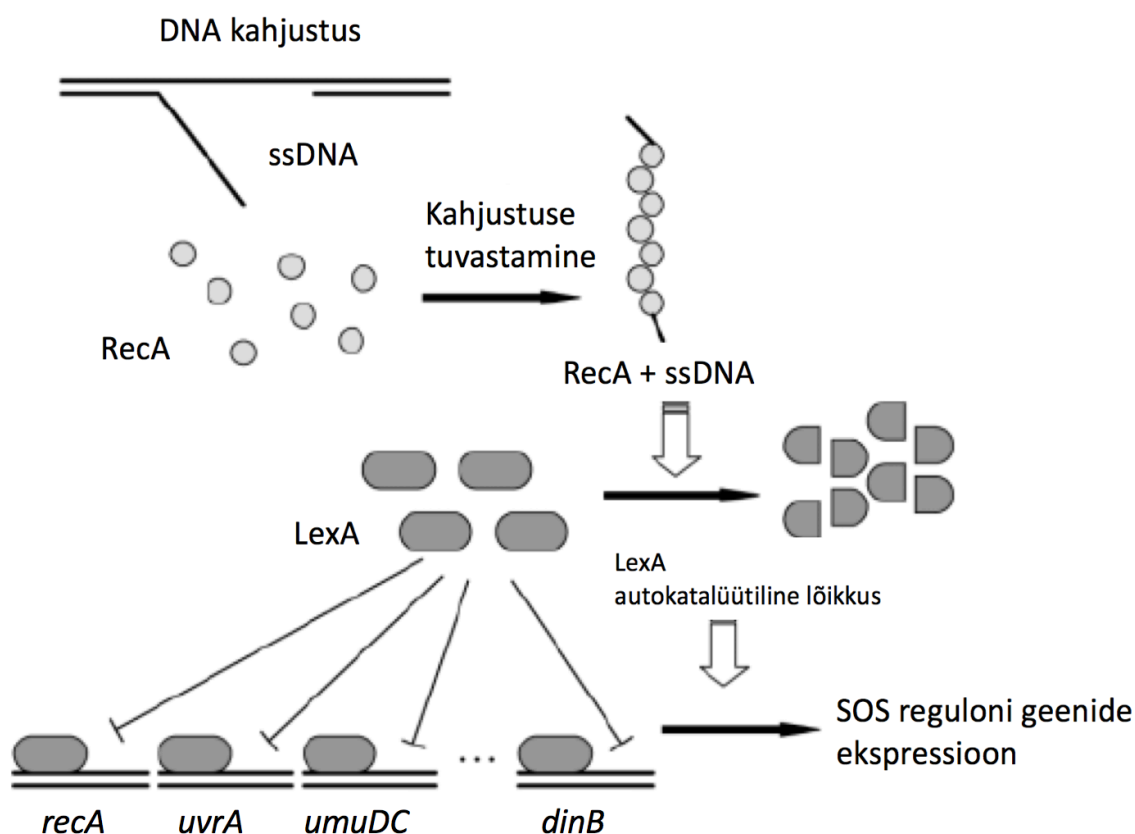
**Joonis 1. Transkriptsiooniga seotud reparatsioonirada bakterites** (joonis muudetud kujul artiklist Artsimovitch, 2014). A) Transkriptsiooni kompleksis DNA ahelad lahutuvad teineteisest, moodustades transkriptsioonimulli ning mittetranskribeeritav ahel (lilla) on transkriptsioonimullist väljas. B) jõudes veani DNA-s (oranž täht) RNAP taganeb DNA-l ning RNA satub aktiivsaidist välja. C) Mfd valk (kollane) tunneb peatunud polümeraasi ära, seondub sellega ning "lükkab" RNAP ahelalt maha, suunates NER-i raja valke vigasele ahelale. Selle tulemusena käivitub NER-i rada ja viga eemaldatakse.

### 1.3.3 SOS vastus

SOS vastus aktiveeritakse bakterites DNA kahjustuste korral (Radman, 1975). On näidatud, et SOS vastus on indutseeritud pärast kokkupuudet erinevate stressoritega ning see mängib olulist rolli DNA kahjustuste parandamises, bakterite stressitaluvuses ja geneetilise varieeruvuse suurendamises (Cairns jt., 1988; Hall, 1988).

Stressivabades tingimustes on SOS reguloni kuuluvate geenide pidev ekspressioon maha surutud juba transkriptsiooni tasemel, kuna see võib bakteritele olla kurnav ning kahjulik. Transkriptsiooni kõigilt SOS reguloni geenidelt represserib LexA valk, mis seondub spetsiifilisele geeni ees olevale DNA regioonile, mida kutsutakse SOS kastiks (SOS *box*) (Thliveris jt., 1991). Selle tulemusena ei saa RNAP promootorile seonduda ning geeni transkriptsiooni ei algatata.

Juhul kui DNA ahelas on kahjustus, peatatakse replikatsioon ning rakkudesse tekib üksikahelaline DNA. ssDNA-ga seondub RecA valk (Shibata, 1987), mis moodustab ssDNA-ga nukleoproteiinfilamendi (RecA valgu aktiivne vorm) (Dutreix jt., 1992; Stasiak jt., 1984). Aktiveeritud RecA vahendusel toimub LexA valgu autokatalüütiline lõikus, mille tagajärjel funktsionaalse LexA repressorvalgu hulk rakkudes väheneb ning saab võimalikuks SOS reguloni kuuluvate geenide transkriptsiooni initsiatsioon (skeem on kujutatud joonisel nr 2). Selle tulemusena ekspresseeritakse mitmeid DNA kahjustusi parandavaid gene nagu *uvrA*, *uvrB* (Kenyon ja Walker, 1981), *recA* (Casaregola jt., 1982), *ruvA* ning *ruvB* (Shurvinton ja Lloyd, 1982).



**Joonis 2. *Escherichia coli* SOS vastuse indutseerimise skeem** (joonis muudetud kujul artiklist Sutton jt., 2000). RecA valgu aktiveerumine põhjustab repressori LexA autokatalüütilise lõikkuse ning SOS vastuse geenid saavad ekspresseeruda.

Lisaks reparatsioonivalkudele suureneb ekspressioonitase ka DNA polümeraasidel, mis on võimelised replitseerima kahjustatud DNA-d (Bonner jt., 1988). Need polümeraasid on küll võimelised sünteesima DNA-d kahjustatud kohalt (*translesion DNA synthesis, TLS*), kuid selline DNA süntees võib olla vigaderohke (Friedberg jt., 2000). TLS polümeraase kodeerivad geenid *dinB* (pol IV) (Layton ja Foster, 2003), *umuDC* (pol V) (Bagg jt., 1981) ja *polB* (pol II). DNA polümeraasid pol IV ja pol V viivad enamasti läbi vigaderohket TLS-i, põhjustades

seeläbi mutatsioonide teket, kuid on ka kahjustusi, mida nad ületavad täpselt (Reuven jt., 1999; Tang jt., 1999; Wagner jt., 1999).

*E. coli*-s toimub polümeraasde valik, mis ületavad DNA kahjustusi, sõltuvalt DNA kahjustuse iseloomust ning järjestusest, milles kahjustus esineb. DNA polümeraas V (Reuven jt., 1999; Tang jt., 1999) võimaldab replikatsiooni jätkamist üle suuremahuliste kahjustuste või vigade DNA ahelas (Friedberg jt., 1995). Tang jt. (Tang jt., 2000) näitasid, et SOS valg RecA aktiveerib DNA pol V, suunates selle otse kahjustatud DNA saiti ning pol V ja ka pol II on võimelised indutseerima raaminihke mutatsioone (Napolitano, 2000). On ka nähtud, et pol IV üleekspressioon *E. coli*-s tõstab raaminihke mutatsioonide teket plasmiidis umbes 1000 korda (Kim jt., 1997).

#### 1.4 Adaptiivne ehk statsionaarse faasi mutagenees

Tingimused, mis võimaldavad pidevat bakterite kasvu, on looduses harva esinevad. Bakterite kiire kasvu korral saavad vajalikud toitained varsti otsa ning toksiliste jääkainete kontsentratsioon muutub liiga kõrgeks, mille tulemusena rakkude kasv ja paljunemine pidurdub. Pidevalt muutuv keskkond ja bakterite omavaheline konkurents sunnivad baktereid kiiresti kohanema. Toitainete suhtes vaestes ning karmides elutingimustes ellu jäämiseks on bakterirakus täheldatud statsionaarse faasi mutageneesi ehk adaptiivset mutageneesi (Foster, 1993, 1999). Adaptiivsed mutatsioonid on spontaanselt tekkinud mutatsioonid mittejagunevates või väga aeglaselt jagunevates ning pikemat aega stressi all kannatavates mikroorganismide populatsioonides. Stressitingimustes võib mutatsioonisagedus suurened (Cairns jt., 1988). Seoses üldise mutatsioonisageduse suurenemisega bakteripopulatsioonis suureneb ka tõenäosus antud keskkonnatingimuste suhtes kohasemate variantide tekkeks, mis jäävad ellu ja paljunevad edukamalt (Hall, 1998; Kivisaar, 2003, 2010). Kasulikeks võivad osutuda mutatsioonid, mis suurendavad bakterite metabolismi aktiivsust ning tekitavad resistentsust erinevatele antibiootikumidele (Han jt., 2008; Petrosino jt., 2009; Wright, 2000). On näidatud, et kui laktoosil mittekasvavaid *E. coli* baktereid nälgutada laktoosi sisaldaval söötmel, siis hakkavad suure sagedusega tekkima laktoosi lagundavad mutandid ehk Lac<sup>+</sup> revertandid (Cairns jt., 1988).

Kuna adaptiivsed mutatsioonid võimaldavad bakteritel, kellel on kasv pärsitud, uuesti kasvu jätkata, siis antibiootikumide poolt pärsitud bakterid võivad uuesti kasvama hakata antibiootikumi olemasolul tänu antibiootikumidele resistentsust põhjustanud spontaansetele mutatsioonidele, mis põhjustavad muutusi geeni järjestuses ning geeni ekspresseerumises (Viswanathan, 2014). Seetõttu toimub kiire antibiootikumresistentsete bakterite teke ja levik

terves maailmas, ohustades antibiootikumide efektiivsust (Aminov, 2009; Golkar jt., 2014; Gould ja Bal, 2013). Sellist järsku ja kiiret antibiootikumi resistentsuse levikut nimetatakse antibiootikumresistentsuse kriisiks, mille põhjusteks peetakse nende ravimite liigset või vale tarbimist, samuti ka piiratud uute antibiootikumide väljatöötamist farmaatsiatööstuses (Gould ja Bal, 2013; Sengupta jt., 2013). Antibiootikumi resistentsus võib bakterites levida resistentsust tagavate geenide omandamisel horisontaalse geeniülekanega geneetiliste elementide nagu näiteks plasmiidide koosseisus. Selline horisontaalne geeni ülekanne võimaldab antibiootikumi resistentsusgeenide ülekannet ka erinevate bakteriliikide vahel, soodustades sel viisil antibiootikumide resistentsuse levikut (Read ja Woods, 2014). On näidatud, et madal antibiootikumi tase bakterite elukeskkonnas on suurt rolli mänginud *Pseudomonas aeruginosa* tüvede mitmekesisustumisel (Wright jt., 2013). Samuti on *E. coli* puhul nähtud, et adaptiivsed mutatsioonid põhjustavad resistentsust antibiootikumile tsiprofloksatsiin (Riesenfeld jt., 1997). Seetõttu on tähtis õigete antibiootikumide õigeaegne kasutamine vältimaks antibiootikumresistentsete bakterite niivõrd kiiret levikut.

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 Töö eesmärk

Rakkude funktsioneerimiseks ning ellu jäämiseks on vajalik DNA korrektne paljundamine. Vead DNA-s võivad põhjustada mutatsioone, defektseid valke ja isegi raku surma. Vigade teket võivad põhjustada nii rakusisesed (DNA replikatsiooni käigus tekkivad vead, reaktiivsed hapnikühendid) kui ka rakuvälised (kemikaalid, kiirgus) tegurid. Parandamata jäänud vead kinnistuvad järgneva replikatsioonitsükli käigus mutatsioonidena.

Pidevalt muutuvad ning rakkudele ebasoodsad keskkonnatingimused põhjustavad bakteritele pidevalt stressi, mille tagajärjel pidurdub nende jagunemine ja kasv. Sellistes rakkudes toimub adaptiivne ehk statsionaarse faasi mutagenees, mille käigus võib rakkude mutatsioonisagedus suurened (Cairns jt., 1988). Kuna üldine mutatsioonisagedus suureneb bakteripopulatsioonis, siis suureneb ka tõenäosus, et antud keskkonnatingimuste suhtes tekkivad kohasemad variandid, millel on parem soodumus jääda ellu ja paljuneda edukamalt (Hall, 1998; Kivisaar, 2003, 2010). Bakterite jaoks on kasulikud sellised mutatsioonid, mis suurendavad nende metaboolset aktiivsust ning tekitavad resistentsust erinevatele antibiootikumidele (Han jt., 2008; Petrosino jt., 2009; Wright, 2000). Seega on mutageneesi mehhanismid olulised patogeensete bakterite evolutsioneerumise seisukohast (resistentsus antibiootikumidele, suurenenud viruletsus jm.).

Antud töö eesmärgiks oli kasutades Tn5TAG testsüsteemi ning transposoonmutageneesi leida ning tuvastada geene, mis suurendavad mutantide tekkesagedust bakteris *Pseudomonas putida*. Antud testsüsteem võimaldab tuvastada mutantide tekkesagedust igas üksikkolonias eraldi ja võimaldab seetõttu identifitseerida transposoonmutante, kus mutatsioonisagedus on kas suurenenud või vähenenud mõne mutatsioonisagedust mõjutava geeni inaktiveerimise tõttu transposooni insertiooni tagajärjel.

## 2.2 Materjal ja meetodika

### 2.2.1 Töös kasutatud bakteritüved, söötmed ja plasmiidid

Minimaalsöötmena kasutasime M9 baasil valmistatud söödet (Adams, 1959) ning täissöötmena LB-söödet (Miller, 1972). Minimaalsööde sisaldas lisaks M9-le veel aminohapete hüdroolüsaati (CAA, lõppkontsentratsiooniga 0,2%), mikroelementide lahust (2,5 ml/l) (Bauchop ja Elsdén, 1960) ning süsinikuallikana glükoosi (Glc) lõppkontsentratsiooniga 10 mM. Vajadusel lisati söötmesse fenooli (Phe) lõppkontsentratsiooniga 2,5 mM ning Kongopunast lõppkontsentratsiooniga 0,1 mg/ml. Tardsöötme saamiseks on lisatud vedelsöötmele agarit (15 g/l).

Bakteritüvede ning plasmiidide selektsiooniks kasutasime järgnevaid antibiootikume: kanamütsiini (Km; 50 µg/ml) ja rifampitsiini (Rif; 100 µg/ml). *P. putida* tüvesid kasvasime temperatuuril 30°C ja *E. coli* tüvesid temperatuuril 37°C. Vedelsöötmes kasvatamisel aereerisime kultuure loksutil (180 pööret/min).

Töös kasutatud bakteritüved ning plasmiidid on leitavad tabelis 1.

**Tabel 1. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid.**

Bakteritüvi või plasmiid	Genotüüp või iseloomustus	Allikas
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
CC118λpir	$\Delta(ara-leu) araD \Delta lacX74 galE galk$ $phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE$ (Am)	Herrero jt., 1990
HB101	subE44 subF58 hsdS3 (rB-mB-) recA13 proΔ2 lacY1 galk2 rsp20 xyl-5 mt1-1	Boyer ja Roulland-Dessoix, 1969
<b><i>Pseudomonas putida</i></b>		
PaW85	<i>P. putida</i> algne tüvi	Bayley jt., 1977
PaWTn5TAGΔuvrD	PaW85 tüvi, millest on deleteeritud <i>uvrD</i> geen ja sisaldab lookuses PP_3610 Tn5TAG testsüsteemi	K. Ukkivi avaldamata andmed

---

## Plasmiidid

pRK2013	abiplasmiid konjugatsioonil (Km <sup>r</sup> )	Figurski ja Helinski, 1979
pBAM1Tn5Km	mini-Tn5 edastamise plasmiid (Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> )	Martínez-García jt., 2011

### 2.2.2 Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon

Plasmiidi viimiseks bakterirakkudesse tuleb bakterirakkude membraan muuta DNA-le läbitavaks. Selleks kasvatati *E. coli* rakke üleöö 1,5 ml-s LB-vedelsöötmes 37°C termostaadis. 200 µl saadud üleööökultuuri lahjendati värskesse 1,5 ml LB söötmesse ning kasvatati ~ 2 tundi 37°C loksutil, et saada rakud eksponentsiaalsesse kasvufaasi. Seejärel rakke tsentrifuugiti söötimest välja „BioFresco“ külmas fuugis (4°C) ja pesti 3 korda 700 µl 10% glütserooliga. *E. coli* rakud võeti üles 50 µl 10% glütseroolis. Vältimaks desoksüribonukleaaside tööd hoiti rakke ja lahuseid pidevalt jääl.

Plasmiidse DNA viimiseks kompetentsetesse *E. coli* CC118λpir rakkudesse kasutasime elektroporatsiooni. Kompetentsetele rakkudele lisasime plasmiidset DNA-d ning viisime läbi elektroporatsiooni “BioRad” elektroporaatoriga “*E. coli* pulser” pingel 2500 V. Seejärel lisasime rakkudele 1,5 ml LB söödet ja kasvasime rakke tund aega temperatuuril 37°C. Sellele järgnevalt plaatisime rakud sobivale selektiivsöötmele.

### 2.2.3 Bakterite konjugatsioon ja transposoonmutagenees

Selleks, et tuvastada mutantide tekkesagedust mõjutavaid gene, viisime läbi transposoonmutageneesi testertüves *P. putida* PaWTn5TAGΔuvrD. Transposoonmutageneesi läbiviimiseks kasutasime plasmiidi pBAM1Tn5Km (Tagel jt., 2016), mis sisaldab minitransposooni kanamütsiini resistentsusgeeniga. Konjugatsiooni jooksul kandub pBAM1Tn5Km plasmiid *P. putida* rakkudesse üle ning toimub transposooni inserteerumine selle genoomi.

Selleks, et *P. putida* rakkudesse sisse viia eelpool nimetatud plasmiid, kasutati konjugatsiooni protsessis doonorrakke *E. coli* CC118λpir. See tüvi sisaldab kromosoomis *pir* geeni, mis kodeerib pBAM1Tn5Km plasmiidi replikatsiooniks vajalikku π valku. Plasmiid pBAM1Tn5Km on suitsiidplasmiid, mis suudab replitseeruda vaid *E. coli* CC118λpir tüves

ning elimineerub *P. putida* rakkudest. See võimaldab ainult minitransposooni ülekannet bakterirakkudesse, uuritavasse tüvesse minitransposooni kandev plasmiid püsima ei jää. Kuna tüvi CC118λpir ei suuda ise plasmidi teise bakterirakku üle kanda, siis kasutasime lisaks ka helpertüve *E. coli* HB101, mille sisse on viidud pBAM1Tn5Km plasmidi konjugatsiooniks vajalikke valke kodeeriv plasmiid pRK2013.

Kõiki tüvesid kasvatati eraldi 1,5 ml antibiootikumita LB söötmes 1-2 tunni jooksul, et saada need eksponentsiaalsesse kasvufaasi. Järgnevalt segati 100 µl doonori, 100 µl helperplasmidi sisaldava tüve ja 100 µl retsipienttüve kultuure kokku ning asetati kogu segu LB tardsöötmele. Selles etapis toimus DNA transformatsioon ehk ülekanne. Kuna retsiipienttüveks on *P. putida* rakud ning nende kasvu optimumtemperatuuriks on 30°C, siis kasvatati rakke üleöö vastavas termostaadis. Üleöö LB-tassil kasvanud rakud suspendeeriti 1 ml M9 puhvrts. Transposoonmutantide selekteerimiseks tegime saadud segust 50- ja 100-kordsed lahjendused ning plaatisime rakud sobivale selektiivsöötmele.

#### 2.2.4 Madala mutantide tekkesagedusega *P. putida* tüvede selekteerimine

Selleks, et selekteerida madala mutantide tekkesagedusega *P. putida* tüvesid, kasutasime primaarse seleksioonina kõrge mutatsiooni sagedusega tüvesse PaWTn5TAGΔ*uvrD* sisse viidud asendusmutatsioone tuvastavat Tn5TAG testsüsteemi (joonis 4), mis võimaldas mutantide tekksagedust jälgida üksikkolooniate tasemel. Meid huvitasid kolooniad, kus mutatsioonisagedus oli transposoonmutageneesi tagajärjel vähenenud.

Tn5TAG testsüsteemi puhul on fenooli monooksügenaasi geeni *pheA* 22. koodon (Leu) asendatud stopkoodoni TAG-ga ning mutatsioonisagedust on võimalik hinnata fenooli lagundavate (Phe<sup>+</sup>) revertantide tekkesageduse järgi fenooli sisaldaval minimaalsöötmel (Tegova jt., 2004). Funktsionaalne fenooli monooksügenaasi geen *pheA* võimaldab fenooli kasutada süsinikuallikana. *pheA* geeni transkriptsioon Tn5TAG testsüsteemis on indutseeritud P<sub>tac</sub> promootori poolt. Transposoonmutante selekteerisime kongopunase, glükoosi, fenooli ja kanamütsiini sisaldaval söötmel. Glükoos oli söötmes *P. putida* rakkudele primaarseks süsinikuallikaks, kanamütsiin võimaldas kanamütsiini resistentsusgeeni sisaldavat minitransposooni omavate transposoonmutantide selekteerimist, fenooli olemasolu söötmes võimaldas jälgida fenooli lagundavate mutantide teket koloonia pinnale mikrokolooniate (papillide) näol ning kongopunane võimaldas tekkinud mutantide paremat visualiseerimist. Primaarne süsinikuallikas (glükoos) võimaldab kolooniate moodustamist ning juhul kui mutatsioonide toimel taastub fenooli kasutamist võimaldav geen *pheA*, saavad rakud kasutada sekundaarset süsinikuallikat fenooli ja moodustada varem tekkinud kolooniate pinnale uue

Phe<sup>+</sup> koloonia ehk papilli. Kuna töö eesmärgiks oli leida gene, mis tõstavad *P. putida* testertüves PaWTn5TAGΔ*uvrD* mutantide tekkesagedust, siis valisime välja need kolooniad, millel oli plaatimise järgselt 10-ndaks päevaks moodustunud vähe või ei ühtegi papilli. Testertüves oli mutantide tekkesagedus kõrge ning madal papillide arv näitab, et mutantide tekkesagedus on langenud transposooni insertiooni tulemusena mingisse geeni, mis mõjutab mutatsioonisagedust.

Transposoonmutantide sekundaarseks selektsiooniks oli väheste papillidega kolooniate paralleelkylv Rif antibiootikumi sisaldavale LB-tassile. See võimaldas umbkaudset mutantide tekkesageduse hindamist. Rif<sup>+</sup> mutantide kasvu puudumine Rif-LB tassil näitas madalat mutantide tekkesagedust saadud tüvedes. Edasiseks uuringuks valisime transposoonmutandid, mis ei moodustanud üldse või moodustasid vähe kolooniaid külvijoonel (vt peatükk 2.2.5).

### 2.2.5 *P. putida* Rif-resistentsete mutantide tekkesageduse määramine

Selleks, et määrata spontaansete mutantide arvuline tekkesagedus transposoonmutageneesi tulemusena saadud tüvedes, tegime uuritavatele tüvedele eelkasvatuse 4-6 tunni jooksul 1 ml CAA+Glc söötmes, milles oli puhvriks M9. Pärast seda tegime 10<sup>3</sup>-10<sup>5</sup> kordse lahjenduse uude glükoos+CAA söötmesse, jagasime 2,3 ml kaupa laiali katseklaasidesse ja kasvasime 20-24 tundi 30°C juures loksutil aereerides. Seejärel plaatisime 20 - 500 µl igast kultuurist 100 µg/ml Rif sisaldavale LB tardsöötmele ja inkubeerisime temperatuuril 30°C termostaadis. Tekkinud Rif<sup>R</sup> kolooniaid loendasime plaatimisjärgselt 1. ja 2. päeval. Rif<sup>R</sup> mutantide tekkesageduse arvutasime bakteripopulatsiooni elusrakkude (CFU) kohta.

1 ml kultuuris elusrakkude määramiseks tegime 20-24 tundi kasvanud kultuurist 10 kordsed lahjendused M9 lahuses ja täpitasime LB tassile. Elusrakkude hulk 1 ml kultuuri kohta arvutasime välja, arvestades tehtud lahjendust ja tekkinud kolooniate arvu. Tasse inkubeerisime temperatuuril 30°C. Mutantide tekkesagedus arvutati valemiga:

$$\text{Mutantide tekkesagedus} = \frac{\text{Rif resistentsete mutantide arv 1 ml kohta}}{\text{elusate rakkude arv 1 ml} - s}$$

### 2.2.6 Rif minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni määramine

Selleks, et määrata rifampitsiini minimaalset inhibeerivat kontsentratsiooni (MIC; ingl k – *minimal inhibitory concentration*), kasvatati baktereid Glc+CAA söötmes üleöö temperatuuril 30°C loksutil. Üleöö kasvanud kultuuridest tehti 10<sup>4</sup>-kordsed lahjendused uude Glc+CAA söötmesse, kanti mikrotiiterplaadile ja lisati rifampitsiini lõppkontsentratsiooniga 3,125-100

µg/ml. Mikrotiiterplaati inkubeerisime 24 tundi temperatuuril 30°C loksutil ning seejärel mõõtsime bakterikultuuride optilist tihedust (OD 580; masinaga Magellan 6, TECAN Sunrise).

### 2.2.7 ARB – PCR ja DNA sekveneerimine

Minitransposooni Tn5Km ja Tn5TAG testsüsteemi insertsioonide asukoha kindlaks tegemiseks *P. putida* kromosoomis kasutasime ARB-PCR-i. Kasutatud praimerid on välja toodud tabelis 2.

ARB-PCR koosnes kahest etapist. Esimeses etapis tekkivate juhusliku pikkusega DNA fragmentide saamiseks on kasutatud praimerit ARBtel1 või ME-I-uus ja kõdupraimerit ARB6 10 pmol reaktsiooni kohta. Kõdupraimeri 3'-otsas asub 5 - 6 nukleotiidi pikkune linkerregioon, mis kordub uuritava organismi genoomis sageli ja on valitud *P. putida* kromosoomiga seondumise sageduse alusel. Järgnev 10-ne nukleotiidi pikkune regioon sisaldab juhuslikus järjekorras kõiki nelja nukleotiidi. Kõdupraimeri 5'-ots on konserveerunud ja sisaldab järjestust, millega teises etapis seondub praimer ARB2. ARB-PCR esimese etapi tingimused olid järgmised: DNA denaturatsioon toimus temperatuuril 96°C 30 sekundit, praimerite seondumine temperatuuril 30°C 30 sekundit, DNA süntees temperatuuril 72°C 1,5 minutit, kokku 6 tsüklit. Sellele järgnes 30 tsüklit, kus DNA denaturatsioon toimus temperatuuril 96°C 30 sekundit, praimerite seondumine temperatuuril 45°C 30 sekundit ja DNA süntees temperatuuril 72°C 2 minutit.

ARB-PCR teises etapis seondub kasutatav praimerite paar esimese paari poolt moodustunud PCR produktidele. Võtsime teise ARB - PCR etappi 0,5 µl esimese etapi produkti ja kasutades praimerit ARBtel2 või KmO ja kõdupraimerit ARB2 amplifitseerisime esimese etapi produkte. Teise etapi reaktsioon toimus tingimustes: DNA denaturatsioon temperatuuril 96°C 30 sekundit, praimerite seondumine temperatuuril 54°C 30 sekundit ja DNA süntees temperatuuril 72°C 2 minutit, kokku 30 tsüklit.

Sekveneerimisreaktsiooni jaoks eemaldasime saadud produktidest kasutamata jäänud desoksüribonukleotiidid ja PCR-i praimerid. Selleks töötlesime reaktsioonisegu aluselise eksonukleaas I (ExoI; 2,5 U/µl) ja fosfataasiga (SAP; 1 U/µl). Segu mahuks oli 10 µl. Reaktsioon toimus 30 minutit temperatuuril 37°C ning ensüümid inaktiveeriti 15 minuti jooksul temperatuuril 80°C. Saadud proovide sekveneerimiseks ettevalmistamisel kasutasime „*Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*“ lahuseid firmalt „Applied Biosystems“. Reaktsiooni võtsime 1 µl eelnevalt kirjeldatud töötluste produkti ning praimerina kasutasime Fw või Rev

(1,6 pmol). DNA järjestused on määratud firma „Applied Biosystems“ 3730xl kapillaarsekvenaatoriga.

**Tabel 2. Töös kasutatud praimerid**

Nimi	Järjestus	Seondumiskoht
ARB6	5'- GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNACGCC- 3'	Kõdupraimer, mille linkerregioonil ACGCC on <i>P.putida</i> kromosoomis 12050 kordust
ME-I- uus	5'-GCTGAATATGGCTCATAACACCC-3'	Seondub Km geenile positsioonides 7 kuni -16
ARB2	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'	Seondub kõdupraimeri ARB6 konserveerunud 5' otsaga
KmO	5'-GTGCAATGTAACATCAGAGATTTT-3'	Seondub Tn5 oleva Km geeni ette positsioonides -62 kuni -39
ARBtel1	5'-GGGTGCAGAGCCATAAGC-3'	Komplementaarne <i>telB</i> geeni stardikoodonist ATG allavoolu jääva alaga positsioonides 938-955, suunaga geenist eemale
ARBtel2	5'-GGCAAGAGACGAAAGCCC-3'	Komplementaarne <i>telB</i> geeni stardikoodonist ATG allavoolu jääva alaga positsioonides 956-973 suunaga geenist eemale

### 2.2.8 Geelelektroforees

Geelektroforeesi kasutasime ARB-PCR fragmentide pikkuse hindamiseks. Proovid kandsime horisontaalsele 1%-sele agarosgeelile TAE puhvril (50 mM Tris-atsetaat, 1mM EDTA; pH

8,2). Geel sisaldas etiidiumbromiidi 0,4 µg/ml. DNA fragmentide pikkuse määramiseks kasutasime firma „Fermentas“ markerit ZipRuler Express DNA Ladder 2. Elektroforeesi viisime läbi toatemperatuuril, pingel 12 V/cm. Geeli vaatlesime ultraviolettvalguses.

### 2.2.9 Statistika

Statistiliselt oluliste erinevuste tuvastamiseks mutatsioonide tekkesageduste vahel kasutasime statistika programmi STATISTICA 10. Kuna andmed ei olnud normaaljaotuses, siis kasutasime mitteparameetrilist Kruskal-Wallis'e testi, millele järgnes ka Dunn'i test. Need testid võimaldasid statistiliselt analüüsida transposoonmutantide, transposoonmutatsiooniks kasutatud tüve PaWTn5TAG $\Delta$ uvrD ning algse tüve PaW85 Rif<sup>R</sup> mutatsioonide tekkesageduste erinevusi. Statistikat aitas teha Kärt Ukkivi.

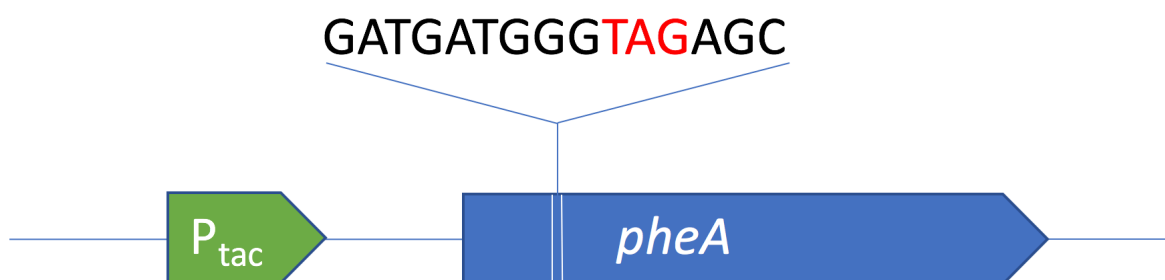
### 2.2.10 *P. putida* ja *E. coli* PstC valkude virtuaalne analüüs

Võrdlesime *P. putida* (KT2440), *P. aeruginosa* (PAO1) ja *E. coli* (K-12 MG1655) *pstC* geenide nukleotiidsest järjestusest tuletatud aminohappelisi järjestusi. PstC valgujärjestused saime *Pseudomonas*'e genoomide andmebaasist (*Pseudomonas Genome database*; [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)) ning *E. coli* puhul Ecocyc andmebaasist ([www.ecocyc.org](http://www.ecocyc.org)). *Fasta* formaadis järjestused joondasime „Clustal Omega“ joendusprogrammis (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>; 26.05.2017). Joendusprogrammi väljundina kasutasime maatriksit „Percent Identity Matrix“.

## 2.3 Tulemused ja arutelu

### 2.3.1 Tn5TAG testsüsteem ja primaarne seleksioon tuvastamaks madala mutantide tekkesagedusega *P. putida* tüvesid

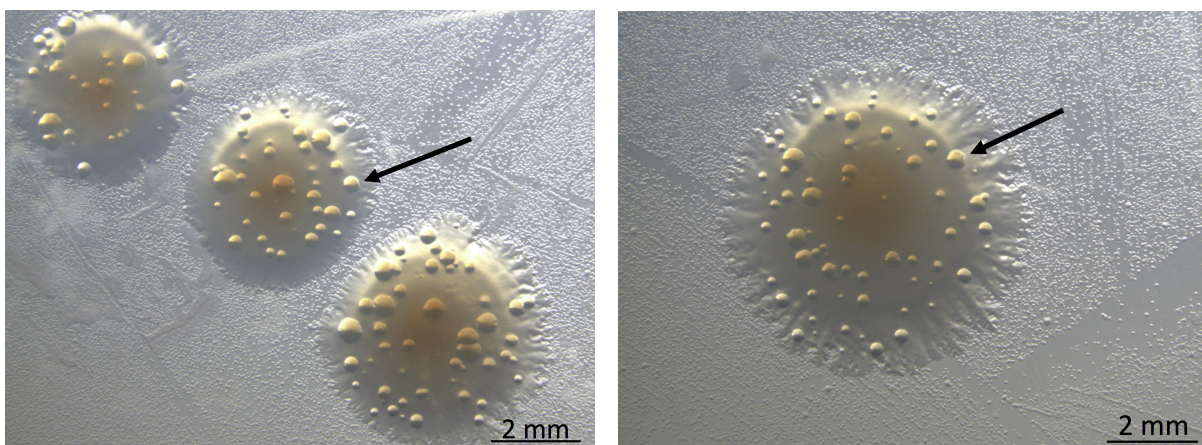
Selleks, et tuvastada mutantide tekkesagedust tõstvaid geene bakteris *P. putida*, kasutasime meie laboris Kärt Ukkivi poolt konstrueeritud tüve PaWTn5TAG $\Delta$ *uvrD*. See tüvi on saadud *P. putida* PaW85 metsiktüvest *uvrD* geeni deleteerimisel ja sisaldab lookuses PP\_3610 Tn5TAG testsüsteemi. Eelnevalt on kontrollitud, et selle testsüsteemi asukoht kromosoomis ei mõjuta mutatsioonide tekkesagedust (K. Ukkivi avaldamata andmed). Metsiktüve PaW85 mutantide tekkesagedus on väga madal, mis ei võimaldaks veelgi madalamat mutantide tekkesagedust hästi jälgida. Sellepärast oli testtüvest *uvrD* geen ära deleteeritud. *uvrD* geeni deletsiooni tulemusena ei sünteesita rakkudes UvrD helikaasi, mille ülesandeks on osaleda DNA reparatsioonimehhanismides nagu näiteks nukleotiidi väljalõike reparatsioon NER, valepaardumiste reparatsioon (MMR, *mismatch repair*) ja rekombinatsiooniline reparatsioon (Kang ja Blaser, 2006). Meie töörühmas on nähtud, et *uvrD* kustutamisel mutatsioonide tekkesagedus *P. putida*-s tõuseb (Saumaa jt., 2006). Mutantide tekkesageduse tuvastamiseks oli testtüve kromosoomi viidud asendusmutatsioonide tuvastav ning üksikkolooniate tasemel mutatsioonide jälgimist võimaldav Tn5TAG testsüsteem, mis sisaldab P<sub>tac</sub> promootori kontrolli all olevat defektsest fenooli monooksügenaasi geeni *pheA*, milles on 22. koodon (Leu) asendatud stoppkoodoniga TAG (Joonis 3).



**Joonis 3. Tn5TAG testsüsteemi skeem.** Stoppkoodonit sisaldav testgeen *pheA* asub miniTn5 sees. Punasega on näidatud stoppkoodoni TAG asukoht.

Testtüvega PaWTn5TAG $\Delta$ *uvrD* viisime läbi transposoonmutageneesi, mille käigus plasmiidis pBAM1Tn5Km (Martínez-García jt., 2011) olev minitransposoon Tn5Km viidi konjugatsiooni teel testtüvesse, kus see inserteerus juhuslikult testtüve kromosoomi erinevatesse piirkondadesse, põhjustades selle tagajärjel insertiooni sisaldavate geenide inaktivatsiooni.

Meie eesmärk oli leida just neid gene, mille inaktiveerimise puhul mutantide tekkesagedus testtüves langeks. Transposoonmutantide selekteerimiseks plaatisime transkonjugante söötmele, mis sisaldas: (1) glükoosi primaarse süsinikuallikana, võimaldades *Pseudomonas putida* rakkude kasvu; (2) kanamütsiini, mis võimaldas kasvu ainult transposooni insertiooni sisaldavatel rakkudel; ning (3) fenooli sekundaarse süsinikuallikana, et oleks võimalik Tn5TAG testsüsteemiga tuvastada transkonjugantide mutantide tekkesagedust. Stoppkoodoni kaotanud asendusmutatsioonide korral *pheA* geenid saavad rakud kasutada söötmes leiduvat fenooli süsinikuallikana ning glükoosil üles kasvanud esialgsele kolooniale tekivad uued mikrokolooniad ehk papillid (Tagel jt., 2016). Tavatingimustes ei saa *P. putida* rakud fenooli süsinikuallikana kasutada, kuna neil puudub fenooli metaboliseeriv geen. Esialgsele kolooniale tekkinud papillide hulka hindasime 10-ndal päeval peale transkonjugantide plaatimist. Papille sisaldavad kolooniad on näidatud joonisel 4.



**Joonis 4. Funktsionaalse *pheA* geeni taastumisel kolooniate pinnale tekkinud papillid (näidatud noolega).** Kolooniaid on pildistatud plaatimisjärgselt 10. päeval.

Meie valisime välja just need kolooniad, millel oli vähe papille, kuna see oli märgiks sellise geeni inaktiveerumisest (transposooni inserteerumise tulemusena), mis on oluline mutatsioonide tekitamises. Sellise geeni inaktivatsiooni tõttu peaks mutatsiooni tekkesagedus selles koloonias vähenema ning seeläbi peaks ka papille vähem tekkima. Kolme sõltumatu transposoonmutageneesi käigus saime ligikaudu 1500 - 1700 kolooniat. Neist 84-l koloonial oli 1-2 papilli ning vaid 1-l koloonial mitte ühtegi papilli. Ülejäänud kolooniatel oli suurem papillide arv, mis näitab suuremat mutatsioonide tekkesagedust antud koloonias.

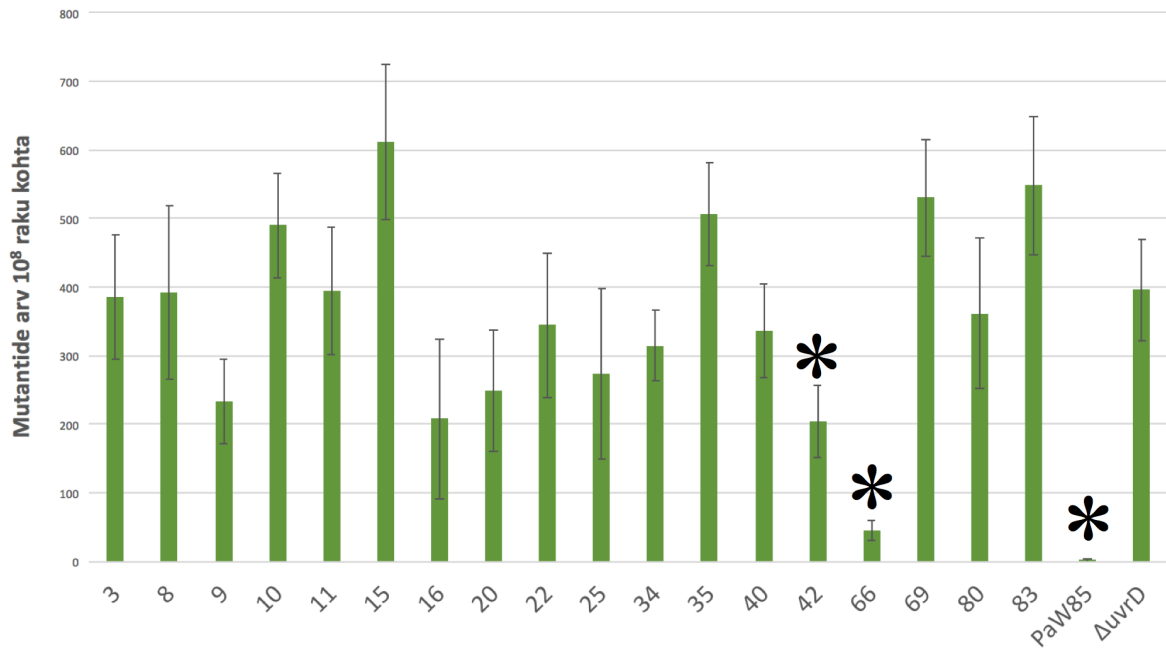
### 2.3.2 Madala mutantide tekkesagedusega tüvede sekundaarne selekteerimine

Sekundaarse seleksioonina nendest bakterikolooniatest, mille pinnale moodustus vähe või ei

ühtegi papilli, tehti külv LB-Rif tassile ning külvijoonel jälgiti 2 päeva jooksul Rif-resistentsete mutantide tekkimist. Rifampitsiin on antibiootikum, mille toimemehhanism põhineb RNA sünteesi inhibeerimises. Rif on bakteriotsiidne aine, mis seondub RNAP RNA/DNA kanalisse ja takistab RNA sünteesil transkripti moodustumist. Rif-i sisaldaval söötmel saavad kasvada vaid need rakud, millel on eksponentsiaalses kasvufaasis spontaansete mutatsioonide tulemusena toimunud muutus RNA polümeraasi  $\beta$  subühikut kodeerivas *rpoB* geenis. Selle tagajärjel kodeeritakse sellist  $\beta$  subühikut, millega Rif ei saa enam seonduda ning RNA elongatsiooni blokeerimist Rifi poolt ei toimu. Nii tekib resistentsus Rif-i suhtes ning seda võivad tekitada paljud erinevad mutatsioonid *rpoB* geenis, mistõttu on see süsteem suhteliselt tundlik mutatsioonisageduse mõõtmiseks (Severinov jt., 1993). Meie valisime välja need kolooniad, millel oli vähene kasv või see puudus Rif-LB söötmel, mis näitas spontaansete mutatsioonide madalat tekkesagedust valitud kolooniates. Sekundaarse selektsiooni tulemusena jäi alles 78 tüve 85-st.

### 2.3.3 Madala mutantide tekkesagedusega transposoonmutantide testimine Rif<sup>R</sup> spontaansete mutantide tekkesageduse mõõtmise teel

Kuna LB-Rif plaadile külvamine oli umbkaudne test ehk see ei näidanud ära kui suur mutantide tekkesagedus tüvedel oli, siis pidime primaarse (Tn5TAG testsüsteem) ning sekundaarse (külv LB-Rif tassile) selektsiooni abil välja tulnud transposoonmutantidele tegema veel ühe kontrolli. Selleks võrdlesime vähese papilli arvuga kolooniate spontaanset Rif<sup>R</sup> tekkesagedust *P. putida* PaWTn5TAG $\Delta$ *uvrD* (edaspidi  $\Delta$ *uvrD*) ja metsiktüve PaW85 suhtes. Rakke kasvatati Glc-CAA vedelsöötmes 20-24 tundi, mille jooksul võis toimuda osades rakkudes spontaanselt mutatsioon *rpoB* geenis. Seejärel plaaditi rakud LB-Rif tassidele. Eelmistest testidest välja tulnud potentsiaalselt madala mutantide tekkesagedusega 78-le transposoonmutandile tegime esmalt Rif-i katse ühe paralleeliga, et elimineerida kõrge mutantide tekkesagedusega tüved. Ainult 19 tüvel oli Rif<sup>f</sup> mutantide tekkesagedus madalam võrreldes  $\Delta$ *uvrD* tüvega. Kuna katset tehti vaid ühe paralleeliga, siis võis juhtuda, et mõni madala mutantide tekkesagedusega tüvi võis edasistest katsetest välja jääda. Seda sel juhul, kui mutant tekkis katseklaasis katse alguses ehk enne plaatimist LB-Rif tassile ning paljunes, mistõttu võis sel tüvel tekkida palju Rif<sup>R</sup> kolooniaid Rif tassil. Edasi iseloomustasime põhjalikumalt 19 transposoonmutanti, millel määrasime Rif<sup>R</sup> mutantide tekkesageduse, viies läbi 3 sõltumatut katset 25 sõltumatu paralleeliga (vaata Rif<sup>R</sup> mutantide tekkesageduse määramine „Materjal ja meetodika“ osas).



**Joonis 5. Spontaansete Rif<sup>R</sup> mutantide tekkesagedus *P. putida* transposoonmutantides,  $\Delta uvrD$  testtüves ja metsiktüves PaW85.** Graafikul on esitatud 3 sõltumatu katse Rif resistentsete kolooniate tekkesageduse mediaanväärtused  $10^8$  elusraku kohta ning 95% usalduspiirid. Statistiliselt oluliselt erinevad tüved võrreldes  $\Delta uvrD$  tüvega (p-väärtus <0,05, Kruskal-Wallis test, millele järgnes Dunn'i test) on tähistatud tärniga.

Nagu Joonisel 5 on näha, Rif<sup>R</sup> mutantide tekkesagedus erines  $\Delta uvrD$  tüve omast statistiliselt oluliselt ainult transposoonmutantidel nr. 42 ja 66. Võrreldes  $\Delta uvrD$  tüvega oli transposoonmutandil nr. 42 mutantide tekkesagedus ~ 2 korda madalam ning võrreldes metsiktüvega PaW85 oli see ~ 135 korda kõrgem. Transposoonmutandil nr. 66 oli Rif<sup>R</sup> mutantide tekkesagedus ~ 9 korda madalam võrreldes  $\Delta uvrD$  tüvega ning ~ 30 korda kõrgem võrreldes metsiktüvega PaW85. Võrreldes  $\Delta uvrD$  tüvega oli PaW85 mutantide tekkesagedus ~ 260 korda madalam.

Välisdamaks võimaluse, et selekteeritud tüved taluvad teistest tüvedest Rif-i kehvemini, mistõttu näeme selektiivsöötmeal ka vähem mutante, tegime neile tüvedele Rif-i suhtes MIC-i testi (vt. ptk 2.2.6). Selgus, et tüvede Rif-i taluvuses ei olnud olulisi erinevusi, mis kinnitas seda, et neis tüvedes on tõesti mutatsioonisagedus vähenenud.

### 2.3.4 Madalat mutatsioonisagedust põhjustavate mini-Tn5 insertioonide asukoha määramine ning inaktiveeritud geenide tuvastamine, iseloomustus ning roll mutatsioonide tekitamises

Nendele kahele transposoonmutandile, mis läbisid kõik eelmised testid, mis kinnitasid, et neis mutantides on mutatsioonisagedus vähenenud, tegime ARB-PCR-i ning tuvastasime sekveneerimise abil mini-Tn5 paiknemise *P. putida* kromosoomis. Minitransposooni insertioonide asukohad transposoonmutantide nr. 42 ja 66 kromosoomis on toodud tabelis 3.

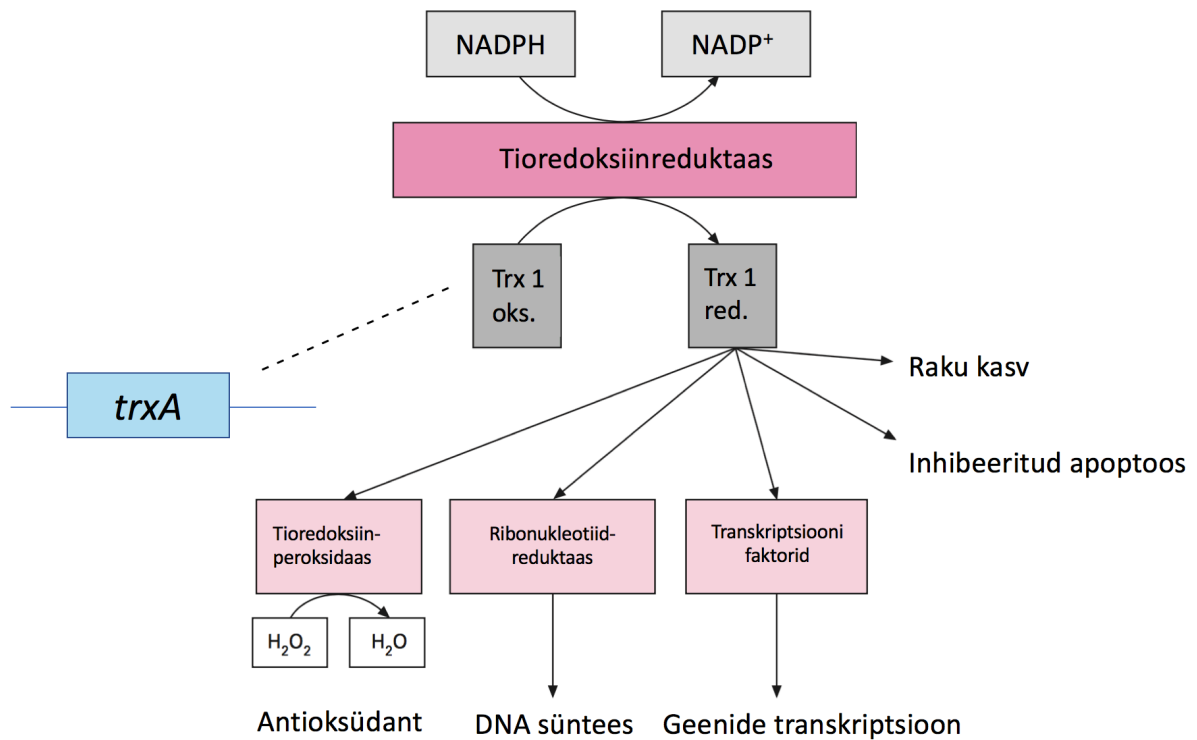
**Tabel 3. Tuvastatud geenide iseloomustus.**

Tüvi	Geeni nimi, kuhu Tn5Km inserteerus	Iseloomustus
42	<i>trxA</i>	Tioreedoksiin 1, osa tioredoksiini süsteemist
66	<i>PP5328</i>	Fosfaadi ABC transporteri permeaas

#### 2.3.4.1 Geen *trxA*

Tüves nr 42 inserteerus mini-Tn5 geeni nimega *trxA* (andmed pseudomonas.com andmebaasist). See geen kodeerib tioredoksiin 1 valku (Trx1), mis kuulub tioredoksiinide rühma ning seda leidub nii prokarüootides kui eukarüootides.

Trx1 on väike redutseeriv valk, mis on põhiline valkude disulfiidi reduktaas, mis osaleb NADH ning NADPH genereerimises. 1964. aastal tuvastati, et Trx valk on *E. coli*-s elektrondonoriks ribonukleotiidreduktaasile ja osaleb seeläbi nukleotiidide sünteesis (Laurent jt., 1964). Trx-i olulisust DNA sünteesil on kinnitatud ka teiste teadlaste poolt, kes leidsid, et Trx on võimeline vesinikku loovutama ribonukleotiidreduktaasile (Orr ja Vitols, 1966), millega täidab olulist rolli DNA sünteesis. Elektrondonorina võib Trx käituda ka tioredoksiini peroksüdaasidele (peroksüredoksiinidele) (Holmgren, 1985), mis osalevad vesinikperoksiidi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> redutseerimises veeks (Spector jt., 1988). Vesinikperoksiid on reaktiivne hapnikuühend (ROS, *reactive oxygen species*), mis kaudselt kahjustab raku DNA-d. See ühend reageerib metallioonidega, tekitades selle tulemusel DNA-d kahjustava hüdroksüülradikaali (Winterbourn, 1995). Seega võivad ka ROS ühendid tekitada mutatsioone (Evans jt., 1997). See funktsioon näitab tioredoksiini osaluse olulisust oksüdatiivse stressi vastuses. Peale ülalnimetatud funktsioonide osaleb tioredoksiini redutseeritud vorm veel raku kasvus, geenide transkriptsioonis ja paljudes muudes rakuprotsessides (joonis 6).



**Joonis 6. Tioredotsiini osaluse skeem rakulistes protsessides** (joonis muudetult, Mustacich ja Powis, 2000). Näidatud on tioredoksiini oksüdeeritud ning redutseeritud vormide osalust rakus.

Nagu eelpool käsitletud, võtab tioredoksiin osa väga paljudest tähtsatest rakulistest protsessidest kaasa arvatud DNA süntees ja kahjustuste ära hoidmine. Seetõttu oleks ootuspärane, et selle geeni inaktiveerumise korral satub rakk stressi ning mutatsioonide tekkesagedus tõuseb. Järelikult raku normaalses elutegevuses võiks *trxA* olla mutatsioonide tekke ärahoidvaks geeniks, millele viitab ka tioredoksiin 1 valgu osalus  $H_2O_2$  redutseerimises veeks (Gonzalez Porque jt., 1970; Laurent jt., 1964; Orr ja Vitols, 1966). Üllatuslikult näitavad aga meie transposoonmutageneesi tulemused, et selle geeni ekspressioon hoopis tõstab bakteris *P. putida* mutatsioonide tekkesagedust. Andmeid *trxA* geeni osalusest mutatsioonide tekitamises bakterites ei ole, seepärast tuleks *trxA* geeni funktsioone edaspidi lähemalt uurida ning selle geeni toimemehhanisme mutatsioonide tekkesagedusele veel selgitada.

#### 2.3.4.2 Geen PP5328

Tüves nr 66 inserteerus transposoon geeni, mis asub lookuses PP\_5328. Algselt kuulus geen *pst* operoni ning geeni nimeks oli *pstC*, kuid *Pseudomonas putida* KT2440 genoomi ülesekveneerimise ning uute funktsionaalsete analüüside tulemusena anti hoopis geenile PP5627 nimi *pstC* (Belda jt., 2016). *pstC* kuulub *pst* operoni, mida on varem *P. putida*-s

uurinud Wu jt. (Wu jt., 1999). Nende käsitletud *pst* operoni asukoht ühtib meie esialgse *pst* operoni asukohaga. Ühtivad ka nende uuritud operoni kuuluvate geenide kodeeritud valgud ning nende funktsioonid. Võrdlesime ka *PP5328* geeni valgujärjestust *P. putida*, *P. aeruginosa* ning *E. coli pstC* geenide järjestusega (tabel 4).

**Tabel 4. *PP5328* ning *pstC* geenide nukleotiidsest järjestusest tuletatud valgujärjestuste võrdlus *P. putida* (KT2440), *P. aeruginosa* (PAO1) ning *E. coli* (K-12 MG1655) bakterite puhul<sup>a</sup>**

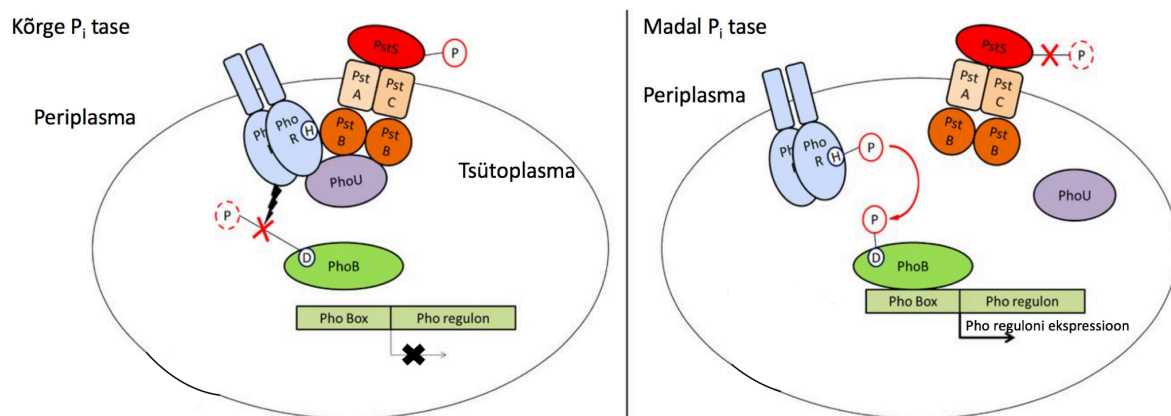
	<i>PP5328</i> ( <i>P.putida</i> )	<i>pstC</i> ( <i>P. aeruginosa</i> )	<i>pstC</i> ( <i>P. putida</i> )	<i>pstC</i> ( <i>E. coli</i> )
<i>PP5328 (P.putida)</i>	100%	75,05%	26,17%	24,21%
<i>pstC (P. aeruginosa)</i>	75,04%	100%	26,79%	23,27%
<i>pstC (P. putida)</i>	26,17%	26,79%	100%	37,3%
<i>pstC (E. coli)</i>	24,21%	23,27%	37,3%	100%

<sup>a</sup>Andmed on saadud *Pseudomonase* genoomi lehelt [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com) ning *E. coli* genoomi puhul [www.ecocyc.org](http://www.ecocyc.org).

Tabelist nr 4 on näha, et *P. aeruginosa pstC* geeni valgujärjestusega on *PP5328* puhul see palju suuremas osas identne (75,05% identsus), kui *P. putida pstC* geeni valgujärjestusega (26,79% identsus). Samal ajal on *E. coli pstC* geeni aminohappeline järjestus rohkem sarnane *P. putida pstC* geeni (37,3% identsus), kui *PP5328* valgujärjestusega (24,21% identsus). Toetudes eelpool toodud valgusarnasuse andmetele ja Wu jt. artiklile (Wu jt., 1999) suhtume geeni *PP5328* kui *pstC* geeni.

*pstC* geen kodeerib PstSCAB fosfaadipumba koosseisus olevat membraanivalku, mis vahendab anorgaanilise fosfaadi liikumist läbi raku sisemembraani. PstSCAB pumba geenide transkriptsioon on aktiveeritud fosfaadinäljas olevates rakkudes (Rao ja Torriani, 1990). See süsteem kuulub ABC tüüpi transporterite superperekonda (*ATP-binding cassette*) (Webb jt., 1992) ja on osa Pho regulonist - kogum gene ja operone, mis on reguleeritud söötme anorgaanilise fosfaadi kontsentratsiooni poolt (Wanner ja Chang, 1987). Seda reguloni reguleerib kahekomponentne süsteem, millese kuuluvad regulaatorid valgud PhoB ning PhoR (Wanner ja Chang, 1987). Kui anorgaanilise fosfaadi kontsentratsioon raku periplasmas on madal, fosforüleerib sensorvalk PhoR PhoB valku (Makino jt., 1993; Wanner, 1993). Fosforüleeritud PhoB seondub Pho-box-idele, seejärel RNA polümeraasi  $\sigma^{70}$  faktoriga ning

sellega initsieerib Pho reguloni transkriptsiooni (Makino jt., 1993; Wanner, 1993). Kõrge  $P_i$  kontsentratsiooni korral toimub rida reaktsioone, mille tulemusena toimub transkriptsioonifaktori PhoB deaktiveerimine ning Pho reguloni ei ekspresseerita. Anorgaanilise fosfaadi regulatsiooni skemaatiline rada on kujutatud joonisel 7.



**Joonis 7. Anorgaanilise fosfaadi regulatsiooni skemaatiline rada bakteris *E. coli*** (joonis muudetud kujul artiklist, Qi jt., 2016). Kõrge  $P_i$  kontsentratsiooni korral fosfaadi seondumisel PstS valguga moodustub PhoR-PhoU-PstB valkkompleks, mis inhibeerib PhoR valku põhjustades transkriptsioonifaktori PhoB defosforüleerimist ning deaktiveerimist ning seetõttu ei ole Pho regulon ekspresseeritud. Madala  $P_i$  kontsentratsiooni korral PhoR fosforüleerib PhoB valgu ning PhoB seondub Pho seondumissaitidele. See võimaldab Pho reguloni geenide transkriptsiooni initsiatsiooni ja vastavate transportvalkude sünteesi, et transportida  $P_i$  raku.

Meie laboris saadud transposoonmutageneesi tulemusi kinnitab Gibson jt. läbiviidud uuring (Gibson jt., 2015). Ka nemad leidsid, et transposooni insertioon *pstC* geeni põhjustab mitte suurt kuid märkimisväärset langust mutatsioonide tekkesageduses. On nähtud, et mutatsioonid *pstSCAB* geenides põhjustavad  $P_i$  madalat taset rakus (Kato jt., 1993; Morohoshi jt., 2002). Sellest võiks järeldada, et *pst* operoni koosseisu kuuluva *pstC* geeni inaktiveerumine põhjustab anorgaanilise fosfaadi transporteri defektset tööd, mille tagajärjel  $P_i$  tase rakus langeb. Gibson jt. pakkusid välja, et *pstC* defektsuse korral väheneb stressist põhjustatud mutageenne katkete parandamine (MBR, *mutagenic break repair*). See on DNA kaksikahelate kahjustuste parandamise viis läbi homoloogilise reparatsiooni, mis stressitingimustes aktiveerub SOS vastusena ning reparatsioon muutub mutageenseks. MBR küll parandab katkeid, kuid põhjustab seeläbi mutatsioonide teket. Sellest võib järeldada, et kui *pstC* ei funktsioneeriks, siis töötab ka

MBR vähem ning tekib vähem mutatsioone. Põhjus, miks *psC* geen võib vähendada MBR-i töötamist võiks olla fosfaadi taseme muutus rakus. Anorgaanilise fosfaadi taseme liig või nappus põhjustavad MBR-i mitte töötamist (Stumpf ja Foster, 2005) ja seega ei tekitata ka mutatsioone. Selle tulemusena mutatsioonide tekkesagedus rakus langeb.

Selleks, et kindlad olla, et madalat mutantide tekkesagedust põhjustab *PP5328* geeni aktiivsuse puudumine, oleks vaja see geen deleteerida. Ka oleks vaja teha lisakatseid, et selgitada *PP5328* geeni osalust mutatsioonide tekitamises.

### 2.3.5 Üldhinnang saadud tulemustele ning perspektiivid

Hinnates meie saadud tulemusi saab öelda, et Tn5TAG testsüsteem võimaldab mutatsioonide jälgimist üksikkoloonia tasemel ning võimaldab tuvastada kõrgeenenud mutantide tekkesagedust põhjustavaid gene *Pseudomonas putida* bakteri tüves, kus mutantide tekkesagedus on suur. Meie tuvastasime seda testsüsteemi kasutades 2 potentsiaalset geeni, mis võiksid mutatsioonide tekkesagedust rakus tõsta. Ühe geeni võimalikku osalust mutatsioonide tekkesageduse suurendamises on ka kirjanduses käsitletud (Gibson jt., 2015). Tuleb nentida, et töö raames on läbi uuritud vähe kolooniaid ning teoorias ei saaks antud testsüsteemi pidada küllastunuks, kuna saadud geenidesse pole transposooni insertiooni toimunud mitmel korral. Seega ei saa me lõpuni kindlad olla just tuvastatud geenide osaluses mutatsioonide tekkesageduse suurendamises. Selleks tuleb transposoonmutagenees läbi viia mitmes korduses, et oleks võimalik tuvastada gene, millede puhul on transposooni insertioon samasse geeni toimunud rohkem kui 1 kord. See kinnitaks saadud geenide osalust mutatsiooni tekkesageduse tõstmises.

Selleks et olla kindlad leitud geenide osaluses mutatsioonide tekkesageduse suurenemises ja välistada võimalus, et lisaks transposooni insertioonile uuritud geeni oli kromosoomis toimunud veel teisi muutusi, oleks vaja saadud transposoonmutageneesi abil leitud geenid ka deleteerida ning uurida rakkude kasvuomadusi ning mutantide tekkesagedust ka neis tüvedes. Välistatud pole ka võimalus, et meie poolt leitud geenidel on mingi seos *uvrD* geeniga, mis oli algselt testsüsteemi sisaldavast tüvest kustutatud. Võimalik on, et nende geenide koosmõju *uvrD* geeniga on mingil viisil oluline mutatsioonide tekkesagedust mõjutavates protsessides.

Oleme püüdnud saada *trxA* ning *PP5328* geenide konstrukti deletsiooni jaoks, kuid katsed nurjusid, mistõttu olime me sunnitud sellest praegu loobuma. Kuna mõlemal tuvastatud geenidest on oluline roll rakule elutähtsates protsessides, siis tasuks kindlasti lähemalt uurida neid gene ning nende mõju mutatsioonide tekkesagedusele. Samuti oleks tarvis selgitada

mutatsioonide tekkesageduse suurendamise mehhanisme, kuna muteerumine võib olla nii kahjulik kui ka kasulik. Nendest mehhanismidest arusaamine võimaldab uurida seda, kuidas *P. putida* bakter kohastub pidevalt muutuva keskkonnaga.

## KOKKUVÕTE

Selleks, et mõista bakterite võimet saavutada resistentsust antibiootikumidele või kohaneda pidevalt muutuvate keskkonnatingimustega, on väga oluline aru saada ning mõista erinevaid mutageneesi mehhanisme, mis on aluseks bakterite niivõrd kiirele evolutsioneerumisele. Erinevate elukeskkondadega kohanemiset võimaldavad sellised mutatsioonid, mille tagajärjel suureneb bakterite metaboolne aktiivsus, tekib resistentsus erinevatele antibiootikumidele või suureneb bakterite virulentsus.

Pidevalt muutuvate keskkonnatingimuste ning stressorite toimet pidurduvad bakterirakkudes jagunemine ja kasv. Selle tagajärjel toimub rakkudes statsionaarse faasi ehk adaptiivne mutagenees, mille käigus võib bakterite mutatsioonisagedus suureneda (Cairns jt., 1988). Vead DNA-s, mis võivad viia mutatsioonide tekkeni, tekkivad paljude tegurite toimet, näiteks võib vigu tekitada replikatsiooni läbiviiv DNA polümeraas, DNA ja RNA polümeraaside vahelised kokkupõrked, vigutekitavad DNA polümeraasid jm. Vältimaks mutatsioonide akumulereerumist on bakterites olevate reparatsioonisüsteemide ülesandeks eemaldada paljusid potentsiaalseid mutageenseid muutusi DNA kaksikahelas. Kuid vaatamata bakteris olevatele mehhanismidele tekib siiski vigu, mis võivad DNA-s järgmise replikatsiooni käigus mutatsioonidena kinnistuda.

Käesoleva töö kirjanduse osas anti ülevaate mutatsioonidest, nende liikidest ning tekkemehhanismidest. Lisaks kirjeldati lähemalt DNA polümeraaside poolt tekitatavaid vigu, transkriptsiooniseolist mutageneesi ning SOS vastust, milles osalevad kahjustatud DNA-d sünteesivad ja seetõttu vigu tekitavad polümeraasid.

Töö eksperimentaalses osas tuvastati geene, mis tõstavad mutatsioonide tekkesagedust *P. putida* rakkudes. Selleks viidi läbi transposoonmutageneesi ning kasutati Tn5TAG testsüsteemi, mis võimaldas jälgida mutantide teket üksikkoloonia tasemel.

Käesoleva uurimistöö tulemused saab kokku võtta järgmiselt:

- kasutades Tn5TAG testsüsteemi, transposoonmutageneesi ja Rif<sup>R</sup> mutantide tekkesageduse määramist, tuvastati 1500-1700 transposoonmutandist 2, millel on mutantide tekkesagedust vähenenud
- nendes tüvedes oli miniTn5 inserteerunud *trxA* ja *PP5328* geeni
- *trxA* geen kodeerib tioredoksiinide rühma kuuluvat tioredoksiin 1 valku (Trx1), mis võtab osa väga paljudest tähtsatest rakulistest protsessidest nagu DNA süntees ja kahjustuste ära hoidmine. Eelnevalt pole nähtud, et geen *trxA* osaleks mutatsioonide tekitamises bakterites.

- *pstC* geen kodeerib PstSCAB fosfaadipumba koosseisus olevat membraanivalku, mis vahendab anorgaanilise fosfaadi liikumist läbi raku sisemembraani. Ka kirjanduses on nähtud, et see geen osaleb mutatsioonide tekkesageduse suurendamises (Gibson jt., 2015). On välja pakutud, et *pstC* geeni inaktiveerumine põhjustab madalat anorgaanilise fosfaadi taset rakus, mis võiks põhjustada mutageense DNA katkete reparatsiooni (MBR) mittetöötamist.
- Tn5TAG testsüsteem võimaldab hinnata mutatsioonide tekkesagedust üksikkoloonia tasemel ning tuvastada geene, mis suurendavad mutantide tekkesagedust sel viisil, et kasutatakse *P. putida* mutaatortüve, kus mutantide tekkesagedus on suur *uvrD* geeni defektsuse tõttu ning otsitakse transposoonmutante, kus mutatsioonisagedus on vähenenud.
- selleks, et kindlad olla, et madalat mutantide tekkesagedust põhjustab *trxA* ning *PP5328* geenide aktiivsuse puudumine, oleks vaja need geenid deleteerida. Ka oleks vaja teha lisakatseid, et selgitada tuvastatud geenide osalust mutatsioonide tekitamises.

## SUMMARY

### Genes inducing mutant frequency in bacterium *Pseudomonas putida*

Valeria Sidorenko

#### Summary

It is very important to recognize and understand different mechanisms of mutagenesis in order to understand the bacteria's ability to obtain resistance to antibiotics or to adapt with constantly changing environmental conditions. Adaptation to different habitat conditions generate mutations that result in bacteria's higher metabolic activity, resistance to different antibiotics or increase in virulence.

Due to constantly changing environmental conditions and presence of stressors bacterial cell growth and division are inhibited. As a result stationary phase or adaptive mutagenesis occurs in these cells which may increase the frequency of mutations in the bacteria (Cairns jt., 1988). Errors in DNA, which may result in mutations, may occur because of different factors, for example errors made by DNA polymerase, collisions between DNA and RNA polymerases, activity of error-prone DNA polymerases et cetera. In order to avoid the accumulation of mutations in bacteria specific repair systems have developed that remove many potentially mutagenic alterations from DNA double-helix. In spite of the DNA repair systems some errors are left unrepaired and are embedded into the DNA during the next replication cycle in form of a mutation.

In the literature review of this study an overview of mutations, their types and the mechanisms of their formation was given. In addition, errors made by DNA polymerases, transcription-coupled mutagenesis and SOS response, in which specific error-prone DNA polymerases are involved during translesion DNA synthesis producing errors in DNA, were described.

In the experimental part of this study genes that induce mutation frequency in *Pseudomonas putida* were identified. For this purpose transposon mutagenesis and Tn5TAG testsystem were used that enables to monitor the formation of mutants on a single colony level.

The results of this can be summarized as follows:

- using the Tn5TAG testsystem, transposon mutagenesis and determination of Rif resistant mutant frequency, 1500-1700 colonies were analysed and in only 2 transposon mutants mutation frequency was decreased.
- In those strains minitransposon Tn5 had inserted into *trxA* and *PP5328* genes.

- *trxA* gene encodes for thioredoxin 1 (Trx1) protein which is a member of the thioredoxins family. This protein participates in many important cellular processes like DNA synthesis and avoidance of DNA damage. The involvement of *trxA* gene in causing formation of mutations in bacteria has not been previously observed.
- *pstC* gene encodes for a membrane protein of the PstSCAB phosphate transporter which mediates the transport of inorganic phosphate through the inner membrane of the cell. It has been observed that this gene is involved in the increase of mutation frequency (Gibson et al., 2015). It has been proposed that the inactivation of this gene causes low levels of inorganic phosphate in the cell which leads to the lack of activity of mutagenic break repair (MBR) and the mutation frequency in the cell decreases.
- the Tn5TAG test system allows assessment of mutation frequency on a level of a single colony and identifying genes which increase mutant frequency in the following way. The mutator strain of *Pseudomonas putida* is used where mutant frequency is high because of *uvrD* gene deletion and then the transposon mutants are identified in which the mutation frequency is decreased.
- in order to be sure that the decreased mutant frequency is caused by the lack of *trxA* and *PP5328* genes activity these genes need to be deleted and additional tests need to be conducted to identify involvement of these genes in generation of mutations.

## KIRJANDUSE LOETELU

- Aguilera, A. (2002). The connection between transcription and genomic instability. *EMBO Journal*. 21: 195-201
- Aminov, R.I. (2009). The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental Microbiology* 11: 2970–2988
- Artsimovitch, I. (2014). The tug of DNA repair. *Nature*: 9–10
- Bagg, A., Kenyon, C. J. and Walker, G. C. (1981). Inducibility of a gene product required for UV and chemical mutagenesis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78: 5749–53
- Bayley, S. A., Duggleby, C. J., Worsey, M. J., Williams, P. A., Hardy, K. G. and Broda, P. (1977). Two modes of loss of the TOL function from *Pseudomonas putida* mt-2. 4: 1–2
- Belda, E., van Heck, R. G. A., José Lopez-Sanchez, M., ... Médigue, C. (2016). The revisited genome of *Pseudomonas putida* KT2440 enlightens its value as a robust metabolic chassis. *Environmental Microbiology* 18: 3403–3424
- Beletskii, A. and Bhagwat, A. S. (2001). Transcription-induced cytosine-to-thymine mutations are not dependent on sequence context of the target cytosine. *Journal of Bacteriology* 183: 6491–6493
- Bonner, C. A., Randall, S. K., Rayssiguier, C., Radman, M., Eritja, R., Kaplan, B. E., McEntee, K. and Goodman, M. F. (1988). Purification and characterization of an inducible *Escherichia coli* DNA polymerase capable of insertion and bypass at abasic lesions in DNA. *Journal of Biological Chemistry* 263: 18946–18952
- Boyer, H. and Roulland-Dessoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41: 459–472
- Bremer, H. and Dennis, P.P. (1987). Modulation of Chemical Composition and Other Parameters of the Cell by Growth Rate. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology* 2: 1527–1542
- Brewer, B.J. (1988). When polymerases collide: Replication and the transcriptional organization of the *E. coli* chromosome. *Cell* 53: 679-686
- Cairns, J., Overbaugh, J. and Miller, S. (1988). The origin of mutants. *Nature* 335: 142–145
- Casaregola, S., D’Ari, R. and Huisman, O. (1982). Quantitative evaluation of *recA* gene expression in *Escherichia coli*. *Molecular & general genetics* : MGG 185: 430–439
- Coulondre, C., Miller, J. H., Farabaugh, P. J. and Gilbert, W. (1978). Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature* 274: 775–780
- Crow, W. and McHenry, C.S. (1978). DNA polymerase III of *Escherichia coli*. *The Journal of*

- biological chemistry 254: 1748–1753
- Davies, J. and Nomura, M. (1972). The genetics of bacterial ribosomes. *Annu Rev Genet* 6: 203–234
- Dutreix, M., Burnett, B., Bailone, A., Radding, C. M. and Devoret, R. (1992). A partially deficient mutant, *recA1730*, that fails to form normal nucleoprotein filaments. *MGG Molecular & General Genetics* 232: 489–497
- Evans, M. D., Griffiths, H. R. and Lunec, J. (1997). Reactive Oxygen Species and their Cytotoxic Mechanisms. *Advances in Molecular and Cell Biology* (Vol. 20)
- Figurski, D. H. and Helinski, D. R. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 76: 1648–52
- Foster, P.L. (1993). Adaptive mutation: the uses of adversity. *Annual review of microbiology* 47: 467–504
- Foster, P. L. (1999). Mechanisms of stationary phase mutation: a decade of adaptive mutation. *Annual Review of Genetics*. 33: 57–88
- Friedberg, E. C., Feaver, W. J. and Gerlach, V. L. (2000). The many faces of DNA polymerases: strategies for mutagenesis and for mutational avoidance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 5681–3
- Friedberg, E. C., Walker, G. C. and Siede, W. (1995). DNA repair and mutagenesis. *Nature* 421: 436–440
- Gibson, J. L., Lombardo, M. J., Aponyi, I., Cruz, V. D., Ray, M. P. and Rosenberg, S. M. (2015). Atypical role for PhoU in mutagenic break repair under stress in *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 10: 1–20
- Golkar, Z., Bagasra, O. and Gene Pace, D. (2014). Bacteriophage therapy: A potential solution for the antibiotic resistance crisis. *Journal of Infection in Developing Countries*. 8: 129-136
- Gonzalez, P. P., Baldestein, A. and Reichard, P. (1970). The Involvement of the Thioredoxin System in the Reduction of Methionine Sulfoxide and Sulfate \*. *The Journal of biological chemistry* 245: 2371–2374
- Gould, I. M. and Bal, A. M. (2013). New antibiotic agents in the pipeline and how they can help overcome microbial resistance. *Virulence* 4: 185–191
- Guillemet, E., Leréec, A., Tran, S. L., Royer, C., Barbosa, I., Sansonetti, P., Lereclus, D. and Ramarao, N. (2016). The bacterial DNA repair protein Mfd confers resistance to the host nitrogen immune response. *Scientific Reports* 6: 29349

- Hall, B.G. (1988). Adaptive evolution that requires multiple spontaneous mutations. II. Mutations involving base substitutions. *Pnas*.
- Hall, B.G. (1998). Adaptive mutagenesis: a process that generates almost exclusively beneficial mutations. *Genetica* 102–103: 109–125
- Han, J., Sahin, O., Barton, Y. W. and Zhang, Q. (2008). Key role of Mfd in the development of fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni*. *PLoS Pathog.* 4: 83
- Heimans, J. (1962). Hugo de Vries and the gene concept. *American Naturalist* 96: 93–104
- Herrero, M., De Lorenzo, V. and Timmis, K. N. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology* 172: 6557–6567
- Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. *Annual Review of Biochemistry* 54: 237–271
- Juurik, T., Ilves, H., Teras, R., Ilmjärv, T., Tavita, K., Ukkivi, K., Teppo, A., Mikkel, K. and Kivisaar, M. (2012). Mutation Frequency and Spectrum of Mutations Vary at Different Chromosomal Positions of *Pseudomonas putida*. *PLoS ONE* 7
- Kang, J. and Blaser, M. J. (2006). UvrD helicase suppresses recombination and DNA damage-induced deletions. *Journal of Bacteriology* 188: 5450–5459
- Kato, J., Yamada, K., Muramatsu, A., Hardoyo and Ohtake, H. (1993). Genetic improvement of *Escherichia coli* for enhanced biological removal of phosphate from wastewater. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 3744–3749
- Kenyon, C. J. and Walker, G. C. (1981). Expression of the *E. coli* *uvrA* gene is inducible. *Nature* 289: 808–810
- Kim, S. R., Maenhaut, M. G., Yamada, M., Yamamoto, Y., Matsui, K., Sofuni, T., Nohmi, T. and Ohmori, H. (1997). Multiple pathways for SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: an overexpression of *dinB/dinP* results in strongly enhancing mutagenesis in the absence of any exogenous treatment to damage DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 13792–7
- Kivisaar, M. (2003). Stationary phase mutagenesis: Mechanisms that accelerate adaptation of microbial populations under environmental stress. *Environmental Microbiology*
- Kivisaar, M. (2010). Mechanisms of stationary-phase mutagenesis in bacteria: Mutational processes in pseudomonads. *FEMS Microbiology Letters* 312: 1–14
- Laurent, C. T., Colleen, M. E. and Peter, R. (1964). Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides. *The Journal of Biological Chemistry* 239: 3436–3444
- Layton, J. C. and Foster, P. L. (2003). Error-prone DNA polymerase IV is controlled by the stress-response sigma factor, RpoS, in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 50: 549–

- Lee, H., Doak, T. G., Popodi, E., Foster, P. L. and Tang, H. (2016). Insertion sequence-caused large-scale rearrangements in the genome of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* 44: 7109–7119
- Livingston, D. M. and Richardsons, C. (1975). Acid Polymerase III of *Escherichia coli* 250: 489–497
- Makino, K., Amemura, M., Kim, S. K., Nakata, A. and Shinagawa, H. (1993). Role of the sigma 70 subunit of RNA polymerase in transcriptional activation by activator protein PhoB in *Escherichia coli*. *Genes & development*. 7: 149–160
- Martínez-García, E., Calles, B., Arévalo-Rodríguez, M. and de Lorenzo, V. (2011). pBAM1: an all-synthetic genetic tool for analysis and construction of complex bacterial phenotypes. *BMC microbiology* 11: 38
- Mellon, I. and Hanawalt, P. C. (1989). Induction of the *Escherichia coli* lactose operon selectively increases repair of its transcribed DNA strand. *Nature* 342: 95–98
- Moras, D. and Argos, P. (1990). An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Engineering, Design and Selection* 3: 461–467
- Morohoshi, T., Maruo, T., Shirai, Y., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H., Kato, J. and Kuroda, A. (2002). Accumulation of Inorganic Polyphosphate in *phoU* Mutants of *Escherichia coli* and Accumulation of Inorganic Polyphosphate in *phoU* Mutants of *Escherichia coli* and *Synechocystis sp.* Strain PCC6803. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1–5
- Mustacich, D. and Powis, G. (2000). Thioredoxin reductase. *The Biochemical journal* 346 Pt 1: 1–8
- Napolitano, R. (2000). All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis. *The EMBO Journal* 19: 6259–6265
- Orr, M. and Vitols, E. (1966). Thioredoxin from *Lactobacillus leichmannii* and its role as hydrogen donor for ribonucleoside triphosphate reductase. *Analysis* 25
- Petrosino, J. F., Galhardo, R. S., Morales, L. D. and Rosenberg, S. M. (2009). Stress-induced Beta-lactam antibiotic resistance mutation and sequences of stationary-phase mutations in the *Escherichia coli* chromosome. *Journal of Bacteriology* 191: 5881–5889
- Qi, W., Baldwin, S. A., Muench, S. P. and Baker, A. (2016). Pi sensing and signalling: from prokaryotic to eukaryotic cells. *Biochemical Society Transactions* 44: 766–773
- Rao, N. N. and Torriani, A. (1990). Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 4: 1083–1090
- Read, A.F. and Woods, R. J. (2014). Antibiotic resistance management. *Evolution, Medicine,*

and Public Health 2014: 147–147

- Reuven, N. B., Arad, G., Maor-Shoshani, A. and Livneh, Z. (1999). The mutagenesis protein UmuC is a DNA polymerase activated by UmuD', RecA, and SSB and is specialized for translesion replication. *Journal of Biological Chemistry* 274: 31763–31766
- Riesenfeld, C., Everett, M., Piddock, L. J. V. and Hall, B.G. (1997). Adaptive mutations produce resistance to ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 2059–2060
- Saumaa, S., Tarassova, K., Tark, M., Tover, A., Tegova, R. and Kivisaar, M. (2006). Involvement of DNA mismatch repair in stationary-phase mutagenesis during prolonged starvation of *Pseudomonas putida*. *DNA Repair* 5: 505–514
- Savery, N.J. (2007). The molecular mechanism of transcription-coupled DNA repair. *Trends in Microbiology*
- Selby, C. P. and Sancar, A. (1993). Molecular mechanism of transcription-repair coupling. *Science (New York, N.Y.)* 260: 53–58
- Selby, C. P., Witkin, E. M. and Sancar, A. (1991). *Escherichia coli* mfd mutant deficient in 'mutation frequency decline' lacks strand-specific repair: in vitro complementation with purified coupling factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 11574–8
- Sengupta, S., Chattopadhyay, M. K. and Grossart, H. P. (2013). The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in Microbiology* 4: 1–13
- Severinov, K., Soushko, M., Goldfarb, A. and Nikiforov, V. (1993). Rifampicin region revisited. New rifampicin-resistant and streptolydigin-resistant mutants in the beta subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *The Journal of biological chemistry* 268: 14820–14825
- Shibata, T. (1987). recA protein. *Tanpakushitsu kakusan koso. Protein, nucleic acid, enzyme* 32: 69–76
- Shurvinton, C. E. and Lloyd, R. G. (1982). Damage to DNA induces expression of the ruv gene of *Escherichia coli*. *MGG Molecular & General Genetics* 185
- Spector, A., Yan, G. Z., Huang, R. R. C., McDermott, M. J., Gascoyne, P. R. C. and Pigiet, V. (1988). The effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> upon thioredoxin-enriched lens epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*
- Stumpf, J. D. and Foster, P. L. (2005). Polyphosphate kinase regulates error-prone replication by DNA polymerase IV in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 57: 751–761
- Sutton, M. D., Smith, B. T., Godoy, V. G. and Walker, G. C. (2000). The Sos Response: Recent

- Insights into umuDC -Dependent Mutagenesis and DNA Damage Tolerance. *Annual Review of Genetics* 34: 479–497
- Tagel, M., Tavita, K., Hõrak, R., Kivisaar, M. and 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*. Elsevier B.V
- Tang, M., Pham, P., Shen, X., Taylor, J. S., O'Donnell, M.E., Woodgate, R. and Goodman, M.F. (2000). Roles of *E. coli* DNA polymerases IV and V in lesion-targeted and untargeted SOS mutagenesis. *Nature* 404: 1014–1018
- Tang, M., Shen, X., Frank, E. G., O'Donnell, M., Woodgate, R. and Goodman, M. F. (1999). UmuD'(2)C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 8919–24
- Thliveris, A. T., Little, J. W. and Mount, D. W. (1991). Repression of the *E. coli* *recA* gene requires at least two LexA protein monomers. *Biochimie* 73: 449–456
- Viguera, E., Canceill, D. and Ehrlich, S. D. (2001). Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. *EMBO Journal* 20: 2587–2595
- Viswanathan, V. K. (2014). Off-label abuse of antibiotics by bacteria. *Gut Microbes* 5
- Wagner, J., Gruz, P., Kim, S. R., Yamada, M., Matsui, K., Fuchs, R. P. P. and Nohmi, T. (1999). The *dinB* gene encodes a novel *E. coli* DNA polymerase, DNA pol IV, involved in mutagenesis. *Molecular Cell* 4: 281–286
- Wanner, B. L. (1993). Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *Journal of Cellular Biochemistry* 51: 47–54
- Wanner, B. L. and Chang, B. D. (1987). The *phoBR* operon in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 169: 5569–5574
- Webb, D. C., Rosenberg, H. and Cox, G.B. (1992). Mutational analysis of the *Escherichia coli* phosphate-specific transport system, a member of the traffic ATPase (or ABC) family of membrane transporters. A role for proline residues in transmembrane helices. *Journal of Biological Chemistry* 267: 24661–24668
- Winterbourn, C. C. (1995). Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology Letters* 82–83: 969–974
- Wright, B. E. (2000). A Biochemical Mechanism for Nonrandom Mutations and Evolution MINIREVIEW. 182: 2993–3001
- Wright, E. A., Fothergill, J. L., Paterson, S., Brockhurst, M. A. and Winstanley, C. (2013). Sub-inhibitory concentrations of some antibiotics can drive diversification of *Pseudomonas*

aeruginosa populations in artificial sputum medium. BMC Microbiology 13: 170

Wu, H., Kosaka, H., Kato, J., Kuroda, A., Ikeda, T., Takiguchi, N. and Ohtake, H. (1999). Cloning and characterization of {*Pseudomonas putida*} genes encoding the phosphate-specific transport system. J. Biosci. Bioeng. 87: 273–279

## KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

- <http://www.pseudomonas.com>
- <http://www.ecocyc.org>
- <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

# LIHTLITSENTS

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Valeria Sidorenko

Sünnikuupäev: 19.12.1994

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose  
Mutantide tekkesagedust suurendavad geenid bakteris *Pseudomonas putida*,  
mille juhendajad on Ph.D. Maia Kivisaar ja M.Sc. Kärt Ukkivi

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, \_\_\_\_\_ (kuupäev)