

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

Mari Tagel

Uute mutatsioonisagedust mõjutavate geenide identifitseerimine bakteris *Pseudomonas putida*

Magistritöö

Juhendaja Ph.D. Maia Kivisaar

TARTU 2014

Sisukord

Sisukord.....	2
Kasutatud lühendid.....	4
1. Kirjanduse ülevaade.....	6
1.1. Statsionaarse faasi mutatsiooniprotsessid.....	6
1.1.1. SOS vastus.....	6
1.1.2. Üldine stressivastus.....	7
1.1.3. Mutagenees vananevates kolooniates.....	8
1.2. Oksüdatiivne stress ja reaktiivsed hapnikuühendid.....	10
1.2.1. ROS-i tekitavad kahjustused.....	12
1.2.2. Oksüdatiivse stressi vastus.....	13
1.3. Bakteriaalsed multiresistentsuspumbad.....	15
1.3.1. RND transporterid.....	16
1.3.2. MATE transporterid.....	16
1.3.3. MFS transporterid.....	16
1.3.4. SMR transporterid.....	16
1.3.5. ABC transporterid.....	17
2. Eksperimentaalne osa.....	18
2.1. Töö eesmärgid.....	18
2.2. Materjal ja meetodika.....	19
2.2.1. Töös kasutatud plasmiidid, bakteritüved ja bakterite kasvutingimused.....	19
2.2.2. Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon.....	19
2.2.3. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR).....	20
2.2.4. Plasmiidse DNA eraldamine ning restriksioonianalüüs.....	20
2.2.5. Geelelektroforees.....	20
2.2.6. Bakterite konjugatsioon.....	20
2.2.7. Testtüve konstrueerimine.....	21
2.2.8. Transposoonmutagenees ja transkonjugantide analüüs.....	21
2.2.9. ARB-PCR.....	22
2.2.10. Sekveneerimine.....	22
2.2.11. Kloneerimine.....	23
2.2.12. <i>ttg2A</i> ja <i>ttg2B</i> geeni deletsioonitüvede konstrueerimine.....	23
2.2.13. Topeltmutantide konstrueerimine.....	24

2.2.14.	<i>P. putida</i> Rif-resistentsete mutantide tekkesageduse määramine.....	24
2.2.15.	Statsionaarse faasi mutatsioonide tekkesageduse määramine <i>P. putida</i> rakkudes plasmiidse TAG testsüsteemi abil	25
2.2.16.	<i>P. putida</i> populatsiooni elumuse määramine fenool-minimaalsöötmetl	25
2.2.17.	DNA-d kahjustavate kemikaalide tundlikkuse test	26
2.2.18.	Minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni määramine	26
2.2.19.	<i>P. putida</i> rakkude generatsiooniaja määramine.....	26
2.2.20.	Membraanivalkude eraldus.....	27
2.2.21.	SDS-poliakrüülamiidgeelelektroforees	27
2.2.22.	Bakteripopulatsioonide analüüs läbivoolutsütomeetril	28
2.3.	Tulemused	29
2.3.1.	Testtüvi ja testsüsteemi põhimõte	29
2.3.2.	Mutatsioonisagedust mõjutavate geenide detekteerimine transposoonmutageneesi abil.....	30
2.3.3.	Transposoonmutageneesi abil tuvastatud mutatsioonisagedust mõjutavad geenid	31
2.3.4.	Ttg2 deletsioonitüvede spontaansete mutatsioonide teke eksponentsiaalses faasis	34
2.3.5.	Ttg2 deletsioonitüvede ja topelmutantide statsionaarse faasi mutagenees.....	35
2.3.6.	Deletsioonitüvede Δ ttg2A ja Δ ttg2B iseloomustamine.....	36
2.4.	Arutelu.....	44
2.4.1.	Mutatsioonisagedust mõjutavaid genee tuvastav testsüsteem lac-lsc.....	44
2.4.2.	Testsüsteemi abil detekteeritud geenid.....	46
2.4.3.	Testsüsteemi abil isoleeritud transporterite geenid	46
2.4.4.	ABC transporter Ttg2	48
	Kokkuvõte	50
	Summary.....	52
	Tänuõnad.....	54
	Kasutatud kirjandus	55
	Kasutatud veebilehed.....	60
	Lisad	61

Kasutatud lühendid

8-oxoG – 8-oksoguaaniin

ABC – ATP-d siduv domeen (ingl k – *ATP-binding cassette*)

glc – glükoos (ingl k – *glucose*)

CAA – kaseiini hüdrolüsaat (ingl k - *casamino acids*)

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

MAC – mutagenees vananevates kolooniates (ingl k – *mutagenesis in aging colonies*)

MATE – väljavoolu pumba perekond (ingl k *multidrug and toxic compound extrusion*)

MDR – väljavoolu pumba superperekond (ingl k *multidrug resistance*)

MFS – väljavoolu pumba superperekond (ingl k *major facilitator superfamily*)

MIC – minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon (ingl k – *minimal inhibitory concentration*)

MMC – mitomütsiin C (ingl k – *mitomycin C*)

MMR – paardumisvea reparatsioon (ingl k – *mismatch repair*)

NBD – nukleotiide siduv domeen (ingl k – *nucleotide-binding domain*)

NQO – 4-nitrokinoliin N-oksiid (ingl k – *4-Nitroquinoline N-oxide*)

PI – propiidiumjodiid

PMS – fenasiin-metasulfaat (ingl k – *phenazine methosulfate*)

RND – väljavoolu pumba superperekond (ingl k *resistance/nodulation/cell divisjon*)

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

SMR – väljavoolu pumba perekond (ingl k *small multidrug resistance*)

phe – fenool (ingl k – *phenol*)

SD – Shine-Dalgarno järjestus

SOD – superoksiidi dismutaas

suc – sahharoos (ingl k – *sucrose*)

TMD – transmembraanne domeen (ingl k – *transmembrane domai*)

wt – metsiktüvi (ingl k – *wild-type*)

Sissejuhatus

Mutatsioonid on evolutsiooni edasiviiv jõud, mille tekkimine sõltub nii otseselt DNA-d kahjustavatest eksogeensetest ja endogeensetest ühenditest kui ka replikatsioonivigadest ja nende parandamata jätmisest. Nende vigade ja kahjustuste parandamine on väga oluline, sest ka üksik mutatsioon võib osutada indiviidile letaalseks. Samas suurendavad mutatsioonid populatsioonis geneetilist varieeruvust ja võivad erinevate looduslike nišside puhul kaasa aidata kohasemate variantide tekkele. Mutatsioonisagedus bakterikultuuris võib sõltuda bakterite kasvufaasist ja eelkõige suurenedas statsionaarses faasis, mil bakterite kasv aeglustub ebasobivate kasvutingimuste tõttu. Suurenenud mutatsioonide hulk stressitingimustes suurendab tõenäosust, et populatsioonis tekivad antud keskkonnas kasulikud mutatsioonid ja neil mutatsioonidel on võimalus fikseeruda (MacLean jt. 2013). Sellist stressist tingitud mutatsioonitaseme tõusu nimetatakse statsionaarse faasi mutageneesiks (Foster 1999; Rosenberg 2001). Kuna enamasti bakterid elavadki stressitingimustes, siis on nende kohanemisvõime mõistmiseks äärmiselt oluline mõista statsionaarse faasi mutageneesi mehhanisme.

Mutatsioonisageduse tõus statsionaarses faasi rakkudes võib olla põhjustatud üldisest geenide ekspressioonimustri muutusest, näiteks vigutegevate DNA polümeraaside ekspressiooni suurenemisest või DNA reparatsiooniradade geenide mahasurumisest. Samuti võib mutatsioonide teket stimuleerida rakusiseste reaktiivsete hapnikuühendite (ROS; ingl k – *reactive oxygen species*) või muude ohtlike elutegevuse kõrvalproduktide kuhjumine (Foster 2001). Kuigi erinevaid reparatsiooniradasid ja nende puudumist on erinevates bakterites palju uuritud, on hoopis vähem teada teistest mehhanismidest, mis võivad samuti suurendada mutatsioonisagedust rakkudes. Seetõttu konstrueeritigi meie laboris testsüsteem, mis võimaldab mudelorganismis *P. putida* ülegenoomselt detekteerida mutatsioonisagedust mõjutavaid gene, panemata rõhku ainult reparatsiooniradadele.

Antud töö eesmärgiks on seda testsüsteemi iseloomustada ja selgitada selle abil tuvastatud geenide rolli mutatsiooniprotsessides. Eelpool mainitud kahjulike ühendite kuhjumisel rakku võivad erinevad membraanides paiknevad väljavoolupumbad muutuda üha olulisemaks ja olla nii kaudselt seotud mutatsiooniprotsessidega. Seetõttu on käesolevas töös lähemalt uuritud testsüsteemiga detekteeritud multiresistentsuspumba (MDR; ingl k - *multidrug-resistance efflux pumps*) Ttg2 funktsioone ja seoseid mutatsioonisagedusega.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Statsionaarse faasi mutatsiooniprotsessid

Toitainete vähenemisel või muude stressitingimuste ilmnemisel rakujagunemine aeglustub ja bakterid sisenevad statsionaarsesse faasi. Statsionaarse faasi rakud läbivad palju morfoloogilisi ja füsioloogilisi muudatusi, et paremini stressiga toime tulla: nad jagunevad aeglasemalt, kuid samas tekib neis sageli mutatsioone (Navarro Llorens jt. 2010). Mutatsioonitaseme tõusu bakterirakkudes peetakse üheks olulisemaks stressitingimustega adapteerumise mehhanismiks. Mutatsioonid on evolutsiooni edasiviiv jõud. Sealjuures on väga oluline, et mutatsioonisagedus poleks liiga kõrge, sest sellega suureneb ka oht kahjulike mutatsioonide tekkeks, ega liiga madal, andes liiga vähe alust geneetilisele varieeruvusele (Watson jt. 2004). Klassikaliselt arvestatakse mutatsioonisagedust konkreetse konstantse väärtusena generatsiooni kohta. Ometi on täheldatud, et erinevad bakterite elutegevust mõjutavad stressitingimused indutseerivad geneetiliste variatsioonide suurenemist populatsioonis. Nendest uutest variantidest selekteeruvad välja antud keskkonnatingimustega enim kohastunud variandid (Foster 2011; MacLean jt. 2013).

Statsionaarse faasi mutageneesi (kirjanduses ka „stressist indutseeritud mutagenees“ ja „adaptiivne mutagenees“) võivad soodustada erinevad stressitingimused: muuhulgas toitainete nappus, liiga kõrge või madal temperatuur, toksilised ühendid ja ebasobiv pH tase (Foster 1999; Rosenberg 2001; Foster 2007). Stressi mõju mutatsioonisageduse suurenemisele võib toimuda näiteks vigutegevate polümeraaside geenide ekspressiooni suurenemise või DNA reparaatoriraja geenide represseerimise kaudu (Foster 2007; MacLean jt. 2013). Stressivastus ja sellega kaasnenud suurenenud mutatsioonisagedus on rakkudele küllaltki kulukad ning seetõttu stressori kadumisel keskkonnast taastub geenide endine ekspressioonitase ja mutatsioonisagedus langeb tavapärasele tasemele, et vältida soovimatute mutatsioonide kuhjumist (Foster 2011).

Erinevate stressivastuste hulka kuuluvad näiteks SOS vastus, üldine stressivastus, „poomisvastus“ (ingl k – *stringent response*), kuumašoki vastus (ingl k – *heat-shock response*) ja külmašoki vastus (ingl k – *cold-shock response*) (Foster 2007; Galhardo jt. 2007).

1.1.1. SOS vastus

SOS vastus on bakteri reaktsioon ebasobivatele keskkonnatingimustele. SOS geenide repressori LexA degradatsioon mõjutab otseselt rohkem kui 40 geeni ekspressiooni. Klassikaliselt käsitletakse SOS vastuse indutseerijana ssDNA katkeid ja peatunud

replikatsioonikahvlit. SOS vastuse esmaseks eesmärgiks ongi rakutsükli aeglustamine ja reparatsiooniraja ensüümide aktiveerimine, et rakk jõuaks parandada tekkinud katkeid ning replikatsioon saaks jätkuda (Foster 2007; Galhardo jt. 2007). Lisaks on näidatud, et *Escherichia coli*'s võivad SOS vastuse esile kutsuda kokkupuude β -laktaamsete antibiootikumidega ja rakuseina stress (Miller jt. 2004).

Kui replikatsioon peatub ja/või tekivad DNA katked, paljastub rakus ssDNA, millega seonduvad RecA monomeerid, moodustades RecA-ssDNA filamente. DNA-ga seondunud nõ aktiveeritud RecA on võimeline vahendama LexA proteolüüsi. LexA on globaalne repressor ja selle lagundamisel kaob ka SOS geenide repressioon. SOS geenide hulka kuuluvad paljud DNA reparatsiooniga seotud, rakujagunemist aeglustavad ja rekombinatsiooniga seotud geenid (Friedberg jt. 2006; Foster 2007; Galhardo jt. 2007; Foster 2011). SOS vastus kutsutakse esile ka siis, kui rakud puutuvad kokku DNA-d kahjustavate kemikaalidega ning samuti on täheldatud SOS vastust näljatingimustes kasvavates rakkudes (Taddei jt. 1995).

SOS vastusest tulenev suurenenud mutatsioonisagedus on enamasti tingitud madala täpsusega DNA polümeraaside tööst. DNA polümeraasidel Pol IV ja Pol V on küll võime vigadest üle sünteesida, kuid neil endil puudub vigu parandav (ingl k – *proofreading*) aktiivsus ning samuti on nende täpsus ja protsessiivsus madalam kui tavalisel replikatiivsel DNA polümeraasil Pol III. Samas suudavad polümeraasid Pol IV ja Pol V (geenid vastavalt *dinB* ja *umuCD*) siiski jätkata DNA sünteesi sealt, kus Pol III seda ei suudaks (Friedberg jt. 2006; Foster 2007; Galhardo jt. 2007).

Lisaks on näidatud, et SOS vastus kutsutakse esile konjugatsiooni, DNA rekombinatsiooni ja transponeeruvate elementide liikumise käigus. Seeläbi on SOS vastus võimeline veelgi geneetilist varieeruvust suurendama (Taddei jt. 1997).

1.1.2. Üldine stressivastus

Puutudes kokku stressitingimustega, näiteks toitainete nappus, toksilised ühendid või ebasobiv pH tase, sisenevad rakud statsionaarsesse faasi. Kohanemaks stressitingimustega läbivad rakud ulatuslikke ümberkorraldusi geeniekspressioonis. Neid muutusi põhjustab statsionaarse faasi keskne regulaator RpoS (σ^{38} , σ^s). RpoS on RNA polümeraasi sigma subühik, mis võimaldab RNA polümeraasi spetsiifilist seondumist promotoriga. Antud tingimustes vahetab RpoS tavapärase sigma faktori RpoD (σ^{70}) välja ning suunab seeläbi RNA polümeraasi eelistatult transkribeerima geene, mis on vajalikud näljaga toime tulemiseks. Sellest tulenevalt väheneb rakkude kiire kasvuga seotud geenide transkriptsiooni tase, rakkudes langeb üldine valgusünteesi tase ning toodetakse vaid ellujäämiseks hädavajalikke valke (Hengge-Aronis 2002; Battesti jt. 2011). Samuti võimendab RpoS nende

geenide transkriptsiooni, mis kaitsevad statsionaarses faasis DNA-d oksüdatiivse stressi eest (Eisenstark jt. 1996). *E. coli*'s reguleerib RpoS kas otseselt või kaudselt umbes 500 geeni ehk 10% kõigist geenidest (Weber jt. 2005).

Mutatsioonisageduse suurenemine üldise stressivastuse tagajärjel on eelkõige kõrvalprodukt stressiolukorras parima kohasuse saavutamiseks. Selle arvelt, et suurendatakse stressivastuse geenide ekspressiooni, vähendatakse energiakulukat DNA paardumisvigade reparatsiooniraja (MMR; ingl k – *mismatch reparation*) ensüümide sünteesi (Foster 2011). Näiteks hilises statsionaarses faasis on *E. coli* K-12 rakkudes MutS-i hulk vähenenud ligi kümme korda (Feng jt. 1996). Samuti on näidatud, et statsionaarses faasis reguleerib RpoS MutS-i ja MutH-d negatiivselt, seega on see MMR raja allasurumine RpoS-ist sõltuv (Tsui jt. 1997). Lisaks võib RpoS soodustada *Pseudomonas putida* rakkudes transponeeruvate elementide vahendatud genoomseid ümberkorraldusi (Ilves jt. 2001) ja nälgivates rakkudes deletsioonide teket (Saumaa jt. 2002).

Üldisest stressivastusest tulenevat mutatsioonisageduse tõusu seletatakse erinevate teooriatega. Arvatakse, et RpoS-i kaudu reparatsiooniraja ensüümide ekspressiooni mahasurumisel on evolutsiooniline eelis, et mitte kulutada energiat reparatsioonile siis, kui toitainete kättesaadavus on limiteeritud (Bjedov jt. 2003). Teiste teooriate kohaselt on see lihtsalt vältimatu ohverdus, kui kogu rakusisene energia suunatakse eelisjärjekorras stressiolukorras paremat kohasust võimaldavate geenide ekspressioonile (MacLean jt. 2013).

1.1.3. Mutagenees vananevates kolooniates

Bakterirakud kasvavad harva keskkonnas, kus toitaineid on piisavalt ja puudub stressiallikas. Selleks, et bakterid suudaksid toitainete nappuses pikalt vastu pidada, peavad nad püsima metaboolselt väheaktiivses seisundis. Sellises seisundis suudavad bakterid üle elada väga pikki näljaperioode. On näidatud, et kui baktereid näljutada agarsöötmel ligikaudu nädal ja seejärel mõõta rakupopulatsioonis spontaanselt tekkinud rifampitsiini resistentsete (Rif^R) mutantide sagedust, siis on seal Rif^R mutantide hulk populatsioonis suurem kui ainult ühe päeva agarsöötmel kasvanud rakupopulatsiooni puhul. Seda fenomeni on hakatud nimetama mutageneesiks vananevates kolooniates (MAC; ingl k – *mutagenesis in aging colonies*) (Taddei jt. 1995; Taddei jt. 1997; Bjedov jt. 2003; Wrande jt. 2008; Katz ja Hershberg 2013). Selle põhjused pole siiani päris selged ja saadud tulemusi on üritatud erinevalt tõlgendada.

Taddei jt. näitasid oma katsetes, et tahkel söötmel vananenud kolooniates indutseeriti SOS vastus, mis sõltus *cya* geenist, mille puhul on tegu cAMP sünteesi võtmeensüümiga. Nende välja pakutud hüpoteesi kohaselt on näljatingimustes tekkinud genotüübilised ja

fenotüübilised muutused tingitud SOS vastusest ja stressist indutseeritud mutageneesist, lisaks pakkusid nad välja, et mõned varem seletamatud SOS vastuse efektid võivadki olla vajalikud eelkõige näljatingimustes adapteerumiseks (Taddei jt. 1995; Taddei jt. 1997).

Bjedov jt. uurisid samuti Rif-resistentsuse tekke näitel mutatsioonisageduse suurenemist nälgivates kolooniates, kuid seda mitte laboritüvedes, vaid looduslikel isolaatidel. Neis katsetes näidati, et võrreldes aeroobsete tingimustega pole anaeroobsetes tingimustes nälgimisest indutseeritud mutatsioonisageduse suurenemine nii märgatav. Kuna varasemast oli teada, et anaeroobne keskkond represserib statsionaarse faasi mutageneesi, siis järelitati, et MAC-i stimuleerib oksüdatiivne stress. Antud tööst ilmnis ka, et MAC sõltub vähemalt kahest SOS vastuse geenist: *recA* ja *polB*. Samas näidati, et MAC ei sõltu LexA olemasolust. Seega toimub SOS vastuse aktiveerimine vananevates rakkudes tõenäoliselt LexA-sõltumatult. Saadud tulemuste põhjal pakkusid Bjedov jt. välja, et MAC fenomen on kirjeldatav osana statsionaarse faasi mutageneesist ning sõltub süsinikunäljast ja oksüdatiivsest stressist (Bjedov jt. 2003).

Seevastu Wrande jt. näitasid, et nende katsetes sõltus Rif-resistentsete mutantide akumulatsioon vananevas rakupopulatsioonis rakkude kasvust: 7 päeva nälginud rakupopulatsioonis oli toimunud võrreldes katse alguspunktiga hoolimata näljast osade rakkude aeglane kasv ja seega võis nälgimisperioodil tekkinud Rif^R mutantidel olla võrreldes teiste rakkudega populatsioonis kasvueelisel (Wrande jt. 2008). Seevastu Bjedovi jt. töös uuritud mutatsioonid kasvueelisel ei andnud (Bjedov jt. 2003). Samuti võrdlesid Wrande jt. ka teistele antibiootikumidele resistentsete mutantide teket. Nad väitsid, et kui MAC oleks seotud mutatsioonisageduse suurenemisega vananevate rakkude populatsioonis, siis peaks seda nägema ka teiste mutatsioonide osas. Selgus aga, et võrreldes Rif^R mutantidega, tekkis teiste antibiootikumide osas resistentseid mutante hoopis vähem (Wrande jt. 2008). Samas on saadud ka vastupidiseid tulemusi. Näiteks nalidiksiinhappe suhtes resistentsete mutantide hulk suurenes isegi rohkem võrreldes Rif^R mutantidega (Katz ja Hershberg 2013). Seega pole MAC ainult Rif^R mutantide tekkega seotud fenomen.

Katz jt. sekveneerisid oma töös nälginud kolooniate täisgenoome ja nägid, et nälgimine polnud tõstnud üldist mutatsioonisagedust genoomis. Selle põhjal nad väitsid, et Rif^R mutantide suurem osakaal vananevates kolooniates pole seotud mutageneesiga, vaid pigem kasvu erinevustega ja loodusliku valikuga (Katz ja Hershberg 2013).

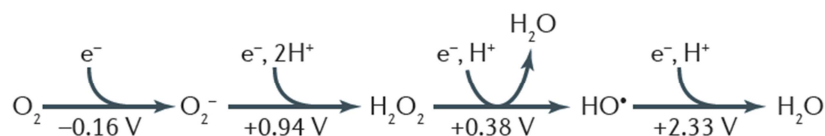
Seega pole päris kindel, mis põhjustab seda, et vananevates bakterikolooniates on täheldatud teatud tüüpi mutantide arvukuse suurenemist. Igal juhul indutseerib seda süsinikunälg ja tõenäoliselt ka oksüdatiivne stress, sest mida kauem rakud antud tingimustes

nälgivad, seda rohkem hakkab neis suurenema rakusisene reaktiivsete hapnikuvormide (ROS; ingl k – *reactive oxygen species*) ja teiste kahjulike ühendite tase. Seega võiks arvata, et mida pikem on rakkude näljaperiood, seda olulisemaks muutuvad rakumembraanis olevad transporterid, mis viivad välja rakkudesse kuhjunud kahjulikke ühendeid.

1.2. Oksüdatiivne stress ja reaktiivsed hapnikuühendid

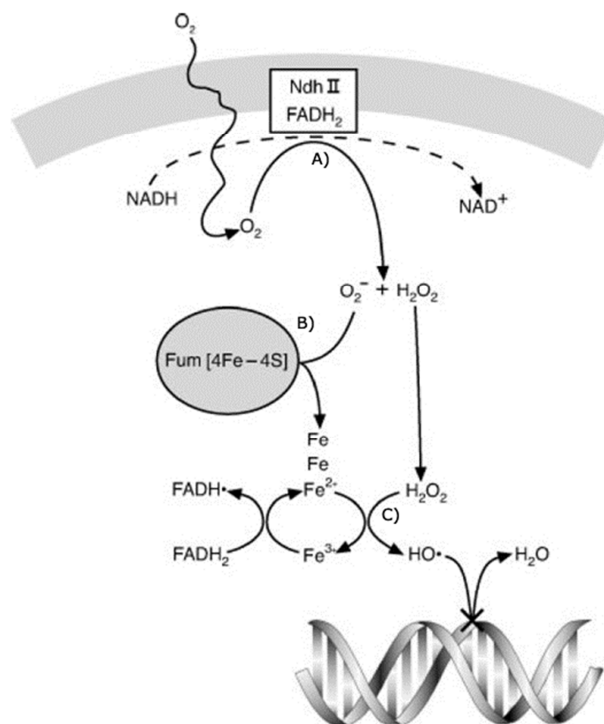
Statsionaarses faasis on replikatsiooni tase rakkudes madal ning samal ajal puutuvad rakud kokku toitainete näljaga ja muude raskete tingimustega. Sellest tulenevalt on enamus statsionaarse faasi mutatsioonidest tingitud kas otseselt DNA kahjustustest või siis nende parandamata jätmisest (Foster 2007). DNA-d kahjustavad nii endogeensed kui eksogeensed faktorid. Ühed tüüpilisemad endogeensed DNA-d kahjustavad ühendid on reaktiivsed hapnikuühendid (ROS), mis on aeroobse metabolismi tavapärased kõrvalproduktid ning mis hakkavad statsionaarses faasis tasapisi akumuleeruma, põhjustades oksüdatiivset stressi (Friedberg jt. 2006). Lisaks spontaanselt aeroobse elutegevuse käigus tekkinud ROS-idele on täheldatud ka ROS-ide taseme tõusu rakkudes nende kokkupuutel antibiootikumide ja aromaatsete ühenditega, näiteks fenooli ja tolueniga (Santos jt. 2004; Dominguez-Cuevas jt. 2006; Kohanski jt. 2007), ning patogeensetel bakteritel peremeesorganismi vasturünnakuna keskkonda paisatud ainete tõttu (Imlay 2003).

Hingamisahela reaktsioonide ning erinevate oksüdatsiooniprotsesside käigus tekkivate endogeensete ROS-ide hulka kuuluvad superoksiidradikaal $\cdot\text{O}_2^-$, vesinikperoksiid H_2O_2 ja hüdroksüülradikaal $\cdot\text{OH}$. Nendest kolmest on H_2O_2 ainus, mis on polaarne laenguta molekul, mistõttu võib ta rakku sattuda lihtsalt läbi membraani difundeerudes ja seega jõuab rakkudesse ka eksogeenset päritolu vesinikperoksiidi. Kõigil neil nimetatud ROS-idest on erinev kineetika ja reaktsioonispetsiifilisus (Friedberg jt. 2006; Vatansever jt. 2013). ROS-id võivad spontaanselt kahjustada nii DNA-d, valke, süsivesikuid kui ka membraane ja on seetõttu rakkudele väga ohtlikud (Friedberg jt. 2006). Aeroobsetel mikroorganismidel on rakkude oksüdatiivse stressi eest kaitsmiseks välja kujunenud palju mehhanisme. Levinud on spetsiifilised ensüümid ROS-ide kahjutuks tegemiseks (superoksiidi dismutaasid (SOD), katalaasid ja peroksüdaasid), oksüdatiivset stressi põhjustavaid ühendeid rakust välja viivad transporterid ja kahjustusi kõrvaldavad spetsiifilised DNA reparatsioonirajad (Imlay 2003; Friedberg jt. 2006).



Joonis 1. Molekulaarsest hapnikust osaliselt redutseerunud reaktiivsete hapnikuühendite teke elektronide lisamisel. Reaktsiooni juurde on märgitud vastava reaktsiooni redokspotentsiaal standardtingimustes (25 °C, pH 7, lähteaine kontsentratsioon 1 M) (Imlay 2013).

O₂ ise on väike polaarne molekul, mis difundeerub vabalt läbi membraanide. Seetõttu ei erine aeroobses keskkonnas rakisene hapniku tase eriti rakuvälisest. Hapnikuaatomi välises elektronkihis paiknevad kahel π-orbitaalil paardumata sama spinniga elektronid ning kumbki neist orbitaalidest on võimeline omastama ühe elektroni. Selline paigutus tagab selle, et ka O₂ omastab elektrone ühekaupa (Imlay 2003; Imlay 2013). O₂ redokspotentsiaal on negatiivne ja molekulaarne hapnik ei ole hea oksüdeerija, suutes omastada elektrone vaid väga headelt elektronide doonoritelt, näiteks flaviinidelt, ensüümide metalltsentritest ja hingamisahelas osalevatelt kinoonidelt (Joonis 2 A) (Imlay 2013). Reaktiivsed hapnikuühendid tekivadki molekulaarsest hapnikust, kui sellele lisatakse elektrone (Joonis 1) (Friedberg jt. 2006). [•]O₂⁻ ja H₂O₂ on termodünaamiliselt juba palju paremad oksüdeerijad ja oluliselt reaktsioonivõimelisemad kui O₂ (Joonis 1).

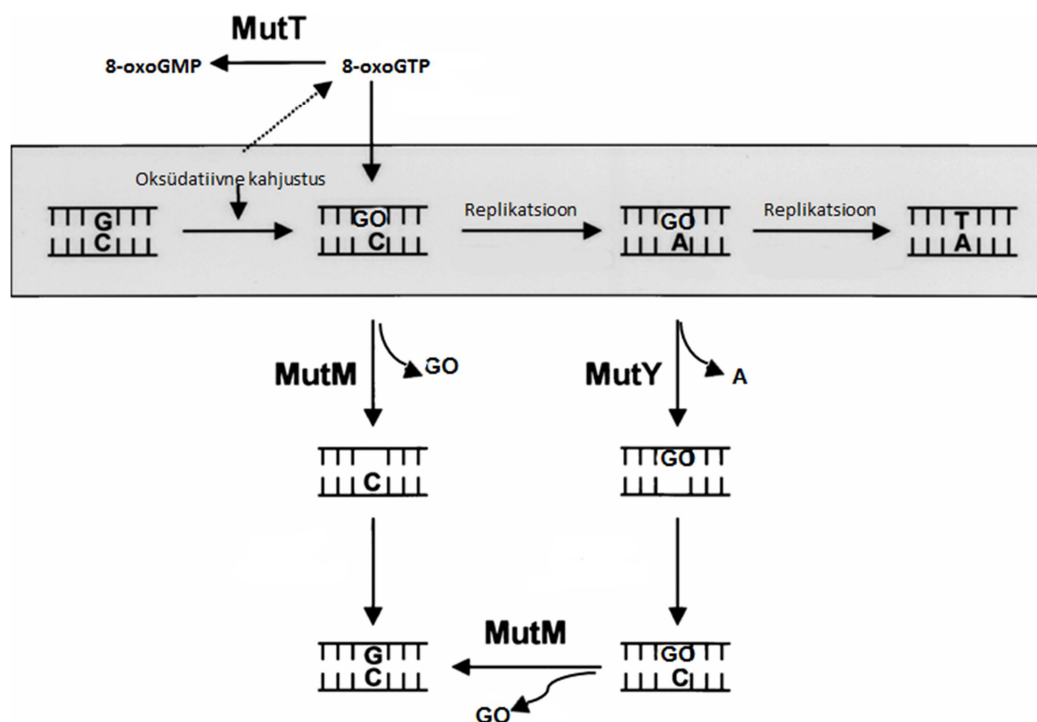


Joons 2. Oksüdatiivne stress rakkudes. A) O₂ difundeerumisel raku võib see erinevate kofaktorite juuresolekul autooksideeruda, mille tulemusel tekivad reaktiivsed hapnikuühendid. B) ROS-id võivad kahjustada 4Fe-4S klastriga ensüüme sealt raua ioone eraldades. C) Fentoni reaktsioonis redutseerub vesinikperoksiid rauaga kokku puutudes hüdroksüülradikaaliks ja kahjustab DNA-d (Imlay 2003, modifitseeritud).

1.2.1. ROS-i tekitatavad kahjustused

Otseselt DNA-d kahjustava toimega on hüdroksüülradikaal, mis tekib Fentoni reaktsioonis, kus H_2O_2 redutseerub Fe^{2+} ioonidega kokku puutudes (Joonis 2 C) (Imlay jt. 1988). Oksüdatiivsed DNA kahjustused on aluseks mutageneesile. ROS-id põhjustavad muuhulgas DNA katkeid, lämmastikaluste deamineerimist, depurineerimist ning üks sagedasemaid muutusi on guaniini oksüdeerimisel moodustuv 8-oksoguaaniin (8-oxoG), mis paardub tsütosiini asemel adeniiniga (Miller 1996). Vältimaks 8-oxoG mutageenset efekti, on bakteritel väljakujunenud oksüdeeritud guaniini GO reparatsioonirada. *E. coli* GO süsteemis on kolm ensüümi: MutM, MutY ja MutT (Joonis 3) (Michaels ja Miller 1992). MutM on glükosülaas, mis eemaldab C nukleotiidiga paardunud 8-oxoG DNA ahelast (Cabrera jt. 1988; Michaels ja Miller 1992). MutY on samuti glükosülaas, mis eemaldab replikatsiooni käigus 8-oxoG-ga paardunud A nukleotiidi ja jääb seejärel ise DNA ahelaga seotuks. See võib olla signaaliks teistele reparatsiooni ensüümidele, kutsudes neid parandama ahelasse jäänud 8-oxoG-d, et DNA ahelas olev aluspaari info kaotsi ei läheks (Nghiem jt. 1988; Michaels ja Miller 1992). MutT tunneb ära 8-oxo-dGTP ja eemaldab sellelt ühe fosfaatrühma, takistades seeläbi 8-oxoG lülitamist sünteesitavasse DNA ahelasse (Maki ja Sekiguchi 1992).

Lisaks otsestele DNA kahjustustele suudavad ROS-id kahjustada ka teisi rakusiseseid makromolekule. Üheks H_2O_2 ja $\cdot\text{O}_2^-$ sihtmärgiks on 4Fe-4S tsentriga ensüümid. ROS-id põhjustavad 4Fe-4S tsentriga reageerides klastrist ühe Fe^{2+} eraldumist ja ensüüm muutub inaktiivseks (Joonis 2 B). Esmalt näidati seda *E. coli* dihüdroksüülhappe dehüdrataasi puhul, mida on võimalik $\cdot\text{O}_2^-$ -ga inaktiveerida (Kuo jt. 1987). Samuti inaktiveeruvad H_2O_2 -ga kokkupuutel ka *E. coli* ensüümid, mille keskmeks on üks raua molekul, näiteks peptiidi deformülaas, treoniini dehüdrogenaas ja tsütosiini deaminaas (Anjem ja Imlay 2012). Tõsiseks probleemiks oksüdatiivse stressi puhul on ka lipiidide peroksüdatsioon. Imetajate rakkudes on lipiidide peroksüdatsioon üks sagedasemaid oksüdatiivseid kahjustusi (Imlay 2003), kuid prokariotide rakkudes see nii sage pole. Sellest hoolimata on tõestatud, et H_2O_2 lisamisel *E. coli* kasvukeskkonda suureneb rakkudes oksüdatiivselt kahjustatud lipiidide hulk (Semchyshyn jt. 2005).



Joonis 3. Oksüdatiivsete kahjustuste reparatsioonis osalevad ensüümid. GO-ga on tähistatud oksüdeeritud G vorm (<http://www.biochemsoctrans.org/bst/033/0679/bst0330679f01.htm>, modifitseeritud).

1.2.2. Oksüdatiivse stressi vastus

Kõigest nendest kahjustustest pääsemiseks on kõige tõhusam meetod hoida rakusiseste ROS-ide tase võimalikult madalal. Superoksiidi seovad superoksiidi dismutaasid (SOD), muundades selle vesinikperoksiidiks (McCord ja Fridovich 1969). Enamikel bakterite SOD-dest on kofaktoriks raud või mangaan ning sellised SOD-d paiknevad tsütoplasmas. Lisaks on leitud Cu-Zn klastriga SOD-sid, mis paiknevad gram-negatiivsetel bakteritel periplasmas ja on eelkõige iseloomulikud patogeensetele bakteritele nagu näiteks *Neisseria meningitis* ja *Haemophilus ducrey* (Kroll jt. 1995). Periplasmaatilised SOD-d on seetõttu olulised, et $\cdot\text{O}_2^-$ ei difundeeru läbi membraanide ja kui see tekib periplasmas, saavad need ensüümid $\cdot\text{O}_2^-$ lokaalselt kahjutuks teha (Imlay 2013). Tsütoplasmaatilise MnSOD ekspressiooni bakteris *E. coli* reguleerib globaalne transkriptsiooni regulaator Fur, mis vastutab raua kättesaamise ja metabolismi eest ning aktiveerib MnSOD geeni transkriptsiooni raua puuduses või vaeguses (Tardat ja Touati 1991).

Vesinikperoksiidi kahjutuks tegemiseks on kahte tüüpi ensüüme: katalaasid ja peroksüdaasid. *E. coli*'s on kaks põhilist katalaasi KatG ja KatE. Kui nende geenid deleteerida, siis madalal H_2O_2 kontsentratsioonil (1,5 μM) mutandi kasv metsiktüvest ei erine. Sellisel H_2O_2 kontsentratsioonil on põhiliseks vesinikperoksiidi lagundajaks peroksüdaas Ahp. Kuna aga peroksüdaasid vajavad H_2O_2 redutseerimiseks kofaktorina NADH-d, muutub

kõrgel H_2O_2 kontsentratsioonil reaktsiooni limiteerivaks faktoriks NADH olemasolu ja juurdepääs. Seega redutseerib *E. coli*'s vesinikperoksiidi madalal kontsentratsioonil peroksüdaas ja kõrgel kontsentratsioonil katalaasid (Seaver ja Imlay 2001). Ehk teisisõnu on katalaasid võimekamad vesinikperoksiidi sidujad. On täheldatud, et kasvu aeglustumisel tõuseb rakkudes katalaaside ekspressioonitase (Gonzalez-Flecha ja Demple 1997). Sellest võib järeldada, et aeglasemalt kasvavates statsionaarse faasi rakkudes on ROS-ide akumulatsioon tõttu vaja rohkem ROS-e kahjutuks tegevaid ensüüme.

Oksüdatiivse stressi vastust reguleerivad *E. coli*'s kaks väga olulist regulaatorit OxyR ja SoxRS. SoxR on positiivne regulaator, mis oksüdatiivse stressi vastusena aktiveerib *soxS* geeni ekspressiooni. SoxS omakorda indutseerib gene, mis aitavad toime tulla oksüdatiivse stressiga, näiteks *sodA* (Mn-sõltuv SOD) ja *nfo* (DNA reparatsiooniks vajalik endonukleas IV) (Greenberg jt. 1990; Tsaneva ja Weiss 1990). Algselt arvati, et superoksiid ise aktiveerib SoxR-i, hilisemates töödes on aga näidatud, et *in vitro* katsetes tunnetab SoxR otse redokstüklites osalevaid kemikaale (ingl k – *redox-cycling drugs*), näiteks paraquaati (Gu ja Imlay 2011). OxyR on regulaator, mis enamasti on rakkudes inaktiivses vormis, kuid muudab H_2O_2 kontsentratsiooni tõustes konformatsiooni ja aktiveerib oksüdatiivse stressi vastuse gene, näiteks *katG*-d ja *ahp*-d (Storz G. ja Hengge-Aronis R. 2000).

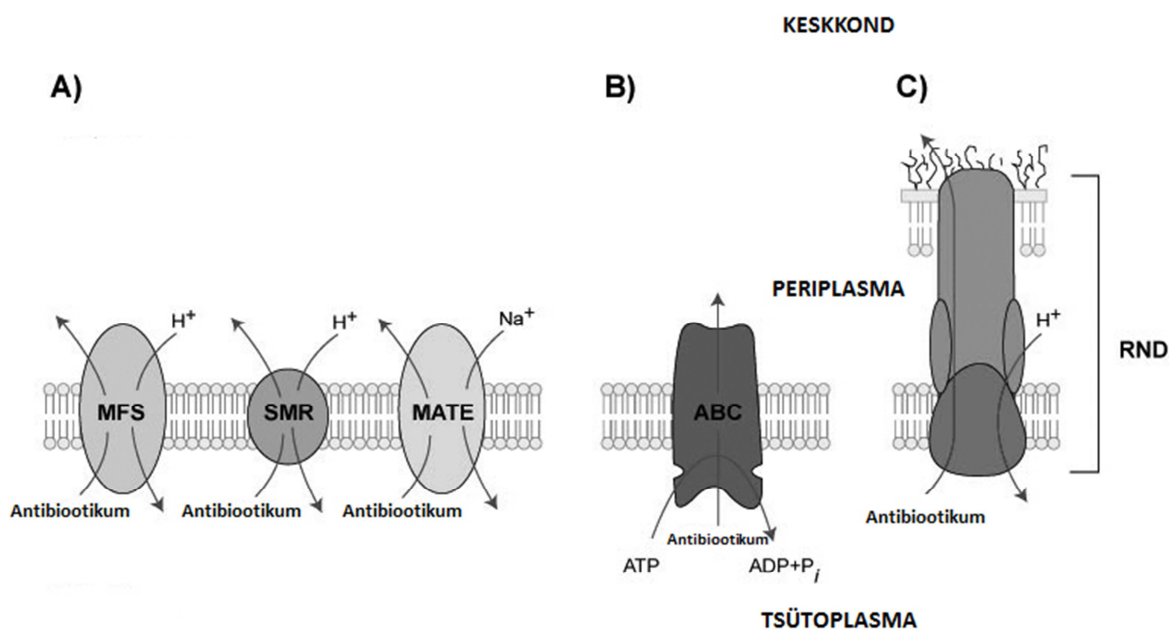
Muuhulgas aktiveerib SoxS ka *acrAB*, *tolC* ja *marRAB* geenide ekspressiooni. Kõik need *E. coli* geenid tagavad resistentsuse mõnele kahjulikule ühendile. Näiteks *marRAB* reguloni kuuluvad paljud antibiootikumi resistentsust tagavad geenid. Samas on näidatud, et mutantse *marR* (*marA* repressor) geeniga tüved taluvad paremini oksüdatiivset stressi (Ariza jt. 1994). Seega võivad ka MarA reguleeritavad geenid olla vajalikud oksüdatiivse stressi talumisel. MarA ja SoxS on struktuurilt väga sarnased valgud (aminohappelise järjestuse identsusprotsent 43, sarnasusprotsent 62) ja ka paljud nende reguleeritavad geenid kattuvad (Alekschun ja Levy 1997).

AcrAB ja TolC on RND perekonna transporterid, mis suurendavad hüdrofiilsete antibiootikumide ja detergentide resistentsust ning aitavad *E. coli*'l paremini taluda keskkonnas olevaid sapisoolasid ja pikaahelalisi rasvhappeid. On näidatud, et *acrAB* ekspressioon suureneb üldistes stressitingimustes, statsionaarses faasis, ning rakkude kõrgel vesinikperoksiidi kontsentratsioonil kasvades (Ma jt. 1995). MarA ja AcrAB süsteemid tagavad resistentsuse paljudele antibiootikumidele, aromaatsetele ühenditele ja superoksiidi tekitatavatele kemikaalidele. Arvatakse, et AcrAB võib redoks-tüklites osalevaid kemikaale välja pumbata (Ma jt. 1995; Alekschun ja Levy 1997; Ramos jt. 2001). Nii nagu SoxS ja MarA on omavahel homoloogsed, on ka AcrAB-le leitud *E. coli*'s vähemalt kolm homoloogit.

Selline mitmete sarnaste omadustega pumpade ja regulaatorite olemasolu võimaldab bakteritel täpsemalt vastata erinevatele keskkonnamuutustele ja stressoritele (Ma jt. 1995; Alekshun ja Levy 1997) nii oksüdatiivse stressi korral kui ka statsionaarses faasis kasvades.

1.3. Bakteriaalsed multiresistentsuspumbad

Bakteritele on membraan vajalik väliskeskkonnast signaalide saamiseks, toitainete omastamiseks ja jääkainete väljutamiseks. Membraani toimimist mõjutab selle valguline koosseis, eelkõige sealsed sensor- ja transportvalgud ning nende tasakaal. Membraanis paiknevad väga mitmekülgsete ülesannetega multiresistentsuspumbad (MDR; ingl k – *multidrug-resistance efflux pumps*), mis vastutavad mitmete antibiootikumide resistentsuse ning nii keskkonnas leiduvate kui ka peremeesorganismi eritatud toksiliste ühendite rakust välja transportimise eest (Piddock 2006). Samuti on näidatud, et MDR pumbad mängivad rolli patogeneesis. Näiteks *Salmonella enterica* serotüüp *Typhimurium* suudab MDR süsteemi AcrAB-TolC puudumisel märgatavalt kehvemini peremeesorganismile kinnituda ning seal ellu jääda (Buckley jt. 2006).



Joonis 4. Bakteriaalsed multiresistentsus pumbad. Nooled tähistavad ainete transporti suunda. A) Sisemembraanis paiknevad MFS, SMR ja MATE perekonna valgud B) ATP energia baasil aineid transportiv ABC transporter C) läbi kahe membraani ulatuv RND perekonna pump (Tegos jt. 2011, modifitseeritud).

MDR pumbad on olulised rakkude metabolismis ja neid eristatakse membraanis paiknemise topoloogia, energia kasutamise mehhanismi ja substraadi spetsiifilisuse alusel (Tegos jt. 2011). Valkude järjestuse sarnasuse järgi jagatakse bakteriaalsed väljavoolu transporterid viide perekonda (Joonis 4): RND (ingl k – *resistance/nodulation/cell division*)

pumpade superperekond, MATE (ingl k – *multidrug and toxic compound extrusion*) valkude perekond, MFS (ingl k – *major facilitator superfamily*) superperekond, SMR (ingl k – *small multidrug resistance*) perekond ja ABC (ingl k – *ATP binding cassette*) pumpade superperekond.

1.3.1. RND transporterid

RND pumbad (Joonis 4 C), mis on levinud gram-negatiivsetel bakteritel, koosnevad kolmest osast: transmembraanne sisemembraani valk vastutab substraadi väljaviimise eest; välismembraanne komponent moodustab periplasmast algava kanali väliskeskonda ning sisemembraanile kinnituv lipovalk seob kahte eelmist komponenti ja stabiliseerib nende vahelist interaktsiooni (Nikaido 1996). Erinevalt teistest MDR süsteemidest suudavad RND perekonna pumbad ühendeid otse läbi mõlema membraani viia ja seetõttu võib neid pidada kõige efektiivsemateks resistentsuse tagajateks. Teiste pumpade eksporditavad ühendid peavad lisatakistusena eraldi läbima välismembraani (Nikaido ja Takatsuka 2009). Üks parimini uuritud RND süsteeme on *E. coli* AcrAB-TolC süsteem (Ma jt. 1995). *P. putida* kromosoomis on kindlaks tehtud 14 RND pumpa, nende hulgas ka TtgABC süsteem (Godoy jt. 2010), mis on järjestuse alusel sarnane *E. coli* AcrAB pumbaga.

1.3.2. MATE transporterid

MATE perekonna valgud (Joonis 4 A) koosnevad enamasti 12 transmembraanses domeenist, mis paigutuvad läbi sisemembraani ja viivad ühendeid tsütosoolist periplasmasse. Selleks kasutavad MATE pumbad reeglina Na⁺-ioonide antipordi abi (Paulsen jt. 2001). Põhjalikumalt uuritud MATE perekonna pumpade hulka kuuluvad näiteks *Vibrio parahaemolyticus*'e NorM (Morita jt. 1998) ja *E. coli* DinF. *E. coli* rakkudes on näidatud, et DinF-i puudumisel väheneb H₂O₂ talumise võime ja sellest lähtuvalt arvatakse, et DinF võib mängida olulist rolli ROS-iga toime tulemisel (Rodriguez-Beltran jt. 2012).

1.3.3. MFS transporterid

MFS superperekonna valgud (Joonis 4 A) vastutavad keemiliste ühendite nii sisse kui välja transportimise eest. Paljud MFS alam perekondade transporterid viivad prootongradiendi jõul antibiootikume ja muid ohtlikke aineid rakust välja (Paulsen jt. 2001).

1.3.4. SMR transporterid

SMR pumbad (Joonis 4 A) koosnevad nagu MATE-valgudki vähemalt 12-st transmembraanses domeenist, kuid SMR domeenid paiknevad membraanis trimeeridena (Van Bambeke jt. 2000). Kemikaalide väljutamise mehhanismiks on prootonite antiport.

Laenguga aminohappejäägi külge seondub prooton, mis nõ vahetatakse välja transporditava kemikaali vastu. Antibiootikumi rakust välja viimiseks läbib transportvalk erinevaid konformatsioonilisi vaheolekuid. Lõpptulemuseks on kemikaalide väljaviimine rakust ja prootonite transport rakku (Van Bambeke jt. 2000).

1.3.5. ABC transporterid

ABC-transporterid (Joonis 4 B) võivad bakterirakust välja viia pinna komponente, patogeenesiga seotud ühendeid, siderofoore ja muidugi ka toksilisi kemikaale ja antibiootikume (Davidson ja Chen 2004). ABC pumbad koosnevad kahest transmembraansest domeenist (TMD; ingl k – *transmembrane domain*), mis moodustavad sisemembraani läbiva kanali ja kahest tsütoplasma poolsest nukleotiidi siduvast domeenist (NBD; ingl k – *nucleotide-binding domain* ehk *ATP-binding cassette*), mis hüdrolüüsivad ATP-d ja selle abil saab pump energiat ühendite transpordiks (Dawson ja Locher 2006). ATP sidumine ja hüdrolüüs NBD-s kutsub esile konformatsioonilisi muutusi transmembraanses domeenis ning see tagab substraatide ühesuunalise välja pumpamise (Davidson ja Chen 2004). ABC-tüüpi pumpadel on ATP-d siduv ja hüdrolüüsiv domeen väga konserveerunud ja seda leidub nii prokariootides kui eukariootides.

Paljude ABC-tüüpi transporterite puhul on näidatud, et lisaks kahele põhilisele pumba koosseisu kuuluvale valgule on substraatide transpordiks vajalikud ka lisavalgud (Fath ja Kolter 1993). On teada, et gram-negatiivsetel bakteritel on sellised abivalgud eelkõige vajalikud, siis kui pumba eesmärgiks on väljutatav ühend korruga läbi mõlema membraani viia. Enamasti on need abistavad komponendid seotud sisemembraaniga, kuid võivad harvematel juhtudel olla seotud ka välismembraaniga. Abivalgu funktsiooniks võib olla ühendada sise- ja välismembraani, et abistada ja kiirendada ühendite transporti läbi mõlema membraani või aidata kaasa substraadi seondumisele (Linton ja Higgins 1998). Näiteks *S. enterica* serotüüp *Typhimurium* tsingi transporteril ZnuABC-1 on lisaks leitud abivalk ZinT, mille olemasolul on transporteril tsingi transport küll võimalik, kuid tsingi vaeguses võimendab see abivalk tsingi kättesaadavust (Petrarca jt. 2010). Abistava valgu geen paikneb genoomis reeglina koos teiste ABC-transporteri valkude geenidega (Fath ja Kolter 1993).

2. Eksperimentaalne osa

2.1. Töö eesmärgid

Mutatsioonid on organismides vältimatud, olles aluseks geneetilise varieeruvuse suurendamisele. Ometi on organismidele ülimalt oluline, et mutatsioonide tase rakus oleks piisavalt madal, et mitte mõjutada populatsiooni elumust. Bakterite mutatsioonide uurimine annab meile informatsiooni mutatsiooniprotsesside kohta kõigis organismides ning samuti võib aidata mõista bakterite kohanemist erinevate elukeskkondadega (sh ka inimese patogeenide kohanemist) ja antibiootikumide resistentsuse teket. Meie laboris on varasemalt uuritud mutatsiooniprotsesse mudelorganismis *P. putida* ja erinevate geenide mõju neile mutatsiooniprotsessidele. Varasemalt pole õnnestunud konstrueerida testsüsteemi, mis võimaldaks ülegenoomselt detekteerida gene, mis mõjutavad mutatsioonitaset ning mille otsest seost mutatsioonidega pole teada.

Käesoleva töö eesmärgid said püstitatud lähtudes Heili Ilvese konstrueeritud testsüsteemist (lac-lsc), mis võimaldab isoleerida mutatsioonisagedust mõjutavaid gene organismis *P. putida*. Eesmärgiks oli:

- ♦ analüüsida ja iseloomustada testsüsteemi lac-lsc töötamist
- ♦ mutatsioonisagedust mõjutavate geenide identifitseerimine transposoonmutageneesi teel, kasutades lac-lsc testsüsteemi mutatsioonisageduse võrdlemiseks üksikkolooniates
- ♦ kuna transposoonmutageneesi käigus tuvastati kaks insertiooni *ttg2B* geeni, siis lähtuvalt sellest oli eesmärgiks kontrollida testsüsteemiga isoleeritud *ttg2B* geeni mutatsioonisageduse muutust antud deletsioonitüves
- ♦ iseloomustada testsüsteemi abil isoleeritud ABC-transporterit Ttg2.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Töös kasutatud plasmiidid, bakteritüved ja bakterite kasvutingimused

Baktereid kasvatati LB (ingl k *lysogeny broth*) täissöötmes (1% trüpton, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl; (Miller 1972) või M9 minimaalsöötmes (Adams 1959). M9 minimaalsöötmele lisati mikroelementide lahust (lõppkontsentratsioonidega 667 μM MgO, 50 μM CaCO₃, 40 μM FeSO₄, 12,5 μM ZnSO₄, 12,5 μM MnSO₄, 2,5 μM CuSO₄, 2,5 μM CoSO₄, 1,9 μM H₃BO₄), süsinikuallikana glükoosi (glc) lõppkontsentratsiooniga 10 mM, sahharoosi (suc) lõppkontsentratsiooniga 300 mM või fenooli (phe) lõppkontsentratsiooniga 2,5 mM ning aminohapete hüdrolüsaati (CAA, lõppkontsentratsiooniga 0,2%). Tardsöötme saamiseks lisati söötmesse agarit 15 g/l.

Seleksioonimarkeritena kasutati bakterite kasvatamisel järgmisi antibiootikume: kanamütsiini (Km; 50 $\mu\text{g/ml}$), streptomütsiini (Sm; 100-200 $\mu\text{g/ml}$), ampitsilliini (Amp; 100 $\mu\text{g/ml}$), bensüülpenitsilliini (Bp; 1,5-3 mg/ml) ja rifampitsiini (Rif; 100 $\mu\text{g/ml}$). *E. coli* rakke kasvatati temperatuuril 37 °C ja *P. putida* rakke temperatuuril 30 °C. Vedelkultuuride aeratsiooni tagamiseks kasvatati kultuure loksutis. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid on toodud lisas 1.

2.2.2. Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon

E. coli rakke kasvatati üleöö 4 ml-is LB-vedelsöötmes. Kompetentsete rakkude saamiseks lahjendati üleöökultuuri värskesse LB söötmesse tiheduseni 0,1 (OD₅₈₀) ja kasvatati loksutil tiheduseni 0,9–1,5. Rakud tsentrifuugiti söötmest välja (45–60 sekundit 12100 x g), pesti kaks korda 1 ml destilleeritud veega ja ühe korra 1 ml 10% glütserooliga. Seejärel suspendeeriti rakud 10% glütseroolis ja jaotati mikrotsentrifuugi tuubidesse. Rakke ja töölahuseid hoiti pidevalt jääl.

P. putida rakke kasvatati üleöö 4 ml-is LB vedelsöötmes. 250 μl üleöökultuuri tsentrifuugiti kokku (45-60 sekundit 12100 x g) ning pesti 3 korda 800 μl 300 mM sahharoosi lahusega. Seejärel suspendeerit rakud 45–70 μl -is 300 mM sahharoosi lahuses.

Plasmiidse DNA viimiseks kompetentsetesse rakkudesse kasutati elektroporatsiooni. Kompetentsetele rakkudele lisati ca 100 ng vees lahustatud plasmiidset DNA-d ning pipeteeriti elektroporatsiooniküveti. Elektroporatsioon viidi läbi “BioRad” elektroporaatoriga “*E. coli* pulser” pingel 2500 V. Rakkudele lisati 800 μl LB söödett ja pesti küvetist välja. Seejärel kasvatati rakke tund aega temperatuuril 37 °C või 30 °C ning sellele järgnevalt tsentrifuugiti rakud kokku ja plaaditi selektiivsöötmele.

2.2.3. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

PCR-is (ingl k *Polymerase Chain Reaction*) kasutati matriitsina eelnevalt eraldatud plasmiidset DNA-d või lüüsitud bakterirakkude DNA-d. PCR-i reaktsioonisegu lõppmahuga 20 µl sisaldas 1 x PCR-i puhvrit, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP-d, 0,5 ühikut Taq polümeraasi ja 10 pmol kumbagi praimerit. Töös kasutatud praimerid on välja toodud lisas 2.

Reaktsiooni viidi läbi 25 tsüklit järgmistel tingimustel:

1. DNA denaturatsioon 96 °C 30–60 sekundit,
2. praimerid seonduvad matriitsile 53–60 °C (olenevalt praimeritest) 30–60 sekundit,
3. DNA süntees 72 °C 30–120 sekundit (sõltuvalt amplifitseeritava fragmendi pikkusest).

Tsüklitele eelnes paariminutiline kuumutamine temperatuuril 96 °C rakkude lõhkumiseks ja järgnes 2–4 minuti pikkune süntees temperatuuril 72 °C, et kõik pooleri olevad fragmendid sünteesitaks lõpuni.

2.2.4. Plasmiidse DNA eraldamine ning restriksioonianalüüs

Plasmiidse DNA eralduseks kasutati firma *Favorgen* plasmidi eralduse komplekti *FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit*, järgides tootja protokollit.

DNA restriksiooniks kasutati firma *Thermo Scientific* ensüüme tootja ette nähtud tingimustel.

2.2.5. Geelelektroforees

PCR-i produkte ja restriksioonidega lõigatud DNA-d analüüsiti geelelektroforeesil. Selleks lisati 5–7 µl-ile PCR-i produktile või restriksioonisegule foreesivärvi (0,04% broomfenoolsinine 50% glütseroolis). Proovid kanti 1% agarosgeelile 1 x TAE puhvris (50 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA; pH 8,2), mis sisaldas etiidiumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,33 µg/ml. DNA fragmentide umbkaudse suuruse nägemiseks kasutati firma *Thermo Scientific* DNA markerit. Elektroforees toimus pingel 100–150 volti. DNA visualiseeriti UV valguses.

2.2.6. Bakterite konjugatsioon

Transposoonmutageneesis kasutatud minitransposoon viidi ainult *E. coli* CC118λpir tüves replitseeruvast plasmiidist pBAM1 testtüve rakkudesse bakterite konjugatsiooni teel. Selleks kasvatati üleöö vastava antibiootikumi juuresolekul LB söötmes doonortüve *E. coli* CC118λpir, mis sisaldas ülekantavat plasmiid; helperplasmiidiga tüve HB101 ja retsipienttüve. Järgmine päev lahjendati kultuure 20 korda 5 ml värskesse antibiootikumita LB-sse. Ristamissegude tegemiseks võeti ajapunktidel 1,5; 2,5 ja 3,5 tundi kõiki värskaid

kultuure 100 µl, segati kokku ja sellest segust pandi 100 µl kultuuri LB tassile. Konjugatsioon toimus üleöö temperatuuril 30 °C. Järgmisel päeval kraabiti soovitud ajapunkti segust ¼ üles, see suspendeeriti 100 µl-is M9 puhvril ning saadud segu plaaditi selektiivsöötmele, millel said üles kasvada vaid transkonjugandid.

2.2.7. Testtüve konstrueerimine

Antud töös kasutatud testtüve saamiseks konstrueeris meie laboris Heili Ilves *lacIP_{lac}lsc3lacZ* geenikasseti ja viis selle *P. putida* kromosoomi. Selleks lõigati pBR-lacItac vektorist, millest olid eelnevalt deleteeritud HindIII ja XbaI lõikesaidid, BamHI fragmendina välja *lacIP_{lac}* järjestused ja tõsteti pHLU102 vektorisse, mis sisaldas multikloneerimissaidi järel *lacZ* geeni. Seejärel amplifitseeriti *P. syringae* DC3000 rakkude DNA-lt PCR meetodil praimeritega XbaI-lsc3uuslõpp ja XbaHindSDlscuus *lsc3* geen. *lsc3* geen viidi XbaI fragmendina vektorisse pHLU102lacItac, mida oli eelnevalt lõigatud vastava ensüümiga. Saadi vektor pHLU102lacItaclsc, millest lõigati antud geenikassett ja sellele järgnevalt *lacZ* geen välja ensüümidega KpnI ja Sall ning tõsteti samade ensüümidega lõigatud pUC18Not plasmidi, millest oli eelnevalt deleteeritud HindIII lõikesait. Vektorist pUC18NotlacItaclsc*lacZ* lõigati omakorda saadud geenikassett välja ensüümiga NotI ning viidi NotI fragmendina plasmidi pUTTn5Sm. Antud kloneerimise etapid viidi läbi *E. coli* rakkudes.

Konjugatsiooni teel viidi pUTTn5lacItaclsc3lacZ plasmidist minitransposooni koosseisus olev *lacIP_{lac}lsc3lacZ* geenikassett *P. putida* kromosoomi. Seejärel tehti ARB-PCR-i (vt. peatükki 2.2.9 ARB-PCR) abil kindlaks geenikasseti asukoht kromosoomis. Antud töös on kasutatud testtüve, kus huvipakkuv geenikassett paikneb histidiini kinaasi geenil *PP3969*.

2.2.8. Transposoonmutagenees ja transkonjugantide analüüs

Transposoonmutageneesi läbiviimiseks kasutati Martinez-Garcia ja kolleegide konstrueeritud vektorit pBAM1, mis sisaldas minitransposooni Tn5 (Martinez-Garcia jt. 2011). *E. coli* CC118λpir rakkudesse viidud pBAM1 kanti konjugatsiooni teel üle retsipienttõttesse PaWlacIsc. Ristamissegu võeti üles 1 ml M9 puhvril, rakud tsentrifugeeriti põhja, neid pesti kaks korda 1 ml-i M9-ga ja plaaditi ~50 µl kaupa välja LB selektiivsöötmele. Selekteerimiseks kasutati LB söödet, mis sisaldas Km-i, Sm-i, X-gal-i ja 10% sahharoosi. Tassidel jälgiti 5–6 päeva jooksul sahharoosi lagundavatel kolooniatel siniste papillide teket.

Siniste papillidega kolooniad külvati järgnevalt rifampitsiini sisaldavatele tassidele (Rif-i tassidele), et identifitseerida suurenenud Rif^R mutatsioonisagedusega kolooniaid. Rif-i tassidel jälgiti 2–3 päeva kolooniate teket ning edasisesse uuringutesse võeti tüved, mis

andsid Rif-i tassidel rohkem kui paar kolooniat. Seejärel tehti kindlaks minitransposooni insertiooni asukoht *P. putida* kromosoomis.

Paralleelselt transposoonmutageneesiga plaaditi sama söötmega tassidele ka lihtsalt testitüvi PaWlacIIsc, et jälgida võrdluseks spontaansete mutatsioonide teket siniste sahharoosi lagundavate papillide näol.

2.2.9. ARB-PCR

ARB-PCR-i kasutati minitransposooni Tn5 insertioonikoha kindlaks tegemiseks *P. putida* kromosoomis. Sel meetodil amplifitseeriti PCR produkt, mis sisaldab minitransposooni otsa ja sellega piirneva kromosomaalse ala liitjärjestust.

ARB-PCR koosneb kahest etapist. Esimeses etapis tekitatakse juhusliku pikkusega DNA fragmendid, kasutades ühte praimerit, mis kinnitub transposooni otsale ja teist, mis kinnitub juhuslikku kohta genomis. Antud töös kasutati primereid BAM1 ja ARB6 (Lisa 2). ARB6 on kōdupraimer, mille 3' otsas asub 5–6 nukleotiidi pikkune linkerregioon ja sellele järgneb 10 nukleotiidine regioon, mis sisaldab juhuslikus järjekorras kõiki nelja nukleotiidi. Kōdupraimeri 5' otsas on konserveerunud järjestus, millega saab teises etapis seonduda praimer ARB2 (Lisa 2).

ARB-PCR reaktsiooni lõppmaht oli 30 µl ja reaktsioonisegu sisaldas 1 x PCRi puhvrit, 10 pmol kumbagi praimerit, 1 U *Taq* polümeraasi ning bakterirakke. ARB-PCR-i esimene etapp toimus järgmistel tingimustel: DNA denaturatsioon temperatuuril 96 °C 30 sekundit, praimerite seondumine 30 °C 30 sekundit, DNA süntees 72 °C 1,5 minutit, seda korrati 6 tsükliks. Sellele järgnes 30 tsükliks tingimustel DNA denaturatsioon 96 °C 30 sekundit, praimerite seondumine 45 °C 30 sekundit, DNA süntees 72 °C 2 minutit.

ARB-PCR-i teise etappi võeti 0,1–0,7 µl esimese etapi produkti. Teises etapis seonduvad kasutatavad praimerid eelmises etapis tekkinud PCR-i produktile. Antud töös kasutati selleks primereid ME-I-uus2 ja ARB2 (Lisa 2). Teise etapi reaktsioon toimus järgmistel tingimustel: DNA denaturatsioon 96 °C 30 sekundit, praimerite seondumine 56 °C 30 sekundit ja DNA süntees 72 °C 2 minuti. Neid etappe korrati 30 tsükliks.

2.2.10. Sekveneerimine

Sekveneeritavaid PCR-i produkte töödeldi 2,5 U *E. coli* ExoI ja 1 U aluselise fosfataasiga (FastAP) 30 minuti jooksul temperatuuril 37 °C, reaktsioon peatati 15 minuti jooksul temperatuuril 80 °C. Seejärel valmistati sekveneerimisproovid, kasutades firma Applied Biosystems'i BigDye Terminator v3.1 sekveneerimiskomplekti ning modifitseeritud kujul tootjafirma protokollit. Reaktsiooniks lõppmahuga 10 µl segati kokku 2 µl 5 x

lahjenduspuhvrit (200 mM Tris pH 9,0; 6 mM MgCl₂); 1,6 pmol praimerit; 0,7 µl premix'i (BigDye PR-100 mix v3.1); 0,5–1,5 µl sekveneeritavat PCR-i produkti ja vett lõppmahuni.

Sekveneerimisreaktsioon toimus 30 tsüklina järgmistel tingimustel:

1. 15 sekundit temperatuuril 95 °C;
2. 10 sekundit temperatuuril 50 °C;
3. 45 sekundit temperatuuril 60 °C.

Reaktsioonile järgnevalt sadestati DNA-d 2 µl dekstraani ja 30 µl 96% etanooliga 10 minutit temperatuuril -20 °C. Seejärel tsentrifuugiti proovides sade põhja temperatuuril 4 °C 16100 g juures 10 minuti jooksul ning pesti kaks korda 150 µl 75% etanooliga ja lasti kuivada. DNA võeti üles 10 µl-is 100% formamiidis ja säilitati sekveneerimiseks temperatuuril -20 °C. Kasutati Eesti Biokeskuse tuumiklabori sekveneerimisteenust ja DNA sekveneeriti ABI Prism™3730xl kapillaarsekvenaatoriga. Saadud järjestusi analüüsiti programmiga BioEdit 7.0.9.1.

2.2.11. Kloneerimine

Kloneerimisel kasutati DNA restriksiooniks, ligeerimiseks ja vektori aluselise fosfataasiga töötlemiseks *Thermo Scientificu* ensüüme vastavalt tootja ettekirjutusele. Kloneerimisel kasutatud restriksiooni reaktsioonisegud, PCR-i produktid ja ligaasisegud sadestati 2,5-kordse mahu 96% etanooli ja 0,1-kordse mahu 5 M NaCl lahuse lisamisega. DNA sadenes temperatuuril -20 °C 10 minuti jooksul, sadet tsentrifuugiti 10 minutit temperatuuril 4 °C 12 000 g juures ning pesti kaks korda 75% etanooliga. Saadud sade kuivatati temperatuuril 37 °C ning suspendeeriti 10–20 µl vees.

Sadestatud ligaasisegu viidi elektroporatsiooni teel *E. coli* DH5α või CC118 λpir tüve rakkudesse või *P. putida* rakkudesse ja plaaditi selektiivsöötmele.

2.2.12. *tig2A* ja *tig2B* geeni deletsioonitüvede konstrueerimine

tig2A ja *tig2B* geenide deletsioonitüvede konstrueerimiseks kasutati Victor de Lorenzo laboris välja töötatud meetodikat (Martinez-Garcia ja de Lorenzo 2011). Esmalt tekitati 3 PCR-i produkti: I ja II produkt tekitati paralleelselt vastavalt ~ 500 nt deleteeritava geeni eest ja tagant. III PCR-i fragmendi tekitamiseks kasutati matriitsina 0,5 µl eelnevatest PCR-idest saadud DNA fragmente. Kuna I ja II reaktsiooni ühed praimerid olid omavahel komplementaarsed (vt Lisa 2), siis see võimaldas tekitatud DNA fragmendid III reaktsioonis „kokku kleepida”. Tekitatud fragmente töödeldi restriksionaasidena KpnI ja EcoRI ning kloneeriti samade restriksionaasidena avatud vektorisse pJP5603 (pEMG). Tulemuseks saadi

ttg2A ja *ttg2B* deleteerimiseks vajaminevat fragmenti sisaldavad plasmiidid pJPttg2A ja pJPttg2B.

Saadud vektorid viidi elektroporatsiooni teel *E. coli* DH5 α pir tüve rakkudesse. Vektori DNA eraldati DH5 α pir rakkudest ja kontrolliti sekveneerimisega. Seejärel viidi deletsiooniga suitsiidplasmiid *P. putida* rakkudesse, kus plasmiid ise ei replitseeru ja siseneb vektorisse kloneeritud fragmendi ja kromosoomi vahel toimuva homoloogilise rekombinatsiooni abil bakteri kromosoomi. Moodustuvad kointegraadiga rakud, mis kannavad Km resistentsust ning kus on olemas nii metsiktüüpi lookus kui ka deletsiooniga lookus. Kointegraatidesse viidi I-SceI nukleaasi kodeeriv plasmiid pSW. I-SceI nukleaas lõikab kromosoomi inserteerunud pJPttg2A või pJPttg2B plasmidi spetsiifilist järjestust. Indutseerimaks nukleaasi sünteesi ja lõigete tegemist, kasvatati rakke üleöö bensüülpenitsilliini (Bp) (vajalik pSW plasmidi säilitamiseks) ja meta-toluaadi (*I-SceI* geeni promootori induktor, lõppkontsentratsioon 750 μ M) juuresolekul ja plaaditi Bp sisaldavale tardsöötmele. Saadud kolooniate hulgast selekteeriti välja Km tundlikud ja deletsiooni olemasolu kontrolliti PCR-iga (*ttg2A* deletsiooni korral praimeritega EcoRI $ttg2$ ees ja KpnI $ttg2B$ ning *ttg2B* deletsiooni korral praimeritega EcoRI $ttg2A$ ja KpnI $ttg2C$). pSW plasmiidist vabanemiseks kasvatati deletsioonitüvesid paar päeva mitteselektiivsetes tingimustes ja valiti välja Bp tundlikud kolooniad.

2.2.13. Topeltmutantide konstrueerimine

Ttg2 ja DinF topeltmutantsete deletsioonitüvede konstrueerimisel lähtuti samast protokollist, mida kasutati *ttg2A* ja *ttg2B* deleteerimisel (vt peatükk 2.2.12). Vastavasse deletsiooni tüvesse viidi pJPdinF vektor ja järgiti eelpool kirjeldatud protokoll.

2.2.14. *P. putida* Rif-resistentsete mutantide tekkesageduse määramine

Spontaansete mutatsioonide tuvastamiseks kasvavates *P. putida* rakkudes kasutati Rif resistentsete (Rif^R) kolooniate tekkel baseeruvat süsteemi. Rif^R kolooniate teket võimaldavad spontaansed mutatsioonid *rpoB* geenis. Selleks kasvatati rakke 6–7 tundi glükoos CAA söötmes temperatuuril 30 °C ning seejärel tehti bakterikultuurist 10⁴-kordne lahjendus, jagati rakud 2,3 ml kaupa katseklaasidesse ning kasvatati 18–20 h temperatuuril 30 °C, aereerides kultuure loksutis. Järgmisel päeval plaaditi katseklaasidest 500 μ l üleöö kultuuri Rif-i sisaldavale LB söötmele ja inkubeeriti temperatuuril 30 °C. Selektiivsöötmele tekkinud Rif^R kolooniaid loendati kahel päeval.

Mõõtmaks Rif^R mutantide tekkesagedust, määrati üleöö kultuurist ka elusrakkude arvukus. Selleks tehti rakukultuurist lahjenduste rida M9 puhvrisesse ja tilgutati see LB

tassidele. Elusrakkude hulk 1 ml kultuuri kohta arvutati välja, arvestades tehtud lahjendust ja tekkinud kolooniate arvu.

Rif^R mutantide tekkesagedus määrati 1 ml üleöö kultuuris elusrakkude kohta ja arvutati ümber 10⁹ raku kohta. Erinevate tüvede omavahelise Rif^R tekkesageduse statistiliseks analüüsiks kasutati Student T-testi.

2.2.15. Statsionaarse faasi mutatsioonide tekkesageduse määramine *P. putida* rakkudes plasmiidse TAG testsüsteemi abil

Tuvastamaks mutatsioonisagedust nälgivas rakupopulatsioonis, kasutati plasmiidset fenooli monooksügenaasi geeni *pheA* aktivatsioonil põhinevat testsüsteemi (Tegova jt. 2004). Plasmidi pKT240 on viidud *pheA* geen, mille 22. koodon (Leu) on asendatud stoppkoodoniga TAG (plasmiid pKTp_{pheA}22TAG), seega detekteerib testsüsteem asendusmutatsioone, mis muudavad ära stoppkoodoni. Uuritavatesse tüvedesse viidi plasmiid pKTp_{pheA}22TAG ning baktereid kasvatati samamoodi nagu spontaansete mutatsioonide tuvastamisel Rif-i söötmel (vt peatükki 2.2.14). Erinevus oli ainult selles, et glükoos CAA söötmel lisati ka plasmidi selektsiooniks vajalikku antibiootikumi (Bp). Üleöö kasvanud kultuuridest plaaditi 500 µl rakke minimaltassidele, kus ainsaks süsinikuallikaks oli lisatud fenool. Fenooli tassidel suudavad üles kasvada vaid need rakud, kus enneaegne stoppkoodon *pheA* geenis on muteerunud. Fenoolitassidel jälgiti kolooniate teket 11 päeva jooksul ning Phe⁺ revertantide tekkesagedus arvutati nälgivas populatsioonis olevate elusrakkude kohta. Statistiliseks analüüsiks võrreldi tüvesid Student T-testiga.

2.2.16. *P. putida* populatsiooni elumuse määramine fenool-minimaalsöötmel

Bakterirakkude elumus määrati kolooniaid moodustavate rakkude (CFU; ingl k – *colony-forming unit*) arvukuse alusel kogu nälgimisperioodi jooksul. Samadelt tassidelt, millel jälgiti Phe⁺ kolooniate teket, lõigati steriilse 1 ml pipetiotsikuga välja agaritükk ning pandi see tükk 990 µl M9 puhvril 20 minutiks temperatuuril 30 °C loksuma. Agaritüki väljalõikamisel välditi Phe⁺ kolooniaid. 20 minuti pärast tehti agaritüki pesust lahjendused ja kanti need LB tassile. CFU arvutamisel lähtuti sellest, et väljalõigatud agaritükk moodustab ~1/100 kogu tassi pindalast. Arvestades LB tassile tekkinud kolooniate arvu, lahjendusfaktorit ja agaritüki suurust, arvutati elusrakkude arv katses, kasutades järgmist valemit:

$$\text{Elusrakkude arv} = \frac{\text{kolooniate arv} \cdot \text{lahjendusfaktor}}{10^{-2}}$$

2.2.17. DNA-d kahjustavate kemikaalide tundlikkuse test

Testimaks uuritavate tüvede tundlikkust erinevatele DNA-d kahjustavatele kemikaalidele, viidi läbi nn täpikatse. Selleks kasvatati vastavaid tüvesid LB vedelsöötmes üleöö. Järgneval päeval tehti M9 puhvriss rakukultuuri lahjendused ja 5 µl suurused tilgad pipeteeriti tassidele, kuhu oli lisatud uuritavat kemikaali. Antud katsetes lisati agaritassidele paraquaat dikloriid x-hüdraati (Paraq; 2-5 µg/ml), mitomütsiin C-d (MMC; 4 µg/ml), 4-nitrokinoliin N-oksiidi (NQO; 100-150 µM), fenooli (phe; 7-9 mM) või fenasiin-metasulfaati (PMS; 200-250 µM). Olenevalt katsest kasutati söötmena LB-d, glükoosiga minimaalsöödet või glükoosiga CAA söödet. Kontrolliks külvati samad lahjendused ka ilma kemikaalideta LB tassile, et võrrelda tüvede kasvu ja rakkude arvukust. Erinevate tüvede kasvu võrreldi kuni nädala jooksul pärast külvamist.

2.2.18. Minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni määramine

Määramaks erinevate kemikaalide minimaalset inhibeerivat kontsentratsiooni (MIC; ingl k – *minimal inhibitory concentration*), mille puhul uuritavad tüved polnud enam võimelised kasvama, kasvatati tüvesid esmalt üleöö 30 °C loksutil. Mikrotiiterplaadile tehti enamike kemikaalide puhul glükoos CAA söötmesse kemikaalidest 2-kordsete lahjenduste rida, metallisoolade puhul tehti lahjenduste rida LB söötmesse, et vältida soolade põhja sadenemist. Antud katsetes kasutati bensüülpenitsillini (Bp; kuni 1000 µg/ml), telluriiti (Tel; kuni 20 µg/ml), tetratsükliini (Tet; kuni 20 µg/ml), paraquaat dikloriid x-hüdraati (Paraq; kuni 10 µg/ml), klooramfenikooli (Cm; kuni 100 µg/ml), gentamütsiini (Gm; kuni 10 µg/ml), polümüksiin B-d (PB; kuni 4 µg/ml), kanamütsiini (Km; kuni 20 µg/ml), streptomütsiini (Sm; kuni 50 µg/ml), kolistiini (Kolis; kuni 4 µg/ml), rifampitsiini (Rif; kuni 12 µg/ml), 4-nitrokinoliin N-oksiidi (NQO; kuni 8 µg/ml), fenooli (phe; kuni 15 mM), ZnSO₄ (kuni 12 mM), CuSO₄ (kuni 12 mM), MnCl (kuni 12 mM) ja CoCl₂ (kuni 12 mM). Igasse kemikaali lahjendusse kanti üleöö kultuuri 100-kordset lahjendust. Mikrotiiterplaati inkubeeriti 24 h 30 °C loksutil ning seejärel mõõdeti bakterikultuuride optiline tihedus (OD₅₈₀; programmiga *Magellan 6, TECAN Sunrise*).

2.2.19. *P. putida* rakkude generatsiooniaja määramine

P. putida erinevate tüvede kasvukiiruste leidmiseks kasvatati vastavaid tüvesid üleöö glc CAA söötmes 30 °C loksutil ning saadud kultuuri lahjendati söötmesse tiheduseni 0,02 (OD₅₈₀). Rakke kasvatati mikrotiiterplaadil ning võrreldi paraquaadi juuresolekul (5 µg/ml) ja ilma kasvanud variante. OD-d mõõdeti iga 15 minuti tagant 24 tunni jooksul *POLARstar Omega* spetrofotomeetris. Saadud kasvukõverate põhjal arvutati igale tüvele minimaalne

generatsiooniaeg. Selle aluseks võeti eksponentsiaalses kasvufaasis logaritmilises skaalas moodustuv sirge. Generatsiooniaja arvutamiseks kasutati järgmist valemit:

$$G = \frac{t}{3,3 \log \frac{b}{B}}$$

G – minimaalne generatsiooniaeg

t – ajaintervall minutites

B – bakterite OD₅₈₀ ajavahemiku alguses

b – bakterite OD₅₈₀ ajavahemiku lõpus

2.2.20. Membraanivalkude eraldus

Membraanivalkude eralduseks kasvatati uuritavaid tüvesid 24 tundi temperatuuril 30 °C glc CAA vedelsöötmes või tardsöötmel nii paraquaadiga (2,5-5 µg/ml) kui ilma. Kogu valkude eraldamise töö toimus jääl. Rakud kas tsentrifuugiti 25 ml üleöö kultuurist põhja või kraabiti tassilt ja suspendeeriti 3 ml-is 10 mM HEPES puhvril (pH 7,4). Rakud purustati kuus korda 10 sekundit sonikeerides, vältimaks rakkude liigset kuumenemist. Järgnevalt tsentrifuugiti rakumass põhja 10 minuti jooksul 10000 x g juures (*Herolab AF 6.250* rootor, 7800 p/min, 4 °C). Supernatant eemaldati rakumassist, tõsteti ultratsentrifuugi topsidesse ning membraanivalkude eraldamiseks tsentrifuugiti 1 h 100000 x g juures (*Beckman SW 55 Ti* rootor, 28700 p/min, 4 °C). Supernatant eemaldati ja sade suspendeeriti 2 ml-is 10 mM HEPES puhvril, kuhu oli lisatud 1% N-lauroülsarkosiini ning saadud lahust inkubeeriti 30 min 37 °C loksutil. Välismembraani valgud sadestati 1 h 100000 x g juures temperatuuril 4 °C, sisemembraani valgud jäid supernatanti. Välismembraanide sadet pesti 3 ml 10 mM HEPES puhvriga ning tsentrifuugiti 1h 100000 x g, 4 °C. Sade suspendeeriti 100 µl-is 10 mM HEPES puhvril. Saadud preparaate välismembraanide valgusisaldus määrati *Bio-Rad*'i *Quick Start* Bradfordi reagentiga vastavalt tootja protokollile. Sisemembraani preparaate valgusisaldust polnud lahusesse jäänud N-lauroülsarkosiini tõttu võimalik sama reaktsiooniga määrata.

2.2.21. SDS-polüakrüülamiidgeelelektroforees

Valkude geelelektroforeesil lahutamiseks valmistati proovid, mis sisaldasid 0,2–0,5 µg valke, 7,5 µl 2x Laemmli puhvrit (0,125 M Tris, 20% glütserool, 2% SDS, 2% β-merkaptotetanool, 0,001% broomfenoolsinine, pH 6,8) ning proovide maht viidi 10 mM HEPES puhvriga 15 µl-ni. Seejärel kuumutati proove valkude denatureerimiseks 10 minutit temperatuuril 96 °C.

Valgud lahutati 10% tritsiin-SDS-poliakrüülamiidgeelis (Schagger 2006) konstantsel pingel ~100 V, kasutades *Bio-Radi Mini PROTEAN Tetra* geelelektroforeesisüsteemi. Valkude suuruse hindamiseks kasutati suurusmarkerit *PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)*. Valkude visualiseerimiseks värviti geele kas Coomassie G-250 värviga või AgNO₃-ga (Chevallet jt. 2006).

Hõbedaga värvimine toimus järgmistes etappides:

1. geel fikseeriti üleöö fikseerimislahuses (30% etanooli, 10% äädikhapet),
2. pesti 2 x 10 min 20% etanooliga ja seejärel 2 x 10 minutit H₂O-ga
3. hoiti 1 min 0,8 mM Na-tiosulfaadi lahuses
4. pesti 2 x 1 min H₂O-ga
5. värviti 20 min kuni 1 h 12 mM AgNO₃ lahuses
6. loputati veega
7. valgud ilmutati geelil ilmuti lahusega (3% K₂NO₃, 0,08 mM Na-tiosulfaat, 0,00025% formaliin) kuni 20 minutit või kuni geel oli piisavalt värvunud ning seejärel värvumisreaktsioon peatati stopplahusega (4% Tris, 2% äädikhape).

2.2.22. Bakteripopulatsioonide analüüs läbivoolutsütomeetril

Läbivoolutsütomeetri abil uuriti rakke, mida oli värvitud DNA-ga seonduvate fluorestseeruvate värvidega propiidiumijodiid (PI) ja SYTO9. SYTO9 fluorestseerub roheliselt ja suudab siseneda kõikidesse rakkudesse, PI fluorestseerub punaselt ja suudab siseneda vaid suurenenud membraani läbilaskvusega rakkudesse ning sel juhul summutab ta SYTO9 fluorestsentsi. Analüüsides nende värvide suhet, on võimalik eristada erineva membraani permeaablusega alampopulatsioone. Läbivoolutsütomeeter võimaldab bakteripopulatsiooni analüüsida üksikraku tasemel.

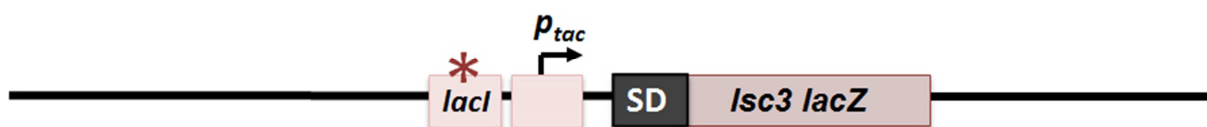
Proovide ettevalmistamiseks kasvatati rakke 24 h temperatuuril 30 °C glc CAA tardsöötmele, paraquaadiga (lõppkontsentratsioon 5 µg/ml), fenooliga (lõppkontsentratsioon 3 mM) või ilma kemikaalideta. Tassilt kraabitud rakud lahjendati filtreeritud M9 puhvrise nii, et proovi OD₅₈₀ oleks 0,015. 150 µl-ile lahjendusele lisati 7,5 µl värvisegu (3% SYTO9, 3% PI M9 puhvrise).

Saadud tulemusi analüüsiti programmiga Flowing Software 2.5.1.

2.3. Tulemused

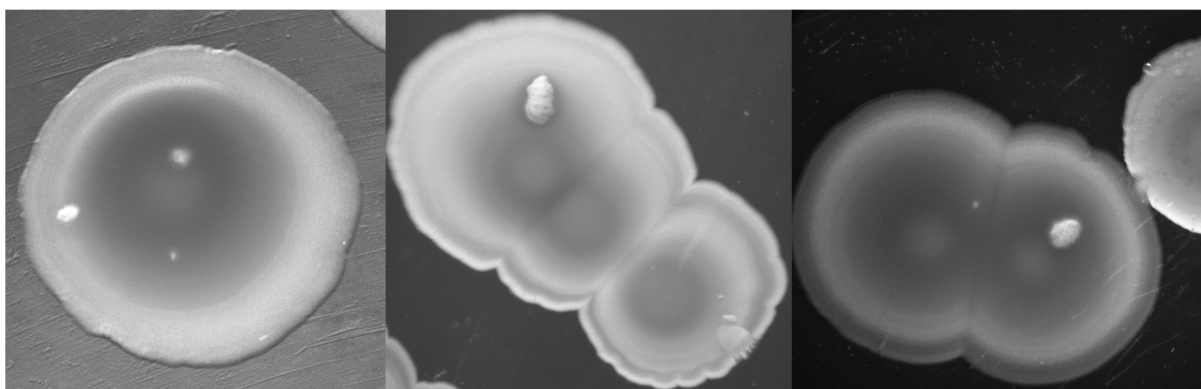
2.3.1. Testtüvi ja testsüsteemi põhimõte

Minu töö esmaseks eesmärgiks oli meie laboris Heili Ilvese koostatud testsüsteemi lac-lsc iseloomustamine ja analüüsimine ning selle abil *P. putida*'s mutatsioonisagedust mõjutavate geenide tuvastamine. Testtüveks on samuti Heili Ilvese konstrueeritud tüvi PaWlacIsc, kus *P. putida* kromosoomis olevasse geeni *PP3969* on minitransposooni (Sm^R) koosseisus viidud geenikassett: P_{tac} promootori repressor *lacI*, P_{tac} promootor, Shine-Dalgarno järjestus (SD), levaansukraasi geen *lsc3* ja β -galaktosidaasi geen *lacZ* (Joonis 5). Testsüsteem põhineb sellel, et tavatingimustes on PaWlacIsc tüves levaansukraasi ja β -galaktosidaasi süntees maha surutud, sest *lacI* geen kodeerib repressorit, mis pärsib P_{tac} promootorilt *lacZ* ja *lsc3* geenide transkriptsiooni. Seega, kui *lacI* geen muteerub ja inaktiveerub, on võimalik selektiivsöötmel detekteerida *lacZ* ja *lsc3* geenide avaldumist – vastavalt sahharoosi lisamisel söötmesse on näha levaani tootmist (kolooniad on limased) ja X-gal-i lisamisel on näha sinise värvuse teket. Lähtuti põhimõttest, et kui tüves on katse käigus mutatsioonisagedus tõusnud, inaktiveerub *lacI* geen suurema tõenäosusega ning koloonia pinnal on võimalik näha levaani tootvate mutantide järglaskonda (papille), mis on värvunud siniseks (Joonis 6).



P. putida kromosoom

Joonis 5. Testtüve PaWlacIsc kromosoomi viidud geenikassett. Punane tärn viitab mutatsioonile *lacI* geenis, mille tekkimisel repressor LacI inaktiveerub ja P_{tac} promootorist allavoolu jäävad geenid saavad avalduda. LacI vahendatud transkriptsiooni repressiooni kadumist võivad põhjustada ka mutatsioonid LacI seondumiseks vajalikus operaatoralas.



Joonis 6. LacI inaktiveerumisel koloonia pinnale tekkinud papillid. Transposooni insertiooniga testtüve kolooniad on pildistatud LB 10% suc X-gal Sm Km tassidel kasvades 6. päeval.

2.3.2. Mutatsioonisagedust mõjutavate geenide detekteerimine transposoonmutageneesi abil

Selleks, et leida suurenenud mutatsioonisagedusega tüvesid, viidi testtüvega läbi transposoonmutagenees, kasutades minitransposooni Tn5 (Km^R). Transposoonmutantide kolooniaid isoleeriti 10% sahharoosi sisaldaval LB tardsöötmele, kuhu olid lisatud ka X-gal, Km ja Sm ning jälgiti kuue päeva jooksul kolooniate pinnal levaani tootmist ja siniste papillide teket. Km lisamine söötmele võimaldas hakata kasvama ainult transposooni insertiooni sisaldavatel bakteritel. Need bakterikolooniad, mille pinnale moodustus siniseid papille, külvati edasi LB Km ja LB Rif tassidele ning jälgiti külvijoonel 2–3 päeva jooksul Rif tassidele Rif-resistentsete (Rif^R) mutantide ilmumist. Rif^R kolooniate teket võimaldavad spontaansed mutatsioonid RNA polümeraasi β -subühiku geenis *rpoB*. Eeldati, et need kolooniad, mille pinnale on tekkinud rohkem siniseid levaansukraasi tootvaid papille, sisaldavad transposooni insertiooni geenid, mille inaktivatsioon suurendab bakterites mutatsioonisagedust. Seega juhul kui transposoonmutandis on mutatsioonisagedus suurenenud, peaks bakterite edasikülvamisel ilmuma ka Rif-i sisaldavale söötmele arvukalt kolooniaid. Transposoonmutantidel, mis läbisid topeltseleksiooni – moodustasid koloonia pinnale siniseid papille ja edasikülvamisel Rif söötmele nähti Rif-resistentseid mutante – tehti ARB-PCR-i ja sekveneerimise abil kindlaks transposooni paiknemine kromosoomis.

Tabel 1. Papillide tekkimine testtüve ja tema transposoonmutantide kolooniatele

Päev	Transposoonmutantidel	Testtüves ilma Tn5-ta
2.-4.	1 papill 150 koloonia kohta	0-1 papilli 950 koloonia kohta
5.	1 papill 70 koloonia kohta	1 papill 300 koloonia kohta
6.	1 papill 60 koloonia kohta	1 papill 200 koloonia kohta
7.	1 papill 60 koloonia kohta	1 papill 60 koloonia kohta

Viidi läbi viis sõltumatut transposoonmutageneesi katset, kus igas individuaalses katses analüüsiti kuni 15 000 transposoonmutanti. Paralleelselt transposoonmutageneesiga plaaditi sama selektiivsöötmele tassidele ka lihtsalt testtüve rakke, mis ei sisaldanud transposooni insertioone, et näha, kas sel juhul tekib kolooniatele vähem papille võrreldes transposoonmutageneesi läbinud kolooniatega. See kontrollkatse kinnitas testsüsteemi selektiivsust. Tabelist 1 on näha, et esimesel 4 päeval on transposoonmutantide puhul papillide teke kolooniatele märgatavalt sagedasem kui testtüve puhul, kus transposoonmutageneesi ei olnud läbi viidud. Alates viiendast päevast hakkab erinevus vähenema ja seitsmendaks päevaks on papillide tekkesagedus testtüve ja tema

transposoonmutantide kolooniatele ühtlustunud. Seega ei ole alates seitsmendast päevast enam võimalik detekteerida geenide katkestustest tulenevat mutaatorfenotüüpi.

2.3.3. Transposoonmutageneesi abil tuvastatud mutatsioonisagedust mõjutavad geenid

Viie katse peale läbis topeltseleksiooni 181 mutanti, mille puhul tuvastati ka minitransposooni asukoht kromosoomis. Tabelis 2 on näha, millistesse geenigruppidesse paigutuvatesse geenidesse minitransposoon on sisenenud. Kõige rohkem võimaldas testsüsteem tuvastada erinevate transporterite geenikatkestusi (16%) ning seejärel replikatsiooni- ja reparatsiooniradade geenide katkestusi (9,9%). Üldiselt on näha, et antud testsüsteemil põhinev seleksioon toob välja palju insertioone geenidesse, mille funktsioon on seotud membraaniga (transporterite geenid, rakuseina ja -membraani sünteesi geenid ning pinnavalkude, raku liikumise ja sekretsiooniga seotud geenid – kokku 27%).

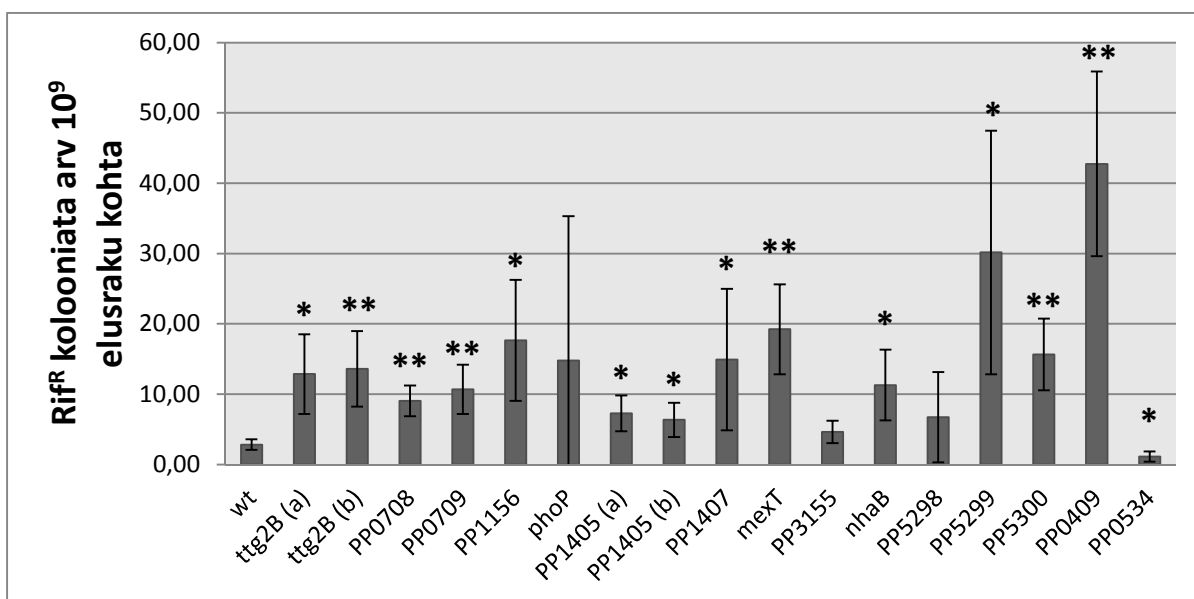
Tabel 2. Transposoonmutantide jaotus geenigruppidesse.

Geenigrupp	Mitu korda	%
Transporterid	29	16,0
Replikatsioon ja reparatsioon	18	9,9
Aminohapete metabolism	14	7,7
Signaali ülekanne	13	7,2
Transkriptsiooni regulatsioon	11	6,1
Rakuseina/membraani süntees	10	5,5
Pinnaalgud, raku liikumine ja sekretsioon	10	5,5
Energia metabolism	9	5,0
Lipiidide metabolism	8	4,4
Translatsioon	7	3,9
Proteaaasid + posttranskriptsiooniline modifikatsioon	6	3,3
Süsiniiku metabolism	5	2,8
Nukleotiidide metabolism	2	1,1
Geenide vaheala	4	2,2
Muu	8	4,4
Hüpoteetilised valgud	27	14,9
Kokku	181	100

181 mutandi puhul leiti 12 geeni ja 4 operoni, millesse minitransposoon sisenes korduvalt. Korduvalt välja tulnud geenidest oli suur osakaal varasemalt juba teada olevatel DNA reparatsiooniradade geenidel: transposoon inserteerus 4 korda *uvrA*, 2 korda *mutS*, 2 korda *uvrC*, 2 korda *mutL*-i ja 4 korda *uvrD* geeni ning lisaks ühe korra *mutM*-i geeni. Nende

DNA reparatsioonil osalevate geenide puhul on teada, et nende inaktiveerimine suurendab mutatsioonisagedust (Saumaa jt. 2006; Saumaa jt. 2007; Tark jt. 2008; Oliver ja Mena 2010)

Selleks, et veel kord kontrollida, kas selekteeritud transposoonmutantidel on ikka mutatsioonisagedus tõusnud, valiti 17 transposoonmutanti, mille puhul mõõdeti spontaanset Rif^R mutatsioonisagedust kasvavates rakukultuurides. Erinevaid transposooni insertioone sisaldavad tüved said välja valitud, pannes rõhku geenidele/operonidele, mis olid katses mitu korda välja tulnud, ning geenigruppidele, mis olid kõige rohkem välja tulnud. Joonisel 7 on näidatud Rif-resistentsete mutantide keskmised hulgid 10⁹ elusraku kohta iga tüve puhul. Geeni nimi/number joonise all näitab, millisesse geeni on antud tüves transposoon sisenenud. Joonisel 7 kasutatud tüvedes katkestatud geenide kirjeldus on esitatud tabelis 3. Joonisel 7 on näha, et peaaegu kõigi tüvede puhul on Rif^R mutantide tekkesagedus statistiliselt oluliselt suurem kui metsiktüves. Erandiks on geenide *phoP*, *PP3155*, *PP5298* katkestused, mille puhul statistiliselt olulisi erinevusi ei ilmnenud. Lisaks oli geeni *PP0534* katkestuse puhul üllatuslikult Rif^R mutantide tekkesagedus statistiliselt oluliselt madalam võrreldes metsiktüvega. Sellest hoolimata võib väita, et enamikul lac-Isc testsüsteemi abil välja tulnud geenikatkestuste korral on mutatsioonisagedus *P. putida* rakkudes kasvanud.

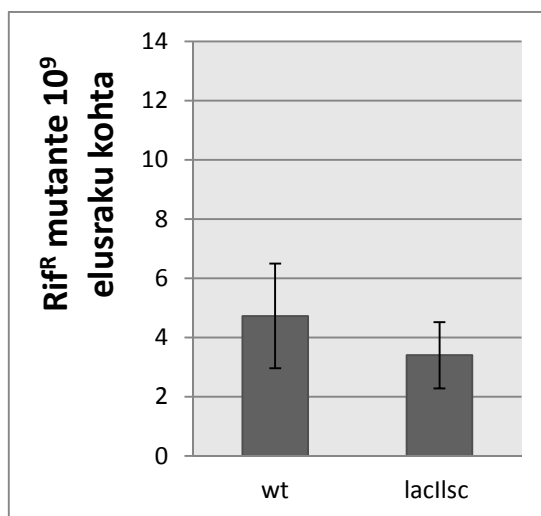


Joonis 7. Spontaansete Rif^R mutatsioonide teke *P. putida* transposoonmutantides ja metsiktüves PaW85 (wt). Iga tüve puhul on esitatud 20–60 sõltumatu kultuuri keskmised väärtused koos 95% usalduspiiridega. Sulgudes a ja b tähistavad erinevat transposoonmutanti, kui antud geeni oli transposoon sisenenud mitmel korral. Tärn tüve kohal näitab, et antud tüve spontaansete mutatsioonide tekkesagedus on statistiliselt erinev metsiktüvest. * tähistab Student'i T-testi p-väärtust < 0,05, ** tähistab p-väärtust < 0,001.

Tabel 3. Joonisel 7 võrreldud transposoonmutantides katkestatud geenide kirjeldus. Halli taustaga märgitud geenid kuuluvad samasse operoni.

Geeni nimi/nr	Kirjeldus	Mitu insertiooni geeni	Geeniklass
<i>ttg2B</i>	ABC tüüpi transporter transmembraanne osa	2x	Transporterid
PP0708	NAD-sõltuv aldehydi dehüdrogenaas	1x	Energia metabolism
PP0709	Nukleosiidi transporter	1x	Transporterid
PP1156	Formaat/nitrat transporter	1x	Transporterid
<i>phoP</i>	Kahekomponentse süsteemi vastuse regulaator	1x	Signaali ülekande
PP1405	Hüpoteetiline valk	2x	Hüpoteetiline valk
PP1407	Sulfaadi transporter	1x	Transporterid
<i>mexT</i>	Transkriptsiooni regulaator	1x	Transkriptsiooni regulatsioon
PP3155	Välismembraani raua siderofoor	1x	Pinnaalgud, raku liikumine ja sekretsioon
<i>nhaB</i>	Na ⁺ /H ⁺ antiporter	1x	Transporterid
PP5298	Peptidaas C26	1x	Proteasid + posttranskriptsiooniline modifikatsioon
PP5299	Glutamiini süntetaas	2x	Aminohapete metabolism
PP5300	LysR perekonna regulaator	1x	Transkriptsiooni regulatsioon
PP0409	Signaali vastusõvtu histidiini kinaas	1x (lisaks 1x samasse operoni ja 2x sellele järgnevasse operoni)	Signaali ülekande
PP0534	Kahekomponentse süsteemi vastuse regulaator	1x	Signaali ülekande

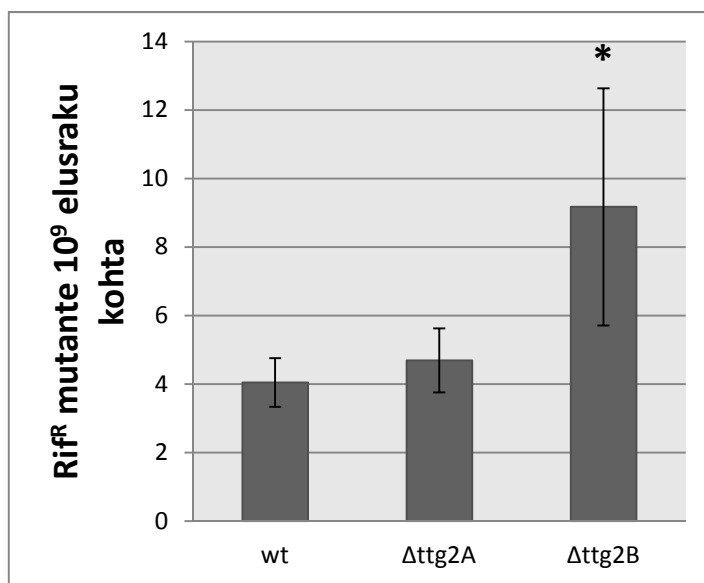
Kuna antud katsetes võrreldi transposoonmutantide mutatsioonisagedust *P. putida* metsiktüvega, tekkis küsimus, et kas mutatsioonisagedus testtüves PaWlacIIsc on võrreldav metsiktüve mutatsioonisagedusega. Selleks võrreldi Rif^R mutantide tekkesagedust ka nende kahe tüve puhul (Joonis 8). Saadud tulemuste põhjal võib kinnitada, et *P. putida* metsiktüve ja antud töös kasutatud testtüve mutatsioonisagedused ei erine.



Joonis 8. *P. putida* PaW85 (wt) ja testtüve PaWlacIIsc (lacIIsc) spontaansete Rif^R mutatsioonide tekke võrdlus. Joonisel on toodud keskmised väärtused 95% usalduspiiridega.

2.3.4. Ttg2 deletsioonitüvede spontaansete mutatsioonide teke eksponentsiaalses faasis

Kontrollimaks, et testsüsteemiga lac-lsc tuvastatud geenid ka realselt mutatsioonisagedust mõjutavad, konstrueeriti *P. putida* metsiktüvest huvipakkuvate geenide deletsioonimutandid. Kuna antud testsüsteem tõi välja palju transportereid, otsustati esmalt uurida Ttg2 transporterit, mille geeni *ttg2B* sisenes transposoon kahel sõltumatul korral. Arvukalt testsüsteemis välja tulnud transporterid võivad viidata sellele, et ohtlike ühendite kuhjumisel suureneb rakkudes mutatsioonisagedus ja nii mõjutavad transporterid kaudselt mutatsiooniprotsesse. Ttg2 transporter on ABC-tüüpi multiresistentsuspump (MDR) (vt peatükki 1.3.5), mis on www.pseudomonas.com andmebaasis (Winsor jt. 2011) annoteeritud orgaaniliste lahustite resistentsust tagavaks MDR pumbaks. ABC-transporteritel on olulised nii ATP-d siduv domeen (Ttg2 transporteri puhul Ttg2A) kui ka transmembraanne domeen (Ttg2 transporteri puhul Ttg2B). Seega ei tohiks neist geenidest kummagi deleteerimisel rakkudes funktsionaalset Ttg2 pumpa olla. Sellest tulenevalt konstrueeriti nii Δ ttg2A kui Δ ttg2B tüved.



Joonis 9. Spontaansete Rif^R mutatsioonide tekkesagedus *P. putida* metsiktüves PaW85 ja deletsioonitüvedes Δ ttg2A ja Δ ttg2B. Joonisel on iga tüve kohta esitatud 105–130 sõltumatu kultuuri keskmised väärtused koos 95% usalduspiiridega. * tähistab p-väärtust <0,05.

Võrdlemaks spontaansete mutatsioonide teket metsiktüves ja deletsioonimutantides, võrreldi Rif^R mutantide teket. *P. putida* tüves Δ ttg2B on spontaansete Rif^R mutatsioonide tekkesagedus suurem kui *P. putida* metsiktüves, seevastu Δ ttg2A tüves on spontaansete mutatsioonide teke võrreldav metsiktüvega (Joonis 9). Võrreldes omavahel

transposoonmutantide (Joonis 7 tüved ttg2B (a) ja (b)) ja deletsioonimutandi (Joonis 9 tüvi Δ ttg2B) Rif-resistentsuse teket, leiti, et statistiliselt need oluliselt ei erine (Student t-testi p-väärtused vastavalt 0,16 ja 0,26). Seega võib väita, et testsüsteemiga lac-lsc tuvastatud geeni *ttg2B* deleteerimisel on spontaansete mutatsioonide hulk võrreldav geeni katkestusega tüvedega. Samas pole see eksponentsiaalse faasi rakkude mutatsioonisageduse tõus väga suur, kõigest ligi kahekordne.

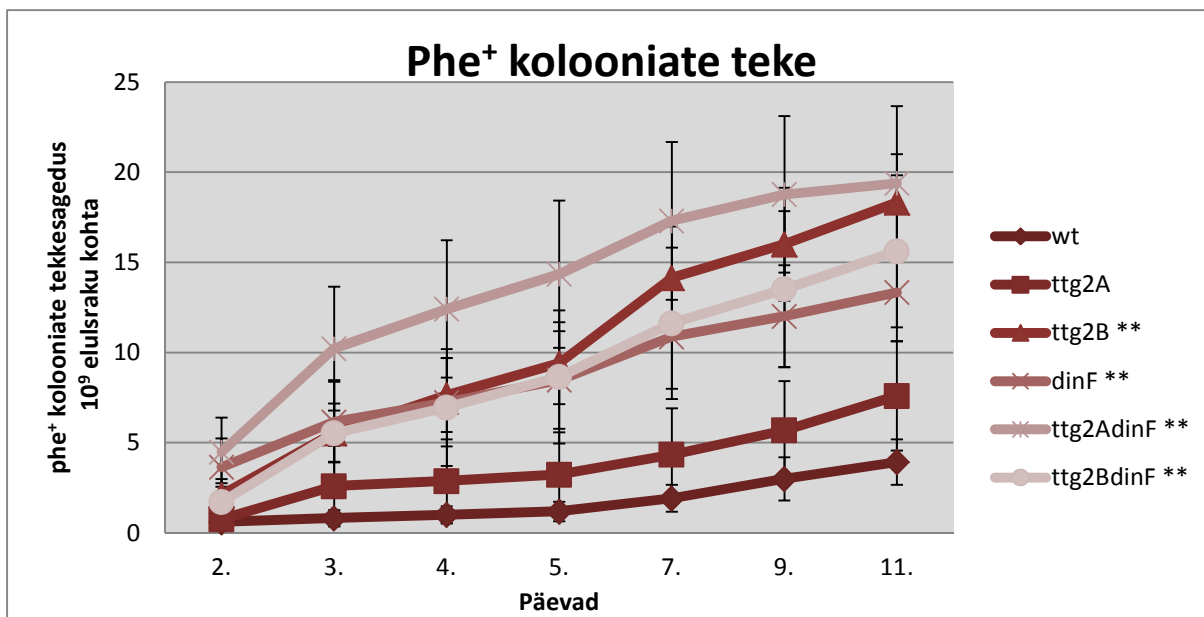
2.3.5. Ttg2 deletsioonitüvede ja topeltnutantide statsionaarse faasi mutagenees

Kirjanduses pole seni väga palju välja toodud seoseid mutatsiooniprotsesside ja transporterite vahel, kuigi iseenesest tundub loogilisena, et mida ohtlikumate ühenditega keskkonnas bakterid kasvavad, seda olulisemaks muutuvad transporterid, et rakkude seest neid ohtlikke ühendeid võimalikult palju taas välja viia. Samuti võib eeldada, et mida kauem rakud elavad statsionaarses faasis, seda rohkem on rakkudes elutegevuse kõrvalprodukte, mida on tarvis välja viia, ja seda olulisemaks muutuvad transporterid. Ka antud testsüsteemi rakendades toimus esmane seleksioon mitu päeva tassidel kasvanud kolooniate hulgast ja seega võib testsüsteem eelkõige välja tuua geene, mis mõjutavad mutatsioonisagedust statsionaarses faasis, mitte eksponentsiaalses faasis.

Rodriguez-Beltran jt. iseloomustasid *E. coli* MATE perekonna transporterit DinF, näidates oma katsetes, et DinF võimaldab tüvedel paremini taluda vesinikperoksiidi ja vähendada rakkudesisest ROS-i taset, olles sel viisil vajalik oksüdatiivse stressi talumiseks (Rodriguez-Beltran jt. 2012). Seega võiks DinF mõjutada ka mutatsioonisagedust ning seda eelkõige statsionaarses faasis. Kuna meie uurimisgrupis on Riho Teras ja Annika Teppo tegelenud *E. coli* DinF-i homoloogiga *P. putida*'s, otsustati käesoleva töö raames konstrueerida topeltnutantid tüved Δ ttg2AdinF ja Δ ttg2BdinF, uurimaks nende mutatsioonisagedust ja võrdlemaks, kas kahe potentsiaalselt mutatsiooniprotsesse mõjutava pumba puudumisel on *P. putida* rakkudes näha akumulereeruvaid efekte.

Antud tüvedega viidi läbi katse, kus tüvesid nälgutati ainsa süsinikuallikana fenooli sisaldaval söötmel ja jälgiti fenooli lagundavate mutantide akumulereerumist nälgivas bakteripopulatsioonis. Tekkinud Phe⁺ kolooniate arv iseloomustab mutatsioonisagedust statsionaarses faasis. 11. nälgimispäeval loendatud Phe⁺ kolooniate koguarv viitab sellele, et *P. putida* metsiktüve puhul on statsionaarse faasi mutatsioonide tekkesagedus võrreldav tüves Δ ttg2A mõõdetuga, kuid kõigil teistel antud katses kasutatud tüvedel on mutatsioonisagedus suurem kui metsiktüvel (Joonis 10). Samas on Δ dinF ja Δ ttg2B tüved omavahel täiesti võrreldavad ning võrreldavad ka topeltnutantidega. Seega pole kahe pumba geenide deleteerimisel märgata mingit akumulereeruvat efekti. Küll aga on näha sarnane tendents nagu

eksponentsiaalse faasis mõõdetud Rif^R mutantide tekkesageduse puhul, kus Δ ttg2B tüvel on mutatsioonisagedus suurenenud ning Δ ttg2A tüvel on mutatsioonisagedus metsiktüvega võrreldav (Joonis 9 ja joonis 10). Küll aga on statsionaarses faasis mutatsioonisageduste erinevus märgatavam kui kasvavates rakkudes mõõdetud Rif^R mutatsioonide puhul. Δ ttg2B tüvel tekkis Rif^R mutante 2,2 korda rohkem kui Phe⁺ mutante 11. päevaks 4,6 korda rohkem kui metsiktüvel. Seega mõjutab Ttg2B olemasolu mutatsioonisagedust statsionaarses faasis rohkem kui eksponentsiaalses faasis. Need tulemused on ka kooskõlas sellega, et testsüsteemi esimene selektsioon leiab üles kõrgenenud mutatsioonitasemega mutante statsionaarses faasis.



Joonis 1. Phe⁺ kolooniate akumulatsioon selektiivsöötmel 11 päeva jooksul *P. putida* algse tüve PaW85 ja transporterite Ttg2AB ning DinF geenide deletsioonmutantides. Omavahel võrreldud metsiktüvi ja deletsioonitüved on näidatud joonise paremas servas. Joonisel on iga tüve kohta esitatud 35–45 sõltumatu kultuuri Phe⁺ mutantide arvude keskmised väärtused 95% usalduspiiridega. X-teljel on toodud nälgimispäevad. Statistiliselt on omavahel võrreldud deletsioonitüvede 11. päevaks fenooli sisaldavatele minimaalsöötmel ilmunud Phe⁺ kolooniate koguarve metsiktüve Phe⁺ kolooniate koguarvuga. ** tähistab Student'i T-testi p-väärtust < 0,001.

2.3.6. Deletsioonitüvede Δ ttg2A ja Δ ttg2B iseloomustamine

P. putida DOT-T1E kromosoomis on kindlaks tehtud kolm RND pumpa, mis aitavad saavutada erinevate toksiliste orgaaniliste lahuste resistentsust: TtgABC, TtgDEF ja TtgGHI pumbad (Rojas jt. 2001). Käesolevas töös konstrueeritud Δ ttg2A ja Δ ttg2B tüvedes on defektne ABC-transporter Ttg2, mis kannab küll annotatsiooni järgi sarnast nime eelpool nimetatud pumpadega (*ttg* tähistab ingl k *toluene tolerance genes*), kuid ei oma teadaolevalt nendega mingit sarnasust. Kuna seda konkreetset pumpa pole varasemalt kirjeldatud, püstitati antud töö üheks eesmärgiks kirjeldada ABC transporterit Ttg2. Ttg2 transporterit operoni esimesed kaks geeni on klassikalised ABC-transporteri osad, vastavalt nukleotiidi siduv domeen (*ttg2A*) ja transmembraane domeen (*ttg2B*). Samasse operoni kuuluvad ka

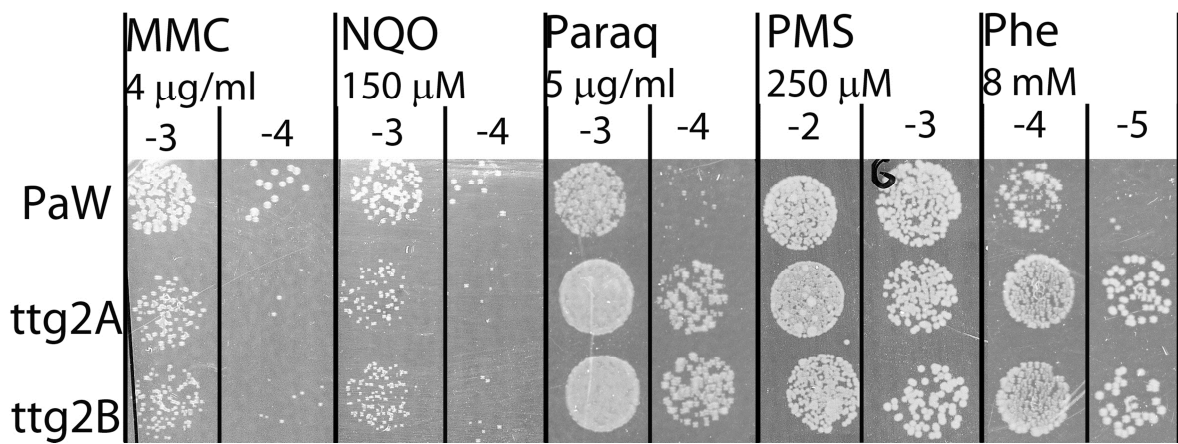
transporteri periplasmaatiline komponent ja abivalk, mille funktsioon pole teada. Seega on Ttg2 üpriski tavapärane ABC-transporter. Küll, aga kuulub samasse operoni ka regulatoorne anti-anti sigmafaktor, mis pole ABC-transporteritele kõige tavapärane. Pseudomonaadides on see operon küllaltki konserveerunud, kuid kõigis liikides on infot selle operoni kohta vaid annotatsiooni tasemel. Seega pole sugugi kindel, et *ttg2A*-le ja *ttg2B*-le järgnevad geenid kuuluvad Ttg2 transporteri hulka.

2.3.6.1. Eksogeenseid DNA kahjustusi põhjustavate kemikaalide mõju Ttg2 pumba mutantidele

DNA-ga seonduvad kemikaalid võivad rakkudes põhjustada väga erinevaid kahjustusi. Kuna Ttg2 pumba transmembraanse komponendi deletsiooni korral suureneb *P. putida* rakkudes spontaansete mutatsioonide hulk, võiks Ttg2 pump osaleda mõne DNA-d kahjustava kemikaali transpordis. Selle võimaluse kontrollimiseks võrreldi metsiktüve ja Ttg2 deletsioonmutantide taluvust erinevate kemikaalide suhtes, tilgutades bakterikultuuride lahjendusi erinevate kemikaalidega tassidele (nn täpikatsed).

Antud töös on välja toodud *P. putida* metsiktüve ja deletsioonitüvede kemikaalide talumise võrdlus viie erineva kemikaali suhtes: mitomütsiin C (MMC), 4-nitrokinoliin N-oksiid (NQO), paraquaat dikloriid x-hüdraat (Paraq), fenasiin-metosulfaat (PMS) ja fenool (Phe). MMC on DNA-ga interkaleeruv ühend, mis põhjustab DNA ahelate vahelisi ristsidemeid, takistades sel viisil replikatsiooni, rekombinatsiooni ja transkriptsiooni. NQO põhjustab kaheaheelalisi DNA katkeid, DNA struktuuri muutusi ja oksüdatiivseid kahjustusi. Paraq ja PMS on mõlemad redoks-tsüklites osalevad kemikaalid ja põhjustavad oksüdatiivset stressi ning DNA katkeid. Fenool, nagu ka teised aromaatsed ühendid, kahjustab rakkude membraani, mis tagab rakkude kaitse väliskeskkonna faktorite eest, ühtlasi on membraani stressist tulenevalt häiritud ka rakkude jagunemine ja DNA replikatsioon ning suureneb ROS-i hulk.

Joonis 11 on võrreldud erinevaid kemikaale sisaldavatel söötmetel metsiktüve ja pumbamutantide kasvu. Jooniselt on näha, et MMC-l ja NQO-l on uuritavatele tüvedele samasugune efekt: tüved, milles puudub Ttg2 pump, taluvad neid kemikaale kehvemini. Seevastu paraquaadil ja fenoolil on just vastupidine efekt – metsiktüvi talub antud kemikaale kehvemini kui mutantid. Paraquaat ja PMS on võrdlemisi sarnase struktuuri ja toimega kemikaalid. Seega on üllatav, et erinevalt paraquaadist ei erine pumbamutantide PMS-i taluvus metsiktüve omast.



Joonis 11. Metsiktüve ja deletsioonitüvede kemikaalide taluvuse võrdlus. PaW tähistab *P. putida* metsiktüve ja ttg2A ja ttg2B vastavaid deletsioonitüvesid. Joonise ülaosas on kirjas, mis kemikaaliga ja kontsentratsiooniga tassile on tüved külvatud. Kemikaale sisaldavatele LB tassidele või Phe puhul glc-tassidele on tilgutatud 5 µl üleöö kultuuri lahjendusest, mille lahjendusfaktor on märgitud joonise kohale. Kõiki teisi tasse on pildistatud pärast 24-tunnist inkubeerimist temperatuuril 30 °C va Phe tasse, mida inkubeeriti temperatuuril 30 °C 1 nädal, sest 8 mM fenool aeglustab oluliselt rakkude kasvu, nii et varem polnud tüvede vaheline erinevus nii selgelt eristatav.

2.3.6.2. Minimaalsete inhibeerivate kontsentratsioonide võrdlus metsiktüves ning Δttg2A ja Δttg2B tüvedes

Selleks, et kaudselt hinnata, mis kemikaale võiks huvipakkuv ABC-tüüpi transporter rakust välja pumbata, määrati erinevate antibiootikumide minimaalsed inhibeerivad kontsentratsioonid (MIC – ingl k *minimal inhibitory concentration*). MIC näitab madalaimat antibiootikumi või muu kemikaali kontsentratsiooni, mille juures antud tüvi pole enam võimeline kasvama. Kui mõne MDR pumba puudumisel on MIC märgatavalt väiksem kui metsiktüves, võib arvata, et antud pump osaleb selle aine transpordis rakust välja.

Käesolevas töös võrreldi erinevate antibiootikumide, rakke kahjustavaid kemikaalide ja metallide minimaalseid inhibeerivaid kontsentratsioone. MIC-ide väärtused on ära toodud tabelis 4. Tabelist on näha, et erinevate metallide puhul on MIC-id metsiktüvel ja mutantidel võrreldavad. Seega ei osale Ttg2 pump tõenäoliselt metallide talumises. Sama on näha ka paljude antibiootikumide puhul, näiteks kanamütsiini (Km), gentamütsiini (Gm), kolistiini (Kolis) ja rifampitsiini (Rif) puhul. Küll aga on bensüülpenitsilliini (Bp), klooramfenikooli (Cm) ja tetratsükliini (Tet) korral Ttg2 pumba puudumisel MIC märgatavalt vähenenud, seega osaleb Ttg2 pump kas otseselt välja pumbates või kaudselt antud antibiootikumide talumises. Huvitavad on ka tulemused polumüksiin B (PB) ja streptomütsiini (Sm) puhul, kus ttg2A deletsiooni korral käitub tüvi võrreldavalt metsiktüvega, kuid ttg2B deletsiooniga tüve kasvu inhibeerib juba madalam antibiootikumi kontsentratsioon.

Kuna kemikaalide taluvuse täpikatses tuli välja, et Δ ttg2A ja Δ ttg2B tüved taluvad paraquaati võrreldes metsiktüvega paremini (Joonis 11), siis tunduvad antud MIC-i katse tulemused paraquaadiga, kus mingeid erinevusi ei olnud, vastuolulised (Tabel 4). Samas võime kinnitada, et tardsöötmele nähtud efekt pole söötmepõhine, sest täpikatses nii LB kui glc CAA söötmele andis sama tulemuse (andmeid pole esitatud). Seega võisid MIC-i ja täpikatsete erinevused olla põhjustatud vedel- ja tahke söötme erinevustest. Sama võiks kehtida ka NQO ja Phe kohta, kus kemikaalide MIC-i väärtustel katsetes vahet polnud, kuid tassil kasvatades ilmnesid erinevused.

Tabel 4. Δ ttg2A ja Δ ttg2B mutantide MIC-ide võrdlus metsiktüve MIC-dega. Baktereid on kasvatatud M9 glc CAA söötmes ja metallisoolade puhul, kus tüvesid kasvatati LB söötmes, et vältida soolade välja sadenemist. Tabelis on toodud iga kemikaali MIC-id $\mu\text{g/ml}$ kohta, välja arvatud metallisooladel ja fenoolil, mille puhul on välja toodud mM kontsentratsioon. Kemikaalide puhul, kus on näha erinevusi, on mõõtmist teostatud vähemalt kolmes sõltumatus katses.

$\mu\text{g/ml}$	Bp	Cm	Tet	PB	Sm	Km	Gm	Kolis	Rif
Paw	500	80	10	4	12,5	15	10	2	6
Δ ttg2A	250	25	2,5	4	12,5	15	10	2	6
Δ ttg2B	250	25	2,5	2	6,25	15	10	2	6

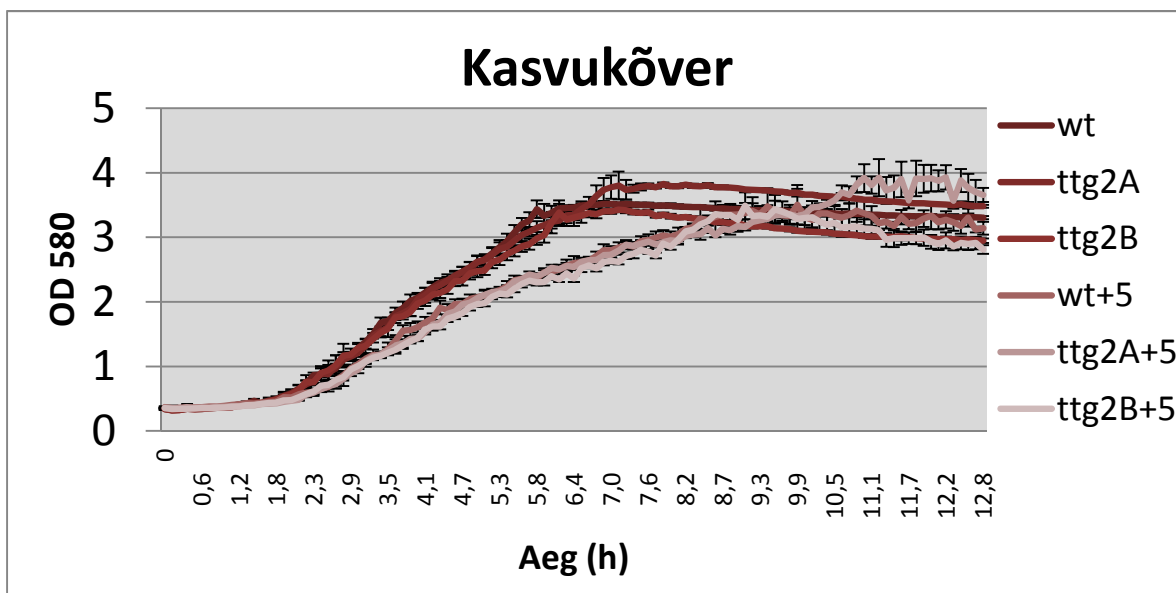
	Tel	Paraq	NQO	Phe	ZnSO ₄	CuSO ₄	MnCl	CoCl ₂
Paw	20	10	4	10	5	6	8	2
Δ ttg2A	20	10	4	10	5	6	8	2
Δ ttg2B	20	10	4	10	5	6	8	2

2.3.6.3. Δ ttg2A ja Δ ttg2B tüvede generatsiooniaja määramine

Eelnevad MIC tulemused viitavad sellele, et paraquaat mõjutab vedelkultuuris deletsioonitüvesid sarnaselt metsiktüvele. Samas on MIC-id mõõdetud 24 h möödudes kultuurist, mis on oma maksimaalse tiheduse saavutanud. See aga ei tähenda, et väiksema rakutiheduse juures paraquaadil efekt puuduks. Seetõttu otsustati määrata Δ ttg2A ja Δ ttg2B mutantide ning metsiktüve kasvukõverad ja võrrelda tüvede generatsiooniaegu glc CAA söötmes nii paraquaadiga kui ilma.

Joonisel 12 esitatud kasvukõverast on näha, et selgelt eristub kaks gruppi. Tüved, mille söötmesse pole lisatud paraquaati, saavutavad veidi varem oma maksimaalse optilise tiheduse kui tüved, mille söötmesse on lisatud paraquaati. Seevastu pole samal söötmele kasvanud metsiktüve ja deletsioonimutantide vahel erinevusi näha. Eksponentsiaalselt kasvufaasist arvutati ka antud tüvede minimaalne generatsiooniaeg, mis on ära toodud tabelis 5. Generatsiooniaja väärtustest on samuti näha, et paraquaadi lisamisel söötmesse ei erine

deletsioonitüvede kasvukiirus oluliselt metsiktüve omast. Seega taluvad Ttg2 pumba suhtes defektsed tüved paremini paraquaati vaid tardsootmel kasvades.



Joonis 12. Δ ttg2A ja Δ ttg2B tüvede kasvukõverate võrdlus metsiktüve kasvukõveraga glc CAA söötmes paraquaadiga ja ilma. „+ 5“ tüvede taga tähistab tüvesid, mis kasvasid glc CAA söötmes, kuhu oli lisatud paraquaati lõppkontsentratsiooniga 5 μ g/ml. Iga tüve puhul on esitatud vähemalt 8 sõltumatu kultuuri keskmised optilised tihedused koos 95% usalduspiiridega.

Tabel 5. Tüvede Δ ttg2A, Δ ttg2B ja metsiktüve (wt) generatsiooniajad (minutites), kasvades glc CAA söötmes.

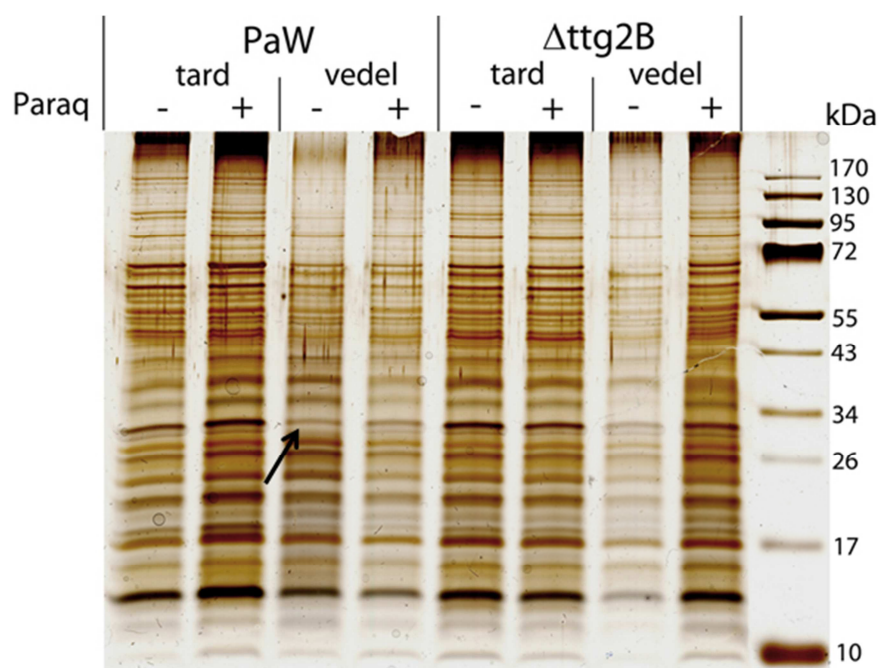
Tüvi	wt	Δ ttg2A	Δ ttg2B	wt +5 μ g/ml paraq	Δ ttg2A+5 μ g/ml paraq	Δ ttg2B+5 μ g/ml paraq
Generatsiooniaeg	54,17 (+/- 3,6)	55,83 (+/-4,8)	60,11 (+/-2,4)	66,01 (+/-2,9)	66,42 (+/-3,5)	71,77 (+/-2,9)

2.3.6.4. Δ ttg2B ja metsiktüve membraanivalkude võrdlus

Kuna transporterid on membraaniseoselised valgud ning uuritava Ttg2 pumba puhul on oluline eelkõige Ttg2B, mis paikneb sisemembraanis, siis püstitati hüpotees, et deletsioonitüved taluvad paraquaati (ja ka fenooli) seetõttu paremini, et nende puudumise arvelt saab mõni muu transporter membraanis arvukamalt esineda. Selle hüpoteesi testimiseks eraldati nii vedelsöotmel kui tardsootmel kasvanud rakkude sise- ja välismembraanid Δ ttg2B tüvel ja metsiktüvel nii paraquaadiga kui ilma kasvanud rakkudel ning analüüsiti SDS-poliüakrüülamiidgeelis membraanide valgumustreid.

Välismembraanis olid detekteeritavad minimaalsed erinevused. Nii vedel- kui tardkultuuri rakkude välismembraanist kadus paraquaadi lisamisel üks visualiseeritav valk, kuid erinevusi metsiktüve ja mutandi vahel polnud (andmeid pole esitatud). Seega ei saa selle välismembraani valgu puudumine seletada mutandi fenotüüpe. Samas, kuna Ttg2B ise on

sisemembraani valk ja ABC-tüüpi transporterid välismembraani ei ulatu, pole see väga üllatav tulemus.



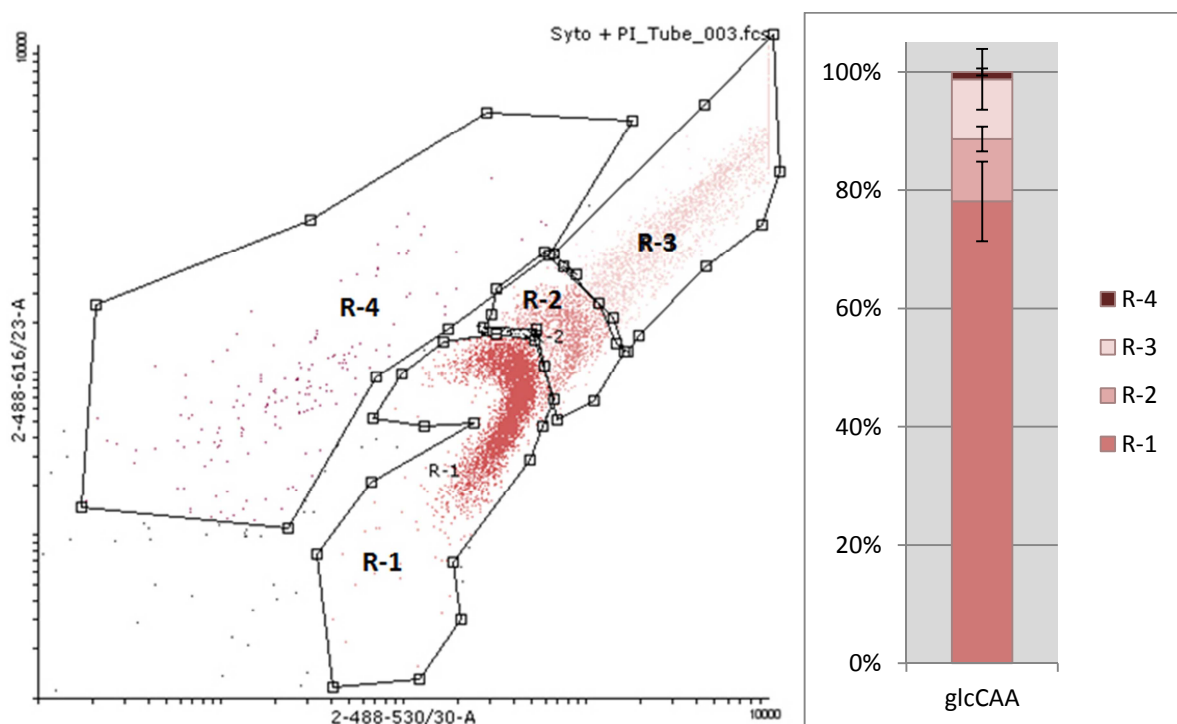
Joonis 13. *P. putida* tüvede PaW85 ja Δ ttg2B sisemembraani valkude võrdlus. „Tard“ tähistab tardsöötmel kasvanud rakkude ja „vedel“ vedelkultuuri rakkude valgupreparaate. Mõlemal juhul oli söötmeks glc CAA sööde. „+“ ja „-“ märk raja kohal tähendavad vastavalt paraquaadiga söötmel (lõppkontsentratsioon 5 μ g/ml) ja paraquaadita söötmel kasvanud rakke. Paremal servas on tähistatud valgumarkeri (9. rajal) suurused kilodaltonites. Nool kolmandal rajal tähistab kohta, kus visuaalselt puudub valk, mis teistel radadel on olemas.

Tahkel söötmel kasvanud rakkude sisemembraani valkudes polnud mingit erinevust näha, seevastu oli erinevus vedelkultuuri rakkude valgumustris (Joonis 13). Üks visualiseeritav valk, mis mutandis esines mõlematel tingimustel, puudus metsiktüvest, kui rakke kasvatati paraquaadivabas keskkonnas (noolega näidatud joonisel 13). Antud tulemus on taaskord vastuoluline varasematega, sest ainsad tingimused, kus paraquaadil kasvades erinevusi on näha, on tardsöötmel, valgumustri erinevused on aga vedelsöötmes. Küll aga on sellest katsest näha, et tavatingimustes vedelkultuuris erinevad *P. putida* metsiktüve ja Ttg2B deletsioonitüve sisemembraani valgumustrid.

2.3.6.5. Δ ttg2A ja Δ ttg2B tüvede võrdlus metsiktüvega läbivoolutsütomeetris

Membraani terviklikkuse hindamiseks üksikraku tasemel analüüsiti SYTO9 ja PI-ga värvitud rakkude populatsioone läbivoolutsütomeetriga. Mõlemad fluorestseerivad värvid seonduvad DNA-ga, kuid SYTO9 siseneb kõikidesse rakkudesse ja PI vaid suurenenud membraani läbilaskvusega rakkudesse. Seega on võimalik nende kahe värvi fluorestsentsi hulka võrreldes detekteerida rakkude membraanide erinevat permeaablust. Võrreldi Δ ttg2A, Δ ttg2B ja PaW85 tüvede rakke, mida oli kasvatatud glc CAA tardsöötmel, kuhu oli lisatud

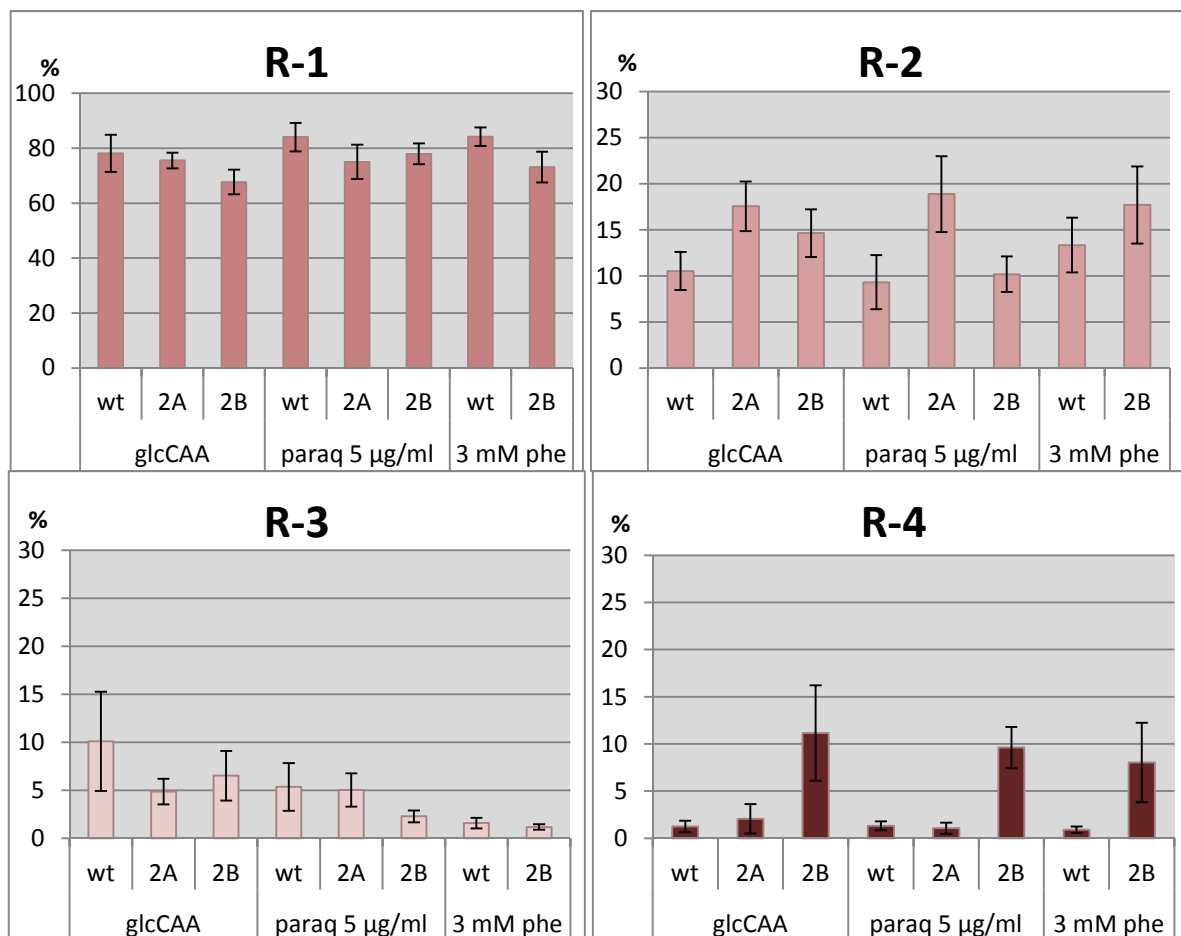
kas paraquaati või fenooli. Surnud rakkude populatsioon oli enamasti olematu, seega seda osa populatsioonist ei märgitud. Ülejäänud rakud jagati nelja rakupopulatsiooni, kus R-1, R-2 ja R-3 tähistavad terve membraaniga rakke ja R-4 läbilaskva membraaniga rakke (Joonis 14). R-1, R-2 ja R-3 populatsioon erinevad üksteisest rakkude DNA hulga poolest, ehk vastavalt esindavad terve membraaniga rakupopulatsioone, milles on erinev kogus DNA-d (R-1 populatsioonis on üks kromosoomi koopiat jne).



Joonis 14. Rakupopulatsioonide eristamine läbivoolutsütomeetriga. Vasakul joonisel on toodud ühe metsiktüve rakkude proovi andmed ~10 000 üksikraku kohta läbivoolutsütomeetris ja paremal joonisel 3 individuaalse katse keskmised väärtused. R-1, R-2 ja R-3 tähistavad vastavalt ühe, kahe ja rohkemate kromosoomikoopiatega tervete membraanidega rakupopulatsioone ja R-4 tähistab läbilaskva membraaniga rakupopulatsiooni. Vasakpoolse joonise x-teljel on tähistatud SYTO9 fluorestsents ja y-teljel propiidium jodiidi fluorestsents.

Samamoodi nagu joonisel 14 on metsiktüve puhul defineeritud rakupopulatsioonid, defineeriti need ka teistel tüvedel ja teistel tingimustel kasvatades. Võrreldes erinevaid rakupopulatsioone, on näha, et R-1 ja R-2 populatsioonide osakaalud ei erine tüvede vahel statistiliselt oluliselt (Joonis 15). Kõige suurem erinevus on näha Δ ttg2B tüvel, mille R-4 populatsioonid on kõigil erinevatel tingimustel märgatavalt suuremad kui teistel tüvedel, seevastu Δ tt2A tüve R-4 populatsioonid on võrreldavad metsiktüvega (Joonis 15). Seega võib Δ ttg2B tüve puhul mutatsioonisageduse tõus olla põhjustatud mitte funktsionaalse Ttg2 pumba puudumisest, (sest see puudub ka Δ ttg2A tüves, kus mutatsioonisagedus pole tõusnud) vaid hoopis muutustest membraani terviklikkuses.

Lisaks on märgata, et erinevate kemikaalide lisamisel väheneb metsiktüves ja Δ ttg2B tüves R-3 populatsiooni osakaal. Seda tendentsi pole aga märgata Δ ttg2A tüve puhul (Joonis 15).



Joonis 15. Ttg2A ja Ttg2B mõju membraanide permeaablusele. Välja on toodud kõigi nelja rakupopulatsiooni 3 katse keskmised väärtused koos 95% usalduspiiridega erinevatel tingimustel kasvatamisel. wt tähistab *P. putida* metsiktüve, 2A ja 2B vastavalt Δ ttg2A ja Δ ttg2B tüvesid. Y-teljel on tähistatud rakupopulatsiooni osahulka %des, R-1, R-2, R-3 ja R-4 populatsioonid kokku moodustavad 100%.

2.4. Arutelu

2.4.1. Mutatsioonisagedust mõjutavaid geene tuvastav testsüsteem lac-lsc

Erinevate molekulaarsete mehhanismide uurimiseks on *E. coli* küll enimkasutatav mudelorganism, kuid samas on ta mitmes mõttes erandlik bakter. Erandlikud on ka osad *E. coli* reparatsiooniradade ensüümid ja DNA polümeraasid (Kivisaar 2010). Seetõttu on üldistes mutatsiooniprotsessides osalevate võrgustike mõistmiseks äärmiselt oluline uurida ka teisi baktereid. *P. putida* on metaboolselt väga mitmekülgne bakter, olles seega huvitav mudelorganism. *P. putida* kuulub suurde ja mitmekesisesse perekonda Pseudomonadaceae, mille erinevad liigid võivad koloniseerida mulda, taimi, veekeskkondi, loomi ja olla ka inimesele patogeensed.

P. putida's mutatsiooniprotsesside uurimise peamiseks probleemiks on mutatsioonide detekteerimisvõimaluste vähesus. Nagu ka *E. coli*'s, saab juhuslikke mutatsioone *P. putida* tüvedes analüüsida Rif-resistentsuse tekke alusel, mil juhuslikud mutatsioonid *rpoB* geenis võimaldavad tüvedel Rif-i sisaldaval söötmel üles kasvada (Jatsenko jt. 2010). Samas *E. coli*'s väga sagedaselt kasutatav Lac⁺ mutantide tekkel baseeruv testsüsteem (Cairns ja Foster 1991) pole *P. putida*'s kasutatav, sest *P. putida* pole võimeline laktoosi lagundama. Varasemalt on meie laboris *P. putida* jaoks konstrueeritud fenooli lagundamisvõime tekkimisel põhinevaid testsüsteeme (Kasak jt. 1997; Saumaa jt. 2002; Tegova jt. 2004; Juurik jt. 2012), mis võimaldavad küll erinevate tüvede mutatsioonisagedusi omavahel võrrelda, kuid millest ei ole abi, kui tahta isoleerida uusi mutatsioonisagedust mõjutavaid geene. Seega on antud töös kirjeldatud *P. putida* PaWlacIIsc tüvel põhinev testsüsteem uudne, kuna see suudab tuvastada mutatsioonisageduse suurenemist igas *P. putida* üksikkolonias eraldi.

E. coli's on ka varem õnnestunud konstrueerida testsüsteeme, mis võimaldavad suuri ülegenoomseid analüüse, kuid enamus neist baseeruvad laktoosi lagundamisel. Nagu ka eelpool mainitud, pole neid testsüsteeme kahjuks võimalik rakendada *P. putida*'s. Esmane spontaansete mutatsioonide tuvastamise viis laktoosi lagundamise abil sarnaneb ka käesolevas töös kasutatud Phe⁺ kolooniate akumulatsioonide katsele, kus *E. coli* tüves FC40 on raaminihkega *lacZ* geen, ning laktoosil kasvavad üles vaid bakterid, milles on toimunud raaminihke mutatsioon (Cairns ja Foster 1991). Selle testsüsteemi edasiarendusi on mitmeid, tihti põhinevad need sellel, et koloonia täissuuruseks kasvamiseks on vaja rakkudel mitmeid mutatsioone, näiteks lisaks mutatsioonile *lacZ* geen on vaja kaotada ka auksotroofsus metioniini suhtes (Miller jt. 1999) või söötmel üles kasvamiseks vajavad rakud kindla antibiootikumi suhtes resistentsuse teket (Al Mamun jt. 2012). Kirjeldamiseks ülegenoomselt

mutatsioonisagedust mõjutavaid geene, on ka nende testsüsteemidega viidud läbi transposoonmutagenees ja analüüsitud papillide teket üksikkolooniatel (Miller jt. 1999; Gibson jt. 2010; Al Mamun jt. 2012). Kasutades neid erinevaid papillide tekke testsüsteeme on olnud võimalik *E. coli*'s tuvastada palju uusi mutatsioonide taset mõjutavaid geene ja mutatsiooniprotsessides osalevaid võrgustikke. Seega on alust arvata, et käesolevas töös kirjeldatud testsüsteem võib anda meie edaspidiseks tööks vajalikke uurimissuundasid pseudomonaadides.

Varasemalt on peamiselt uuritud mutatsioonisagedust mõjutavaid tegureid seoses mõne DNA reparatsioonirajaga või statsionaarse faasi mutageneesis osalevate globaalsete regulaatoritega (nt LexA ja RpoS). Kuid on alust arvata, et nendega seotud geenid pole ainsad, mis mõjutavad mutatsioonisagedust rakkudes. Käesolevas töös kirjeldatud testsüsteem võimaldab detekteerida mutatsioonisagedust mõjutavaid geene ja seeläbi ehk avastada ka uusi radasid, mis osalevad mutatsiooniprotsessides ja nende reguleerimises. Kuigi selliste transposoonmutageneesil baseeruvate testsüsteemide puhul peab olema ettevaatlik, et mitte püüda taustamüra, vaid selekteerida välja tegelikult mutatsioonisagedust suurendavad geenikatkestused (Tabel 1), on siiski alust arvata, et see testsüsteem lac-lsc toimib selektiivselt. Sellele viitavad nii katsed transposoonmutantidega kui deletsioonitüvega. Sõelale jäänud mutantidest valikuliselt 17-ga läbi viidud katsetes vaid neljal polnud mutatsioonisagedus võrreldes metsiktüvega statistiliselt oluliselt suurenenud (Joonis 7). Samuti on spontaansete mutatsioonide hulk tõusnud transposoonmutageneesi abil identifitseeritud geeni *ttg2B* deletsioonitüvel, seda nii eksponentsiaalses (Joonis 9) kui statsionaarses faasis (Joonis 10).

Samas tuleb mutatsioonisagedust mõjutavaid geene otsides saadud geenikatkestustesse siiski kriitiliselt suhtuda, sest kuigi ilma transposooni insertioonita testtüves tekib esimestel päevadel üle kuue korra vähem siniseid papille põhjustavaid mutatsioone, siis neid siiski tekib (Tabel 1). Seega peab arvestama, et lisaks päriselt mutatsioonisagedust mõjutavatele geenidele võib mõnedel juhtudel detekteerida lihtsalt nõ taustamüra. Seetõttu on äärmiselt oluline, lisaks esmasele papillide otsimisele läbi viia ka teine seleksioon Rif-i sisaldaval söötmel.

Lisaks sellele peab ka tõdema, et kuigi käesolevas töös konstrueeritud *ttg2B* deletsioonitüvi käitub võrreldavalt katkestustüvedega (Joonis 7 ja joonis 9), siis võivad transposoonmutantidel olla lisaks ka polaarsed efektid. Antud töös läbiviidud transposoonmutageneesis kasutati minitransposooni Tn5, mille *Km^R* geeni järel ei paiknenud terminaatorit (Martinez-Garcia jt. 2011) ning kuna *Km^R* geen on transkribeeritav

konstitutiivselt promootorilt, võib mõnel juhul transposoon võimendada geenikatkestusele järgnevate geenide transkriptsioonitaset ja mutatsioonisageduse suurenemine võib olla tingitud hoopis taolisest polaarsest efektist.

Sellest kõigest hoolimata on käesoleva töö käigus õnnestunud kirjeldada ja iseloomustada testsüsteemi lac-lsc, mis võimaldab detekteerida mutatsiooniprotsessides osalevaid gene. Seetõttu võib antud testsüsteem olla edaspidises töös väga vajalik tööriist, võimaldades tuvastada ja süvitsi uurida uusi süsteeme, mille osalusest mutatsiooniprotsessides pole seni veel teada.

2.4.2. Testsüsteemi abil detekteeritud geenid

Käesolev testsüsteem on võimaldanud kindlaks teha väga laia spektri gene, mis potentsiaalselt mõjutavad mutatsioonisagedust (Tabel 2). Kuigi *E. coli*'s on varasemalt statsionaarse faasi mutageneesiga seostatud eelkõige paariteistkümnest geenist koosnevat võrgustikku, siis hiljutiste tulemuste põhjal tundub statsionaarse faasi mutageenes olevat sõltuv vähemalt 93-st geenist koosnevast võrgustikust (Al Mamun jt. 2012). Antud tulemus viitab sellele, et tegelikult sõltuvad mutatsiooniprotsessid hoopis rohkematest geenidest kui varem arvati. See julgustab ka käesolevas töös välja tulnud arvukaid varasemalt mutatsiooniprotsessidega mitte seostatud gene põhjalikumalt uurima.

Lisaks annab testsüsteemi selektiivsusele kindlust ka fakt, et ligi 10% juhtudest oli transposoon inserteerunud juba varasem teada olevatesse DNA reparatsiooniga seotud geenidesse (Tabel 2). Nende 10% hulgas oli mitmeid gene, kuhu transposoon sisenes korduvalt ja mille puudumisel on näidatud mutaatorfenotüübi ilmumist nii *P. putida*'s kui *E. coli*'s (Saumaa jt. 2006; Saumaa jt. 2007; Oliver ja Mena 2010).

Kuna lac-lsc testsüsteemil baseeruv esmane seleksioon toimus mitu päeva nälgitud rakkude hulgas, on alust arvata, et käesoleva testsüsteemi abil leiab eelistatult gene, mis mõjutavad mutatsioonitaset statsionaarses faasis. Seda hüpoteesi kinnitab ka see, et testsüsteemis välja tulnud geeni *ttg2B* katkestuse korral oli mutatsioonisagedus statsionaarses faasis suurenenud peaaegu viis korda (Joonis 9), seevastu eksponentsiaalses faasis vaid 2 korda (Joonis 10).

2.4.3. Testsüsteemi abil isoleeritud transporterite geenid

Analüüsidest lac-lsc testsüsteemi sisaldava *P. putida* tüve transposoonmutageneesist sõelale jäänud gene, torkas silma, et ebaproportsionaalselt palju (ligi üks kolmandik) toimus transposooni insertsioone transporterite geenidesse ja teistesse membraani funktsioonidega seotud geenidesse (Tabel 2). *P. putida* KT2440-i genoomis on leitud ~350 sisemembraani

transporterit, mida on 15% rohkem kui *P. aeruginosa*'s (Nelson jt. 2002). Nii suur transporterite arv *P. putida* genoomis on üks põhjusest, miks *P. putida* on metaboolselt nii mitmekesine.

Varem pole eriti leitud seoseid mutatsiooniprotsesside ja membraansete transporterite vahel. Samas on teada, et paljud pumbad osalevad oksüdatiivset stressi põhjustavate ühendite, DNA-d kahjustavate kemikaalide ja teiste rakkudele kahjulike ühendite välja pumpamises ning seetõttu tundub loogiline, et mida ohtlikumas keskkonnas bakterid kasvavad, seda olulisemaks muutuvad pumbad, hoidmaks mutatsioonide taset endisena. Gram-negatiivsetel bakteritel on näidatud, et näiteks orgaaniliste solventide rikkas keskkonnas kasvamiseks ja sellest tuleneva osmootse stressiga toime tulemiseks ning ka antibiootikumide ja oksüdatiivse stressi korral on transporterid eriti olulised, võimaldades bakteritel kiirelt kohaneda keeruliste keskkonnatingimustega (Ramos jt. 2001). Pumpade olulisusele stressitingimustes viitas fakt, et ABC transporterit Ttg2 transmembraanse valgu puudumisel on mutatsioonisagedus nälja tingimustes tõusnud (Joonis 10). See võib omakorda viidata sellele, et Ttg2 pump transpordib rakust ohtlikke aineid välja.

Paljud MDR pumbad, mis tagavad bakterite resistentsust erinevatele antibiootikumidele ja toksilistele ühenditele, on laia spetsiifikaga ja suudavad seeläbi üksteist kompenseerida. Näiteks on *P. putida* DOT-T1E genoomis 3 RND perekonna pumpa: TtgABC, TtgDEF ja TtgGHI, mis kõik koos tagavad resistentsuse tolueenile ja erinevatele orgaanilistele solventidele (Rojas jt. 2001). Lisaks on vähemalt 4 erinevat RND pumpa, mis viivad rakust välja redokstsüklites osalevaid kemikaale (Godoy jt. 2010). Seetõttu võivad ka transporterite seosed mutatsiooniprotsessidega ilmnedas alles mitme pumba puudumisel ning see võib olla ka üheks põhjuseks, miks nende seost mutatsioonisagedusega pole väga lihtne uurida.

Kompenseerimise hüpoteesi kinnituseks uuriti käesolevas töös ka topeltmutantseid tüvesid. Lisaks testsüsteemis välja tulnud Ttg2 pumba geenidele deleteeriti *P. putida* kromosoomist ka MATE perekonna transporterit geen *dinF*. DinF on üks väheseid transporterit, mille puhul *E. coli*'s on näidatud transporterit võimet kaitsta DNA-d oksüdatiivse stressi eest MutT puudumisel. Seega võib DinF olla kaudselt seotud mutatsiooniprotsessidega (Rodriguez-Beltran jt. 2012). Lisaks kuulub DinF *E. coli*'s ka SOS geenide hulka (Courcelle jt. 2001). Seda enam sobiks DinF-i ja Ttg2 pumba koos uurida, kuna käesolevas töös näidati, et ka Ttg2 pump on eelkõige oluline just statsionaarses faasis. Samuti on ka Ttg2 transporteril seoseid oksüdatiivse stressiga ning seega võiksid need kaks pumpa täita sarnaseid rolle. Tulemustest on aga näha, et nende kahe süsteemi geenide deleteerimisel

mingeid akumuleeruvaid efekte pole (Joonis 10), mis viitab sellele, et need kaks konkreetset pumpa teineteist statsionaarse faasi mutageneesi korral ei komplementeeri. Küll aga saab nende tulemuste põhjal järeldada, et DinF-i või Ttg2B puudumine mõjutab spontaansete mutatsioonide teket statsionaarses faasis (Joonis 10). Seega saime kinnitust hüpoteesile, et pumbad võivad mõjutada mutatsioonisagedust eelkõige statsionaarses faasis, kus jääkainete kogunemine bakterisse võib olla oluliseks mutatsioonisagedust mõjutavaks teguriks.

2.4.4. ABC transporter Ttg2

Käesolevas töös iseloomustati varem kirjeldamata pumpa Ttg2. Kui ABC transporterit Ttg2 suhtes defektsete tüvedega viidi läbi erinevate kemikaalide taluvuse katsed tahkel söötmel, siis enamus kemikaale, mis mõjutasid tüvede kasvu, olid seotud vähemal või rohkemal määral oksüdatiivse stressiga (Joonis 11). Küll aga olid need tulemused vastuolulised: pumbamutandid kasvasid mõne oksüdatiivset stressi põhjustava kemikaali juures paremini kui metsiktüvi ja mõne juures kehvemini. Kui mutatsioonisageduse katsetest oli selgelt näha, et pumba erinevate komponentide geenide deleteerimisel esineb erinev fenotüüp, siis kõigil kemikaalidel kasvades olid Δ ttg2A ja Δ ttg2B tüved võrreldavad. Sellest võib järeldada, et nende kemikaalide erinev taluvus oli tingitud funktsionaalse Ttg2 pumba olemasolust või puudumisest.

Tulemused, kus kemikaalide lisamisel kasvavad pumbamutandid kehvemini, on lihtsamini seletatavad. Kõige lihtsam seletus oleks, et Ttg2 pump osaleb NQO ja MMC välja pumpamises (Joonis 11), samas võib efekt olla ka kaudsem. Sarnaseid järeldusi võib teha ka MIC katsete tulemuste kohta. Nendel juhtudel, kus antibiootikumi minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon oli pumbamutantidel väiksem, võib Ttg2 pump osaleda nende antibiootikumide väljapumpamises, suurendades sellega nende suhtes taluvust. Nii viitab käesolev töö sellele, et Ttg2 transporter võib osaleda Bp, Cm ja Tet välja pumpamises (Tabel 4). Seevastu on paraquaadi ja fenooli taluvuskatsete tulemuste interpreteerimine keerulisem. *P. putida*'s on leitud vähemalt 4 pumpa, mis osalevad paraquaadi väljapumpamises (Godoy jt. 2010). Sellest lähtuvalt tekkis hüpotees, et ehk on Ttg2 pumba puudumise arvelt membraanis mõnda teist transporterit, mis aitab paraquaati rakust välja transportida, rohkem. Erinevatel tingimustel kasvatatud rakkude membraanivalkude eraldused (Joonis 13) aga seda hüpoteesi ei kinnita. Samuti pole vedelkultuuri ja tassil kasvanud rakkude valgumustris visuaalselt märgatavaid erinevusi. Seevastu paraquaadist tulenevad kasvuerinevused metsiktüve ja Ttg2 deletantide vahel ilmnevad just tardsöötmel (Joonis 11) ja mitte vedelkultuuris (Joonis 12). Seega on alust arvata, et need tüvede kasvuerinevused tassil, aga mitte vedelkultuuris tulevad füsioloogilise seisundi erinevusest, mitte transporterite ekspresioonimustri muutustest.

Tõenäoliselt ilmneb efekt toitainete, hapniku ja teiste eluks vajalike ühendite kättesaadavuse erinevusest tahkel ja vedelsöötmel. Samas ei saa välistada, et osasid membraanivalkude ekpressioonimustri muutusi ei suudetud visuaalselt tuvastada.

Seda, et mingi pumba puudumisel suudavad bakterid osasid kemikaale paremini taluda, on näidatud ka *P. putida*'s põhjalikult uuritud TtgABC pumba puhul, kus *ttgB* ja *ttgC* puudumisel suutsid rakud fenooli paremini taluda (Putrins jt. 2010). Oma töös pakkusid Putrinš jt. välja, et TtgABC pumba negatiivne efekt fenooli tolerantsusele võib olla seotud rakujagunemise kontrollpunktidega. Nimelt oli fenoolil kasvanud *ttgC* deletsioonitüvel rakupopulatsiooni struktuur võrreldes metsiktüvega muutunud, fenooliga tassidelt analüüsitud populatsioonides oli rohkem mitme kromosoomi koopiaga rakke (Putrins jt. 2010). Käesoleva töö kontekstis ei saa paraquaadi ega fenooli tolerantsuse negatiivne efekt sellest tulla. Siin on näha, et pigem väheneb *ttg2B* deletsiooni korral mitme kromosoomi koopiaga rakkude hulk (käesolevas töös defineeritud kui R-3 populatsioon, joonis 15) ja seega on see efekt vastupidine Putrinši jt. töös *ttgC* mutandiga saadud tulemustele. Seega nõuab transporterite negatiivne efekt osade kemikaalide tolerantsusele veel edasist uurimist.

Läbivoolutsütomeetria tulemustest on veel näha, et Δ ttg2A ja Δ ttg2B tüved käituvad erinevalt (Joonis 15). Sarnaselt tulemustele, mis saadi mutatsioonisageduste võrdlemisest (Joonis 9 ja joonis 10), on ka läbivoolutsütomeetri andmeid analüüsides metsiktüvi ja Δ ttg2A tüvi võrreldavad ja Δ ttg2B tüvi käitub erinevalt. Selgesti on näha, et Δ ttg2B tüvel on rakupopulatsioonis protsentuaalselt palju rohkem läbilaskva membraaniga rakke kui metsiktüvel ja Δ ttg2A tüvel (antud töös defineeritud R-4, joonis 15). Lähtudes läbivoolutsütomeetri tulemustest ja erinevate tüvede mutatsioonisagedustest, pakun välja, et Ttg2 puhul ei pruugi mutatsioonisageduse suurenemine tuleneda funktsionaalse pumba puudumisest vaid membraani terviklikkust mõjutavatest protsessidest. Δ ttg2B tüvel puudub transmembraanne valk Ttg2B ning selle tüve membraani läbilaskvus on märgatavalt suurenenud ning samuti on suurenenud ka mutatsioonisagedus. Ttg2A, mis paikneb sisemembraani tsütoplasmaatilisel poolel ning ei läbi membraani, puudumisel ei suurene R-4 populatsioon ega ka mutatsioonisagedus rakkudes võrreldes metsiktüvega. Võimalik, et ka DinF-i geeni deleteerimisest põhjustatud efekt mutatsioonisagedusele tuleneb hoopiski selle mõjust membraani terviklikkusele. Samas saab käesolevas töös saadud tulemuste põhjal teha kindlaid järeldusi siiski vaid Ttg2 pumba kohta ning need tulemused ei välista seda, et teised lac-lsc testsüsteemi abil detekteeritud transporterite geenid mõjutavad mutatsioonisagedust oma funktsionaalsuse alusel.

Kokkuvõte

Mõistmaks patogeensete bakterite võimet koloniseerida teisi organisme, saavutada antibiootikumide resistentsust või lihtsalt mõistmaks bakterite võimet kohaneda eluga väga erinevates ökoloogilistes niššides, on äärmiselt oluline mõista erinevaid molekulaarseid mehhanisme, mis põhjustavad nende kiiret evolutsioneerumist. Tihti võimaldavad erinevate elukeskkondadega kohaneda arvukad mutatsioonid, mille tulemusena selekteeruvad populatsioonist välja antud keskkonnas kohaseimad variandid. Rasketes keskkonnaoludes ja stressitingimustes kasvavad bakterid aeglasemalt – sisenevad statsionaarsesse faasi. Kuigi statsionaarse faasi rakkudes on DNA replikatsiooni tase oluliselt langenud, tekib neis endiselt mutatsioone, mis võiksid olla stimuleeritud stressitingimustest. Kuna enamasti kasvavadki bakterid tingimustes, kus üht või teist eluks vajalikku ühendit napib, annab statsionaarse faasi mutageneesi uurimine meile rohkem infot looduslikes tingimustes valitsevate mutatsiooniprotsesside kohta ja ühtlasi ka erinevate keskkondadega kohanemise kohta.

Mutatsiooniprotsesse on bakterites uuritud juba aastakümneid, aga enamasti on keskendunud ilmselgetele seostele DNA reparatsiooniradade ja vigutegevate polümeraaside näol. Käesolevas magistritöös on kirjeldatud *P. putida* kromosoomi viidud testsüsteemi lac-lsc, mis võimaldab üle genoomi detekteerida mutatsioonisagedust suurendavaid geenikatkestusi. Selline testsüsteem võimaldab leida ka mitte nii ilmselgeid ja otseseid seoseid geenide ja mutatsioonisageduse vahel ning seeläbi on potentsiaali tuvastada ka suuremaid mutatsiooniprotsesse mõjutavad geenivõrgustikke. Ühtlasi on alust arvata, et käesoleva testsüsteemi näol on õnnestunud luua väga vajalik ja perspektiivikas tööriist mutatsiooniprotsesside uurimiseks *P. putida*'s.

Käesoleva töö käigus õnnestus:

- ♦ iseloomustada ja kirjeldada testsüsteemi lac-lsc mutatsioonisagedust mõjutavate geenide identifitseerimisel
- ♦ analüüsida testsüsteemiga isoleeritud gene ning nende kuulumist erinevatesse geenigruppidesse
- ♦ näidata, et paljude testsüsteemi abil identifitseeritud geenide transposoonmutantides on Rif^R mutantide tekkesagedus tõusnud
- ♦ konstrueerida ABC-transporteri Ttg2 suhtes defektsed tüved Δ ttg2A ja Δ ttg2B
- ♦ tõestada, et kui testsüsteemi abil tuvastatud *ttg2B* geeni deleteerimisel tõuseb mutatsioonisagedus nii eksponentsiaalse kui statsionaarse faasi rakkudes, siis *ttg2A* geeni deleteerimisel sellist mõju ei ole

- ◆ näidata, et MATE perekonna transporter DinF-i olemasolu mõjutab mutatsioonisagedust statsionaarses faasis, kuid samas ei ilmne DinF-i puudumisel mingit akumul eeruvat efekti mutatsioonisageduse suurenemisele Ttg2-defektses tüves
- ◆ näidata, et Ttg2 pump võib osaleda bensüülpenitsillini, klooramfenikooli ja tetratsükliini rakust väljapumpamises
- ◆ võrrelda Ttg2 pumba kemikaalide taluvust vedelkultuuris ja tardsöötme l ning näidata, et tardsöötme l on efektid suuremad kui vedelsöötmes
- ◆ näidata, et vedelsöötmes kasvades on Δ ttg2B tüvel ja PaW85 tüvel visuaalselt tuvastatavad sisemembraani valgumustri erinevused, mis ei ole otseselt seletatavad Ttg2 pumba puudumisega
- ◆ pakkuda välja hüpotees, et transporterite transmembraansete valkude puudumisel nähtavad mutatsioonisageduse erinevused tulenevad hoopiski membraani terviklikkuse rikkumisest, mitte aga konkreetse funktsionaalse pumba puudumisest
- ◆ tõestada selle hüpoteesi paikapidamist Ttg2 transporteri puhul.

Identification of new mutation rate affecting genes in *Pseudomonas putida*

Mari Tagel

Summary

Studying mutational processes is the key to understanding the rapid evolving ability of bacteria. Bacteria usually live under adverse environmental conditions and to cope with different stresses they enter the stationary growth phase – their growth is slowed down and their gene expression undergoes extensive changes. It has been shown that the mutation frequency is higher in the stationary phase than in the exponential growth phase and due to the increased mutation frequency bacterial populations can rapidly adapt to different stressful conditions. This rise in mutation frequency is termed “stationary phase mutagenesis” (also “stress-induced mutagenesis” and “adaptive mutagenesis”) (Foster 1999; Rosenberg 2001). To understand the bacterial adaptive ability it is particularly important to understand stationary phase mutagenesis.

It is known that the increase in mutation frequency in the stationary phase is due to the downregulation of DNA repair enzymes and the upregulation of low fidelity SOS DNA polymerases. Recently it has been proven that in *E. coli* stationary phase mutagenesis depends on a lot more genes than it has been believed. The network is made up of at least 93 genes (Al Mamun jt. 2012). This leads us to assume that the mutational processes are regulated by huge gene networks in *E. coli* and also in other bacteria.

In our laboratory we have been studying the model organism *P. putida*. Even though there are numerous test systems to detect the rise of mutation frequency in *P. putida* strains lacking some specific genes, there were no systems that could detect new mutation rate affecting genes throughout the whole genome. In this study I have been analyzing a new test system lac-lsc that was constructed in our laboratory by Heili Ilves. Coupled with transposon mutagenesis, the lac-lsc system detected a variety of genes, amongst them numerous genes that are already known to function in DNA repair enzymes and also many genes affecting the cell membrane.

The results of this study can be summarized as follows:

- ◆ I have characterized a new test system lac-lsc to be used in identification of genes that affect frequency of mutation in *P. putida* and analyzed the genes detected by this system
- ◆ the particular gene *ttg2B* isolated with the test system affects mutation rate in both exponential and stationary growth phases
- ◆ the ABC transporter Ttg2 and the MATE family transporter DinF have no accumulating effect on mutation frequency

- ♦ the ABC transporter Ttg2 might take part in providing tolerance to the antibiotics tetracycline, benzylpenicillin and chloramphenicol
- ♦ the membrane permeability of the *ttg2B* defective strain has increased and therefore our hypothesis is that the increased mutation frequency is due to general membrane defects and not the lack of a specific transport protein.

In conclusion it can be said that the test system characterized in this work is a very promising new tool for our future works towards understanding the mutational processes in *P. putida*.

Tänuõnad

Eelkõige sooviksin tänada oma juhendajat Maiat, kelle toetus ja ideed suutsid mind alati motiveerida. Samuti Heilit, kelle tehtud testsüsteemita poleks mul midagi uurida olnud ja kelle õpetusteta ei oskaks ma laboris midagi teha. Ei saa ka mainimata jätta Johannat, keda juhendades õppisin ma ise rohkem kui oleks osanud arvata.

Suur aitäh Rihole ja Annikale DinF tüve eest ja Dimitri Lubenetsile abi eest läbivoolutsütomeetriga.

Ning muidugi tahaks ma tänada kõiki oma rõõmsameelseid labroikaaslaseid, kes on alati valmis aitama, toetama ja tuju tõstma ning kes teevad igapäevase töötamise meeleolukaks. Lõpetuseks suur aitäh Hannale ja Andresele minu torkimise eest seni, kuni ma magistritöö valmis kirjutasin.

Aitäh teile.

Kasutatud kirjandus

- Adams, M. H. (1959). *Bacteriophages.*, Interscience Publishers Inc., NY.
- Al Mamun, A. A., M. J. Lombardo, C. Shee, A. M. Lisewski, C. Gonzalez, D. Lin, R. B. Nehring, C. Saint-Ruf, J. L. Gibson, R. L. Frisch, O. Lichtarge, P. J. Hastings and S. M. Rosenberg (2012). "Identity and function of a large gene network underlying mutagenic repair of DNA breaks." *Science* **338**(6112): 1344-1348.
- Alekshun, M. N. and S. B. Levy (1997). "Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon." *Antimicrob Agents Chemother* **41**(10): 2067-2075.
- Anjem, A. and J. A. Imlay (2012). "Mononuclear iron enzymes are primary targets of hydrogen peroxide stress." *J Biol Chem* **287**(19): 15544-15556.
- Ariza, R. R., S. P. Cohen, N. Bachhawat, S. B. Levy and B. Dimple (1994). "Repressor mutations in the *marRAB* operon that activate oxidative stress genes and multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **176**(1): 143-148.
- Battesti, A., N. Majdalani and S. Gottesman (2011). "The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*." *Annu Rev Microbiol* **65**: 189-213.
- Bayley, S. A., C. J. Duggleby, M. J. Worsey, P. A. Williams, K. G. Hardy and P. Broda (1977). "Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2." *Mol Gen Genet* **154**(2): 203-204.
- Bjedov, I., O. Tenaillon, B. Gerard, V. Souza, E. Denamur, M. Radman, F. Taddei and I. Matic (2003). "Stress-induced mutagenesis in bacteria." *Science* **300**(5624): 1404-1409.
- Boyer, H. W. and D. Roulland-Dussoix (1969). "A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*." *J Mol Biol* **41**(3): 459-472.
- Buckley, A. M., M. A. Webber, S. Cooles, L. P. Randall, R. M. La Ragione, M. J. Woodward and L. J. Piddock (2006). "The AcrAB-TolC efflux system of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* plays a role in pathogenesis." *Cell Microbiol* **8**(5): 847-856.
- Cabrera, M., Y. Nghiem and J. H. Miller (1988). "*mutM*, a second mutator locus in *Escherichia coli* that generates G.C---T.A transversions." *J Bacteriol* **170**(11): 5405-5407.
- Cairns, J. and P. L. Foster (1991). "Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli*." *Genetics* **128**(4): 695-701.
- Chevallet, M., S. Luche and T. Rabilloud (2006). "Silver staining of proteins in polyacrylamide gels." *Nat Protoc* **1**(4): 1852-1858.
- Courcelle, J., A. Khodursky, B. Peter, P. O. Brown and P. C. Hanawalt (2001). "Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*." *Genetics* **158**(1): 41-64.
- Davidson, A. L. and J. Chen (2004). "ATP-binding cassette transporters in bacteria." *Annu Rev Biochem* **73**: 241-268.
- Dawson, R. J. and K. P. Locher (2006). "Structure of a bacterial multidrug ABC transporter." *Nature* **443**(7108): 180-185.
- de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik and K. N. Timmis (1990). "Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria." *J Bacteriol* **172**(11): 6568-6572.
- Dominguez-Cuevas, P., J. E. Gonzalez-Pastor, S. Marques, J. L. Ramos and V. de Lorenzo (2006). "Transcriptional Tradeoff between Metabolic and Stress-response Programs in *Pseudomonas putida* KT2440 Cells Exposed to Toluene." *J Biol Chem.* **281**(17): 11981-11991.

- Eisenstark, A., M. J. Calcutt, M. Becker-Hapak and A. Ivanova (1996). "Role of *Escherichia coli rpoS* and associated genes in defense against oxidative damage." Free Radic Biol Med **21**(7): 975-993.
- Fath, M. J. and R. Kolter (1993). "ABC transporters: bacterial exporters." Microbiol Rev **57**(4): 995-1017.
- Feng, G., H. C. Tsui and M. E. Winkler (1996). "Depletion of the cellular amounts of the MutS and MutH methyl-directed mismatch repair proteins in stationary-phase *Escherichia coli* K-12 cells." J Bacteriol **178**(8): 2388-2396.
- Figurski, D. H. and D. R. Helinski (1979). "Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans*." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(4): 1648-1652.
- Foster, P. L. (1999). "Mechanisms of stationary phase mutation: a decade of adaptive mutation." Annu Rev Genet **33**: 57-88.
- Foster, P. L. (2001). Stress-induced Mutagenesis in Bacteria. eLS, John Wiley & Sons, Ltd.
- Foster, P. L. (2007). "Stress-induced mutagenesis in bacteria." Crit Rev Biochem Mol Biol **42**(5): 373-397.
- Foster, P. L. (2011). "Stress-induced Mutagenesis in Bacteria." eLS. John Wiley & Sons, Ltd.
- Friedberg, E., G. Walker, W. Siede, S. Wood, R. Wood, R. Schultz and T. Ellenberger (2006). DNA Repair and Mutagenesis. Washington D.C, ASM Press.
- Galhardo, R. S., P. J. Hastings and S. M. Rosenberg (2007). "Mutation as a stress response and the regulation of evolvability." Crit Rev Biochem Mol Biol **42**(5): 399-435.
- Gibson, J. L., M. J. Lombardo, P. C. Thornton, K. H. Hu, R. S. Galhardo, B. Beadle, A. Habib, D. B. Magner, L. S. Frost, C. Herman, P. J. Hastings and S. M. Rosenberg (2010). "The sigma(E) stress response is required for stress-induced mutation and amplification in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **77**(2): 415-430.
- Godoy, P., A. J. Molina-Henares, J. de la Torre, E. Duque and J. L. Ramos (2010). "Characterization of the RND family of multidrug efflux pumps: *in silico* to *in vivo* confirmation of four functionally distinct subgroups." Microb Biotechnol **3**(6): 691-700.
- Gonzalez-Flecha, B. and B. Dimple (1997). "Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration in aerobically growing *Escherichia coli*." J Bacteriol **179**(2): 382-388.
- Greenberg, J. T., P. Monach, J. H. Chou, P. D. Josephy and B. Dimple (1990). "Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(16): 6181-6185.
- Gu, M. and J. A. Imlay (2011). "The SoxRS response of *Escherichia coli* is directly activated by redox-cycling drugs rather than by superoxide." Mol Microbiol **79**(5): 1136-1150.
- Hengge-Aronis, R. (2002). "Signal Transduction and Regulatory Mechanisms Involved in Control of the sigma(S) (RpoS) Subunit of RNA Polymerase." Microbiol Mol Biol Rev **66**(3): 373-395.
- Herrero, M., V. de Lorenzo and K. N. Timmis (1990). "Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria." J Bacteriol **172**(11): 6557-6567.
- Ilves, H., R. Hõrak and M. Kivisaar (2001). "Involvement of sigma(S) in starvation-induced transposition of *Pseudomonas putida* transposon Tn4652." J Bacteriol **183**(18): 5445-5448.
- Imlay, J. A. (2003). "Pathways of oxidative damage." Annu Rev Microbiol. **57**: 395-418.
- Imlay, J. A. (2013). "The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium." Nat Rev Microbiol **11**(7): 443-454.
- Imlay, J. A., S. M. Chin and S. Linn (1988). "Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*." Science **240**(4852): 640-642.

- Jatsenko, T., A. Tover, R. Tegova and M. Kivisaar (2010). "Molecular characterization of Rif(r) mutations in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*." Mutat Res **683**(1-2): 106-114.
- Juurik, T., H. Ilves, R. Teras, T. Ilmjarv, K. Tavita, K. Ukkivi, A. Teppo, K. Mikkil and M. Kivisaar (2012). "Mutation frequency and spectrum of mutations vary at different chromosomal positions of *Pseudomonas putida*." PLoS One **7**(10): e48511.
- Kasak, L., R. Hõrak and M. Kivisaar (1997). "Promoter-creating mutations in *Pseudomonas putida*: a model system for the study of mutation in starving bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(7): 3134-3139.
- Katz, S. and R. Hershberg (2013). "Elevated mutagenesis does not explain the increased frequency of antibiotic resistant mutants in starved aging colonies." PLoS Genet **9**(11): e1003968.
- Kivisaar, M. (2010). "Mechanisms of stationary-phase mutagenesis in bacteria: mutational processes in pseudomonads." FEMS Microbiol Lett **312**(1): 1-14.
- Kohanski, M. A., D. J. Dwyer, B. Hayete, C. A. Lawrence and J. J. Collins (2007). "A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics." Cell **130**(5): 797-810.
- Kroll, J. S., P. R. Langford, K. E. Wilks and A. D. Keil (1995). "Bacterial [Cu,Zn]-superoxide dismutase: phylogenetically distinct from the eukaryotic enzyme, and not so rare after all!" Microbiology **141** (Pt 9): 2271-2279.
- Kuo, C. F., T. Mashino and I. Fridovich (1987). "alpha, beta-Dihydroxyisovalerate dehydratase. A superoxide-sensitive enzyme." J Biol Chem **262**(10): 4724-4727.
- Lang, H. and E. T. Palva (1993). "The *ompS* gene of *Vibrio cholerae* encodes a growth-phase-dependent maltoporin." Mol Microbiol **10**(4): 891-901.
- Linton, K. J. and C. F. Higgins (1998). "The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins." Mol Microbiol **28**(1): 5-13.
- Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido and J. E. Hearst (1995). "Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*." Mol Microbiol **16**(1): 45-55.
- MacLean, R. C., C. Torres-Barcelo and R. Moxon (2013). "Evaluating evolutionary models of stress-induced mutagenesis in bacteria." Nat Rev Genet **14**(3): 221-227.
- Maki, H. and M. Sekiguchi (1992). "MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis." Nature **355**(6357): 273-275.
- Martinez-Garcia, E., B. Calles, M. Arevalo-Rodriguez and V. de Lorenzo (2011). "pBAM1: an all-synthetic genetic tool for analysis and construction of complex bacterial phenotypes." BMC Microbiol **11**: 38.
- Martinez-Garcia, E. and V. de Lorenzo (2011). "Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440." Environ Microbiol **13**(10): 2702-2716.
- McCord, J. M. and I. Fridovich (1969). "Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)." J Biol Chem **244**(22): 6049-6055.
- Michaels, M. L. and J. H. Miller (1992). "The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine)." J Bacteriol **174**(20): 6321-6325.
- Miller, C., L. E. Thomsen, C. Gaggero, R. Mosseri, H. Ingmer and S. N. Cohen (2004). "SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality." Science **305**(5690): 1629-1631.
- Miller, J. H. (1972). Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.

- Miller, J. H. (1992). A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.
- Miller, J. H. (1996). "Spontaneous mutators in bacteria: insights into pathways of mutagenesis and repair." Annu Rev Microbiol **50**: 625-643.
- Miller, J. H., A. Suthar, J. Tai, A. Yeung, C. Truong and J. L. Stewart (1999). "Direct selection for mutators in *Escherichia coli*." J Bacteriol. **181**(5): 1576-1584.
- Morita, Y., K. Kodama, S. Shiota, T. Mine, A. Kataoka, T. Mizushima and T. Tsuchiya (1998). "NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*." Antimicrob Agents Chemother **42**(7): 1778-1782.
- Navarro Llorens, J. M., A. Tormo and E. Martinez-Garcia (2010). "Stationary phase in gram-negative bacteria." FEMS Microbiol Rev **34**(4): 476-495.
- Nelson, K. E., C. Weinel, I. T. Paulsen, R. J. Dodson, H. Hilbert, V. A. Martins dos Santos, D. E. Fouts, S. R. Gill, M. Pop, M. Holmes, L. Brinkac, M. Beanan, R. T. DeBoy, S. Daugherty, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, O. White, J. Peterson, H. Khouri, I. Hance, P. Chris Lee, E. Holtzapple, D. Scanlan, K. Tran, A. Moazzez, T. Utterback, M. Rizzo, K. Lee, D. Kosack, D. Moestl, H. Wedler, J. Lauber, D. Stjepandic, J. Hoheisel, M. Straetz, S. Heim, C. Kiewitz, J. A. Eisen, K. N. Timmis, A. Dusterhoft, B. Tumbler and C. M. Fraser (2002). "Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440." Environ Microbiol **4**(12): 799-808.
- Nghiem, Y., M. Cabrera, C. G. Cupples and J. H. Miller (1988). "The *mutY* gene: a mutator locus in *Escherichia coli* that generates G.C----T.A transversions." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(8): 2709-2713.
- Nikaido, H. (1996). "Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria." J Bacteriol **178**(20): 5853-5859.
- Nikaido, H. and Y. Takatsuka (2009). "Mechanisms of RND multidrug efflux pumps." Biochim Biophys Acta **1794**(5): 769-781.
- Ojangu, E. L., A. Tover, R. Teras and M. Kivisaar (2000). "Effects of combination of different -10 hexamers and downstream sequences on stationary-phase-specific sigma factor sigma(S)-dependent transcription in *Pseudomonas putida*." J Bacteriol **182**(23): 6707-6713.
- Oliver, A. and A. Mena (2010). "Bacterial hypermutation in cystic fibrosis, not only for antibiotic resistance." Clin Microbiol Infect **16**(7): 798-808.
- Paulsen, I. T., J. Chen, K. E. Nelson and M. H. Saier, Jr. (2001). "Comparative genomics of microbial drug efflux systems." J Mol Microbiol Biotechnol **3**(2): 145-150.
- Petrarca, P., S. Ammendola, P. Pasquali and A. Battistoni (2010). "The Zur-regulated ZinT protein is an auxiliary component of the high-affinity ZnuABC zinc transporter that facilitates metal recruitment during severe zinc shortage." J Bacteriol **192**(6): 1553-1564.
- Piddock, L. J. V. (2006). "Multidrug-resistance efflux pumps — not just for resistance." NATURE REVIEWS **4**: 629-636.
- Putrins, M., H. Ilves, L. Lilje, M. Kivisaar and R. Horak (2010). "The impact of ColRS two-component system and TtgABC efflux pump on phenol tolerance of *Pseudomonas putida* becomes evident only in growing bacteria." BMC Microbiol **10**: 110.
- Ramos, J. L., M. T. Gallegos, S. Marques, M. I. Ramos-Gonzalez, M. Espinosa-Urgel and A. Segura (2001). "Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors." Curr Opin Microbiol **4**(2): 166-171.
- Rodriguez-Beltran, J., A. Rodriguez-Rojas, J. R. Guelfo, A. Couce and J. Blazquez (2012). "The *Escherichia coli* SOS gene *dinF* protects against oxidative stress and bile salts." PLoS One **7**(4): e34791.

- Rojas, A., E. Duque, G. Mosqueda, G. Golden, A. Hurtado, J. L. Ramos and A. Segura (2001). "Three efflux pumps are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E." J Bacteriol **183**(13): 3967-3973.
- Rosenberg, S. M. (2001). "Evolving responsively: adaptive mutation." Nat Rev Genet **2**(7): 504-515.
- Santos, P. M., D. Benndorf and I. Sa-Correia (2004). "Insights into *Pseudomonas putida* KT2440 response to phenol-induced stress by quantitative proteomics." Proteomics **4**(9): 2640-2652.
- Saumaa, S., K. Tarassova, M. Tark, A. Tover, R. Tegova and M. Kivisaar (2006). "Involvement of DNA mismatch repair in stationary-phase mutagenesis during prolonged starvation of *Pseudomonas putida*." DNA Repair (Amst) **5**(4): 505-514.
- Saumaa, S., A. Tover, L. Kasak and M. Kivisaar (2002). "Different spectra of stationary-phase mutations in early-arising versus late-arising mutants of *Pseudomonas putida*: involvement of the DNA repair enzyme MutY and the stationary-phase sigma factor RpoS." J Bacteriol **184**(24): 6957-6965.
- Saumaa, S., A. Tover, M. Tark, R. Tegova and M. Kivisaar (2007). "Oxidative DNA damage defense systems in avoidance of stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*." J Bacteriol **189**(15): 5504-5514.
- Schagger, H. (2006). "Tricine-SDS-PAGE." Nat Protoc **1**(1): 16-22.
- Seaver, L. C. and J. A. Imlay (2001). "Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*." J Bacteriol **183**(24): 7173-7181.
- Semchyshyn, H., T. Bagnyukova, K. Storey and V. Lushchak (2005). "Hydrogen peroxide increases the activities of *soxRS* regulon enzymes and the levels of oxidized proteins and lipids in *Escherichia coli*." Cell Biol Int **29**(11): 898-902.
- Storz G. and Hengge-Aronis R. (2000). Bacterial stress responses. Washington DC, ASM Press.
- Taddei, F., J. A. Halliday, I. Matic and M. Radman (1997). "Genetic analysis of mutagenesis in aging *Escherichia coli* colonies." Mol Gen Genet **256**(3): 277-281.
- Taddei, F., I. Matic and M. Radman (1995). "cAMP-dependent SOS induction and mutagenesis in resting bacterial populations." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(25): 11736-11740.
- Taddei, F., M. Vulic, M. Radman and I. Matic (1997). Genetic variability and adaptation to stress, Exs.
- Tardat, B. and D. Touati (1991). "Two global regulators repress the anaerobic expression of MnSOD in *Escherichia coli*::Fur (ferric uptake regulation) and Arc (aerobic respiration control)." Mol Microbiol **5**(2): 455-465.
- Tark, M., A. Tover, L. Koorits, R. Tegova and M. Kivisaar (2008). "Dual role of NER in mutagenesis in *Pseudomonas putida*." DNA Repair (Amst) **7**(1): 20-30.
- Tegos, G. P., M. Haynes, J. J. Strouse, M. M. Khan, C. G. Bologna, T. I. Oprea and L. A. Sklar (2011). "Microbial efflux pump inhibition: tactics and strategies." Curr Pharm Des **17**(13): 1291-1302.
- Tegova, R., A. Tover, K. Tarassova, M. Tark and M. Kivisaar (2004). "Involvement of Error-Prone DNA Polymerase IV in Stationary-Phase Mutagenesis in *Pseudomonas putida*." J Bacteriol **186**(9): 2735-2744.
- Tsaneva, I. R. and B. Weiss (1990). "*soxR*, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-12." J Bacteriol **172**(8): 4197-4205.
- Tsui, H. C., G. Feng and M. E. Winkler (1997). "Negative regulation of *mutS* and *mutH* repair gene expression by the Hfq and RpoS global regulators of *Escherichia coli* K-12." J Bacteriol **179**(23): 7476-7487.

- Van Bambeke, F., E. Balzi and P. M. Tulkens (2000). "Antibiotic efflux pumps." Biochem Pharmacol **60**(4): 457-470.
- Vatansver, F., W. C. de Melo, P. Avci, D. Vecchio, M. Sadasivam, A. Gupta, R. Chandran, M. Karimi, N. A. Parizotto, R. Yin, G. P. Tegos and M. R. Hamblin (2013). "Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species--bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond." FEMS Microbiol Rev **37**(6): 955-989.
- Watson, D., T. Baker, S. Bell, A. Gamm, M. Levine and R. Losick (2004). Molecular Biology of the Gene. United States of America, PEARSON Benjamin Cummings.
- Weber, H., T. Polen, J. Heuveling, V. F. Wendisch and R. Hengge (2005). "Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity." J Bacteriol **187**(5): 1591-1603.
- Winsor, G. L., D. K. Lam, L. Fleming, R. Lo, M. D. Whiteside, N. Y. Yu, R. E. Hancock and F. S. Brinkman (2011). "Pseudomonas Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes." Nucleic Acids Res **39**(Database issue): D596-600.
- Wrande, M., J. R. Roth and D. Hughes (2008). "Accumulation of mutants in "aging" bacterial colonies is due to growth under selection, not stress-induced mutagenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(33): 11863-11868.

Kasutatud veebilehed

- ◆ <http://www.biochemsoctrans.org/bst/033/0679/bst0330679f01.htm>
- ◆ <http://www.pseudomonas.com/>

Lisad

Lisa 1. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Bakteritüvi	Genotüüp või iseloomustus	Allikas
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 (ϕ80 <i>lacZ</i>ΔM15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i><i>endA1</i> <i>gyr A96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i></i>	(Miller 1992)
CC118 λ pir	Δ (<i>ara-leu</i>) <i>araD</i> Δ <i>lacX74</i> <i>galE</i> <i>galK</i> <i>phoA20</i> <i>thi-1</i> <i>rspE</i> <i>rpo B</i> <i>argE</i> (<i>Apm</i>)	(Herrero jt. 1990)
HB101	<i>subE44</i> <i>subF58</i> <i>hsdS3</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>) <i>recA13</i> <i>pro</i> Δ 2 <i>lacY1</i> <i>galK2</i> <i>rsp20</i> <i>xyl-5</i> <i>mt1 -1</i>	(Boyer ja Roulland-Dussoix 1969)
<i>Pseudomonas putida</i>		
PaW85	Algne tüvi, isogeenne täielikult sekveneeritud <i>P. putida</i> KT2440 tüvega	(Bayley jt. 1977)
PaWlacIIsc (testtüvi)	Kromosoomis geenile <i>PP3968</i> järgnevasse alasse on viidud sisse <i>lacI_{P_{lac}}</i> <i>lac3</i> <i>lacZ</i> geenikassett	H. Ilves, avaldamata
PaW Δ ttg2A	PaW85 tüvest <i>Attg2A</i>	Käesolev töö
PaW Δ ttg2B	PaW85 tüvest <i>Attg2B</i>	Käesolev töö
PaW Δ dinF	PaW85 tüves Δ dinF	A. Teppo, avaldamata
PaW Δ ttg2A Δ dinF	PaW Δ ttg2A tüvest Δ dinF	Käesolev töö
PaW Δ ttg2B Δ dinF	PaW Δ ttg2B tüvest Δ dinF	Käesolev töö
Plasmiidid		
pBAM1Tn5	mini-Tn5 (Km^R) kandev suitsiidvektor (Amp^R , oriR6K)	(Martinez-Garcia jt. 2011)
pRK2013	Konjugatiivset ülekannet abistav plasmiid	(Figurski ja Helinski 1979)
pKTpheA22TAG	Asendusmutatsioone detekteeriv plasmiidne testsüsteem, kus plasmiidis pKT240 sisalduva <i>pheA</i> geeni 22. koodon (CTG – Leu) on asendatud stoppkoodoniga TAG (<i>bla</i>)	(Tegova jt. 2004)
pJP5603-I-SceI _{v2} (pEMG)	I-SceI restriktsoonisaitse ja multikloneerimisjärjestust sisaldav suitsiidplasmiid (Km^r)	(Martinez-Garcia ja de Lorenzo 2011)
pSW (I-SceI)	I-SceI nukleaasi ekspresseeriv plasmid (Amp^R)	(Martinez-Garcia ja de Lorenzo 2011)
pJPttg2A	pJP5603-I-SceI _{v2} plasmiid, kuhu on klooritud EcoRI ja KpnI fragmendina <i>ttg2A</i> geeni eelne ja järgne ala.	Käesolev töö
pJPttg2B	pJP5603-I-SceI _{v2} plasmiid, kuhu on klooritud EcoRI ja KpnI fragmendina <i>ttg2B</i> geeni eelne ja	Käesolev töö

	järgne ala.	
pJPdinF	pJP5603-I-SceI _{v2} plasmiid, kuhu on kloneeritud <i>dinF</i> geeni eelne ja järgne ala.	A. Teppo, avaldamata
pBRlacItac (HindIII XbaI del)	pBR322 baasil vektor, kuhu on kloneeritud <i>tac</i> promootor ja selle repressor <i>lacI</i> , vektoris on deleteeritud HindIII ja XbaI lõikesaidid.	(Ojangu jt. 2000)
pHLU102	Amp ^R plasmiid, multikloneerimissaidi järel paikneb <i>lacZ</i> geen	(Lang ja Palva 1993)
pHLU102:lacItac	pHLU102 vektor, kuhu on viidud BamHI fragmendina <i>lacItac</i> järjestus	H. Ilves, avaldamata
pHLU102:lacItacsc3	pHLU102:lacItac vektor, kuhu on viidud XbaI fragmendina <i>lsc3</i> geen	H. Ilves, avaldamata
pUC18Not (HindIII del)	Amp ^R kloneerimisvektor, NotI polülimeriga multikloneerimissait, vektoris on deleteeritud HindIII lõikesait	H. Ilves, avaldamata
pUC18Not:lacItacsc3lacZ	pUC18Not (HindIII del) vektor, kuhu on viidud pHLU102:lacItacsc3 plasmiidist KpnI ja SalI-ga välja lõigatud <i>lacItacsc3lacZ</i> geenikonstruktsioon	H. Ilves, avaldamata
pUTTn5Sm	Sm resistentsust kodeerivat minitransposooni sisaldav plasmiid (Amp ^R Sm ^R)	(de Lorenzo jt. 1990)
pUTTn5:lacItacsc3lacZ	pUTTn5Sm vektor, kuhu on NotI fragmendina sisse viidud geenikassett <i>lacItacsc3lacZ</i>	H. Ilves, avaldamata

Lisa 2. Töös kasutatud praimerid ja nende kirjeldus

Praimer	Praimeri järjestus	Iseloomustus ja seondumiskoht
lacopRev	5'-GATCCTCTAGAGTCGACCTG-3'	komplementaarne <i>lacI</i> geeni eelse alaga positsioonides -420 kuni -401 initsiaatorkoodonist GTG, komplementaarne vektoriga pBAM1 positsioonides 1052 kuni 1032
Km1	5'-CAAGGGGTGTTATGAGCCAT-3'	Komplementaarne <i>km</i> geeni algusega suunaga geeni sisse, seondub vektorile pBAM1 positsioonis 143 kuni 163
pheAtsII	5'-GTTTCATGGGGGACTGCTTC-3'	komplementaarne <i>pheA</i> geenis alaga positsioonides 295 kuni 313 nukleotiidi allapoole translatsiooni startikoodonist ATG
pheABamei	5'-AAGGCGGCTCCCGTAAGACA-3'	komplementaarne <i>pheA</i> geeni ette jääva alaga positsioonides -22 kuni -40

		initsiaatorkoodon ATG-st, suunaga geenis
Forward	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	plasmidi pBluescript universaalpraimer
Reverse	5'-AACAGCTATGACCATG-3'	plasmidi pBluescript universaalpraimer
ARB6	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'	kõdupraimer, mille linkerregioonile ACGCC on <i>P. putida</i> kromosoomis 12050 kordust
BAM1	5'-TTATGTAAGCAGACAGTTTT-3'	komplementaarne Km resistentsusgeeni initsiaatorkoodinist ATG ette jääva alaga positsioonides -21 kuni -40 suunaga geenist välja
ARB2	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'	seondub kõdupraimeri ARB6 konserveerunud 5' otsaga
ME-1-uus2	5'-TATCTTGTGCAATGTAACATCAGAG-3'	komplementaarne Km resistentsusgeeni initsiaatorkoodinist ATG ette jääva alaga positsioonides -63 kuni -87 suunaga geenist välja
EcoRI $ttg2$ ees	5'-AGGAATTCGGATGCACGAAAAA CGCCGG-3'	komplementaarne positsioonides -482 kuni -461 nukleotiidi <i>ttg2A</i> geenile eelneva alaga suunaga geeni poole, praimer 5' otsa on disainitud EcoRI lõikesait
$ttg2A$ välja	5'-AAGGATTTTCTGCGCATCCTC CTTGCTAAT GCAGCCTCG-3'	praimer 3' ots on komplementaarne <i>ttg2A</i> geenile eelneva alaga positsioonides -26 kuni -5, suunaga geenist välja, ning praimer 5' ots on komplementaarne praimeriga $ttg2B$ start
$ttg2B$ start	5'-TTGATGCGCAGAAAATCCTTACT-3'	komplementaarne <i>ttg2B</i> geeni algusega positsioonides -3 kuni 20 <i>ttg2B</i> geeni ATG koodoni suhtes
KpnI $ttg2B$	5'-GTGGTACCGCTGAAGATCAGCG CCAGC-3'	komplementaarne <i>ttg2B</i> geeniga positsioonides 502 kuni 482, praimer 5' otsas on KpnI lõikesait
EcoRI $ttg2A$	5'-AGGAATTC CCGTTGCGCGTGCATC -3'	Komplementaarne <i>ttg2A</i> geeniga positsioonides 322 kuni 342 suunaga geeni lõpu poole, praimer 5' otsa on disainitud EcoRI lõikesait
$ttg2A$ lõpp	5'-TCCAGGGTGC GTTTTGCATC AACGCGCCCC CAGCAGGT-3'	praimer 5' ots on komplementaarne praimeriga $ttg2C$ start ja 3' ots on komplementaarne 19 viimase nukleotiidiga <i>ttg2A</i> geeni lõpust
$ttg2C$ start	5'-TGCAAACCGCACCTGGAAT-3'	komplementaarne <i>ttg2C</i> geeniga

		positsioonist +1
KpnIttg2C	5'-GTGGTACCATGGGTACTCCTT AATTAGCC-3'	komplementaarne <i>ttg2C</i> geeniga positsioonides +475 kuni +497 suunaga geeni alguse poole, praimer 5' otsa on disainitud KpnI lõikesait
pSW-R	5'-AACGTCGTGACTGGGAAAA-3'	komplementaarne plasmiidis pSW(I-SceI) oleva järjestusega, suunaga multikloneerimisjärjestuse poole
pSW-F	5'-GGACGCTTCGCTGAAAATA-3'	komplementaarne plasmiidis pSW(I-SceI) oleva järjestusega, suunaga multikloneerimisjärjestuse poole
PP0569lf	5'-AGAATTCTCGACATCCACTTTGTGC- 3'	Komplementaarne <i>PP0569</i> eelse alaga positsioonides -753 kuni -734 suunaga <i>PP0569</i> poole, 5'otsas EcoRI lõikesait
PP0569-2r	5'-AGGATCCATATCCGGCCCTGGTCCA- 3'	komplementaarne alaga 630 kuni 648 nt-i pärast <i>PP0569</i> geeni lõppu, suunaga geeni poole, 5'otsast BamHI lõikesait
PP0569K	5'-ACCGAAATGTTGGACAGGAT-3'	Komplementaarne geeniga <i>PP0569</i> positsioonides 72 kuni 92, suunaga geeni alguse poole
PP0569KI	5'-ATGGTTGCCTGGTCGTTAC-3'	komplementaarne geeni <i>PP0569</i> eelse alaga 75 kuni 55 nukleotiidi enne start koodonit suunaga geeni poole
Xbalsc3uuslõpp	5'-TCTTCTAGATTTCAGCTCAGTTGC ACGTCTTTCAT-3'	komplementaarne <i>lsc3</i> geenile järgneva alaga, suunaga geeni poole, praimer 5' otsa on disainitud XbaI lõikesait
XbaHindSDlsc uus	5'-AGATCTAGAAGCTTAGGAGG CTGCAGATGTAC AATAGCAACTCTGC- 3'	komplementaarne <i>lsc3</i> geenile eelneva alaga, suunaga geeni poole, praimer 5' otsas on XbaI ja HindIII lõikesaidid

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina; Mari Tagel

(sünnikuupäev: 23.11.1989)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
Uute mutatsioonisagedust mõjutavate geenide identifitseerimine bakteris *Pseudomonas putida*,

mille juhendaja on Maia Kivisaar, Ph.D.

- 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, 26.05.2014