

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

**Kromosoomsete profaagide ja toksiini-antitoksiini süsteemide roll *Pseudomonas putida*
faagiresistentsuses**

Bakalaureusetöö

Bioloogia ja elustiku kaitse

12 EAP

Liis Kärgerberg

Juhendajad PhD Rita Hõrak

MSc Sirli Rosendahl

TARTU 2021

INFOLEHT

Kromosoomsete profaagide ja toksiini-antitoksiini süsteemide roll *Pseudomonas putida* faagiresistentsuses

Profaagid kaitsevad peremeesbakterit sarnaste bakteriofaagidega nakatumise eest. Sama on spekuleeritud ka toksiini-antitoksiini süsteemide kohta. Käesoleva töö eesmärk oli välja selgitada, kas kromosoomsed profaagid ja toksiini-antitoksiini (TA) süsteemid mõjutavad *P. putida* vastupanuvõimet faagidele. Selle eesmärgi saavutamiseks eraldasin keskkonnaproovist *P. putida*'t nakatava faagi Pp_F2 ja optimeerisin faagide isoleerimise meetodikat. Faagidega Pp_F1 ja Pp_F2 läbi viidud nakatamiskatsed näitavad, et *P. putida* kromosoomsed profaagid kaitsevad bakterit faagiga nakatumise eest. Kromosoomsed TA süsteemid ei suurenda, vaid pigem vähendavad *P. putida* kohasust faagirünnaku korral. Nii kromosoomsed profaagid kui ka TA süsteemid mõjutavad *P. putida* faagiresistentsust erineval määral, sõltuvalt ründavast faagist. Faagide isoleerimise meetodika optimeerimisel selgus, et *P. putida* on faaginakkusele vastuvõtlikuim eksponentsiaalses kasvufaasis, temperatuuril 20°C ja DNA stressi põhjustava antibiootikumiga inkubeerimisel.

Märksõnad: profaagid, toksiini-antitoksiini süsteemid, bakteriofaag, faagiresistentsus

CERCS kood: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

The role of chromosomal prophages and toxin-antitoxin systems in phage resistance in *Pseudomonas putida*

Prophages are thought to protect the host bacterium from infection by bacteriophages. This has also been speculated in regard to toxin-antitoxin (TA) systems. The aim of this study was to determine whether chromosomal prophages and TA systems affect the resistance of *P. putida* to phages. To achieve this goal, I isolated phage Pp_F2 that infects *P. putida* from an environmental sample and optimized the phage isolation methodology. Infection experiments with phages Pp_F1 and Pp_F2 show that *P. putida* chromosomal prophages increase phage resistance of the host bacterium. Chromosomal TA systems do not increase the phage resistance of *P. putida* phage, but rather reduce *P. putida*'s fitness under phage attack. Chromosomal prophages and TA systems affect phage resistance to varying degrees, depending on the phage. Optimization of the methodology showed that *P. putida* is most susceptible to phage infection in the exponential growth phase, at 20°C and incubation in the presence of DNA stress inducing antibiotic.

Keywords: prophages, toxin-antitoxin systems, bacteriophage, phage resistance

CERCS code: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD	
INFOLEHT	3
KASUTATUD LÜHENDID	6
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1. <i>Pseudomonas putida</i>	8
1.2. Bakteriofaagid	9
1.3. Kromosoomsed profaagid	10
1.4. Profaagide mõju peremeesbakterile	12
1.5. Kromosoomsed toksiini-antitoksiini süsteemid	14
1.6. Kromosoomsete toksiini-antitoksiini süsteemide mõju peremeesbakterile	16
2. EKSPERIMENTAALOSA	20
2.1. Töö eesmärgid	20
2.2. Materjal ja meetodika	21
2.2.1. Kasutatud söötmed, bakteritüved ja bakteriofaagid	21
2.2.2. Keskkonnaproovist bakteriofaagi eraldamine	22
2.2.3. Faagide rikastamine ja puhastamine	22
2.2.4. <i>P. putida</i>'t nakatavate bakteriofaagide eraldamise meetodika optimeerimine 23	
2.2.5. Faagiga nakatatud bakterite kasvudünaamika jälgimine mikrotiiterplaadil ..	23
2.2.6. Statistiline andmetöötlus	24
2.3. Tulemused ja arutelu	25
2.3.1. Faagide eraldamine Purtse jõe kalda mullaproovist ja faagieraldusmeetodika optimeerimine	25
2.3.2 Kromosoomsed profaagid suurendavad <i>P. putida</i> faagiresistentsust	29
2.3.3. Kromosoomsed TA süsteemid ei mõjuta oluliselt <i>P. putida</i> faagiresistentsust .	32
KOKKUVÕTE	36
SUMMARY	38

TÄNUSÕNAD	40
KIRJANDUSE LOETELU	41
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	66
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	67

KASUTATUD LÜHENDID

Abi - katkestatud infektsioon (ingl. k. *abortive infection*)

Cas - CRISPR-iga seotud (ingl. k. *CRISPR-associated*)

CFU - kolooniaid moodustavad ühikud (ingl. k. *colony forming unit*)

CRISPR - rühmitatud korrapäraste vahedega lühikesed palindroomsed järjestused (ingl. k. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)

cipro - tsiprofloksatsiin (ingl. k. *ciprofloxacin*)

LB - lüsogeenne sööde (ingl. k. *lysogeny broth*)

MOI - nakatamiskordaja (ingl. k. *multiplicity of infection*)

ORF - avatud lugemisraam (ingl. k. *open reading frame*)

PFU - lüüsilaike tekitavad faagid (ingl. k. *plaque forming units*)

ROS - reaktiivsed hapnikuühendid (ROS, ingl. k. *reactive oxygen species*)

rpm - pööret minutis (ingl. k. *revolutions per minute*)

sRNA - väike mittekodeeriv RNA (ingl. k. *small noncoding RNA*)

TA süsteem - toksiini-antitoksiini süsteem (ingl. k. *toxin-antitoxin system*)

wt - algne tüvi (ingl. k. *wild-type*)

SISSEJUHATUS

Kromosoomne profaag on bakteriofaagi ehk baktereid nakatava viiruse genoom, mis on lülitatud peremeesbakteri kromosoomi ja mida peremeesbakter jagunemise käigus oma kromosoomi koosseisus paljundab. Profaagid ei ekspresseeri virulentsusega seotud geene, kuid ei ole ka päris vaikeolekus ja seetõttu võivad mõjutada peremeesbakterit olulisel määral. Muuhulgas võivad profaagid mängida rolli peremeesbakteri faagiresistentsuses (Cumby et al., 2012). Kromosoomse profaagi indutseerimisel (näiteks antibiootikumiga) võib faagi genoom bakteri kromosoomist väljuda ja panna peremeesbakteri tootma faagipartikleid.

Kromosoomne toksiini-antitoksiini süsteem on rohkem või vähem toksilisest toksiinist ja selle mõju nullivast antitoksiinist koosnev tandem. Antitoksiin lagundatakse üldjuhul kiiremini kui toksiin ja kui antitoksiini juurde ei toodeta, saab toksiin peremeesbakterile mõju avaldada. Näiteks on plasmiidsetel toksiini-antitoksiini süsteemidel plasmidi stabiliseeriv toime, kuna antitoksiini kodeeriva geeni kaotanud bakter jääb pärssimata toksiini tõttu olelusvõitluses plasmiidiga bakteritele alla (Unterholzner et al., 2013). Erinevalt plasmiidsetest toksiini-antitoksiini süsteemidest on nende kromosoomsete õvede bioloogiline roll palju segasem. Kõik kromosoomsed toksiinid ei olegi alati peremehele toksilised või siis on seda ebaolulisel määral ja ainult teatud tingimustel, näiteks, kui neid kunstlikult üle ekspresseerida.

Minu uurimustöö eesmärk oli välja selgitada kromosoomsete profaagide ja toksiini-antitoksiini süsteemide roll *Pseudomonas putida* faagiresistentsuses, kasutades lisaks varem keskkonnaproovist isoleeritud faagile ka *de novo* eraldatud bakteriofaagi ja seejuures optimeerida faagi eraldamise protokoll.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida on aeroobne gramnegatiivne fluorestseeruvate pseudomonaadide rühma kuuluv heterotroofne bakter (Daum et al., 1998; Suzuki & Goto, 1971; Whitman et al., 2015). *P. putida*-t leidub ohtralt vees, risosfääris ja mullas (Molina, 2000; Remold et al., 2015), kuid mõnevõrra ka inimeste ja loomade nahal ning limaskestadel (Carlson et al., 2009; Viju et al., 2017). *P. putida* poolt põhjustatud infektsioone inimestel hakati dokumenteerima alles 1960-ndatest (Rogers, 1960). Enne seda arvati, et *P. putida* ei ole inimpatogeen (Graewenitz & Weinstein, 1970). Tõepoolest on *P. aeruginosa* pseudomonaadide hulgas peamine tõvestaja, põhjustades oportunistlikke infektsioone (Araújo et al., 2018; Berrouane et al., 2000; Emerson et al., 2002; Grundmann et al., 1993). Ka *P. putida* infektsioon tabab pigem puuduliku immuunsusega või krooniliste haigustega inimesi, kuid kliiniline tähtsus on *P. putida*'l oluliselt väiksem kui *P. aeruginosa*'l (Anaissie et al., 1987; Madhavan et al., 1973; Rogers, 1960; Treviño et al., 2010; Yoshino et al., 2011).

Seevastu on *P. putida* (iseäranis tüvi KT2440 (Casey et al., 2013; Nakazawa, 2002; Regenhardt et al., 2002; Santos et al., 2004) ja temaga isogeenne PaW85 (Regenhardt et al., 2002; Rosendahl et al., 2020)) oluline mudelorganism, kuna sellel on mitmeid laboritöös olulisi omadusi. Näiteks on KT2440 metaboolselt paindlik ning suudab kasutada erinevaid süsiniku-, lämmastiku- ja fosforiallikaid (de la Peña Mattozzi et al., 2006; K. Lee et al., 2003; Mozejko-Ciesielska, 2018), sealhulgas ka selliseid keskkonnaohtlikke aroomaatseid ühendeid nagu toluen ja fenoolid (Afegbua & Batty, 2019; Hill & Robinson, 1975; K. Kim et al., 1998; Kuddus et al., 2013; Mosqueda et al., 1999; J. L. Ramos et al., 1995; Zeyer & Kearney, 1984; Weber, 1994). Samuti on *P. putida* tüvi KT2440 hea stressitaluvusega, püsides eluvõimelisena nii kõrgema soolsuse (Costa-Gutierrez et al., 2020) kui ka mitmete toksiliste ühendite (Fernández et al., 2012; Krayl et al., 2003; Santos et al., 2004) ja raskmetallide leidumisel kasvukeskkonnas (Banh et al., 2013; Manara et al., 2012; Miller et al., 2009; Ray et al., 2013). Lisaks on *P. putida* KT2440 hõlpsasti käideldav madala bioohutuse tasemega laboris (Kampers et al., 2019) tänu arvestatavate virulentsusfaktorite puudumisele (Belda et al., 2016; Iseppi et al., 2020; Udaondo et al., 2016).

1.2. Bakteriofaagid

Bakteriofaag ehk faag on viirus, mille infektsioonitsükkel toimub bakteris (Adams, 1959). Bakteriofaagide avastamise au jagavad Frederick W. Twort ja Felix d'Herelle, kellest viimane on bakteriofaagide „ristiisa“ (Duckworth, 1976).

Kuna bakteriofaagid esinevad koos bakteritega, on faage isoleeritud erinevatest keskkondadest, kus bakterid elavad: näiteks pinnasest (Ashelford et al., 2003; Campbell et al., 2006), veest (Bergh et al., 1989; Matsuzaki et al., 1992; Weinbauer et al., 2003), koduloomadest (Keller & Traub, 1974; Osawa et al., 1981) ja inimesest (Blanco-Picazo et al., 2020). Teadmisi bakteriofaagidest on soovitud kasutada inimeste huvides. Näiteks enterokokkidele iseloomulike faagide leidumine vees võimaldab hinnata vee kvaliteeti (Booncharoen et al., 2018); faagide bakteriolüütilisi omadusi püütakse rakendada (antibiootikumresistentsete) bakterite poolt põhjustatud haiguste ravimisel (*resp.* faagiteraapias) (Dedrick et al., 2019; Oliveira et al., 2020; Schooley et al., 2017). Loomulikult on bakteriofaagidel oma koht ka geneetikute arsenalis (Keen et al., 2017; Nakayama et al., 1999).

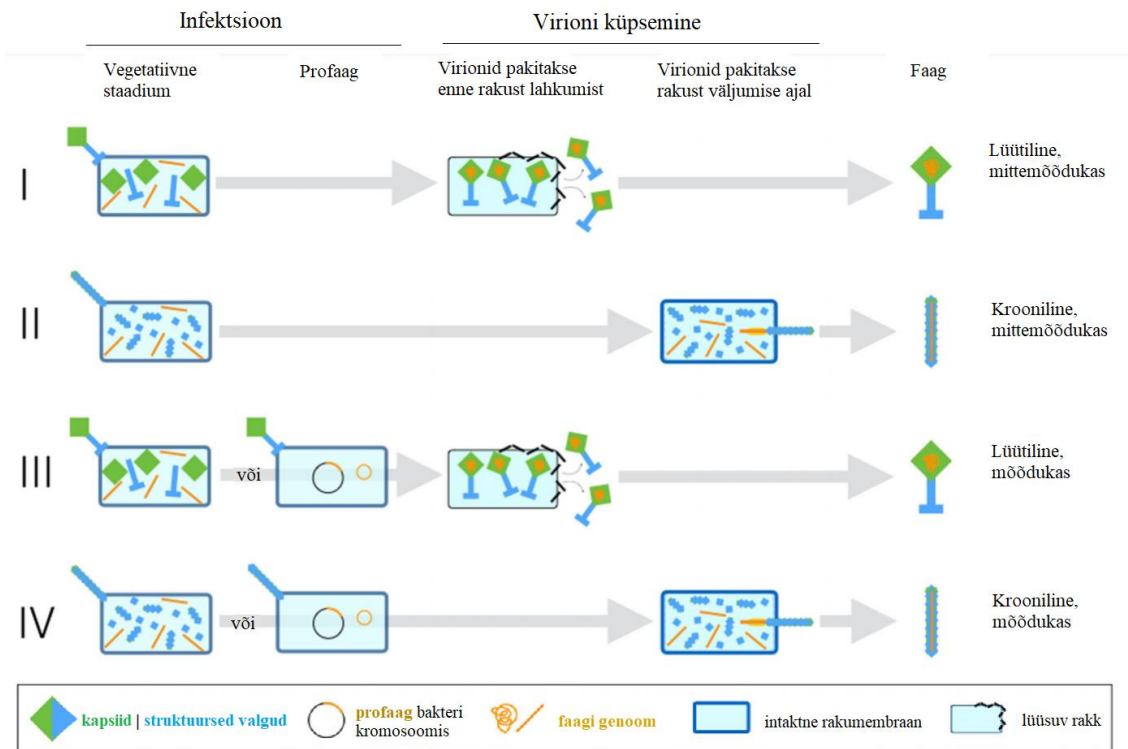
Vastavalt infektsioonitsüklile võib bakteriofaagid jagada nelja rühma (Tabel 1): lüütilised mittemõõdukad, kroonilised mittemõõdukad, lüütilised mõõdukad ja kroonilised mõõdukad (Hobbs & Abedon, 2016).

Tabel 1. Bakteriofaagide rühmitamine vastavalt infektsioonitsüklile:

	Lüütiline – vabanemiseks lõhuvad peremeesraku	Krooniline – vabanevad peremeesrakust ilma seda lõhkumata
Mittemõõdukas – ei esine profaagina	lüütiline mittemõõdukas (I)	krooniline mittemõõdukas (II)
Mõõdukas – esinevad ka profaagina	lüütiline mõõdukas (III)	krooniline mõõdukas (IV)

Lüütiline infektsioonitsükkel tähendab, et virionid küpsevad enne bakterirakust väljumist ning vabanemisel lõhuvad bakteri membraani ja hävitavad seega peremeesraku. Kroonilise infektsioonitsükli korral valmivad ja väljuvad viiruspartiklid rakust pungudes ega hävita seejuures peremeesrakku. Mittemõõdukas infektsioonitsükkel tähendab, et viirus ei esine profaagina.

Mõõduka infektsioonitsükli korral võib viirus esineda ka profaagina (Joonis 1) (Hobbs & Abedon, 2016).

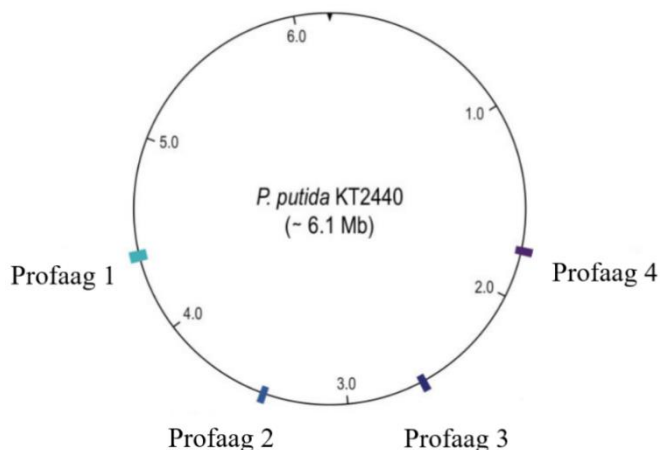


Joonis 1. Faagide rühmitamine infektsioonitsükli alusel. Faagid jagunevad nelja rühma: lütüülsed mittemõõdukad (I), kroonilised mittemõõdukad (II), lütüülsed mõõdukad (III) ja kroonilised mõõdukad (IV) (Hobbs & Abedon, 2016 põhjal).

1.3. Kromosoomsed profaagid

Mõõdukad bakteriofaagid võivad infektsioonitsükli jooksul esineda profaagina (Hobbs & Abedon, 2016; Owen et al., 2020). Profaagiks nimetatakse bakteriofaagi genoomi, mis on lülitatud peremeesbakteri kromosoomi (kromosoomne profaag) või mis paikneb tsütoplasmas plasmiidina (Freifelder & Meselson, 1970; Lwoff, 1953). Sellisel juhul on peremeesbakter lüsogeenne bakter (*resp.* lüsogeen) ja faagi infektsioonitsükkel on lüsogeenses faasis (Little, 2014; Lwoff, 1953).

Profaage esineb bakterite genoomis sageli (Roux et al., 2015; Touchon et al., 2016) ja neid võib olla rohkem kui üks (Chen et al., 2006; Ohnishi et al., 2001). Näiteks *P. putida* KT2440 rõngaskromosoomis paiknevad neli profaagi (Joonis 2, Tabel 2) moodustavad genoomist ligikaudu 2,6% (Canchaya et al., 2003; Martínez-García et al., 2015).



Joonis 2. *P. putida* rõngaskromosoomis on neli profaagi (Martínez-García et al., 2015 põhjal).

Tabel 2. *P. putida* KT2440 kromosoomsed profaagid (Canchaya et al., 2003; Martínez-García et al., 2015 põhjal).

Profaag	Pikkus (kb)	Avatud lugemisraamide arv	Näiteid kodeeritavatest produktidest
1	54,7	72	Integraasid, endolüsiin, holiinid, toksiini-antitoksiini süsteem
2	35,6	41	Seriinrekombinaas, holiin
3	39,1	32	Integraas
4	40	53	Integraasid, holiinid

Genoomseid (sh. kromosoomseid) profaage paljundatakse peremeesbakteri DNA koosseisus, tänu millele kanduvad genoomsed profaagid enamasti edasi ka tütarrakku (Freifelder & Meselson, 1970; Lwoff, 1953). Seejuures ei pruugi profaagid olla ainuüksi passiivne geneetiline materjal, mida kantakse rakust rakku, vaid nad võivad aktiivselt mõjutada peremeesraku toimimist (Little, 2014). Näiteks *Streptococcus spp.* mRNA ekspressioonimustri uurimisel leiti, et lüsogeensetes bakterites aktiveerusid vastusena kasvukeskkonna temperatuurimuutustele (37°C vs 29°C ja 40°) lisaks bakteri geenidele ka profaagide geenid (Smoot et al., 2001).

Faagi väljumist lüsogeenset faasist (*resp.* profaagi induktsioon) pärsib faagi enda kodeeritud repressor (Dodd et al., 2001; Little, 2014; Shi & Friedman, 2001). Näiteks *Escherichia coli* faag λ infektsioonitsükli kontrollib CI repressor, mis inhibeerib faagi lüütilise faasi gene ja stabiliseerib lüsogeenset faasi. Peremeesbakteri SOS vastuse käigus aktiveeruv valk RecA soodustab CI

repressori lagundamist ja profaagi geenide induktsiooni (Garriga et al., 1992; Little, 2014; Roberts et al., 1978). Üheks tavalisemaks lüütilist tsükli induktsiooniks teguriks on DNA kahjustus, mida võivad põhjustada nii bakteriraku metabolismi käigus tekkivad endogeensed reaktiivsed hapnikuühendid (ROS, ingl. k. *reactive oxygen species*) (Figuroa-Bossi & Bossi, 1999; Livny & Friedman, 2004) kui ka keskkonnategurid, nagu näiteks UV-kiirgus ja kemikaalid (Choi et al., 2010; Cochran et al., 1998; Little, 2014). Ka antibiootikumid võivad subletaalses doosis stimuleerida profaagi induktsiooni. Iseäranis selgelt tuleb see esile DNA sünteesi pärssivate antibiootikumide (näiteks kinoloonide (Hiasa & Shea, 2000; Tran & Jacoby, 2002; Wentzell & Maxwell, 2000)) kasutamise korral (Comeau et al., 2007; Goerke et al., 2006). Profaagi geenide induktsioon vallandab lüütilise tsükli, mille käigus toimub faagi genoomi replikatsioon, faagi geenide transkriptsioon ja faagipartiklite assambleerumine (Barksdale et al., 2006; Wegrzyn et al., 1992).

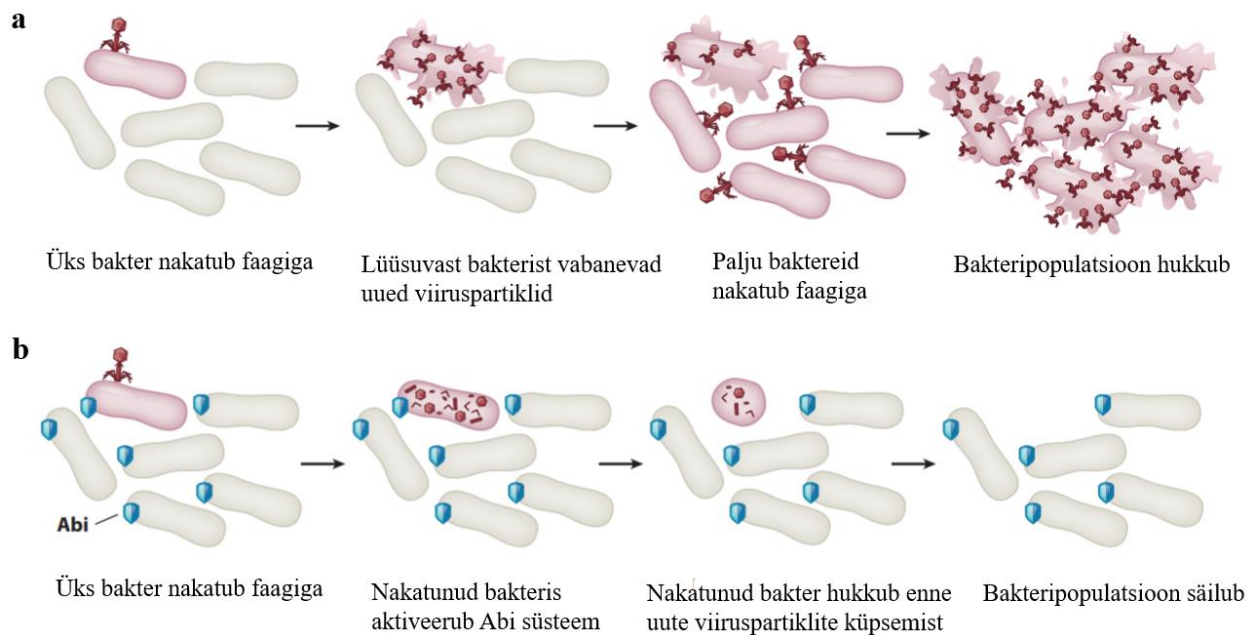
1.4. Profraagide mõju peremeesbakterile

Bakteriofaage on väga palju – umbes 10 korda rohkem kui baktereid – ja nad on olulised bakterite arvukuse piirajad (Fuhrman & Noble, 1995). Ometi ei ole faagid bakterite jaoks alati suuremust suurendavad parasiidid, vaid faaginakkus võib peremeesbakteri kohasust hoopiski tõsta. Mutualistlik (*resp.* vastastikku kasulik) suhe saab kujuneda faagi infektsioonitsükli lüsogeenses faasis, mil surutakse maha lüütilisse faasi suunavate faagi geenide avaldumine ja faag püsib peremeesbakteris profaagina (Dodd et al., 2001; Shi & Friedman, 2001; Waldor & Friedman, 2005). Ühtlasi ekspresseeritakse gene, mis kaitsevad faagiga nakatunud peremeesbakterit uuesti nakatumise (*resp.* superinfektsiooni) eest (Bondy-Denomy et al., 2016; Bondy-Denomy & Davidson, 2014). Sellisel juhul võib aset leida lüsogeenne konversioon – peremeesbakteri fenotüübi muutus, mis ei ole seletatav ainuüksi faagi poolt kodeeritud repressori toimega (Little, 2014; Waldor & Friedman, 2005). Ühtlasi annab lüsogeenne tsükkel peremeesorganismile aega viirusevastaste kaitsemehhanismide tekkimiseks ja täiustumiseks (Koonin et al., 2006).

Bakterid võitlevad faagidega nakatumise vastu erinevate mehhanismidega. Nii on neil näiteks restriktiooni-modifikatsiooni süsteemid ja CRISPR-Cas (CRISPR, rühmitatud korrapärase vahedega lühikesed palindroomsed järjestused, ingl. k. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*; Cas, CRISPR-iga seotud, ingl. k. *CRISPR-associated*). Restriktiooni-modifikatsiooni süsteemid lõikavad katki bakterisse sisenenud võõr-DNA, samas kui bakteri enda DNA on lõikamise eest kaitstud modifikatsioonide abil (Wilson, 1991). Ka bakterite CRISPR-Cas

süsteem tuvastab võõr-DNA-d. Cas-ensüümid lõikavad võõr-DNA fragmentideks ja sisestavad „näidised“ bakteri kromosoomi CRISPR-i lookusesse. Nendelt fragmentidelt ekspresseeritakse RNA, mis protsessitakse CRISPR-RNA-ks (crRNA). CrRNA seondub komplementaarse võõr-DNA-ga ning juhib Cas-nukleaasi seda lõikama ja lagundama (Barrangou, 2015; Knott & Doudna, 2018).

Abortiivse infektsiooni (Abi, ingl. k. *abortive infection*) ehk katkestatud infektsiooni süsteemid kaitsevad bakteripopulatsiooni, mitte üksikut bakterit, sest põhjustavad faagiga bakteri surma enne kui faag on jõudnud oma replikatsioonitsükli lõpetada (Joonis 3) (Lopatina et al., 2020).



Joonis 3. Abi süsteemi põhimõte: a) bakterikultuur ei kodeeri Abi süsteemi. Ühe raku nakatumisel faagiga levib nakkus üle terve kultuuri; b) bakterikultuur kodeerib Abi süsteemi. Faaginakkus ei levi üle terve kultuuri, kuna nakatunud rakk hävib Abi süsteemi toimel (*Lopatina et al., 2020* põhjal).

Abi süsteemid võivad endas kätkeada peremeesbakteri ja profaagi koostööd. Näiteks *E. coli* faag λ profaagi ekspresseeritavate geenide *rexA-rexB* produktid takistavad faagi T4 rII (ja teiste T4 mutantide) DNA replikatsiooni peremeesbakteri apoptoosi abil (Shinedling et al., 1987). Valk RexA on faagi DNA retseptor, RexB aga ioonkanaleid moodustav valk. Faagi DNA-ga kompleksi moodustanud RexA (Li et al., 1991, 1992) seondub RexB-ga ja aktiveerib bakteriraku membraanipotentsiaali langetavad ioonkanalid (Parma et al., 1992). Selle tagajärjel väheneb

peremeesbakteris ATP tootmine ja rakk suunatakse apoptoosi (Shinedling et al., 1987). Sellist mehhanismi, kus nakatunud bakteriraku hävitamine pidurdab nakkuse levimist, nimetatakse bakteriraku „altruistlikuks“ enesetapuks (Hazan & Engelberg-Kulka, 2004; Parma et al., 1992).

Peale Abi süsteemi panustavad profaagid peremeesbakteri faagiresistentsusesse veel mitmeti. Nende mehhanismide läbiv joon on bakteri rakumembraani mõjutamine. On profaage, mis takistavad faagide seondumist peremeesbakteri pinnale. Näiteks *E. coli*'s resideerivate Φ 80 ja N15 profaagide kodeeritud Cor valk inaktiveerib peremeesbakteri membraanireseptori FhuA ning seeläbi blokeerib faagide Φ 80, N15, T1 ja λ seondumise bakterirakuga (Uc-Mass et al., 2004; Vostrov et al., 1996). *P. aeruginosa* profaag D3 muudab peremeesbakteri serotüüpi seeläbi, et ekspresseerib valke Oac, Wzy ja Iap, mis modifitseerivad välismembraani lipopolüsahhariidide O-antigeeni. See välistab superinfektsiooni faagidega, mis peavad nakatamiseks seonduma spetsiifilise O-antigeeniga (Newton et al., 2001).

Enamus profaagide superinfektsioonivastase toime mehhanismidest on suunatud mitte faagi adsorptsiooni, vaid hoopis sellele järgneva faagi genoomi sisenemise vastu. Näiteks *E. coli* profaagi HK97 geen *I5* kodeerib membraanivalku, mis takistab superinfitseerival virionil genoomi sisestamist bakterirakku (Cumby et al., 2012). Samalaadselt toimib ka *Salmonella typhimurium*'i profaagi P22 kodeeritud membraanivalk SieA, mis ei takista faagi P22 seondumist raku pinnale, vaid blokeerib sellele järgneva DNA sisenemise peremeesbakterisse (Hofer et al., 1995). *Vibrio cholerae* profaag K139 takistab faagi genoomi sisenemist geenilt *glo* ekspresseeritava periplasmaatilise valgu abil (Nesper et al., 1999).

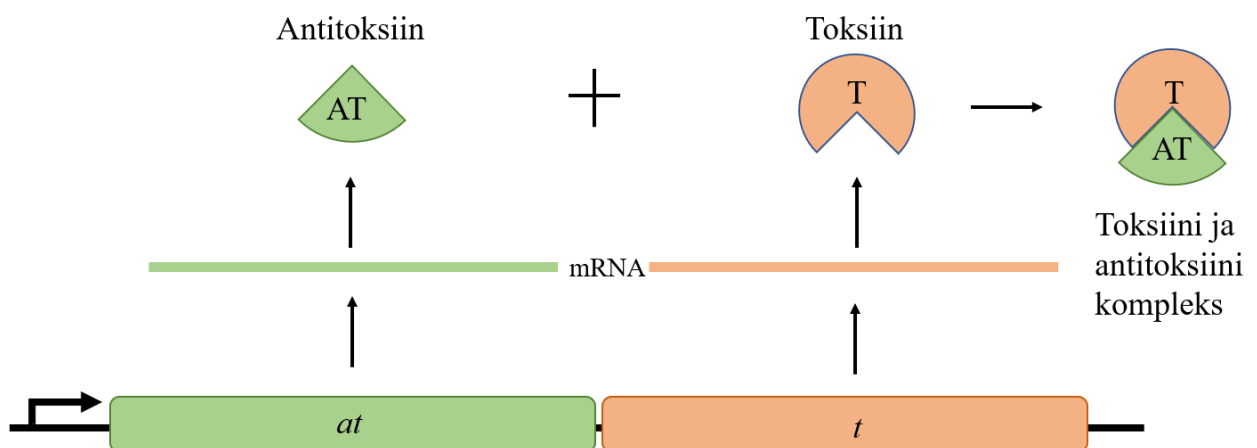
1.5. Kromosoomsed toksiini-antitoksiini süsteemid

Toksiini-antitoksiini süsteemid (TA süsteemid, ingl. k. *toxin-antitoxin systems*) on toksiinist ja toksiini suhtes antagonistlikult toimivast antitoksiinist koosnevad geneetilised elemendid, mis on bakterites ja arhedes laialt levinud (Pandey, 2005; Yamaguchi & Inouye, 2016). Toksiini-antitoksiini süsteeme leidub nii peremeesbakteri kromosoomis (kromosoomsed TA süsteemid) (Pandey, 2005) kui ka ekstrakromosoomselt plasmiidides (Ogura & Hiraga, 1983). Bakterites võib TA süsteeme olla rohkem kui üks. Näiteks *P. putida* tüvel KT2440 on bioinformaatilise analüüsi kohaselt 15 kromosoomset toksiini-antitoksiini süsteemi ja *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv-l arvatakse neid olevat lausa 76 (Xie et al., 2018).

Toksiini-antitoksiini süsteemid jagatakse antitoksiini toimemehhanismi alusel kaheksasse klassi (Song & Wood, 2020):

- 1) I tüüp: antitoksiini sRNA (väike mittekodeeriv RNA, ingl. k. *small noncoding RNA*) inhibeerib toksiini mRNA translatsiooni (Gerdes et al., 1986);
- 2) II tüüp: antitoksiini valk seob ja inhibeerib toksiini valgu (Ogura & Hiraga, 1983);
- 3) III tüüp: antitoksiini RNA seob ja inhibeerib toksiini valgu (Fineran et al., 2009);
- 4) IV tüüp: antitoksiini valk takistab toksiini valgu seondumist sihtmärgile (Masuda et al., 2012);
- 5) V tüüp: antitoksiin on spetsiifiline RNAas, mis lagundab toksiini mRNA (Wang et al., 2012);
- 6) VI tüüp: antitoksiini valk soodustab toksiini valgu lagundamist (Aakre et al., 2013);
- 7) VII tüüp: antitoksiini valk soodustab toksiini valgu tsüsteiinijääkide spontaanset oksüdatsiooni (Marimon et al., 2016);
- 8) VIII tüüp: antitoksiini sRNA paardub toksiini sRNA-ga ja soodustab selle lagundamist (Choi et al., 2018).

Enamus teadaolevatest toksiini-antitoksiini süsteemidest on II tüüpi (Xie et al., 2018). Ka *P. putida* KT2440 kromosoomsed toksiini-antitoksiini süsteemid on II tüüpi TA süsteemid, kus antitoksiini valk inhibeerib toksiini temaga seondudes, moodustades mittetoksilise toksiini-antitoksiini kompleksi (Joonis 4) (Ogura & Hiraga, 1983; Xie et al., 2018). Näiteks *P. putida* PaW85 GraT/GraA (PP_1586-1585) süsteemi puhul seondub antitoksiin GraA toksiiniga GraT ja neutraliseerib selle mRNAasse aktiivsuse (Talavera et al., 2019; Tamman et al., 2014).



Joonis 4. II tüüpi TA süsteemi operon ja toksiini inaktiveerimise mehhanism. Antitoksiini geenilt *at* kodeeritav antitoksiin AT seondub toksiini geenilt *t* kodeeritava toksiiniga T ja moodustub

toksiini-antitoksiini mittetoksiline kompleks T-AT. Nurknoolega on tähistatud operoni promootorilt lähtuv transkriptsioon.

Enamasti paiknevad toksiini-antitoksiini süsteeme kodeerivad geenid bitsistroomses operonis (Joonis 4) ja tavaline on ka nende geenide osaline kattuvus (1-20 nukleotiidi ulatuses) (Fraikin et al., 2020; Sevin & Barloy-Hubler, 2007). Näiteks *P. putida* KT2440 kromosoomse TA süsteemi RelB/RelE (PP_1267-1268) toksiini PP_1267 geen asub positsioonil 1449212..1449679 ja antitoksiini PP_1268 geen positsioonil 1449676..1450065, kattudes 4 aluspaari ulatuses toksiini kodeeriva järjestusega (Xie et al., 2018).

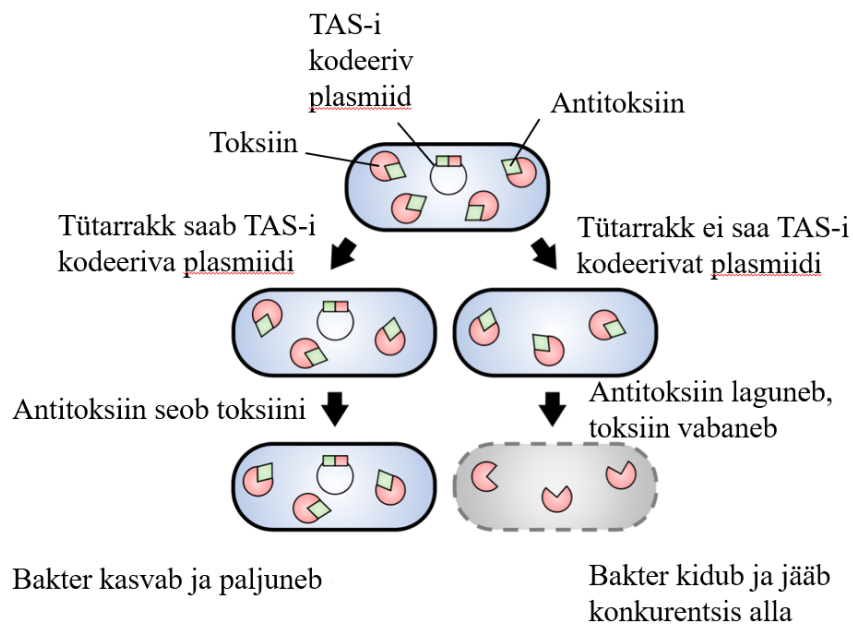
Reeglina on toksiin stabiilsem kui antitoksiin. Näiteks *E. coli* F plasmiidilt kodeeritud CcdB/CcdA süsteemi toksiini CcdB poolestusaeg on 2 tundi, aga vastava antitoksiini CcdA poolestusaeg toksiini juuresolekul 1 tund ja ilma toksiini juuresolekuta veel vähem – ainult 30 minutit (van Melderen et al., 1994). Vastukaaluks toodetakse antitoksiini rohkem kui toksiini. Kuigi TA süsteemide geenid on üldjuhul kotranskribeeritavad (M. Li et al., 2016; Sun et al., 2017), on mitmeid võimalusi, kuidas produtseerida antitoksiini rohkem kui toksiini. Näiteks *P. aeruginosa* HigB/HigA süsteemi antitoksiini HigA mRNA-d on võimalik ekspresseerida ka eraldi toksiini HigB mRNA-st tänu lisapromootorile *higA* ees (Guo et al., 2019). *P. aeruginosa* HigB/HigA süsteemiga homoloogse *P. putida* GraT/GraA süsteemi puhul antitoksiini ees lisapromootorit ei ole (Tamman et al 2014), aga antitoksiini sünteesitakse siiski rohkem kui toksiini, sest *graTA* mRNA-lt transleeritakse antitoksiini efektiivsemalt kui toksiini (Tamman, 2016).

Tavaliselt on toksiini-antitoksiini süsteemid isereguleeruvad (Magnuson & Yarmolinsky, 1998; Sun et al., 2017). Näiteks *P. putida* tüves KT2440 on antitoksiin MqsA *mqsRA* operoni ekspressiooni negatiivne regulaator, kuna seondub geenide promootoralale. Kui aga moodustub MqsR/MqsA toksiini-antitoksiini kompleks, siis ei saa antitoksiin MqsA enam *mqsRA* promootorile seonduda ja pärssida geenide ekspressiooni. Seetõttu põhjustab *mqsA* geeni rikkumine *mqsR* ekspressiooni suurenemist ja vastupidi – antitoksiini MqsA ületootmine pärsib toksiini MqsR produktsiooni (Sun et al., 2017).

1.6. Kromosoomsete toksiini-antitoksiini süsteemide mõju peremeesbakterile

Plasmiidsete toksiini-antitoksiini süsteemide puhul on teada vähemalt üks kindel ülesanne, mida nad peremeesbakteris täidavad – plasmidi stabiliseerimine (Masuda et al., 1993). Tavaliselt on antitoksiini rohkem kui toksiini ja neist moodustuvad mittetoksilised kompleksid. Kui aga

antitoksiini tase langeb, ei neutraliseerita enam kõiki toksiini molekule ning toksiin võib hakata peremeesbakteri kasvu pidurdama (Ogura & Hiraga, 1983). Selline olukord võib tekkida näiteks siis, kui bakteri jagunemise käigus jääb üks tütar-rakkudest ilma TA süsteemi geneetilist materjali sisaldavast plasmiidist (joonis 5). Kuna antitoksiin laguneb kiiremini kui toksiin ja vastava plasmidi kaotanud bakteris pole enam geeni, millelt antitoksiini juurde toota, saab antitoksiini pärssivast toimest vabanenud toksiin peremeesbakterile olulisi protsesse ja struktuure mõjutada. Selle tagajärjel võib TA süsteemi kodeeriva plasmidi kaotanud bakter olelusvõitluses konkurentidele alla jääda ja isegi surra (Fraikin et al., 2020). Seetõttu on plasmiidsete TA süsteemide korral peremeesbakteri kohasuse seisukohalt ülioluline, et bakter ei kaotaks TA süsteemi gene sisaldavat plasmidi. Seda nimetatakse plasmiidisõltuvuseks (ingl. k. *plasmid addiction*) (Zielenkiewicz & Ceglowski, 2005).



Joonis 5. Plasmidi stabiliseerimine plasmiidse TA süsteemi poolt. Jagunemise käigus TA süsteemi geneetilist materjali sisaldava plasmidi kaotanud tütar-rakk võib vähenenud kohasuse tõttu olelusvõitluses alla jääda (Fraikin et al., 2020 põhjal).

Kromosoomsete toksiini-antitoksiini süsteemide roll peremeesbakteris pole siiani üheselt määratletud ja teadlaste seas jätkub sel teemal hoogne arutelu (Goormaghtigh et al., 2018; Harms et al., 2016; Song & Wood, 2020).

Sarnaselt plasmiidsetele TA süsteemidele võivad ka kromosoomsed TA süsteemid stabiliseerida kromosoomis leiduvaid mobiilseid DNA elemente. Näiteks transposoone (Wozniak & Waldor, 2009), patogeensussaari (Yao et al., 2015) ja profaage (Szekeres et al., 2007; Yao et al., 2018). See pole kasulik mitte ainult mobiilse DNA seisukohast vaid võib olla tähtis ka peremeesbakterile, sest kui mobiilsed geneetilised elemendid asuvad kromosoomis piirkonnas, mis sisaldab bakteri elutegevuseks kriitilisi geene või tähtsaid operone, võib nende lahkumine kromosoomist põhjustada olulise geneetilise materjali kao (Szekeres et al., 2007). Lisaks võib profaagi lahkumine kromosoomist algatada lüütilise tsükli, mis lõppeb bakteriraku hävimisega (Feiner *et al.*, 2015). Seetõttu on oluline hoida mobiilsed geneetilised elemendid võimalikult stabiilsed.

Kõige rohkem on diskuteeritud teemal, et kromosoomsed TA süsteemid kontrollivad mehhanisme, mis aitavad bakteritel toime tulla toitainete nappusest ja muudest keskkonnateguritest lähtuva stressiga; peremeesbakterite kasvu inhibeerimine toksiiniga on seejuures vahend, mis aitab ebasoodsa perioodi üle elada. Soodsates keskkonnaoludes põhjustab madalam kasvukiirus konkurentidele allajäämist, aga stressitingimustes võib aeglasem kasv anda bakteritele hoopis eelise. Näiteks on leitud, et kasvuseisakus *E. coli* kultuur oli tunduvalt tundetu β -laktaamsete antibiootikumide suhtes (Tuomanen, 1986). Mitmed uurimused on näidanud, et paljude TA lookuste ekspressioon indutseeritakse stressitingimustes (Christensen-Dalsgaard et al., 2010; Shan et al., 2017), mis viitab, et TA süsteemid võivad stressitingimustes bakterile olulised olla. Näiteks indutseerisid aminohapete ja süsinikuallika puudus ning DNA kahjustus mitme *E. coli* RelE/RelB perekonna TA operoni ekspressiooni (Christensen-Dalsgaard et al., 2010). Paljudel juhtudel on näidatud, et toksiooni üleekspressioonil või antitoksiini geeni rikkumisel suureneb bakteri stressitaluvus. Näiteks talub *P. putida* PaW85 GraTA süsteemi antitoksiini suhtes defektne tüvi $\Delta graA$ oksüdatiivset ja osmootset stressi ning erinevate toimetehhanismidega antibiootikumide mõju (rifampiin, kanamütsiin, tsiprofloksatsiin, bensüülpenitsilliin jt) oluliselt paremini kui algne tüvi (Tamman et al., 2014). Samas ei mõjutanud toksiooni geeni *graT* või *graTA* operoni eemaldamine bakterite stressitaluvust (Tamman et al., 2014). Sama lugu on paljude teiste TA süsteemidega, mille puhul on näidatud toksiooni üleekspresseerimise mõju bakteri stressitaluvusele, aga kogu TA lookuse deleteerimisel pole stressitolerantsusele mõju (Freire et al., 2019; Goormaghtigh et al., 2018; Rosendahl et al., 2020). Seetõttu on kromosoomsete TA süsteemide roll bakteri stressitaluvuse reguleerimisel seni ebaselge.

Ebasoodsa perioodi üleelamisega seostub ka biokile teke, kuna biokile pakub bakteritele kaitset erinevate stressorite (näiteks soolsus, pH-taseme kõikumine, UV-kiirgus, temperatuur, kisklus,

antibiootikumid, kuivamine, peremeesorganismi immuunsüsteem) eest (Flemming, 2011; Hall-Stoodley et al., 2004; K. W. K. Lee et al., 2014). Võib leida mitmeid artikleid kus väidetakse, et kromosoomne TA süsteem on oluline biofilmi tekkes. Näiteks *P. putida* tüve KT2440 puhul on arvatud, et biokile moodustumist soodustavad MqsR/MqsA süsteemi toksiin MqsR ja antitoksiin MqsA ning biokilet tekib oluliselt vähem nii *mqsR* kui ka *mqsA* deleteerimisel (Sun et al., 2017). See on erinev *E. coli*'st, kus toksiin MqsR vähendab ja antitoksiin MqsA suurendab biokile teket (Kasari et al., 2010; Y. Kim et al., 2010). Samas lükkavad aga teised andmed ümber väited TA süsteemide osalemisest biokile formeerimise regulatsioonis, sest *mqsRA* lookuse puudumisel ja enamgi veel, 10 TA lookuse puudumisel polnud *E. coli* biokile tekkele mitte mingisugust efekti (Fraikin et al., 2019). Ka *P. putida* PaW85 kromosoomsed TA süsteemid ei näi osalevat biokile regulatsioonis, sest 13 TA süsteemi deleteerimine ei mõjutanud biokile tekkimist (Rosendahl et al., 2020).

Toksiini-antitoksiini süsteeme on uuritud ka seoses faagiresistentsuse tagamisega. Seda suunda on õhutanud mitme TA süsteemi struktuurne sarnasus faage inhibeerivate süsteemidega, näiteks CRISPR-Cas-iga. Nimelt leiti, et II tüüpi TA süsteemi VapB/VapC perekonna operoniga funktsionaalselt seotud VapD valkude järjestus on mõnevõrra sarnane CRISPR-Cas süsteemi Cas-2 ensüümi valkude järjestusega (Katz et al., 1994) ja mõlema RNAasne aktiivsus võib olla tagatud samasuguse konserveerunud järjestuse poolt (Makarova et al., 2006). Hiljem näidatigi, et *Haemophilus influenzae vapXD* lookus kodeerib funktsionaalset TA süsteemi (Ren et al., 2012), mille toksiooni VapD struktuur on väga sarnane Cas-2-ga (Bertelsen et al., 2021). Cas-valkude tioredoksiinilaadseid domääne on leitud ka II tüüpi TA süsteemide perekonna FizC järjestustest (Guglielmini & Melderer, 2011). Lisaks on leitud, et peremeesbakteri kromosoomis paiknevad TA süsteemid võivad toimida Abi süsteemidena, indutseerides faagiga nakatunud rakkude surma. Näiteks III tüüpi TA süsteemide perekond ToxIN on katsetes näidanud faagidevastast toimet (Blower et al., 2012; Fineran et al., 2009). *E. coli* II tüüpi TA süsteem MazEF kaitseb bakteripopulatsiooni faag P1 rünnaku korral – erinevalt *ΔmazEF* tüvest oli P1 paljunemine algses tüves inhibeeritud, sest indutseeriti rakusurm (Hazan & Engelberg-Kulka, 2004). Siiski on toksiooni-antitoksiini süsteemide peremeesbakteri faagiresistentsust tõstvat toimet täheldatud pigem plasmiidsete TA süsteemide puhul (Dy et al., 2014; Fineran et al., 2009) ja edasised uuringud kromosoomsete TA süsteemide mõjust faagiresistentsusele on kindlasti vajalikud.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Kromosoomseid profaage ja toksiini-antitoksiini süsteeme seostatakse mitmesuguste mõjudega peremeesbakteri füsioloogiale (Bondy-Denomy & Davidson, 2014; Fraikin et al., 2020). Ehkki kromosoomseid toksiini-antitoksiini süsteeme on intensiivselt uuritud, pole siiski täit selgust ja üksmeelt selles osas, kas ja millist tähtsust need omavad peremeesbakteri faagiresistentsuse kujundamisel (Rosendahl et al., 2020; Song & Wood, 2020).

Minu uurimustöö eesmärgid olid:

- 1) optimeerida faagieraldusmetoodikat keskkonnaproovist *Pseudomonas putida*'t nakatava bakteriofaagi isoleerimiseks;
- 2) eraldada mullaproovist *P. putida*'t nakatavaid bakteriofaage;
- 3) testida hüpoteesi, et kromosoomsed profaagid ja toksiini-antitoksiini süsteemid mõjutavad *P. putida* faagiresistentsust.

2.2. Materjal ja meetoodika

2.2.1. Kasutatud söötmed, bakteritüved ja bakteriofaagid

Eksperimentaalselt kasutatud faagid ning *P. putida* tüved ja derivaadid on toodud Tabelis 2. Söötmetena kasutasin LB (*lysogeny broth*) vedelsöödet (1% trüpton, 0,5% NaCl, 0,5% pärmiekstrakt), tardsöödet (1,5% LB agar) ja pehmet agarit (0,35% LB agar). *P. putida*'t nakatavate faagide isoleerimiseks valasin kahekihilise agariga Petri tassid (*resp.* bakterimuruga tassid), milles alumine kiht on 20 ml 1,5% LB agar ja pealmine kiht bakteritega segatud 0,35% LB agar. Selleks segasin 4 ml pehmet agarit temperatuuriga 42°C, 100 µl *P. putida* Δ all- Φ üleöökuultuuri ja 95 µl faagifiltraati. Baktereid kasvasin temperatuuril 20°C. Vedelsöötmes bakterikultuure inkubeerisin parema õhustuse tagamiseks loksutil (120 rpm). Keskkonnaproovis leiduvate profaagide indutseerimiseks ja peremeesbakteri lüsogeniseerumise vältimiseks lisasin söötmetesse DNA stressi tekitavat antibiootikumi tsiprofloksatsiin (cipro). Tsiprofloksatsiini kontsentratsioon oli keskkonnaproovist bakteriofaagi eraldamisel 0,01 µg/ml ja nakatamiskatsetes 0,03 µg/ml.

Tabel 2. Kasutatud *P. putida* tüved ja bakteriofaagid

Bakteritüvi/faag	Iseloomustus	Allikas
<i>Pseudomonas putida</i>		
PaW85	algne tüvi, isogeenne <i>P. putida</i> tüvega KT2440	(Bayley et al., 1977)
KT2440 Δ all- Φ	<i>P. putida</i> KT2440 derivaat, mille kromosoomist on deleteeritud 4 profaagi	(Martínez-García et al., 2015)
Δ 13TA	PaW85 kromosoomist on deleteeritud 13 TA süsteemi	(Rosendahl et al., 2020)
Δ 4 Φ	PaW85 kromosoomist on deleteeritud 4 profaagi	Sirli Rosendahl, Kendra Piirmets
Δ 13TA Δ 4 Φ	PaW85 kromosoomist on deleteeritud 13 TA süsteemi ja 4 profaagi	Sirli Rosendahl, Kendra Piirmets
Faagid		
Pp_F1	<i>P. putida</i> lüütiline faag	Andres Ainelo
Pp_F2	<i>P. putida</i> lüütiline faag	Käesolev töö

2.2.2. Keskkonnaproovist bakteriofaagi eraldamine

Faagide eraldamiseks kasutasin eksponentsiaalses kasvufaasis olevat *P. putida* KT2440 Δ all- Φ kultuuri. Selleks tegin LB söötmes üleöö kasvanud bakterikultuurist 12,5-kordse lahjenduse värskesse LB söötmesse ja inkubeerisin baktereid ~4 tundi temperatuuril 20°C (120 rpm). Mullas leiduvate bakteriofaagide vette difundeerumiseks segasin 100 g mulda 500 ml destilleeritud veega ja inkubeerisin loksutil temperatuuril 20°C ~4 tundi (80 rpm). Seejärel lisasin mullasegule 25 ml 10x LB söödet ja 10 ml eksponentsiaalse kasvufaasi bakterikultuuri ($OD_{580} \sim 0,75-0,85$). Saadud segu jagasin kaheks võrdseks osaks (a' 250 ml), millest ühele lisasin profaagide indutseerimiseks tsiprofloksatsiini 0,01 μ g/ml. Kolbe inkubeerisin loksutil üleöö temperatuuril 20°C (80 rpm).

Faagide eraldamiseks tsentrifuugisin 50 ml mullasegu 30 min pööretel 5000 rpm, saadud supernatandi jagasin 2 ml plasttuubidesse ja tsentrifuugisin 5 min pööretel 13400 rpm. Bakteritest puhastamiseks filtreerisin lahused läbi 0,22 μ m filtri. Saadud filtraadist valmistasin 10-kordsete lahjenduste rea, millest tegin 5 μ l tilkkülvid bakterimuruga Petri tassidele. Külvid tegin nii tsiprofloksatsiini (0,03 μ g/ml) sisaldavatele kui ka mittesisaldavatele tassidele ja inkubeerisin tasse üleöö temperatuuril 20°C.

2.2.3. Faagide rikastamine ja puhastamine

Faagide paljundamiseks ja puhastamiseks eemaldasid tassile tekkinud paremini märgatavad lüüsilaiatud pipetiotsikuga, suspendeerisin 100 μ l LB vedelsöötmes ning segasin Vortexil agarsöötme purustamiseks ja faagide lahusesse viimiseks. Saadud faagisegust panin 49 μ l 5 ml LB vedelsöötmesse koos 280 μ l eksponentsiaalses kasvufaasis oleva KT2440 Δ all- Φ bakterikultuuriga ja lisasin tsiprofloksatsiini 0,03 μ g/ml. Pärast üleöö inkubeerimist loksutil temperatuuril 20°C (80 rpm) tsentrifuugisin igast katseklaasist 2 ml bakterikultuuri pööretel 13400 rpm ja filtreerisin supernatandi läbi 0,22 μ m filtri. Saadud esmasele faagifiltraadile lisasin 10 μ l kloroformi. Filtraati säilitatakse temperatuuril 4°C.

Esmase faagifiltraadi puhastamiseks nakatasin faagilahusega uuesti *P. putida* KT2440 Δ all- Φ . Selleks tegin faagilahusest 10-kordsete lahjenduste rea, millest külvasin 5 μ l tilgad Δ all- Φ bakterimurule. Järgmisel päeval eraldasid üksiku faagilaigu ja suspendeerisin 100 μ l SM puhvril (100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,01 % želatiin). Bakterimurust kaasa tulnud bakterite lüüsimiseks lisasin 4 μ l kloroformi, segasin lahust 2 minutit Vortexil ja tsentrifuugisin 5 minutit pööretel 13400 rpm. Saadud sekundaarset faagilahust puhastasid kolmandat korda (nii nagu puhastasid esmast faagilahust). Faagi paljundamiseks nakatasid

bakterimuru kolmandast puhastusest saadud faagilahusega. Järgmisel päeval kraapisin kogu bakterimuru kokku, segasin 2 ml faagipuhvriga ja lisasin 200 µl kloroformi. Segasin lahust 10 minutit Vortexil, tsentrifuugisin 20 minutit pöretel 5000 rpm ja seejärel filtreerisin. Faagifiltraati koos tilga kloroformiga säilitatakse temperatuuril 4°C.

Faagi tiitri määramiseks valmistasin faagifiltraadist 10-kordsete lahjenduste rea, millest tegin 5 µl tilkkülvid bakterimuruga pehmeagarile. Järgmisel päeval loendasin lüüsilaiatud lahjendusest, kus lüüsilaiatud olid üksikuina eristatavad ja seeläbi hõlpsasti loendatavad, ning arvutasin faagifiltraadi tiitri – lüüsilaike tekitavate faagide hulk/ml (PFU, ingl. k. *plaque forming units*) ehk PFU/ml.

2.2.4. *P. putida*'t nakatavate bakteriofaagide eraldamise meetodika optimeerimine

Metoodika optimeerimisel võrdlesin bakteriofaagide toimet *P. putida* tüvele KT2440 Δall-Φ temperatuuril 20°C ja 30°C, antibiootikumi tsiprofloksatsiini (0,03 µg/ml) sisaldaval ja mittesisaldaval söötmel ning bakterikultuuri eksponentsiaalse ja statsionaarse kasvufaasi korral. Selleks tegin faagilahusest 10-kordsete lahjenduste rea, millest külvasin 5 µl tilgad *P. putida* KT2440 Δall-Φ bakterimurule.

2.2.5. *Faagiga nakatatud bakterite kasvudünaamika jälgimine mikrotiiterplaadil*

Katsetes kasutasin *P. putida* PaW85, Δ13TA, Δ4Φ ja Δ13TAΔ4Φ eksponentsiaalse kasvufaasi bakterikultuure (OD₅₈₀ ~0,75-0,85). 96 kannuga mikrotiiterplaadile kandsin proovid (100 µl), milles sisaldus 45 µl bakterikultuuri, 45 µl LB vedelsöödet koos tsiprofloksatsiiniga (0,03 µg/ml) ja 10 µl faagifiltraati 10-kordsete lahjenduste reast. *P. putida* arvukuse ja faagitiitri põhjal arvutasin välja nakatamiskordaja MOI (ingl. k. *multiplicity of infection*), mida arvestasin bakterite nakatamisel faagiga. MOI näitab nakatavate ühikute hulka sihtmärgi suhtes, antud juhul faagide hulka bakterite kohta.

P. putida arvukuse ehk CFU/ml (kolooniaid moodustavate ühikute hulk/ml, ingl. k. *colony forming unit*) määrasin eksponentsiaalse kasvufaasi bakterikultuurist tehtud 10-kordsete lahjenduste rea abil, millest tegin 5 µl tilkkülvid LB tardsöötmel. Järgmisel päeval loendasin bakterikolooniaid lahjendusest, kus kolooniaid olid üksikuina eristatavad. Nende põhjal arvutasin bakterite arvukuse (CFU/ml). Faagiga nakatatud kultuure inkubeerisin Heidolph Titramax 1000 mikrotiiterplaadi loksutil (900 rpm) ja 10 tunni jooksul mõõtsin iga 15 minuti järel proovide optilise tiheduse (OD₅₈₀) Tecan SunRise mikrotiiterplaadi lugejaga.

2.2.6. Statistiline andmetöötlus

Statistilise andmetöötluse teostas in tabelarvutustarkvara programmiga Microsoft Excel. Bakterikultuuri lahuste optilise tiheduse mõõtmisel saadud tulemuste erinevuse luges in statistiliselt oluliseks siis, kui võrreldavate keskmiste väärtuste usaldusvahemikud ei kattunud. Usaldusvahemike arvutamisel võts in usaldusnivooks 95%.

2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. Faagide eraldamine Purtse jõe kalda mullaproovist ja faagieraldusmetoodika optimeerimine

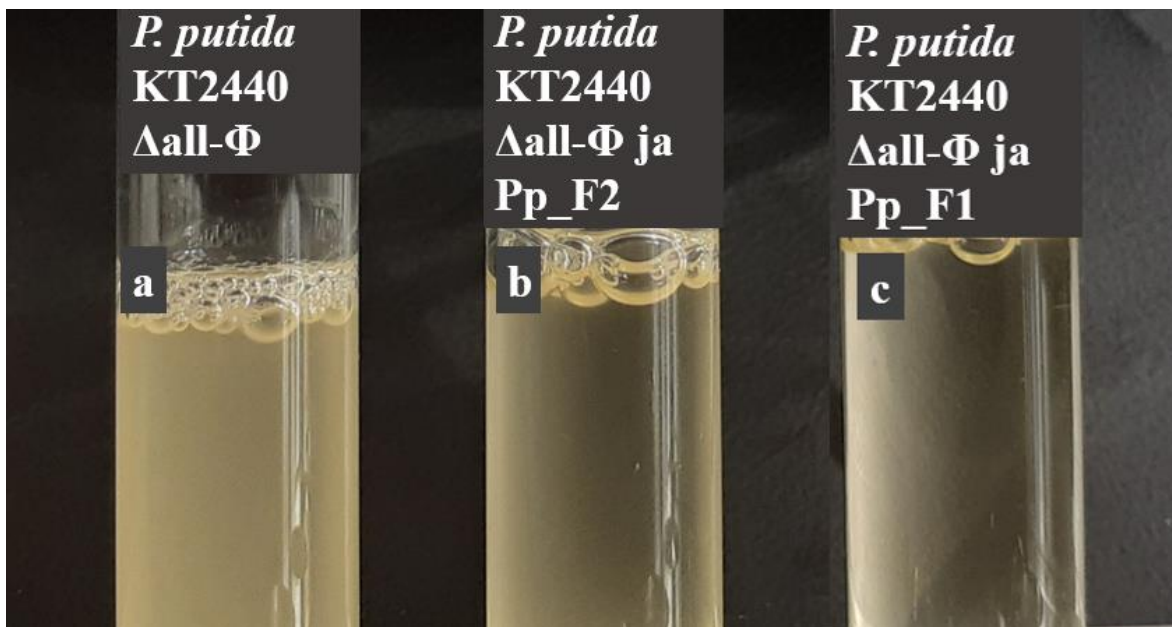
Selleks, et uurida kromosoomsete profaagide ja TA süsteemide rolli *P. putida* faagiresistentsuses, oli esmalt vaja isoleerida *P. putida*'t nakatavaid bakteriofaage. *P. putida* metaboolne mitmekesisus võimaldab tal hõivata põlevkiviõlitööstuse jääkidega saastatud keskkonda (Hill & Robinson, 1975; Khraisheh et al., 2020). Kuna Ida-Virumaal asuv Purtse jõestik on olnud Eesti saastatuim vesikond sinna juhitud põlevkiviõlitööstuse jääkide tõttu (MAVES AS, 2008, Velner et al. 1972), kasutasin Purtse jõe kaldalt pärinevat mullaproovi. Lisaks on Purtse jõest *P. putida*'t eraldatud juba varemgi (CELMS EEUT PC39).

Faagide eraldamise pilootkatses kasutasin peremeesbakterina nii algset *P. putida* tüve PaW85 kui ka *P. putida* KT2440 derivaati Δ all- Φ , mille genomist on deleteeritud kõik neli profaagi (Martínez-García et al., 2015). *P. putida* PaW85 tüve profaagdeletetsioonvarianti Δ 4 Φ minu katsete alguses veel polnud. Kuna pilootkatses ilmusid lüüsilaidud ainult nendele tassidele, kus bakterimuruna kasvas *P. putida* Δ all- Φ , siis kasutasin seda tüve edaspidistes faagieraldustes ja metoodika optimeerimisel.

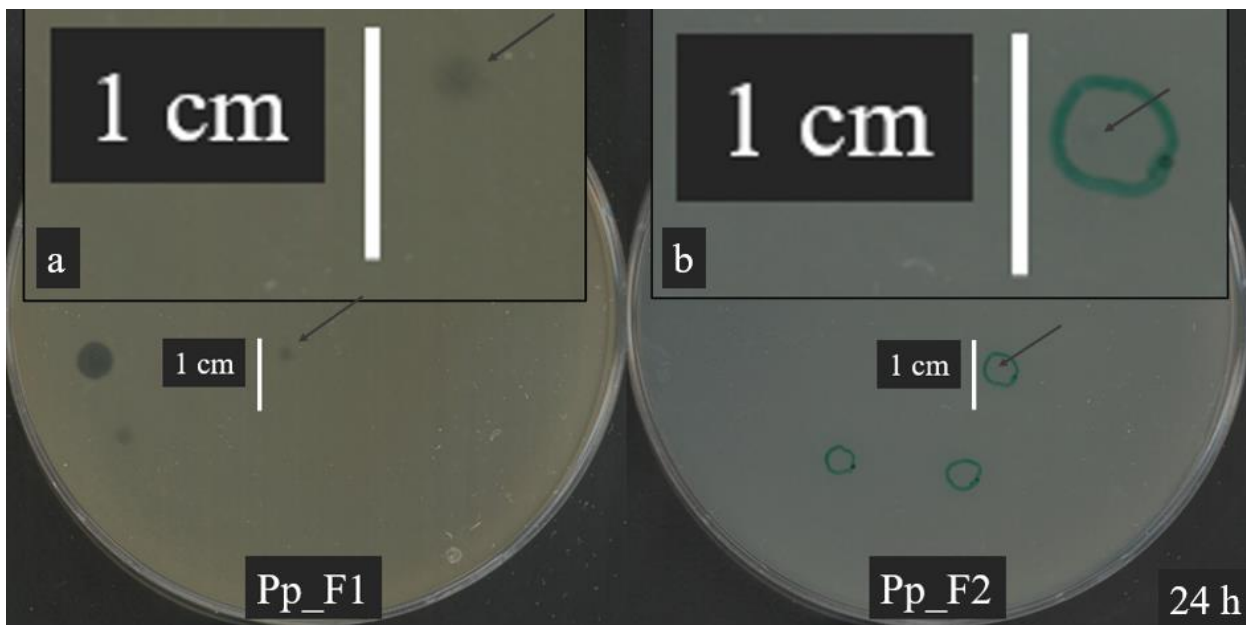
Mitmed antibiootikumid, sealhulgas bakteri DNA replikatsiooni häirivad kinoloonid (näiteks tsiprofloksatsiin), võivad põhjustada profaagide induktsiooni (Devos et al., 2017; Goerke et al., 2006). Seetõttu kasutasin bakteriofaagide keskkonnaproovist eraldamisel profaagide indutseerimiseks tsiprofloksatsiini kontsentratsioon 0,01 μ g/ml, mis ei inhibeerinud bakterite kasvu, aga tekitas DNA stressi (Sirli Rosendahli andmed). Selleks, et faagid ei läheks nakatamiskatsetes infektsioonitsükli lüsogeensesse faasi, lisasin söötmesse tsiprofloksatsiini *P. putida*'le subinhibeerivas doosis 0,03 μ g/ml (Sirli Rosendahli andmed).

Purtse jõe kalda mullaproovist õnnestus eraldada lüütiline faag, mille nimetasin Pp_F2-ks (Joonised 6, b ja 7, b). Võrdluseks kasutasin nakatamiskatsetes varem meie laboris isoleeritud faagi Pp_F1.

Bakterimurule tekkinud lüüsilaidude suuruse järgi otsustades on Pp_F2 (Joonis 7, b) vähem agressiivne kui meie laboris varem eraldatud Pp_F1 (Joonis 7, a), kuna Pp_F2 tekitatud üksikud lüüsilaidud olid vaevumärgatavad, erinevalt Pp_F1 ~2 mm suurustest lüüsilaidudest.



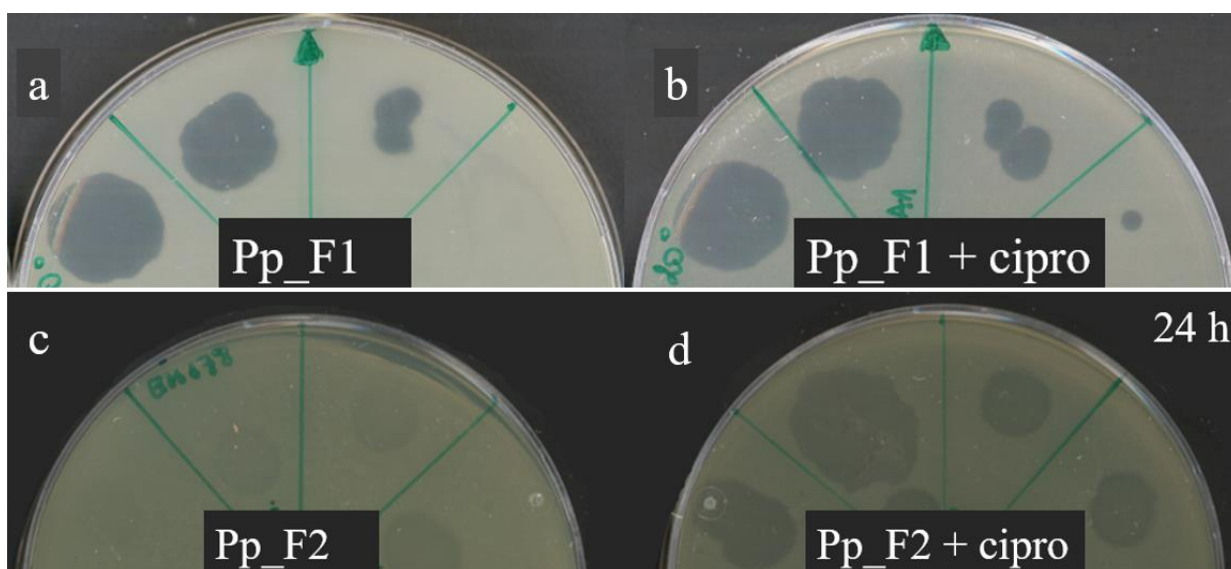
Joonis 6. Keskkonnaproovist eraldatud faagi Pp_F2 pärssiv mõju *P. putida* KT2440 derivaadi Δ all- Φ kasvule. *P. putida* KT2440 Δ all- Φ (a), *P. putida* kultuur koos faagiga Pp_F2 (b) ja *P. putida* kultuur koos faagiga Pp_F1 (c). Inkubatsiooniaeg on 24 tundi.



Joonis 7. Bakteriofaagide Pp_F1 (a) ja Pp_F2 (b) lüüsilaidud *P. putida* tüve KT2440 derivaadi Δ all- Φ bakterimurul. Inkubatsiooniaeg on 24 tundi.

Bakterite vastupanuvõimet stressoritele (sh. faagirünnakule) võivad mõjutada nii keskkonnatingimused kui ka bakterikultuuri kasvufaas (Ramos et al., 2001; Sillankorva et al., 2004). Peremeesbakterile tekitatud temperatuuri- või antibiootikumistress võivad indutseerida peremeesbakteris paiknevaid profaage (Smoot et al., 2001) ja mõjutada toksiooni-antitoksiini süsteeme (Jahn et al., 2012; Tamman et al., 2014).

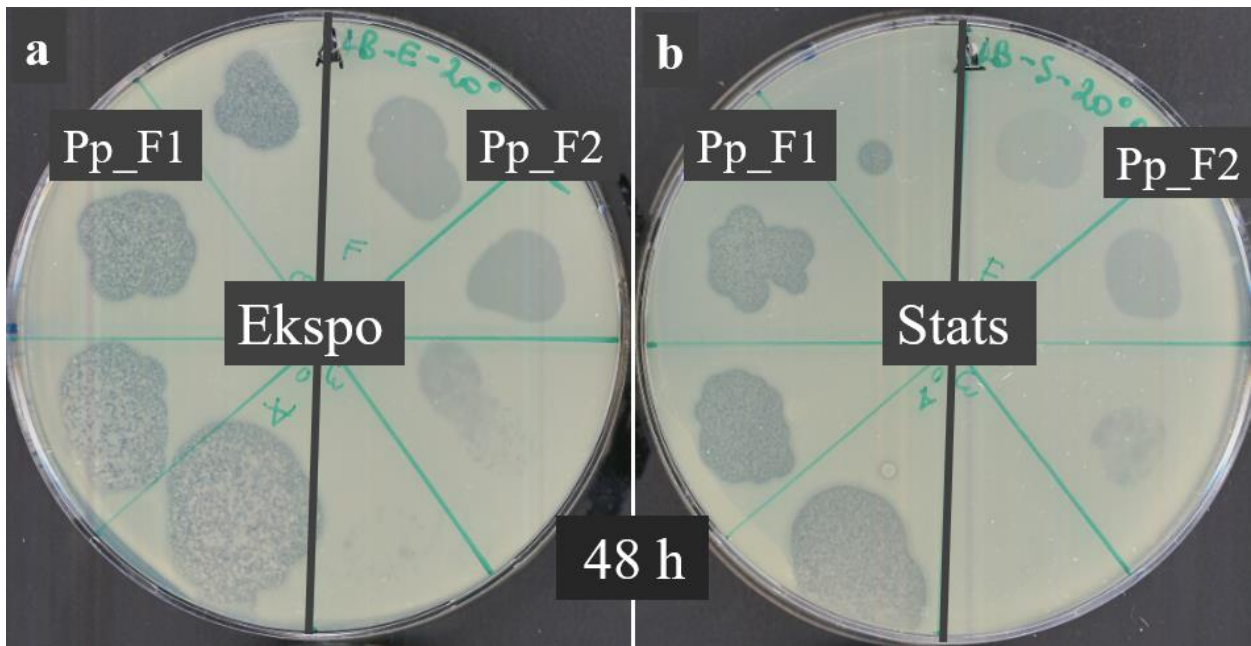
P. putida DNA-stressi põhjustamiseks kasutasin faagieraldusmetoodika optimeerimisel DNA güraasi inhibeerivat fluorokinoloon-antibiootikumi tsiprofloksatsiin kontsentratsioonis 0,03 µg/ml (Joonis 8). Kuna tsiprofloksatsiini sisaldaval söötmel tekkisid suuremad ja selgemad lüüsilaiugud (Joonis 8, b, d) kui LB söötmel (Joonis 8, a, c), järeldasin, et Pp_F1 ja Pp_F2 puhul tsiprofloksatsiin tugevdab bakteriofaagi toimet.



Joonis 8. Faagide Pp_F1 ja Pp_F2 mõju *P. putida* tüve KT2440 derivaadile Δ all- Φ LB-söötmel (a, c) ja antibiootikumi tsiprofloksatsiin sisaldaval söötmel (b, d). Bakterimuru nakatamisel on kasutatud faagilahuse 10-kordset lahjendusrida. Inkubatsiooniaeg on 24 tundi.

Et bakterite ainevahetuse- ja kasvukiirus on eksponentsiaalses kasvufaasis kõrgem kui statsionaarses kasvufaasis, peetakse baktereid eksponentsiaalses kasvufaasis faaginakkusele vastuvõtlikumaks kui statsionaarses kasvufaasis (Monod, 1949; Sillankorva et al., 2004). Testimaks kasvufaasi efekti *P. putida* faagiresistentsusele, nakatasin faagidega Pp_F1 ja Pp_F2 *P. putida* tüve KT2440 derivaadi Δ all- Φ eksponentsiaalses ja statsionaarses kasvufaasis bakterikultuuri (Joonis 9). Sellest, et faagidega nakatatud *P. putida* bakterimurule, mis oli valmistatud eksponentsiaalse kasvufaasi kultuurist, ilmusid suuremad ja selgemad lüüsilaiugud

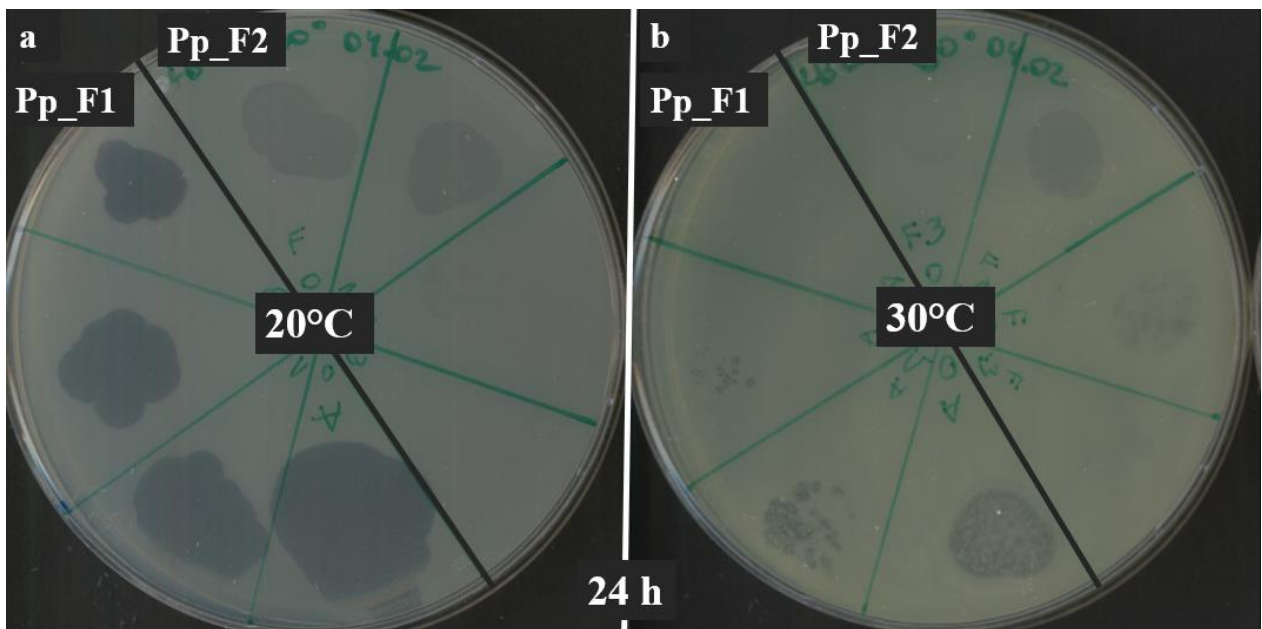
(Joonis 9, a) kui statsionaarse faasi rakkude puhul (Joonis 9, b), järeldasin, et *P. putida* on eksponentsiaalses kasvufaasis faaginakkusele vastuvõtlikum kui statsionaarses kasvufaasis.



Joonis 9. Faagide Pp_F1 ja Pp_F2 mõju eksponentsiaalses (Ekspo) ja statsionaarses (Stats) kasvufaasis nakatatud *P. putida* tüve KT2440 derivaadile $\Delta all-\Phi$. *P. putida* on eksponentsiaalses kasvufaasis (a) faagide Pp_F1 ja Pp_F2 nakkusele vastuvõtlikum kui statsionaarses kasvufaasis (b). Bakterimuru nakatamisel on kasutatud faagilahuse 10-kordset lahjendusrida. Inkubatsiooniaeg on 48 tundi.

P. putida kasvukiirus on kõige suurem temperatuuril 30–33°C (Munna et al., 2015). Optimaalsest vahemikust kõrgemal või madalamal temperatuuril kasvukiirus väheneb (Munna et al., 2015; Reva, 2006) ja vallandub stressivastus (Shivaji & Prakash, 2010). Stress võib bakterikultuuri vastuvõtlikkust faagi suhtes nii suurendada kui ka vähendada (Denes & Wiedmann, 2014). Testimaks, kuidas mõjutab kasvukeskkonna temperatuur *P. putida* faagidega nakatumist, inkubeerisin tase temperatuuril 20°C ja 30°C (Joonis 10). Tulemused näitasid, et temperatuuri mõju nakatumisele on enam väljendunud faagi Pp_F1 puhul, sest temperatuuril 20°C ilmusid bakterimurule selged, laatanud lüüsilaiagud, seevastu temperatuuril 30°C olid lüüsilaiagud väikesed, hõredad ja piimjad (Joonis 10, a). Faagi Pp_F2 puhul ei ole temperatuuri mõju *P. putida* nakatumisele nii oluline kui faag Pp_F2 puhul, aga siiski võis märgata, et temperatuuril 20°C olid

lүүsilaigud paremini väljendunud (Joonis 10, b). Sellest järeldasin, et mõlemad faagid on temperatuuritundlikud.



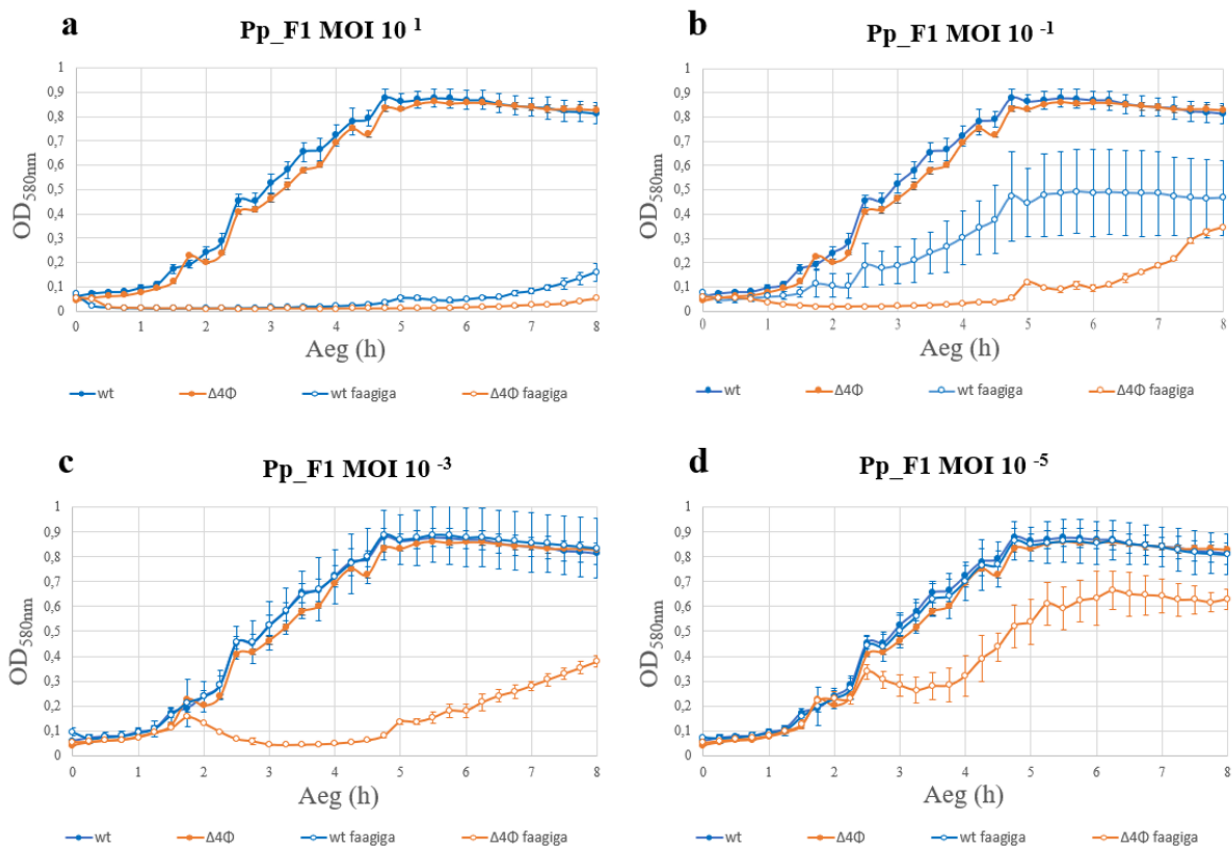
Joonis 10. Faagide Pp_F1 ja Pp_F2 mõju *P. putida* tüve KT2440 derivaadile Δ all- Φ temperatuuril 20°C ja 30°C. *P. putida* on temperatuuril 20°C (a) faaginakkusele vastuvõtlikum kui temperatuuril 30°C (b). Bakterimuru nakatamisel on kasutatud faagilahuse 10-kordset lahjendusrida. Inkubatsiooniaeg on 24 tundi.

Metoodika optimeerimise tulemusena selgus, et *P. putida* tüve KT2440 derivaadi Δ all- Φ nakatamine bakteriofaagidega Pp_F1 ja Pp_F2 on tõhusaim siis, kui lisada söötmesse DNA stressi tekitavat antibiootikumi tsiprofloksatsiini, nakatada eksponentsiaalses kasvufaasis bakterikultuuri ja inkubatsioonil hoida temperatuuri 20°C.

2.3.2 Kromosoomsed profaagid suurendavad *P. putida* faagiresistentsust

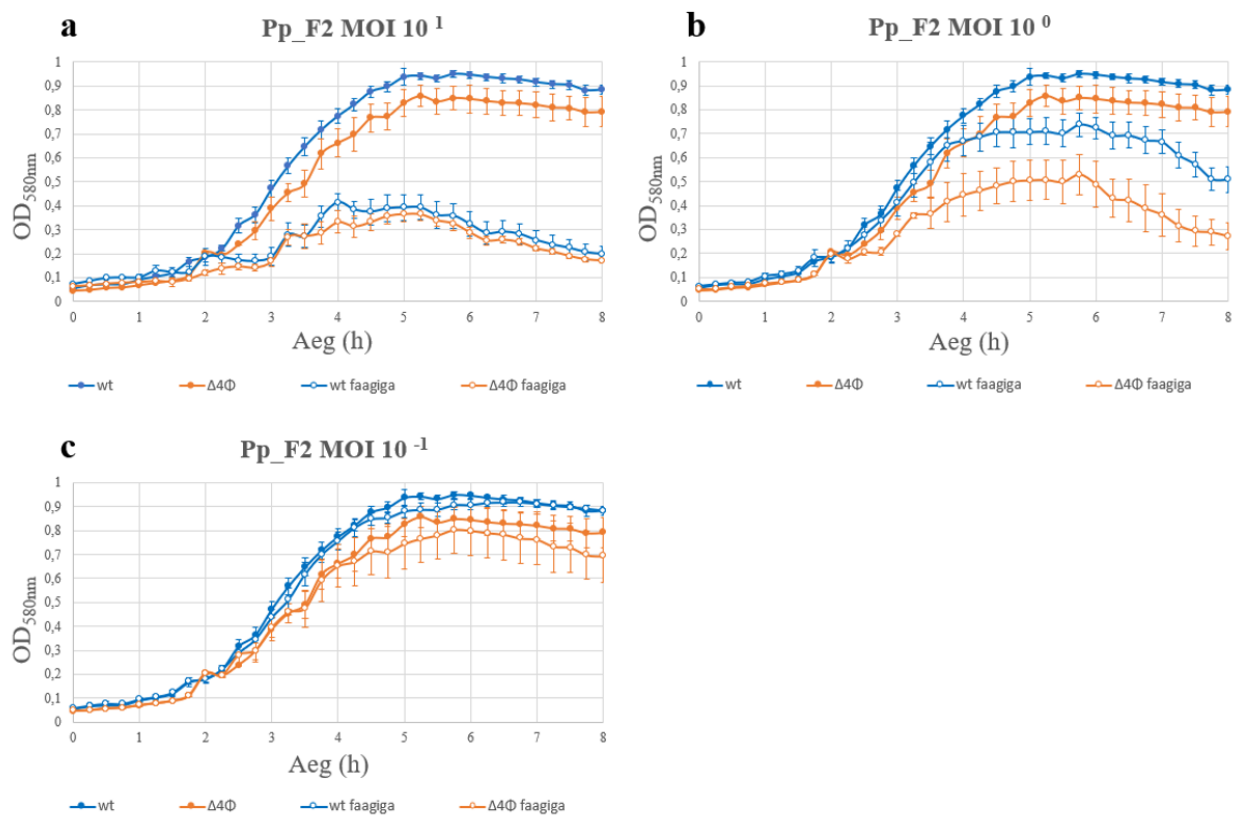
Kirjanduse põhjal on teada, et bakteri genoomis leiduvad profaagid võivad kaitsta bakterit uue faaginakkuse korral, ergutada bakterikultuuri kasvumist ning suurendada vastupanuvõimet kinoloonidele ja beetalaktaamidele (Gentile et al., 2019; Wang et al., 2010). Faagi eralduskatsed näitasid, et *P. putida* KT2440 kromosoomsete profaagideta derivaat Δ all- Φ osutus faagide eraldamisel tõhusamaks kui profaagidega *P. putida* algne tüvi PaW85, mis viitas sellele, et kromosoomsed profaagid kaitsevad algset tüve faaginakkuse eest.

P. putida isogeensete tüvede KT2440 ja PaW85 kromosoomis on neli profaagi (Martínez-García et al., 2015). Kuna *P. putida* tüve KT2440 puhul ei olnud kättesaadav TA süsteemideta derivaat, kasutasin võrdlevates katsetes *P. putida* tüve PaW85. Testimaks, kas kromosoomsed profaagid kaitsevad *P. putida*'t faaginakkuse korral, võrdlesin *P. putida* PaW85 algset tüve (wt) ja sellest tüvest konstrueeritud profaagideta $\Delta 4\Phi$ tüve kasvudünaamikat faagidega Pp_F1 ja Pp_F2 nakatamise korral. Selleks nakatasin baktereid erineva faagikogusega ehk erineva nakatamiskordajaga (MOI). Kontrollgrupina kasvasin *P. putida* PaW85 ja selle derivaate ilma faagideta. Kasvudünaamika põhikatsed on tehtud tsiprofloksatsiiniga söötmega, et vähendada peremeesbakteri lüso-geniseerumist.



Joonis 11. *P. putida* PaW85 (wt) ja tema profaagideta derivaadi $\Delta 4\Phi$ kasvudünaamika faagiga Pp_F1 nakatamise korral. Paneelidel a-d on esitatud erineva nakatamiskordaja (MOI) korral saadud kasvukõverad. Toodud on kolme mõõtmise keskmine ja 95% usalduspiirid. LB söötmes on tsiprofloksatsiin kontsentratsioonis 0,03 $\mu\text{g/ml}$. Kasvutemperatuur on 20°C.

Saadud tulemused näitavad, et kromosoomsed profaagid kaitsevad *P. putida*'t faagiga Pp_F1 nakatumise eest – võrreldes $\Delta 4\Phi$ tüvega oli algse tüve kasv faagi juuresolekul oluliselt vähem häiritud (Joonis 11). Profaagide kaitsva efekti ulatust ilmestab fakt, et ka kõige lahjema faagitiitriga nakatatud $\Delta 4\Phi$ tüve kasv oli pärssitud (Joonis 11, d), samas kui algne tüvi kasvas hästi ka 100 korda suurema faagitiitri korral (Joonis 11, c). Kõrgemate faagitiitrite juures hakkab profaagide kaitsev efekt vähenema (Joonis 11, b) ja olukorras, kus faage on nakatamishetkel 10 korda rohkem kui baktereid, ei suuda profaagid enam mõjutada peremeesbakteri faagiresistentsust (Joonis 11, a).



Joonis 12. *P. putida* PaW85 (wt) ja tema profaagideta derivaadi $\Delta 4\Phi$ kasvudünaamika faagiga Pp_F2 nakatamise korral. Paneelidel a-c on esitatud erineva nakatamiskordaja (MOI) korral saadud kasvukõverad. Toodud on kolme mõõtmise keskmine ja 95% usalduspiirid. LB söötmes on tsiprofloksatsiin kontsentratsioonis 0,03 $\mu\text{g/ml}$. Kasvutemperatuur on 20°C.

Joonisel 12 on näha, et *P. putida* profaagide kaitsev toime faagi Pp_F2 rünnaku korral erineb oluliselt Pp_F1 puhul nähtust. Profaagide kaitsev efekt on väike ja märgatav vaid suhteliselt kõrge faagitiitri puhul (Joonis 12, b). Suurusjärgu võrra kõrgema tiitri korral, mil faagid on

nakatamishetkel bakterite suhtes arvulises ülekaalus, on algse tüve ja profaagideta tüve kasv ühtmoodi inhibeeritud (Joonis 12, a). Madalama faagitiitri korral (MOI^{-1}) pole kummagi bakteri kasv faagi Pp_F2 juuresolekust oluliselt mõjutatud (Joonis 12, c). Seetõttu võib öelda, et *P. putida* kromosoomsete profaagide kaitsev mõju faagi Pp_F2 vastu on vähem väljendunud kui faagi Pp_F1 vastu ja avaldub ainult nakatamiskordaja kindla väärtuse korral. Kõik katsed näitavad, et faagid Pp_F1 ja Pp_F2 on väga erineva virulentsusega (*resp.* tõvestamisvõimega) – Pp_F2 ei avalda juba $MOI 10^{-1}$ korral *P. putida*'le erilist mõju, samas kui Pp_F1 pärsib *P. putida* profaagideta derivaadi kasvu ka veel $MOI 10^{-5}$ korral.

Arvatakse, et profaagid kaitsevad peremeesbakterit tõhusamalt sarnaste faagidega nakatumise eest, kuna sellisel juhul inhibeerib profaagi poolt kodeeritud repressor ka superinfitseerivat faagi (Bondy-Denomy et al., 2016; de Sousa et al., 2020; Ptashne, 1967). See seletaks *P. putida* profaagide erineva tõhususega kaitsvat mõju faagide Pp_F1 ja Pp_F2 suhtes, kuna faagid Pp_F1 ja Pp_F2 on oma virulentsuse poolest küllaltki erinevad (Joonised 6 ja 7); ühtlasi võib selgitada ka seda, miks on profaage bakterite genoomis nii palju (Canchaya et al., 2003; Martínez-García et al., 2015) – baktereid on hõlpsamini nakatanud faagid, mille sarnaseid peremehes profaagina ei esine. Lisaks tõstab see bakteri kohasust, kui kromosoomis olevad erinevad profaagid annavad võimalikult laiaspektrilise faagivastase kaitse.

Kuna profaagid andsid Pp_F1 suhtes tugeva immuunsuse, oleks edaspidi huvitav see faag sekveneerida ja välja selgitada, kas Pp_F1 võiks olla mõne *P. putida* genoomis leiduva faagi sugulane.

Kokkuvõtteks võib kasvudünaamikakatsete tulemuste põhjal väita, et kromosoomsed profaagid tõstavad *P. putida* faagiresistentsust erineval määral, sõltuvalt ründavast faagist.

2.3.3. Kromosoomsed TA süsteemid ei mõjuta oluliselt *P. putida* faagiresistentsust

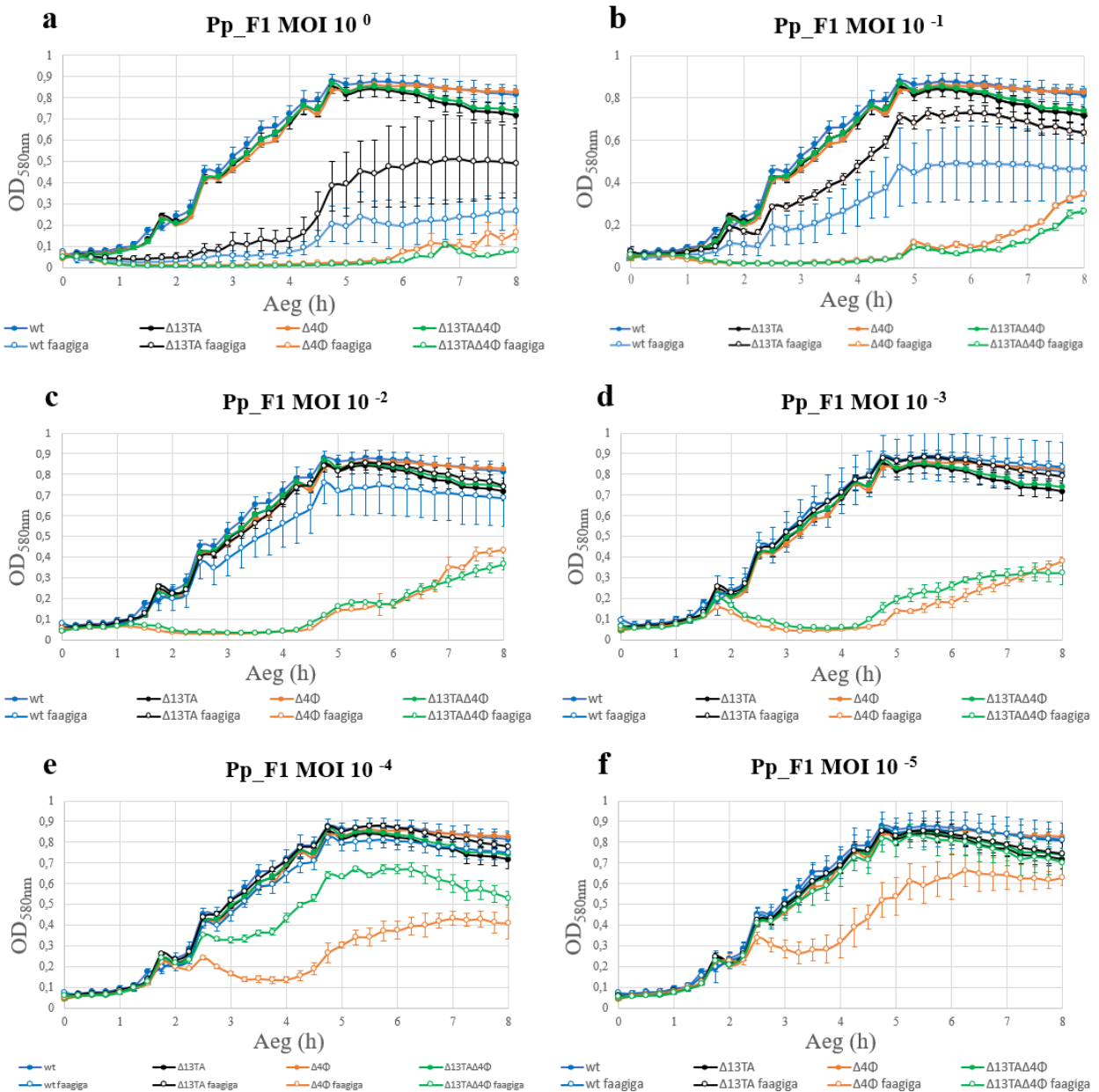
Kirjanduses on viiteid sellele, et TA süsteemid võivad osaleda bakterite faagiresistentsuses (Song & Wood, 2020). Testimaks, kas kromosoomsed TA süsteemid mõjutavad *P. putida* faagitolerantsust, võrdlesin *P. putida* PaW85 algse tüve ning derivaatide $\Delta 13TA$, $\Delta 4\Phi$ ja $\Delta 13TA\Delta 4\Phi$ kasvudünaamikat faagidega Pp_F1 ja Pp_F2 nakatamisel (Joonised 13 ja 14).

Tulemused näitavad, et kromosoomsed toksiini-antitoksiini süsteemid kindlasti ei suurenda, vaid pigem vähendavad *P. putida* resistentsust faagiga Pp_F1 nakatamise korral (Joonis 13). Sellele viitab nii $\Delta 13TA$ populatsiooni mõnevõrra kiirem nakatamisjärgne taastumine võrreldes algse *P.*

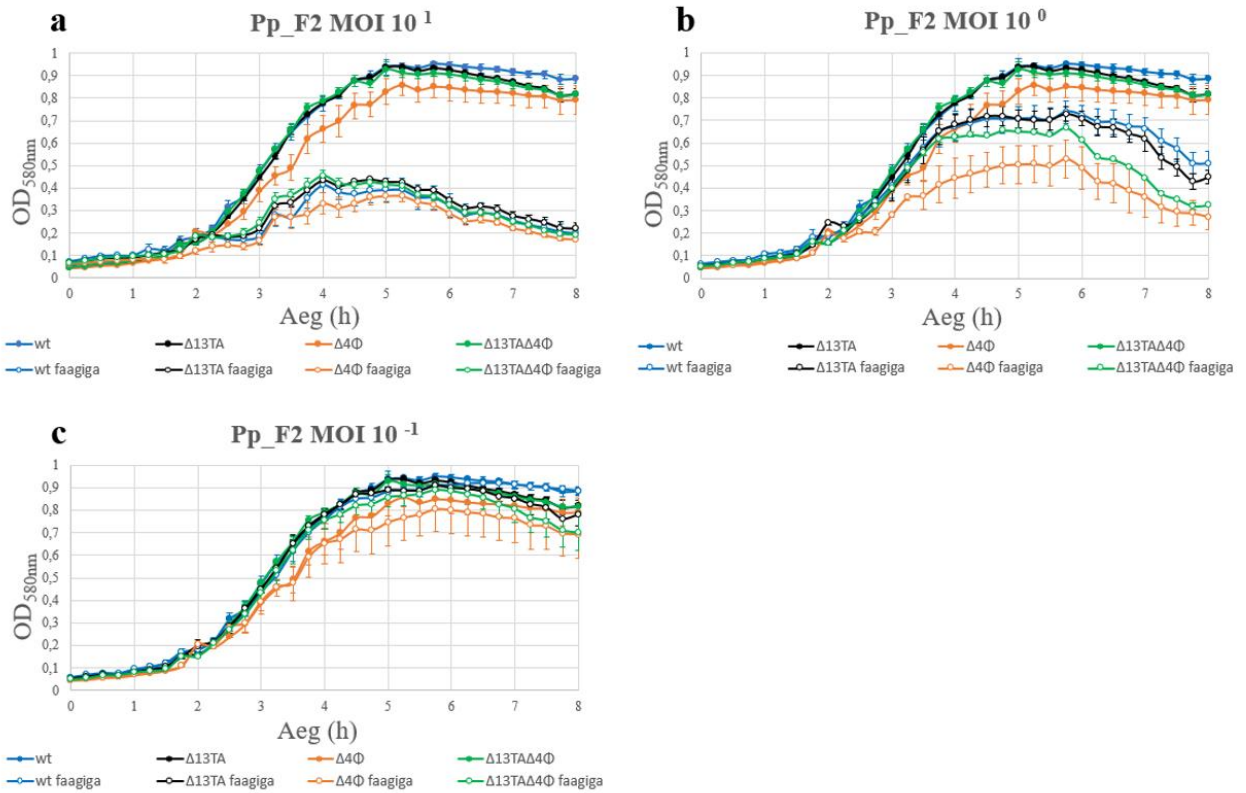
putida'ga (Joonis 13, a-c), kui ka $\Delta 13TA\Delta 4\Phi$ populatsiooni selgelt kiirem taastumine võrreldes $\Delta 4\Phi$ tüvega (Joonis 13, e ja f).

Seega näitavad minu katsed, et TA süsteemide olemasolu on Pp_F1 nakkuse korral bakterile pigem kahjulik kui kasulik. Nakatamiskatsed Pp_F2-ga näitavad samamoodi nagu Pp_F1 puhul, et TA süsteemid ei tõsta *P. putida* faagiresistentsust, vaid pigem langetavad seda (Joonis 14, b), kuid see mõju on vähem väljendunud kui nakatamisel faagiga Pp_F1 ja kõikide tüvede kasvukiirus läheneb kontrollgrupi kasvukiirusele juba küllaltki kõrge faagitiitri juures ($MOI 10^{-1}$) (Joonis 14, c).

Katsetulemustest järeldub, et kromosoomsed toksiini-antitoksiini süsteemid ei tõsta *P. putida* resistentsust faagide Pp_F1 ja Pp_F2 suhtes, vaid pigem vähendavad seda. Tulemusi, kus TA süsteemid on *P. putida*'le ennemini koormaks kui kasuks, on saadud varemgi (Rosendahl et al., 2020). Edaspidi võiks teha veel katseid suurema hulga erinevate faagidega, et saada teada, kas TA süsteemid on pigem kulukad ka nende faagide rünnaku puhul või ehk ilmneb TA süsteemidel teistsugune, näiteks peremeesbakteri kohasust tõstev toime.



Joonis 13. *P. putida* PaW85 (wt) ning tema derivaadite $\Delta 13TA$, $\Delta 4\Phi$ ja $\Delta 13TA\Delta 4\Phi$ kasvudünaamika faagiga Pp_F1 nakatamise korral. Paneelidel a-f on esitatud erineva nakatamiskordaja (MOI) korral saadud kasvukõverad. Toodud on kolme mõõtmise keskmine ja 95% usalduspiirid. Söötmes on tsiprofloksatsiin kontsentratsioonis 0,03 $\mu\text{g/ml}$. Kasvutemperatuur on 20°C.



Joonis 14. *P. putida* PaW85 (wt) ning tema derivaadite $\Delta 13TA$, $\Delta 4\Phi$ ja $\Delta 13TA\Delta 4\Phi$ kasvudünaamika faagiga Pp_F2 nakatamise korral. Paneelidel a-c on esitatud erineva nakatamiskordaja (MOI) korral saadud kasvukõverad. Toodud on kolme mõõtmise keskmine ja 95% usalduspiirid. Söötmes on tsiprofloksatsiin kontsentratsioonis 0,03 $\mu\text{g/ml}$. Kasvutemperatuur on 20°C.

KOKKUVÕTE

Kromosoomsed profaagid ja toksiini-antitoksiini süsteemid on bakterites laialt levinud. Kromosoomsete profaagide osas on leitud, et need mõjutavad lüsogeenset peremeesbakterit mitmeti, muuhulgas ka tõstes bakteri faagiresistentsust. TA süsteemid avastati esmalt plasmiidides, kus nad on olulised plasmiidide stabiliseerimisel (Chan et al., 2016). Kromosoomsete TA süsteemide rolli üle peremeesbakteri bioloogias on tekkinud elav diskussioon ja esitatakse lausa risti vastupidiseid arvamusi. On teadlasi, kelle arvates TA süsteemid kaitsevad peremeesorganismi stressitingimustes ja faagide rünnaku korral, ja on ka uuringuid, mille kohaselt puudub kromosoomsetel TA süsteemidel bakteri kohasusele ja stressitaluvusele oluline efekt või osutuvad TA süsteemid peremehele lausa kulukaks (Goormaghtigh et al., 2018; Harms et al., 2018; Rosendahl et al., 2020; Song & Wood, 2020). Nende teadmiste valguses tegin uurimustöö eesmärgiga tuua selgust kromosoomsete profaagide ja toksiini-antitoksiini süsteemide rolli *Pseudomonas putida* faagiresistentsuses. Seejuures oli vaja optimeerida faagide eraldamise protokollid ja isoleerida keskkonnaproovist *P. putida*'t nakatavaid bakteriofaage.

Püstitatud eesmärkide täitmiseks viisin läbi nakatamis- ja kasvudünaamikakatsed, mille tulemused on järgmised:

- 1) *P. putida*'t infitseerivate faagide isoleerimisel on optimaalne keskkonnaproovist eraldatud (faagi)filtraadiga nakatada eksponentsiaalses kasvufaasis bakterikultuuri, kasutada antibiootikumi (tsiprofloksatsiin) sisaldavat söödet ja inkubeerida bakterikultuure temperatuuril 20°C;
- 2) Purtse jõe kalda mullast õnnestus eraldada *P. putida*'t nakatav lüütiline bakteriofaag Pp_F2;
- 3) kromosoomsed profaagid suurendavad *P. putida* faagiresistentsust;
- 4) kromosoomsed toksiini-antitoksiini süsteemid ei suurenda *P. putida* faagiresistentsust, vaid pigem langetavad seda;
- 5) nii kromosoomsete profaagide kui ka TA süsteemide toimeefekti tugevus *P. putida* faagiresistentsusele varieerub, sõltuvalt ründavast faagist.

Kokkuvõtteks võib öelda, et minu uurimustöös kasutatud faagide rünnaku korral avaldasid *P. putida* kromosoomsed profaagid ja TA süsteemid erinevat toimet: profaagid tõstsid faagiresistentsust ja TA süsteemid vähendasid faagiresistentsust. Seejuures sõltus mõlema uurimisobjekti toime tugevus nakatamiseks kasutatud faagist.

The role of chromosomal prophages and toxin-antitoxin systems in phage resistance in *Pseudomonas putida*

Liis Kärgerberg

SUMMARY

Chromosomal prophages and toxin-antitoxin systems are widespread in bacteria. Chromosomal prophages have been found to affect lysogenic host bacteria in a number of ways, for example by increasing bacterial phage resistance. Toxin-antitoxin (TA) systems were first discovered in plasmids where they are important in plasmid stabilization (Chan et al., 2016). The role of chromosomal TA systems in host bacteria biology has been the subject of intense debate and opposing views have been expressed. There are researchers who believe that TA systems protect the host under stress and phage attack. However, other studies show that chromosomal TA systems have no significant effect on bacterial fitness and stress tolerance, or that TA systems are rather costly to the host (Goormaghtigh et al., 2018; Harms et al., 2018; Rosendahl et al., 2020; Song & Wood, 2020). In the light of this knowledge, I conducted research to elucidate the role of chromosomal prophages and toxin-antitoxin systems in phage resistance of *Pseudomonas putida*. It was necessary to optimize the phage isolation protocol and isolate bacteriophages infecting *P. putida* from an environmental sample.

In order to meet the set goals, I performed phage infection and growth dynamics tests, the results of which are as follows:

- 1) when isolating phages infecting *P. putida*, it is optimal to infect the bacterial culture in the exponential growth phase with the (phage) filtrate isolated from an environmental sample, to use the medium containing the antibiotic (ciprofloxacin) and to incubate the bacterial cultures at 20°C;
- 2) the lytic bacteriophage Pp_F2 infecting *P. putida* was isolated from the soil of the bank of the Purtse River;
- 3) chromosomal prophages increase the phage resistance of *P. putida*;

4) chromosomal toxin-antitoxin systems do not increase phage resistance of *P. putida*, but rather decrease it;

5) the potency of the effect of both chromosomal prophages and TA systems on *P. putida* phage resistance varies greatly depending on the attacking phage.

In conclusion, in the attack of the phages used in my research, the chromosomal prophages of *P. putida* and the TA systems had different effects: the prophages increased the phage resistance and the TA systems decreased the phage resistance. The potency of both subjects depended on the phage used for infection.

TÄNUSÕNAD

Aitäh, juhendajad Rita Hõrak ja Sirli Rosendahl, et olite minuga nii heas kui ka halvas - õnnestunud katsetulemuste juures kiljumas ja käsi plaksutamas, käkkide juures ja tupikutes õlale patsutamas ja väljapääsu otsimas ning vahel lausa pesulapi ja kruvikeerajaga koristusmeeskonnas kaasa löömas! Selline entusiasm, sõbralik suhtumine, ettevõtlikkus, naljasoolikas, abivalmidus ja lõputu kannatlikkus on parimad motivaatorid ning loovivad juhendatava eemale loomekriisi karidest ja kirjutamismaratoniga kaasnevast kurnatusest. Aitäh!

Olge tänatud ka teised meie tööruumiasukad Heili, Karl, Lea, Kendra, Riho ja Johanna, et lubasite jälgida oma huvitavaid katseid, näitasite, kus asjad asuvad ja kuidas neid kasutatakse, ning jagasite labori- ja elutarkust! Eriline tänu Annely Kukele operatiivsete söötmesööstude ning tublile Milvile puhaste kopsikute ja sõbrapäevakommide eest ja onu Sepamellile keskkonnaproovide eest!

Suur ja soe aitäh! mu toetavatele lähedastele, kes on üles näidanud ennastsalgavat hoolivust ning mõõtmatud kannatlikkust ja vaprust neil aegadel, mil mind kas füüsiliselt või vaimselt kohal ei olnud.

KIRJANDUSE LOETELU

- Aakre, C. D., Phung, T. N., Huang, D., & Laub, M. T. (2013). A Bacterial Toxin Inhibits DNA Replication Elongation through a Direct Interaction with the β Sliding Clamp. *Molecular Cell*, 52(5), 617–628. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.014>
- Adams, M. (1959). *Bacteriophages*. Interscience Publishers.
- Afegbua, S. L., & Batty, L. C. (2019). Effect of plant growth promoting bacterium; *Pseudomonas putida* UW4 inoculation on phytoremediation efficacy of monoculture and mixed culture of selected plant species for PAH and lead spiked soils. *International Journal of Phytoremediation*, 21(3), 200–208. <https://doi.org/10.1080/15226514.2018.1501334>
- Anaissie, E., Fainstein, V., Miller, P., Kassamali, H., Pitlik, S., & Bodey, G. (1987). *Newly Recognized Pathogen in Patients with Cancer*.
- Araújo, D., Shteinberg, M., Aliberti, S., Goeminne, P. C., Hill, A. T., Fardon, T. C., Obradovic, D., Stone, G., Trautmann, M., Davis, A., Dimakou, K., Polverino, E., De Soya, A., McDonnell, M. J., & Chalmers, J. D. (2018). The independent contribution of *Pseudomonas aeruginosa* infection to long-term clinical outcomes in bronchiectasis. *European Respiratory Journal*, 51(2), 1701953. <https://doi.org/10.1183/13993003.01953-2017>
- Ashelford, K. E., Day, M. J., & Fry, J. C. (2003). Elevated Abundance of Bacteriophage Infecting Bacteria in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 285–289. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.285-289.2003>
- Banh, A., Chavez, V., Doi, J., Nguyen, A., Hernandez, S., Ha, V., Jimenez, P., Espinoza, F., & Johnson, H. A. (2013). Manganese (Mn) Oxidation Increases Intracellular Mn in *Pseudomonas putida* GB-1. *PLoS ONE*, 8(10), e77835. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077835>

- Barksdale, L., Garmise, L., & Horibata, K. (2006). VIRULENCE, TOXINOGENY, AND LYSOGENY IN CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 88(5), 1093–1108. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1960.tb20099.x>
- Barrangou, harms. (2015). The roles of CRISPR–Cas systems in adaptive immunity and beyond. *Current Opinion in Immunology*, 32, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.12.008>
- Bayley, S. A., Duggleby, C. J., Worsley, M. J., Williams, P. A., Hardy, K. G., & Broda, P. (1977). Two modes of loss of the tol function from *Pseudomonas putida* mt-2. *Molecular and General Genetics MGG*, 154(2), 203–204. <https://doi.org/10.1007/BF00330838>
- Belda, E., van Heck, R. G. A., José Lopez-Sanchez, M., Cruveiller, S., Barbe, V., Fraser, C., Klenk, H.-P., Petersen, J., Morgat, A., Nikel, P. I., Vallenet, D., Rouy, Z., Sekowska, A., Martins dos Santos, V. A. P., de Lorenzo, V., Danchin, A., & Médigue, C. (2016). The revisited genome of *Pseudomonas putida* KT2440 enlightens its value as a robust metabolic chassis: Re-annotation of the *Pseudomonas putida* KT2440 genome. *Environmental Microbiology*, 18(10), 3403–3424. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13230>
- Bergh, Ø., Børshheim, K. Y., Bratbak, G., & Heldal, M. (1989). High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*, 340(6233), 467–468. <https://doi.org/10.1038/340467a0>
- Berrouane, Y. F., McNutt, L., Buschelman, B. J., Rhomberg, P. R., Sanford, M. D., Hollis, R. J., Pfaller, M. A., & Herwaldt, L. A. (2000). Outbreak of Severe *Pseudomonas aeruginosa* Infections Caused by a Contaminated Drain in a Whirlpool Bathtub. *Clinical Infectious Diseases*, 31(6), 1331–1337. <https://doi.org/10.1086/317501>
- Bertelsen, M. B., Senissar, M., Nielsen, M. H., Bisiak, F., Cunha, M. V., Molinaro, A. L., Daines, D. A., & Brodersen, D. E. (2021). Structural Basis for Toxin Inhibition in the VapXD

Toxin-Antitoxin System. *Structure*, 29(2), 139-150.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2020.10.002>

Blanco-Picazo, P., Fernández-Orth, D., Brown-Jaque, M., Miró, E., Espinal, P., Rodríguez-Rubio, L., Muniesa, M., & Navarro, F. (2020). Unravelling the consequences of the bacteriophages in human samples. *Scientific Reports*, 10(1), 6737. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63432-7>

Blower, T. R., Short, F. L., Rao, F., Mizuguchi, K., Pei, X. Y., Fineran, P. C., Luisi, B. F., & Salmond, G. P. C. (2012). Identification and classification of bacterial Type III toxin-antitoxin systems encoded in chromosomal and plasmid genomes. *Nucleic Acids Research*, 40(13), 6158–6173. <https://doi.org/10.1093/nar/gks231>

Bondy-Denomy, J., & Davidson, A. R. (2014). When a virus is not a parasite: The beneficial effects of prophages on bacterial fitness. *Journal of Microbiology*, 52(3), 235–242. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4083-3>

Bondy-Denomy, J., Qian, J., Westra, E. R., Buckling, A., Guttman, D. S., Davidson, A. R., & Maxwell, K. L. (2016). Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms. *The ISME Journal*, 10(12), 2854–2866. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.79>

Booncharoen, N., Mongkolsuk, S., & Sirikanchana, K. (2018). Comparative persistence of human sewage-specific enterococcal bacteriophages in freshwater and seawater. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(14), 6235–6246. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9079-1>

Campbell, J. I. A., Albrechtsen, M., & Sørensen, J. (2006). Large *Pseudomonas* phages isolated from barley rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 18(1), 63–74. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1995.tb00164.x>

- Canchaya et al. (2003). *Prophage Genomics*.
- Carlson, D., McKeen, E., Mitchell, M., Torres, B., Parad, R., Comeau, A. M., & O'Sullivan, B. P. (2009). Oropharyngeal flora in healthy infants: Observations and implications for cystic fibrosis care: Oropharyngeal Flora in Healthy Infants. *Pediatric Pulmonology*, *44*(5), 497–502. <https://doi.org/10.1002/ppul.21029>
- Casey, W. T., Nikodinovic-Runic, J., Fonseca Garcia, P., Guzik, M. W., McGrath, J. W., Quinn, J. P., Cagney, G., Prieto, M. A., & O'Connor, K. E. (2013). The effect of polyphosphate kinase gene deletion on polyhydroxyalkanoate accumulation and carbon metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440: *Pseudomonas putida* KT2440 Δ ppk mutant. *Environmental Microbiology Reports*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12076>
- Chan, W. T., Espinosa, M., & Yeo, C. C. (2016). Keeping the Wolves at Bay: Antitoxins of Prokaryotic Type II Toxin-Antitoxin Systems. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *3*. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00009>
- Chen, F., Wang, K., Stewart, J., & Belas, R. (2006). Induction of Multiple Prophages from a Marine Bacterium: A Genomic Approach. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(7), 4995–5001. <https://doi.org/10.1128/AEM.00056-06>
- Choi et al. (2010). *Various physico-chemical stress factors cause prophage induction in Nitrosospira multiformis 25196—An ammonia oxidizing bacteria*.
- Choi, J. S., Kim, W., Suk, S., Park, H., Bak, G., Yoon, J., & Lee, Y. (2018). The small RNA, SdsR, acts as a novel type of toxin in *Escherichia coli*. *RNA Biology*, *15*(10), 1319–1335. <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1532252>
- Christensen-Dalsgaard, M., Jørgensen, M. G., & Gerdes, K. (2010). Three new RelE-homologous mRNA interferases of *Escherichia coli* differentially induced by environmental stresses.

Molecular Microbiology, 75(2), 333–348. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06969.x>

Cochran, P., Kellogg, C., & Paul, J. (1998). Prophage induction of indigenous marine lysogenic bacteria by environmental pollutants. *Marine Ecology Progress Series*, 164, 125–133. <https://doi.org/10.3354/meps164125>

Comeau, A. M., Tétart, F., Trojet, S. N., Prère, M.-F., & Krisch, H. M. (2007). Phage-Antibiotic Synergy (PAS): β -Lactam and Quinolone Antibiotics Stimulate Virulent Phage Growth. *PLoS ONE*, 2(8), e799. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000799>

Costa-Gutierrez, S. B., Lami, M. J., Santo, M. C. C.-D., Zenoff, A. M., Vincent, P. A., Molina-Henares, M. A., Espinosa-Urgel, M., & de Cristóbal, R. E. (2020). Plant growth promotion by *Pseudomonas putida* KT2440 under saline stress: Role of *eptA*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(10), 4577–4592. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10516-z>

Cumby, N., Edwards, A. M., Davidson, A. R., & Maxwell, K. L. (2012). The Bacteriophage HK97 gp15 Moron Element Encodes a Novel Superinfection Exclusion Protein. *Journal of Bacteriology*, 194(18), 5012–5019. <https://doi.org/10.1128/JB.00843-12>

Daum, M., Zimmer, W., Papen, H., Kloos, K., Nawrath, K., & Bothe, H. (1998). Physiological and Molecular Biological Characterization of Ammonia Oxidation of the Heterotrophic Nitrifier *Pseudomonas putida*. *Current Microbiology*, 37(4), 281–288. <https://doi.org/10.1007/s002849900379>

de la Peña Mattozzi, M., Tehara, S. K., Hong, T., & Keasling, J. D. (2006). Mineralization of Paraoxon and Its Use as a Sole C and P Source by a Rationally Designed Catabolic Pathway in *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10), 6699–6706. <https://doi.org/10.1128/AEM.00907-06>

- de Sousa, J. A. M., Buffet, A., Haudiquet, M., Rocha, E. P. C., & Rendueles, O. (2020). Modular prophage interactions driven by capsule serotype select for capsule loss under phage predation. *The ISME Journal*, *14*(12), 2980–2996. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0726-z>
- Dedrick, R. M., Guerrero-Bustamante, C. A., Garlena, R. A., Russell, D. A., Ford, K., Harris, K., Gilmour, K. C., Soothill, J., Jacobs-Sera, D., Schooley, R. T., Hatfull, G. F., & Spencer, H. (2019). Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nature Medicine*, *25*(5), 730–733. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0437-z>
- Denes, T., & Wiedmann, M. (2014). *Environmental responses and phage susceptibility in foodborne pathogens: Implications for improving applications in food safety*.
- Devos, S., Van Putte, W., Vitse, J., Van Driessche, G., Stremersch, S., Van Den Broek, W., Raemdonck, K., Braeckmans, K., Stahlberg, H., Kudryashev, M., Savvides, S. N., & Devreese, B. (2017). Membrane vesicle secretion and prophage induction in multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* in response to ciprofloxacin stress: Ciprofloxacin-induced membrane vesicle secretion. *Environmental Microbiology*, *19*(10), 3930–3937. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13793>
- Dodd, I. B., Perkins, A. J., Tsemitsidis, D., & Egan, J. B. (2001). Octamerization of λ CI repressor is needed for effective repression of PRM and efficient switching from lysogeny. 11.
- Duckworth, D. H. (1976). „Who discovered bacteriophage?“. *Bacteriological Reviews*, *40*(4), 793–802. <https://doi.org/10.1128/BR.40.4.793-802.1976>
- Dy, R. L., Przybilski, R., Semeijn, K., Salmond, G. P. C., & Fineran, P. C. (2014). A widespread bacteriophage abortive infection system functions through a Type IV toxin–antitoxin

- mechanism. *Nucleic Acids Research*, 42(7), 4590–4605.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt1419>
- Emerson, J., Rosenfeld, M., McNamara, S., Ramsey, B., & Gibson, R. L. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology*, 34(2), 91–100. <https://doi.org/10.1002/ppul.10127>
- Feiner, R., Argov, T., Rabinovich, L., Sigal, N., Borovok, I., & Herskovits, A. A. (2015). A new perspective on lysogeny: Prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 13(10), 641–650. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3527>
- Fernández, M., Niqui-Arroyo, J. L., Conde, S., Ramos, J. L., & Duque, E. (2012). Enhanced Tolerance to Naphthalene and Enhanced Rhizoremediation Performance for *Pseudomonas putida* KT2440 via the NAH7 Catabolic Plasmid. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), 5104–5110. <https://doi.org/10.1128/AEM.00619-12>
- Figueroa-Bossi, N., & Bossi, L. (1999). Inducible prophages contribute to *Salmonella* virulence in mice. *Molecular Microbiology*, 33(1), 167–176. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01461.x>
- Fineran, P. C., Blower, T. R., Foulds, I. J., Humphreys, D. P., Lilley, K. S., & Salmond, G. P. C. (2009). The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein–RNA toxin–antitoxin pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(3), 894–899. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808832106>
- Flemming, H.-C. (2011). The perfect slime. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 86(2), 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.04.025>
- Fraikin, N., Goormaghtigh, F., & Van Melderen, L. (2020). Type II Toxin-Antitoxin Systems: Evolution and Revolutions. *Journal of Bacteriology*, 202(7), e00763-19, [/jb/202/7/JB.00763-19.atom](https://doi.org/10.1128/JB.00763-19). <https://doi.org/10.1128/JB.00763-19>

- Fraikin, N., Rousseau, C. J., Goeders, N., & Van Melderen, L. (2019). Reassessing the Role of the Type II MqsRA Toxin-Antitoxin System in Stress Response and Biofilm Formation: *MqsA* Is Transcriptionally Uncoupled from *mqsR*. *MBio*, *10*(6), e02678-19, /mbio/10/6/mBio.02678-19.atom. <https://doi.org/10.1128/mBio.02678-19>
- Freifelder, D., & Meselson, M. (1970). *Topological Relationship of Prophage X to the Bacterial Chromosome in Lysogenic Cells*. 7.
- Freire, D. M., Gutierrez, C., Garza-Garcia, A., Grabowska, A. D., Sala, A. J., Ariyachaokun, K., Panikova, T., Beckham, K. S. H., Colom, A., Pogenberg, V., Cianci, M., Tuukkanen, A., Boudehen, Y.-M., Peixoto, A., Botella, L., Svergun, D. I., Schnappinger, D., Schneider, T. R., Genevaux, P., ... Neyrolles, O. (2019). An NAD⁺ Phosphorylase Toxin Triggers Mycobacterium tuberculosis Cell Death. *Molecular Cell*, *73*(6), 1282-1291.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.028>
- Fuhrman, J. A., & Noble, R. T. (1995). Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. *Limnology and Oceanography*, *40*(7), 1236–1242. <https://doi.org/10.4319/lo.1995.40.7.1236>
- Garriga, X., Calero, S., & Barbé, J. (1992). Nucleotide sequence analysis and comparison of the *lexA* genes from *Salmonella typhimurium*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *Molecular and General Genetics MGG*, *236*(1), 125–134. <https://doi.org/10.1007/BF00279651>
- Gentile, G. M., Wetzel, K. S., Dedrick, R. M., Montgomery, M. T., Garlena, R. A., Jacobs-Sera, D., & Hatfull, G. F. (2019). More Evidence of Collusion: A New Prophage-Mediated Viral Defense System Encoded by Mycobacteriophage Sbash. *MBio*, *10*(2), e00196-19, /mbio/10/2/mBio.00196-19.atom. <https://doi.org/10.1128/mBio.00196-19>

- Gerdes, K., Bech, F. W., Jørgensen, S. T., Løbner-Olesen, A., Rasmussen, P. B., Atlung, T., Boe, L., Karlstrom, O., Molin, S., & von Meyenburg, K. (1986). Mechanism of postsegregational killing by the hok gene product of the parB system of plasmid R1 and its homology with the relF gene product of the E. coli relB operon. *The EMBO Journal*, 5(8), 2023–2029. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04459.x>
- Goerke, C., Köller, J., & Wolz, C. (2006). Ciprofloxacin and Trimethoprim Cause Phage Induction and Virulence Modulation in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(1), 171–177. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.171-177.2006>
- Goormaghtigh, F., Fraikin, N., Putrinš, M., Hallaert, T., Hauryliuk, V., Garcia-Pino, A., Sjödin, A., Kasvandik, S., Udekwu, K., Tenson, T., Kaldalu, N., & Van Melderen, L. (2018). Reassessing the Role of Type II Toxin-Antitoxin Systems in Formation of *Escherichia coli* Type II Persister Cells. *MBio*, 9(3), e00640-18, [/mbio/9/3/mBio.00640-18.atom](https://doi.org/10.1128/mBio.00640-18). <https://doi.org/10.1128/mBio.00640-18>
- Graewenitz, & Weinstein. (1970). *Pathogenic Significance of Pseudomonas fluorescens and Pseudomonas putida*.
- Grundmann, H., Kropec, A., Hartung, D., Berner, R., & Daschner, F. (1993). *Pseudomonas aeruginosa in a Neonatal Intensive Care Unit: Reservoirs and Ecology of the Nosocomial Pathogen*. 5.
- Guglielmini, J., & Melderen, L. V. (2011). Bacterial toxin-antitoxin systems. *Mobile Genetic Elements*, 1(4), 9.
- Guo, Y., Sun, C., Li, Y., Tang, K., Ni, S., & Wang, X. (2019). Antitoxin HigA inhibits virulence gene *mvfR* expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 21(8), 2707–2723. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14595>

- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: From the Natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Harms, A., Brodersen, D. E., Mitarai, N., & Gerdes, K. (2018). Toxins, Targets, and Triggers: An Overview of Toxin-Antitoxin Biology. *Molecular Cell*, 70(5), 768–784. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.003>
- Harms, A., Maisonneuve, E., & Gerdes, K. (2016). Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science*, 354(6318), aaf4268. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4268>
- Hazan, R., & Engelberg-Kulka, H. (2004). Escherichia coli mazEF-mediated cell death as a defense mechanism that inhibits the spread of phage P1. *Molecular Genetics and Genomics*, 272(2), 227–234. <https://doi.org/10.1007/s00438-004-1048-y>
- Hiasa, H., & Shea, M. E. (2000). DNA Gyrase-mediated Wrapping of the DNA Strand Is Required for the Replication Fork Arrest by the DNA Gyrase-Quinolone-DNA Ternary Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 275(44), 34780–34786. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001608200>
- Hill, G. A., & Robinson, C. W. (1975). Substrate inhibition kinetics: Phenol degradation by *Pseudomonas putida*. *Biotechnology and Bioengineering*, 17(11), 1599–1615. <https://doi.org/10.1002/bit.260171105>
- Hobbs, Z., & Abedon, S. T. (2016). Diversity of phage infection types and associated terminology: The problem with ‘Lytic or lysogenic’. *FEMS Microbiology Letters*, 363(7), fnw047. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw047>
- Hofer, B., Ruge, M., & Dreiseikelmann, B. (1995). The superinfection exclusion gene (sieA) of bacteriophage P22: Identification and overexpression of the gene and localization of the

- gene product. *Journal of Bacteriology*, 177(11), 3080–3086.
<https://doi.org/10.1128/JB.177.11.3080-3086.1995>
- Iseppi, R., Sabia, C., Bondi, M., Mariani, M., & Messi, P. (2020). Virulence Factors, Drug Resistance and Biofilm Formation in *Pseudomonas* Species Isolated from Healthcare Water Systems. *Current Microbiology*, 77(8), 1737–1745. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01990-9>
- Jahn, N., Preis, H., Wiedemann, C., & Brantl, S. (2012). BsrG/SR4 from *Bacillus subtilis*- the first temperature-dependent type I toxin-antitoxin system: BsrG/SR4 - toxin-antitoxin system in *B. subtilis*. *Molecular Microbiology*, 83(3), 579–598. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07952.x>
- Kampers, L. F. C., Volkers, R. J. M., & Martins dos Santos, V. A. P. (2019). *Pseudomonas putida* KT 2440 is HV 1 certified, not GRAS. *Microbial Biotechnology*, 12(5), 845–848. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13443>
- Kasari, V., Kurg, K., Margus, T., Tenson, T., & Kaldalu, N. (2010). The *Escherichia coli* mqsR and ygiT Genes Encode a New Toxin-Antitoxin Pair. *Journal of Bacteriology*, 192(11), 2908–2919. <https://doi.org/10.1128/JB.01266-09>
- Katz, M. E., Wright, C. L., Gartside, T. S., Cheetham, B. F., Doidge, C. V., Moses, E. K., & Rood, J. I. (1994). Genetic organization of the duplicated vap region of the *Dichelobacter nodosus* genome. *Journal of Bacteriology*, 176(9), 2663–2669. <https://doi.org/10.1128/JB.176.9.2663-2669.1994>
- Keen, E. C., Bliskovsky, V. V., Malagon, F., Baker, J. D., Prince, J. S., Klaus, J. S., & Adhya, S. L. (2017). Novel “Superspreader” Bacteriophages Promote Horizontal Gene Transfer by Transformation. *MBio*, 8(1), e02115-16, [/mbio/8/1/e02115-16.atom](https://doi.org/10.1128/mBio.02115-16). <https://doi.org/10.1128/mBio.02115-16>

- Keller, R., & Traub, N. (1974). The Characterization of *Bacteroides fragilis* Bacteriophage Recovered from Animal Sera: Observations on the Nature of *Bacteroides* Phage Carrier Cultures. *Journal of General Virology*, *24*(1), 179–189. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-24-1-179>
- Khraisheh, M., Al-Ghouti, M. A., & AlMomani, F. (2020). *P. putida* as biosorbent for the remediation of cobalt and phenol from industrial waste wastewaters. *Environmental Technology & Innovation*, *20*, 101148. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101148>
- Kim, K., Lee, S., Lee, K., & Lim, D. (1998). Isolation and Characterization of Toluene-Sensitive Mutants from the Toluene-Resistant Bacterium *Pseudomonas putida* GM73. *Journal of Bacteriology*, *180*(14), 3692–3696. <https://doi.org/10.1128/JB.180.14.3692-3696.1998>
- Kim, Y., Wang, X., Zhang, X.-S., Grigoriu, S., Page, R., Peti, W., & Wood, T. K. (2010). *Escherichia coli* toxin/antitoxin pair MqsR/MqsA regulate toxin CspD: MqsR/MqsA regulate cspD. *Environmental Microbiology*, *12*(5), 1105–1121. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02147.x>
- Knott, G. J., & Doudna, J. A. (2018). CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science*, *361*(6405), 866–869. <https://doi.org/10.1126/science.aat5011>
- Koonin, E. V., Senkevich, T. G., & Dolja, V. V. (2006). The ancient virus world and the evolution of cells. *Biology Direct*, *1*(1), 29. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-1-29>
- Krayl, M., Benndorf, D., Loffhagen, N., & Babel, W. (2003). Use of proteomics and physiological characteristics to elucidate ecotoxic effects of methyltert-butyl ether in *Pseudomonas putida* KT2440. *PROTEOMICS*, *3*(8), 1544–1552. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300477>
- Kuddus, M., Joseph, B., & Wasudev Ramteke, P. (2013). Production of laccase from newly isolated *Pseudomonas putida* and its application in bioremediation of synthetic dyes and industrial

- effluents. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2(4), 333–338.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.06.002>
- Lee, K., Park, J.-W., & Ahn, I.-S. (2003). Effect of additional carbon source on naphthalene biodegradation by *Pseudomonas putida* G7. *Journal of Hazardous Materials*, 105(1–3), 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2003.08.005>
- Lee, K. W. K., Periasamy, S., Mukherjee, M., Xie, C., Kjelleberg, S., & Rice, S. A. (2014). Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm. *The ISME Journal*, 8(4), 894–907. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.194>
- Li, Kwasniewski, M., & Bockrath, R. (1991). Inactivation of *lacZ* gene expression by UV light and bound DNA photolyase implies formation of extended complexes in the genomes of specific *Escherichia coli* strains. *Molecular and General Genetics MGG*, 228(1–2), 249–257. <https://doi.org/10.1007/BF00282473>
- Li, Kwasniewski, M., Kirehner, J., & Boekrath, R. (1992). *RexAB* proteins of bacteriophage enhance the effect of photolyase-dimer complexes on *lacZ* gene expression in *Escherichia coli*. 5.
- Li, M., Long, Y., Liu, Y., Liu, Y., Chen, R., Shi, J., Zhang, L., Jin, Y., Yang, L., Bai, F., Jin, S., Cheng, Z., & Wu, W. (2016). HigB of *Pseudomonas aeruginosa* Enhances Killing of Phagocytes by Up-Regulating the Type III Secretion System in Ciprofloxacin Induced Persister Cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00125>
- Little, J. W. (2014). Lysogeny, Prophage Induction, and Lysogenic Conversion. M. K. Waldor, D. I. Friedman, & S. L. Adhya (Toim), *Phages* (lk 37–54). ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555816506.ch3>

- Livny, J., & Friedman, D. I. (2004). Characterizing spontaneous induction of Stx encoding phages using a selectable reporter system: Identification of induced lysogens. *Molecular Microbiology*, *51*(6), 1691–1704. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2003.03934.x>
- Lopatina, A., Tal, N., & Sorek, R. (2020). Abortive Infection: Bacterial Suicide as an Antiviral Immune Strategy. *Annual Review of Virology*, *7*(1), 371–384. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-011620-040628>
- Lwoff. (1953). *Lysogeny*.
- Madhavan, T., Fisher, E., Cox, F., & Quinn, E. (1973). *Pseudomonas putida and Septic Arthritis*.
- Magnuson, R., & Yarmolinsky, M. B. (1998). Corepression of the P1 Addiction Operon by Phd and Doc. *J. BACTERIOL.*, *180*, 10.
- Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes. *Biology Direct*, *1*(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-1-7>
- Manara, A., DalCorso, G., Baliardini, C., Farinati, S., Cecconi, D., & Furini, A. (2012). *Pseudomonas putida* Response to Cadmium: Changes in Membrane and Cytosolic Proteomes. *Journal of Proteome Research*, *11*(8), 4169–4179. <https://doi.org/10.1021/pr300281f>
- Marimon, O., Teixeira, J. M. C., Cordeiro, T. N., Soo, V. W. C., Wood, T. L., Mayzel, M., Amata, I., García, J., Morera, A., Gay, M., Vilaseca, M., Orekhov, V. Y., Wood, T. K., & Pons, M. (2016). An oxygen-sensitive toxin–antitoxin system. *Nature Communications*, *7*(1), 13634. <https://doi.org/10.1038/ncomms13634>
- Martínez-García, E., Jatsenko, T., Kivisaar, M., & de Lorenzo, V. (2015). Freeing *Pseudomonas putida* KT2440 of its proviral load strengthens endurance to environmental stresses: The

- prophages of *P. putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, 17(1), 76–90.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.12492>
- Masuda, H., Tan, Q., Awano, N., Wu, K.-P., & Inouye, M. (2012). YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*: YeeU enhances bundling of MreB and FtsZ filaments. *Molecular Microbiology*, 84(5), 979–989. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08068.x>
- Masuda, Y., Miyakawa, K., Nishimura, Y., & Ohtsubo, E. (1993). ChpA and chpB, *Escherichia coli* chromosomal homologs of the pem locus responsible for stable maintenance of plasmid R100. *Journal of Bacteriology*, 175(21), 6850–6856.
<https://doi.org/10.1128/JB.175.21.6850-6856.1993>
- Matsuzaki, S., Tanaka, S., Koga, T., & Kawata, T. (1992). A Broad-Host-Range Vibriophage, KVP40, Isolated from Sea Water. *Microbiology and Immunology*, 36(1), 93–97.
<https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1992.tb01645.x>
- Miller, C. D., Pettee, B., Zhang, C., Pabst, M., McLean, J. E., & Anderson, A. J. (2009). Copper and cadmium: Responses in *Pseudomonas putida* KT2440. *Letters in Applied Microbiology*, 49(6), 775–783. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02741.x>
- Molina, L. (2000). Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(3), 315–321. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00156-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00156-X)
- Monod, J. (1949). *The Growth of Bacterial Cultures*. 25.
- Mosqueda, G., Ramos-González, M.-I., & Ramos, J. L. (1999). Toluene metabolism by the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* DOT-T1 strain, and its role in solvent impermeabilization. *Gene*, 232(1), 69–76. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00113-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00113-4)

- Mozejko-Ciesielska, J. (2018). Transcriptome remodeling of *Pseudomonas putida* KT2440 during mcl-PHAs synthesis: Effect of different carbon sources and response to nitrogen stress. *Journal of Industrial Microbiology*, 14.
- Munna, S., Zebunnesa Zeba, & Noor, R. (2015). *Influence of Temperature on the growth of Pseudomonas putida*.
- Nakazawa, T. (2002). Travels of a *Pseudomonas*, from Japan around the world. *Environmental Microbiology*, 5.
- Nakayama, K., Kanaya, S., Terawaki, Y., & Hayashi, T. (1999). The complete nucleotide sequence of \square CTX, a cytotoxin-converting phage of *Pseudomonas aeruginosa*: Implications for phage evolution and horizontal gene transfer via bacteriophages. *Molecular Microbiology*, 21.
- Nesper, J., Blaß, J., Fountoulakis, M., & Reidl, J. (1999). Characterization of the Major Control Region of *Vibrio cholerae* Bacteriophage K139: Immunity, Exclusion, and Integration. *Journal of Bacteriology*, 181(9), 2902–2913. <https://doi.org/10.1128/JB.181.9.2902-2913.1999>
- Newton, G. J., Daniels, C., Burrows, L. L., Kropinski, A. M., Clarke, A. J., & Lam, J. S. (2001). Three-component-mediated serotype conversion in *Pseudomonas aeruginosa* by bacteriophage D3: Bacteriophage D3 seroconversion in *P. aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 39(5), 1237–1247. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2001.02311.x>
- Ogura, T., & Hiraga, S. (1983). Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(15), 4784–4788. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.15.4784>

- Ohnishi, M., Kurokawa, K., & Hayashi, T. (2001). Diversification of *Escherichia coli* genomes: Are bacteriophages the major contributors? *Trends in Microbiology*, 9(10), 481–485. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02173-4](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02173-4)
- Oliveira, V. C., Bim, F. L., Monteiro, R. M., Macedo, A. P., Santos, E. S., Silva-Lovato, C. H., Paranhos, H. F. O., Melo, L. D. R., Santos, S. B., & Watanabe, E. (2020). Identification and Characterization of New Bacteriophages to Control Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm on Endotracheal Tubes. *Frontiers in Microbiology*, 11, 580779. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.580779>
- Osawa, S., Furuse, K., & Watanabe, I. (1981). Distribution of ribonucleic acid coliphages in animals. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(1), 164–168. <https://doi.org/10.1128/AEM.41.1.164-168.1981>
- Owen, S. V., Canals, R., Wenner, N., Hammarlöf, D. L., Kröger, C., & Hinton, J. C. D. (2020). A window into lysogeny: Revealing temperate phage biology with transcriptomics. *Microbial Genomics*, 6(2). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000330>
- Pandey, D. P. (2005). Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Research*, 33(3), 966–976. <https://doi.org/10.1093/nar/gki201>
- Parma, D. H., Snyder, M., Sobolevski, S., Nawroz, M., Brody, E., & Gold, L. (1992). *The Rex system of bacteriophage k: Tolerance and altruistic cell death*. 15.
- Ptashne, M. (1967). *Isolation of the phage lambda repressor*.
- Ramos, J., Gallegos, M.-T., Marques, S., Gonzalez, M.-I., Espinosa-Urgel, M., & Segura, A. (2001). *Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors*.
- Ramos, J. L., Duque, E., Huertas, M. J., & Haïdour, A. (1995). Isolation and expansion of the catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in the presence of high

- concentrations of aromatic hydrocarbons. *Journal of Bacteriology*, 177(14), 3911–3916.
<https://doi.org/10.1128/JB.177.14.3911-3916.1995>
- Ray, P., Girard, V., Gault, M., Job, C., Bonneu, M., Mandrand-Berthelot, M.-A., Singh, S. S., Job, D., & Rodrigue, A. (2013). Pseudomonas putida KT2440 response to nickel or cobalt induced stress by quantitative proteomics. *Metallomics*, 5(1), 68–79.
<https://doi.org/10.1039/C2MT20147J>
- Regenhardt, D., Heuer, H., Heim, S., Fernandez, D. U., Strompl, C., Moore, E. R. B., & Timmis, K. N. (2002). Pedigree and taxonomic credentials of Pseudomonas putida strain KT2440. *Environmental Microbiology*, 4(12), 912–915. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00368.x>
- Remold, S. K., Purdy-Gibson, M. E., France, M. T., & Hundley, T. C. (2015). Pseudomonas putida and Pseudomonas fluorescens Species Group Recovery from Human Homes Varies Seasonally and by Environment. *PLOS ONE*, 10(5), e0127704.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127704>
- Ren, D., Walker, A. N., & Daines, D. A. (2012). Toxin-antitoxin loci vapBC-1 and vapXD contribute to survival and virulence in nontypeable Haemophilus influenzae. *BMC Microbiology*, 12(1), 263. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-263>
- Reva. (2006). *Functional Genomics of Stress Response in Pseudomonas putida KT2440*.
- Roberts, J. W., Roberts, C. W., & Craig, N. L. (1978). Escherichia coli recA gene product inactivates phage X repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 5.
- Rogers, K. B. (1960). PSEUDOMONAS INFECTIONS IN A CHILDREN'S HOSPITAL. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(3), 533–537. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00225.x>

- Rosendahl, S., Tamman, H., Brauer, A., Remm, M., & Hōrak, R. (2020). Chromosomal toxin-antitoxin systems in *Pseudomonas putida* are rather selfish than beneficial. *Scientific Reports*, *10*(1), 9230. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65504-0>
- Roux, S., Hallam, S. J., Woyke, T., & Sullivan, M. B. (2015). Viral dark matter and virus–host interactions resolved from publicly available microbial genomes. *ELife*, *4*, e08490. <https://doi.org/10.7554/eLife.08490>
- Santos, P. M., Benndorf, D., & Sá-Correia, I. (2004). Insights into *Pseudomonas putida* KT2440 response to phenol-induced stress by quantitative proteomics. *PROTEOMICS*, *4*(9), 2640–2652. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300793>
- Schooley, R. T., Biswas, B., Gill, J. J., Hernandez-Morales, A., Lancaster, J., Lessor, L., Barr, J. J., Reed, S. L., Rohwer, F., Benler, S., Segall, A. M., Taplitz, R., Smith, D. M., Kerr, K., Kumaraswamy, M., Nizet, V., Lin, L., McCauley, M. D., Strathdee, S. A., ... Hamilton, T. (2017). Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *61*(10), e00954-17, e00954-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00954-17>
- Sevin, E. W., & Barloy-Hubler, F. (2007). RASTA-Bacteria: A web-based tool for identifying toxin-antitoxin loci in prokaryotes. *Genome Biology*, *8*(8), R155. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-8-r155>
- Shan, Y., Brown Gandt, A., Rowe, S. E., Deisinger, J. P., Conlon, B. P., & Lewis, K. (2017). ATP-Dependent Persister Formation in *Escherichia coli*. *MBio*, *8*(1), e02267-16, /mbio/8/1/e02267-16.atom. <https://doi.org/10.1128/mBio.02267-16>

- Shi, T., & Friedman, D. I. (2001). The operator-early promoter regions of Shiga-toxin bearing phage H-19B: The H-19B operator region. *Molecular Microbiology*, *41*(3), 585–599. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02507.x>
- Shinedling, S., Parma, D., & Gold, L. (1987). Wild-type bacteriophage T4 is restricted by the lambda rex genes. *Journal of Virology*, *61*(12), 3790–3794. <https://doi.org/10.1128/JVI.61.12.3790-3794.1987>
- Shivaji, S., & Prakash, J. S. S. (2010). How do bacteria sense and respond to low temperature? *Archives of Microbiology*, *192*(2), 85–95. <https://doi.org/10.1007/s00203-009-0539-y>
- Sillankorva, S., Oliveira, R., Vieira, M. J., Sutherland, I., & Azeredo, J. (2004). *Pseudomonas fluorescens* infection by bacteriophage ÎS1: The influence of temperature, host growth phase and media. *FEMS Microbiology Letters*, *241*(1), 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.06.058>
- Smoot, L. M., Smoot, J. C., Graham, M. R., Somerville, G. A., Sturdevant, D. E., Migliaccio, C. A. L., Sylva, G. L., & Musser, J. M. (2001). Global differential gene expression in response to growth temperature alteration in group A Streptococcus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(18), 10416–10421. <https://doi.org/10.1073/pnas.191267598>
- Song, S., & Wood, T. K. (2020). A Primary Physiological Role of Toxin/Antitoxin Systems Is Phage Inhibition. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1895. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01895>
- Szekeres, S., Dauti, M., Wilde, C., Mazel, D., & Rowe-Magnus, D. A. (2007). Chromosomal toxin-antitoxin loci can diminish large-scale genome reductions in the absence of selection: Chromosomal addiction loci minimize gene loss. *Molecular Microbiology*, *63*(6), 1588–1605. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05613.x>

- Sun, C., Guo, Y., Tang, K., Wen, Z., Li, B., Zeng, Z., & Wang, X. (2017). MqsR/MqsA Toxin/Antitoxin System Regulates Persistence and Biofilm Formation in *Pseudomonas putida* KT2440. *Frontiers in Microbiology*, 8, 840. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00840>
- Suzuki, A., & Goto, M. (1971). *Isolation and Characterization of Pteridines from Pseudomonas ovalis*.
- Zeyer, J., & Kearney, P. C. (1984). Degradation of o-nitrophenol and m-nitrophenol by a *Pseudomonas putida*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32(2), 238–242. <https://doi.org/10.1021/jf00122a015>
- Zielenkiewicz, U., & Cegłowski, P. (2005). The Toxin-Antitoxin System of the Streptococcal Plasmid pSM19035. *Journal of Bacteriology*, 187(17), 6094–6105. <https://doi.org/10.1128/JB.187.17.6094-6105.2005>
- Talavera, A., Tamman, H., Ainelo, A., Konijnenberg, A., Hadži, S., Sobott, F., Garcia-Pino, A., Hůrak, R., & Loris, R. (2019). A dual role in regulation and toxicity for the disordered N-terminus of the toxin GraT. *Nature Communications*, 10(1), 972. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08865-z>
- Tamman. (2016). *The GraTA toxin-antitoxin system of Pseudomonas putida: Regulation and role in stress tolerance*.
- Tamman, H., Ainelo, A., Ainsaar, K., & Horak, R. (2014). A Moderate Toxin, GraT, Modulates Growth Rate and Stress Tolerance of *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, 196(1), 157–169. <https://doi.org/10.1128/JB.00851-13>
- Touchon, M., Bernheim, A., & Rocha, E. P. (2016). Genetic and life-history traits associated with the distribution of prophages in bacteria. *The ISME Journal*, 10(11), 2744–2754. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.47>

- Tran, J. H., & Jacoby, G. A. (2002). Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8), 5638–5642. <https://doi.org/10.1073/pnas.082092899>
- Treviño, M., Moldes, L., Hernández, M., Martínez-Lamas, L., García-Riestra, C., & Regueiro, B. J. (2010). Nosocomial infection by VIM-2 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas putida*. *Journal of Medical Microbiology*, 59(7), 853–855. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.018036-0>
- Tuomanen. (1986). *The Rate of Killing of Escherichia coli by P-Lactam Antibiotics Is Strictly Proportional to the Rate of Bacterial Growth*. 9.
- Uc-Mass, A., Loeza, E. J., de la Garza, M., Guarneros, G., Hernández-Sánchez, J., & Kameyama, L. (2004). An orthologue of the cor gene is involved in the exclusion of temperate lambdoid phages. Evidence that Cor inactivates FhuA receptor functions. *Virology*, 329(2), 425–433. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.09.005>
- Udaondo, Z., Molina, L., Segura, A., Duque, E., & Ramos, J. L. (2016). Analysis of the core genome and pangenome of *Pseudomonas putida*: The *Pseudomonas putida* pangenome. *Environmental Microbiology*, 18(10), 3268–3283. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13015>
- Unterholzner, S. J., Poppenberger, B., & Rozhon, W. (2013). Toxin–antitoxin systems: Biology, identification, and application. *Mobile Genetic Elements*, 3(5), e26219. <https://doi.org/10.4161/mge.26219>
- van Melderen, L., Bernard, P., & Couturier, M. (1994). Lon-dependent proteolysis of CcdA is the key control for activation of CcdB in plasmid-free segregant bacteria. *Molecular Microbiology*, 11(6), 1151–1157. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00391.x>

- Viju, N., Satheesh, S., & Punitha, S. M. J. (2017). Antifouling Activities of Antagonistic Marine Bacterium *Pseudomonas putida* Associated with an Octopus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 87(4), 1113–1124. <https://doi.org/10.1007/s40011-015-0691-x>
- Vostrov, A. A., Vostrukhina, O. A., Svarchevsky, A. N., & Rybchin, V. N. (1996). *Proteins Responsible for Lysogenic Conversion Caused by Coliphages N15 and ϕ 80 Are Highly Homologous*. 3.
- Waldor, M. K., & Friedman, D. I. (2005). Phage regulatory circuits and virulence gene expression. *Current Opinion in Microbiology*, 8(4), 459–465. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.06.001>
- Wang, X., Kim, Y., Ma, Q., Hong, S. H., Pokusaeva, K., Sturino, J. M., & Wood, T. K. (2010). Cryptic prophages help bacteria cope with adverse environments. *Nature Communications*, 1(1), 147. <https://doi.org/10.1038/ncomms1146>
- Wang, X., Lord, D. M., Cheng, H.-Y., Osbourne, D. O., Hong, S. H., Sanchez-Torres, V., Quiroga, C., Zheng, K., Herrmann, T., Peti, W., Benedik, M. J., Page, R., & Wood, T. K. (2012). A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. *Nature Chemical Biology*, 8(10), 855–861. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1062>
- Weber, F. J. (1994). *Cis/trans isomerization of fatty acids as a defence mechanism of Pseudomonas putida strains to toxic concentrations of toluene*. 5.
- Wegrzyn, G., Glass, R., & Thomas, M. (1992). *Involvement of the Escherichia coli RNA polymerase alpha subunit in transcriptional activation by the bacteriophage lambda CI and CII proteins*.

- Weinbauer, M. G., Brettar, I., & Höfle, M. G. (2003). Lysogeny and virus-induced mortality of bacterioplankton in surface, deep, and anoxic marine waters. *Limnology and Oceanography*, 48(4), 1457–1465. <https://doi.org/10.4319/lo.2003.48.4.1457>
- Wentzell, L. M., & Maxwell, A. (2000). The Complex of DNA Gyrase and Quinolone Drugs on DNA Forms a Barrier to the T7 DNA Polymerase Replication Complex. *Journal of Molecular Biology*, 304(5), 779–791. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4266>
- Whitman, W. B., Rainey, F., Kämpfer, P., Trujillo, M., Chun, J., DeVos, P., Hedlund, B., & Dedysh, S. (Toim). (2015). *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (1. tr). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118960608>
- Wilson, G. G. (1991). Organization of restriction-modification systems. *Nucleic Acids Research*, 19(10), 2539–2566. <https://doi.org/10.1093/nar/19.10.2539>
- Wozniak, R. A. F., & Waldor, M. K. (2009). A Toxin–Antitoxin System Promotes the Maintenance of an Integrative Conjugative Element. *PLoS Genetics*, 5(3), e1000439. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000439>
- Xie, Y., Wei, Y., Shen, Y., Li, X., Zhou, H., Tai, C., Deng, Z., & Ou, H.-Y. (2018). TADB 2.0: An updated database of bacterial type II toxin–antitoxin loci. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D749–D753. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1033>
- Yamaguchi, Y., & Inouye, M. (2016). Toxin-Antitoxin Systems in Bacteria and Archaea. F. J. de Bruijn (Toim), *Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria* (1k 97–107). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781119004813.ch8>
- Yao, J., Guo, Y., Wang, P., Zeng, Z., Li, B., Tang, K., Liu, X., & Wang, X. (2018). Type II toxin/antitoxin system ParESO/CopASO stabilizes prophage CP4So in *Shewanella oneidensis*. *Environmental Microbiology*, 16.

- Yao, X., Chen, T., Shen, X., Zhao, Y., Wang, M., Rao, X., Yin, S., Wang, J., Gong, Y., Lu, S., Le, S., Tan, Y., Tang, J., Fuquan, H., & Li, M. (2015). The chromosomal SezAT toxin-antitoxin system promotes the maintenance of the SsPI-1 pathogenicity island in epidemic *S treptococcus suis*: SezAT promotes SsPI-1 stability in *S. suis*. *Molecular Microbiology*, 98(2), 243–257. <https://doi.org/10.1111/mmi.13116>
- Yoshino, Y., Kitazawa, T., Kamimura, M., Tatsuno, K., Yotsuyanagi, H., & Ota, Y. (2011). *Pseudomonas putida* bacteremia in adult patients: Five case reports and a review of the literature. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 17(2), 278–282. <https://doi.org/10.1007/s10156-010-0114-0>

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Maves AS. 2008. Purtse jõe põhjasetete ohtlike ainete uuring Purtse jõe majandamise kavaks. Töö nr 7187, aruanne. Tallinn

https://www.envir.ee/sites/default/files/purtse_lopparuanne_lyhiversioon.pdf (17.05.2021)

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Liis Kärgerberg,

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

Kromosoomsete profaagide ja toksiini-antitoksiini süsteemide roll *Pseudomonas putida* faagiresistentsuses,

mille juhendajad on Rita Hõrak ja Sirli Rosendahl,

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

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates 07.06.2024 kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Liis Kärgerberg

31.05.2021