

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

GENEETIKA ÕPPETOOL

Toksiin-antitoksiin süsteemide mõju *Pseudomonas putida* kohasusele ja stressitaluvusele

Magistritöö

30 EAP

Sirli Luup

Juhendajad PhD Hedvig Tamman

PhD Rita Hõrak

TARTU 2017

INFOLEHT

Toksiin-antitoksiin süsteemide mõju *Pseudomonas putida* kohasusele ja stressitaluvusele

Kromosomaalsete toksiin-antitoksiin süsteemide tähtsus bakteri elutegevusele ei ole selge, kuigi mitmed uuringud viitavad, et nad on olulised stressivastuses. Lisaks on ka viiteid, et toksiin-antitoksiin süsteemid võivad töötada ühtse võrgustikuna. Sellest lähtuvalt oli käesoleva töö eesmärgiks välja selgitada, kas mitme TA-süsteemi puudumisel *Pseudomonas putida* genoomist võiks olla mõju bakteri kohasusele ja stressitaluvusele. Leiti, et 13 ennustatud TA-süsteemi eemaldamisel ei ole olulist efekti ei *P. putida* kohasusele ega ka stressitaluvusele. Kuid avastati, et süsteemi PP4100-4101 eemaldamisega kaasnevad polaarsed efektid globaalse transkriptsioonifaktori *gacA* ekspressioonile ning süsteemi PP3899-3900 funktsiooniks on profaag P1 stabiliseerimine *P. putida* genoomis.

Märksõnad: toksiin-antitoksiin süsteem, stressitaluvus, kohasus, *Pseudomonas putida*

CERCS kood: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

The effects of toxin-antitoxin systems to the fitness and stress tolerance of *Pseudomonas putida*

The function of chromosomal toxin-antitoxin systems is not known, but different results indicate that they are important in stress management. In addition, there are implications that toxin-antitoxin systems might work synergistically. Based on this, the study aimed to determine whether the deletion of multiple toxin-antitoxin systems from the genome of *Pseudomonas putida* affects the bacteria's fitness and stress tolerance. It was shown that deletion of the 13 predicted toxin-antitoxin systems did not have a significant effect on the fitness and stress tolerance of *P. putida*. However, it was found that the deletion of the system PP4100-4101 from *P. putida*'s genome causes polar effects on the global transcription factor *gacA* and the function of the system PP3899-3900 is to stabilize the prophage P1 in *P. putida*'s genome.

Keywords: toxin-antitoxin system, stress tolerance, fitness, *Pseudomonas putida*

CERCS code: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

INFOLEHT.....	3
KASUTATUD LÜHENDID	7
SISSEJUHATUS	8
I KIRJANDUSE ÜLEVAADE	9
1.1. Toksiin-antitoksiin süsteemid (TA-süsteemid).....	9
1.2. Tüüp II TA-süsteemid.....	10
1.3. TA-süsteemide levik	12
1.4. TA-süsteemide funktsioonid.....	13
1.4.1. Genoomse mobiilse DNA stabiliseerimine	13
1.4.2. Programmeeritud rakusurm.....	14
1.4.3. Biofilmi moodustumine.....	15
1.4.4. Kaitse faagide vastu	16
1.4.5. Kasvukiiruse kontroll	17
1.4.6. Persistorid.....	17
1.5. <i>Pseudomonas putida</i> TA-süsteemid	21
1.5.1. GraTA süsteem.....	22
1.5.2. MazEF süsteem	23
II EKSPERIMENTAALNE OSA	24
2.1 Töö eesmärgid.....	24
2.2. Materjal ja metoodika	25
2.2.1. Kasutatud söötmed, bakteritüved ja plasmiidid	25
2.2.2. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)	25
2.2.3. Kloneerimine	25
2.2.4. Plasmidse DNA eraldamine ja restriksioonanalüüs	26
2.2.5. Sekveneerimine	26
2.2.6. Bakterite elektroporatsioon	27

2.2.7. Deletsioonmutantide konstrueerimine.....	27
2.2.8. Bakterite kasvukõverate analüüs	28
2.2.9. Bakterirakkude hüdrofoobsuse määramine	28
2.2.10. UV-taluvuse määramine.....	28
2.2.11. Stressitaluvuse hindamine agarsöötmel	29
2.2.12. Biofilmi moodustumise mõõtmine	29
2.2.13. Persistorite arvukuse määramine.....	29
2.2.14. Konkurentsikatse	30
2.3 Tulemused.....	31
2.3.1. $\Delta 13TA$ tüve konstrueerimine	31
2.3.2. PP4100-4101 operoni eemaldamisel on polaarne efekt <i>uvrY/gacA</i> geenile.....	33
2.3.3. PP3899-3900 TA-süsteem stabiliseerib profaagi P1.....	34
2.3.4. 13 TA-süsteemi puudumine ei mõjuta testitud tingimustel oluliselt <i>P. putida</i> kohasust.....	35
2.3.4.1. TA-süsteemide mitmikmutantide kasvukiirus sarnaneb algse tüvega	36
2.3.4.2. $\Delta 13TA$ tüve stressitaluvus ja UV-tolerantsus ei ole muutunud	36
2.3.4.3. Nitrokinoliini ja parakvaadi juuresolekul kasvava $\Delta 12TA$ tüve lag-faasi pikkus erineb <i>P. putida</i> metsiktüvest	37
2.3.4.4. 13 TA-süsteemi ei mõjuta <i>P. putida</i> persistorite hulka	39
2.3.4.5. $\Delta 13TA$ biofilmi moodustamine ei ole muutunud.....	40
2.3.4.6. TA-süsteemid ei mõjuta <i>P. putida</i> konkurentsivõimet toitaineterikkas söötmes.....	40
2.3.5. Toksiinide funktsionaalsuse analüüs antitoksiini deletsioonmutantidega.....	41
3. Arutelu	44
3.1. <i>P. putida</i> TA-süsteemid	44
3.2. TA-süsteemide eemaldamisega kaasnevad polaarsed efektid.....	45
3.3. PP3899-3900 stabiliseerib genoomset profaagi	47
3.4. TA-süsteemide eemaldamise mõju <i>P. putida</i> kohasusele	47
3.5. Toksiinide funktsionaalsus	49

KOKKUVÕTE	51
SUMMARY	52
TÄNUSÕNAD	54
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU	55
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	63
LISAD	64

KASUTATUD LÜHENDID

Amp – ampitsilliin

ap – aluspaar

BATH katse – bakterite hüdrofoobsuse määramise katse (ingl. k. *bacterial adherence to hydrocarbons assay*)

Bp – bensüülpenitsilliin

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

Cipro – tsiprofloksatsiin

GltX – glutamüül-tRNA süntetaas

Km – kanamütsiin

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

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

NQO – 4-nitrokinoliin N-oksiin

Para – parakvaat

PCD – programmeeritud rakusurm (ingl. k. *programmed cell death*)

PPX – polüfosfaadi (polüP) fosfataas

Rif – rifampitsiin

Sm – streptomütsiin

Tet – tetratsükliin

U – ühik (ingl. k. *unit*)

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

SISSEJUHATUS

Bakterid suudavad elada väga erinevates keskkondades. Kuna kasvukeskkond nende ümber võib sageli väga kiirelt muutuda, puutuvad bakterid oma elu jooksul kokku mitmesuguste stressidega ning nendega toime tulemiseks on bakteritel välja kujunenud erinevad mehhanismid. Üheks suhteliselt omapäraseks stressirohkete aegade üleelamise mehhanismiks peetakse bakterite kromosoomides rohkelt leiduvaid toksiin-antitoksiin süsteeme (TA-süsteeme). TA-süsteemid koosnevad kahest osapooldest – kahjulikust toksiinist ning teda neutraliseerivast antitoksiinist. Stressitingimustes antitoksiin lagundatakse ja kuna toksiooni märklauaks on rakule olulised protsessid, nagu näiteks translatsioon või replikatsioon, siis nende häirumisel peatub rakkude kasv, mis aitab bakteril stressiga toime tulla (Schuster ja Bertram, 2013).

Kuigi kromosomaalseid TA-süsteeme peetakse stressitaluvuse mõjutajateks, ei ole nende tähtsus bakteri kohasusele siiski veel selge ja sellealastes uuringutes on väga palju vastuolulisi tulemusi. Seni on TA-süsteeme seostatud genoomse mobiilse DNA stabiliseerimise (Magnuson, 2007), programmeeritud rakusurma (Sat *et al.*, 2001), faagidevastase kaitse (Hazan ja Engelberg-Kulka, 2004), biofilmi ja kasvukiiruse regulatsiooni (Christensen *et al.*, 2001; Gonzalez Barrios *et al.*, 2006) ning persistorrakkude tekkega (Germain *et al.*, 2015). On ka üksikuid viiteid, et TA-süsteemid võivad toimida ühtse võrgustikuna (Kim *et al.*, 2009; Maisonneuve *et al.*, 2011). Kuid samas on võimalik, et nad on vaid iseka DNA jupid, millest bakterile kasu ei olegi (Van Melderren ja Saavedra De Bast, 2009).

Ka meie laboris uuritava *Pseudomonas putida* PaW85 genoomis on ennustatud mitmeid TA-süsteeme, kuid vaid kahte nendest (GraTA ja MazEF) on lähemalt kirjeldatud (Tamman *et al.*, 2014; Miyamoto *et al.*, 2016). Seega pole enamiku *P. putida* TA-süsteemide puhul teada, milline on nende tähtsus bakteri kohasusele.

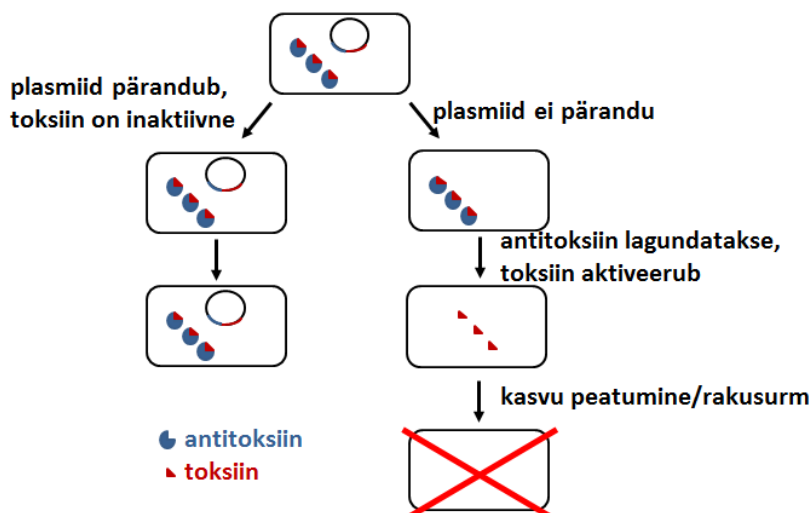
Sellest tulenevalt on käesoleva töö praktilise osa eesmärgiks välja selgitada, kas *P. putida* TA-süsteemide puudumine mõjutab bakteri kohasust ja stressitaluvust ning kas mitme TA-süsteemi puudumisel võib olla kumulatiivne efekt.

I KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Toksiin-antitoksiin süsteemid (TA-süsteemid)

Toksiin-antitoksiin süsteem (TA-süsteem) koosneb reeglina kahest vastandlikust osapooldest – rakule kahjulikust toksiinist ning toksiini neutraliseerivast antitoksiinist. Toksiin on alati valk, kuid antitoksiin võib olla kas valk või väike RNA. Toksiini ja antitoksiini geenid paiknevad ühes operonis, mille ekspressioon on enamasti antitoksiini negatiivse kontrolli all (Hayes, 2003; Gerdes *et al.*, 2005).

TA-süsteemid avastati juba rohkem kui 30 aastat tagasi, kui märgati, et neil on oluline roll plasmidi säilitamisel rakus (Joonis 1) (Ogura ja Hiraga, 1983). TA-süsteemi kodeeriva plasmiidiga rakkudes ei saa toksiini mõju avalduda, sest antitoksiini tootmine tagab toksiini vaigistamise. Bakterirakkude pooldumisel võib aga juhtuda, et mõlemale tütarrakule plasmidi ei pärandu. Küll aga saavad nad emarakult kaasa juba valmis TA-kompleksid. Antitoksiin on labiilsem kui toksiin ja lagundatakse rakus kiiremini. Kuna plasmidi puudumise tõttu ei saa antitoksiini enam juurde toota, ründab vabanenud toksiin oma märklauda. See viib rakkude normaalse elutegevuse häirumiseni, mistõttu saavad kasvueelise plasmiidiga rakud ning plasmiidita rakud konkureeritakse populatsioonist välja (Hayes, 2003).

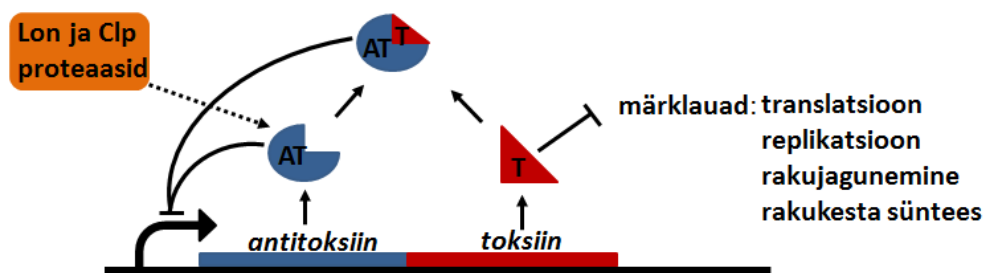


Joonis 1. TA-süsteemist sõltuv plasmidi säilitismehhanism. Kui raku jagunemisel ei pärandu tütarrakule TA-süsteemiga plasmidi, päranduvad ikkagi tsütoplasmas olevad toksiini (punane) ja antitoksiini (sinine) kompleksid. Antitoksiin lagundatakse toksiinist kiiremini ning vabanenud toksiin ründab oma märklauda. See viib rakkude kasvu peatumiseni või ka surmani, mistõttu konkureeritakse plasmiidita rakud populatsioonist välja.

TA-süsteemid jaotatakse antitoksiinist lähtuvalt kuude erinevasse klassi. Oluline on mehhanism, kuidas antitoksiin neutraliseerib toksiini ning kas antitoksiin on valk või mittekodeeriv RNA (Page ja Peti, 2016). Tüüp I ja III TA-süsteemide antitoksiin on väike mittekodeeriv RNA. Tüüp I TA-süsteemide puhul (näiteks *E. coli* TisB/IstR, Hok/Sok süsteemid) seondub antitoksiin toksiini mRNA-ga, takistades ribosoomi seondumist ja seega toksiini tootmist (Thisted *et al.*, 1994; Wagner ja Unoson, 2012). Tüüp III TA-süsteemide puhul (näiteks *Pectobacterium atrosepticum*'i ToxIN süsteem) moodustab antitoksiin RNA pseudosõlmi, mis toksiini valguga seondudes ta inaktiveerivad (Short *et al.*, 2013). Tüüp II, IV, V ja VI TA-süsteemidel on antitoksiin väike valk. Tüüp II TA-süsteemide (näiteks *E. coli* RelBE, HipBA, YafNO süsteemid) antitoksiin moodustab toksiiniga stabiilse kompleksi, milles toksiin on inaktiivne (Gotfredsen ja Gerdes, 1998; Korch *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2009). Tüüp IV TA-süsteemide (näiteks *E. coli* YeeUV süsteem) antitoksiin ja toksiin otseselt omavahel ei seonu, küll aga kaitseb antitoksiin toksiini eest tema märklaudu (Masuda *et al.*, 2012a; Dy *et al.*, 2014). Tüüp V TA-süsteeme on seni leitud vaid üks, milleks on *E. coli* GhoST süsteem. Selle süsteemi antitoksiin GhoS on RNAas, mis lõikab GhoT toksiini mRNA-d (Wang *et al.*, 2012). Hiljuti avastatud VI tüüpi SocAB süsteemi puhul toimib SocA antitoksiin ClpXP proteaasi adaptorina, soodustades SocB toksiini lagundamist (Aakre *et al.*, 2013).

1.2. Tüüp II TA-süsteemid

Tüüp II TA-süsteemid on laialt levinud ja kõige põhjalikumalt uuritud TA-süsteemid. Nagu juba eelnevalt mainitud, on tüüp II TA-süsteemidel nii toksiin kui antitoksiin valk. Toksiin ja antitoksiin on kodeeritud ühes operonis ning enamasti on antitoksiini geen operonis esimene (Joonis 2). Arvatakse, et selline geenide paigutus soosib antitoksiini tootmist ülehulgas, mis on vajalik, et labiilesem antitoksiin suudaks stabiilset toksiini kontrolli all hoida (Jensen ja Gerdes, 1995; Gerdes *et al.*, 2005). Leidub siiski ka vastupidist geenide järjekorda, nagu näiteks *higBA* operonis, kus toksiini geen on operonis esimene. Enamasti tagatakse sel juhul antitoksiini suurem tootmine antitoksiini geeni ees oleva lisapromootoriga (Gerdes *et al.*, 2005), kuid näiteks GraTA süsteemi puhul, kus toksiin on samuti operonis esimene, tagab antitoksiini suurema ekspressioonitaseme mRNA ebavõrdne transleerimine – võrreldes GraA antitoksiiniga on GraT toksiini translatatsiooniefektiivsus väga madal (Tamman, 2016).



Joonis 2. Klassikaline tüüp II TA-süsteemi operon. Antitoksiini (AT) ja toksiini (T) geenid paiknevad ühes operonis, mida enamasti repressseerib nii vaba antitoksiin kui ka TA-kompleks. Antitoksiiniga seondunud toksiin on inaktiivne. Stressi korral lagundavad Lon ja/või Clp proteaasid antitoksiini ning vabanenud toksiin ründab oma märklauda.

Antitoksiinil on tavaliselt eristatavad kaks domeeni, millest üks seondub DNA-ga, osaledes TA-operoni autoregulatsioonis, ja teine toksiiniga, inhibeerides tema aktiivsust (Gotfredsen ja Gerdes, 1998; Afif *et al.*, 2001). Antitoksiin võib iseenda operoni promootorile seonduda nii üksinda kui kompleksis toksiiniga (Joonis 2) (Gotfredsen ja Gerdes, 1998). Viimasel juhul võib toksiin, sõltuvalt toksiini ja antitoksiini suhtest, toimida kas TA-süsteemi operoni transkriptsiooni korepressorina või derepressorina (Afif *et al.*, 2001; Garcia-Pino *et al.*, 2010). Näiteks kui toksiini ja antitoksiini suhe on 1:1 või antitoksiini on rohkem kui toksiini, siis operoni repressseeritakse. Kui aga toksiini on rohkem, siis toimub operoni derepressioon, sest toksiini ülehulk takistab antitoksiini seondumist promootorile (Afif *et al.*, 2001). Sellist transkriptsiooni regulatsiooni mehhanismi nimetatakse tingimuslikuks kooperasiivsuseks (ingl. k. *conditional cooperativity*) ning seda on kirjeldatud paljude tüüp II TA-operonide regulatsioonil (Afif *et al.*, 2001; Overgaard *et al.*, 2008; Garcia-Pino *et al.*, 2010).

Lisaks transkriptsioonilisele regulatsioonile mõjutavad antitoksiini hulka rakus ka post-translatsioonilised protsessid. Stressi korral aktiveeruvad rakus Lon ja Clp proteaasid, mis lagundavad antitoksiini ning vaba toksiin saab rünnata oma märklauda (Joonis 2) (Aizenman *et al.*, 1996; Christensen *et al.*, 2001). Üldiselt on antitoksiinide eluiga üsna lühike, jäädes enamasti 15-20 minuti sisse (Goeders ja Van Melder, 2014). Näiteks on *E. coli* RelB ja HipB antitoksiinide poolestusajad vastavalt ~15 ja ~17 minutit (Christensen *et al.*, 2001; Hansen *et al.*, 2012) ning *S. aureus*'e MazE antitoksiini poolestusaeg ~18 minutit (Donegan *et al.*, 2010). Kuid leidub ka stabiilsemaid antitoksiine, nagu näiteks *E. coli* MazE ja MqsA, mille poolestusajad on vastavalt ~30 ja ~60 minutit (Aizenman *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2011).

Tüüp II TA-süsteemide toksiinidel ei ole ühtset märklauda, kuid nad kõik mõjutavad rakule elutähtsaid protsesse (Schuster ja Bertram, 2013). Näiteks takistab toksiin CcdB DNA güraasi tööd, külmutades DNA-güraasi kompleksi, mille tõttu tekivad DNA katked ning replikatsioon ei saa normaalselt toimuda (Bernard *et al.*, 1993). Lisaks replikatsiooni häirivatele toksiinidele on ka palju toksiine, mis inhibeerivad translatsiooni. Näiteks lõikavad RelE ja YoeB toksiinid ribosoomsõltuvalt mRNA-d (Christensen ja Gerdes, 2003; Christensen *et al.*, 2004), kuid leidub ka ribosoomsõltumatuid RNAasseid toksiine, nagu näiteks MazF ja MqsR (Zhang *et al.*, 2003; Yamaguchi *et al.*, 2009). MazF võib lisaks mRNA-dele lõigata ka rRNA-sid või tRNA-sid (Vesper *et al.*, 2011; Schifano *et al.*, 2013; Schifano *et al.*, 2016). Mõned toksiinid on kinaasid, mis translatsioonifaktoreid fosforüleerides inhibeerivad valgusünteesi. Näiteks fosforüleerib Doc toksiin elongatsioonifaktorit EF-Tu, mistõttu ei suuda EF-Tu enam aminoatsüleeritud tRNA-dega seonduda (Castro-Roa *et al.*, 2013). HipA fosforüleerib glutamüül-tRNA süntetaasi, mille tagajärjel häirub glutamüül-tRNA süntees ning translatsioon peatub (Germain *et al.*, 2013; Kaspary *et al.*, 2013). Hiljuti kirjeldati toksiooni AtaT, mis on hoopiski N-atsetüültransferaas (Jurénas *et al.*, 2017). AtaT inhibeerib translatsiooni atsetüleerides initsiaator-tRNA-d, mistõttu ei seonu initsiaator-tRNA initsiatsioonifaktor IF-2-ga ning translatsiooni initsiatsioonikompleksi moodustumine on häiritud (Jurénas *et al.*, 2017). Lisaks replikatsioonile ja translatsioonile võivad toksiinide märklauadeks olla ka rakukesta süntees ning raku jagunemine (Mutschler *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2011; Masuda *et al.*, 2012b).

1.3. TA-süsteemide levik

Esimene TA-süsteem avastati plasmiidilt miniF (Ogura ja Hiraga, 1983) ning algselt peetigi TA-süsteeme omasteks vaid plasmiididele. Hiljem aga selgus, et TA-süsteemid on väga levinud ka vabalt elavate bakterite ja arhede kromosoomides (Pandey ja Gerdes, 2005). TA-süsteemide arv võib erinevatel bakteriliikidel olla väga erinev. Bakterigenoomide bioinformaatiline analüüs on näidanud, et bakteril on seda rohkem TA-süsteeme, mida varieeruvamas ja stressirohkemas keskkonnas ta elab, parasiitsetel bakteritel nad aga enamasti puuduvad või on neid vähe (Pandey ja Gerdes, 2005). Näiteks on rakusisesel parasiidil *Mycobacterium leprae*'l vaid üks TA-süsteem (Leplae *et al.*, 2011), samas kui tema lähedasel sugulasel, vabalt elaval patogeenil *Mycobacterium tuberculosis*'el, on ennustatud lausa 88 TA-süsteemi (Ramage *et al.*, 2009). Arvatakse, et stressi korral aktiveeruvad toksiinid ning bakteri kasvukiirus ning translatsiooni tase pidurduvad, mis aitavad bakteril stressirohkaid aegu üle elada (Gerdes *et al.*, 2005). Suur TA-süsteemide hulk vabalt elavatel bakteritel võib samas tuleneda aga ka sellest, et vabalt elavatel bakteritel on horisontaalne geeniülekanne

sagedasem ning seetõttu võivad TA-süsteemid mobiilse DNA abil bakterite vahel hõlpsasti levida (Koonin ja Wolf, 2008; Van Melder, 2010).

Kõige põhjalikumalt uuritud *Escherichia coli* K12 tüvel on leitud üle 30 TA-süsteemi (Yamaguchi *et al.*, 2011). Ka rakusisesel patogeenil *Salmonella enterica* serovar Typhimuriumil arvatakse olevat ligikaudu 30 TA-süsteemi (Lobato-Marquez *et al.*, 2015), millest 14 tüüp II TA-süsteemi puhul on näidatud, et nad aitavad toime tulla stressirohkete olukordadega (Helaine *et al.*, 2014). Ka *Staphylococcus aureus*'e genoomist on leitud mitu TA-süsteemi, sealhulgas nii tüüp I, II kui III TA-süsteeme (Schuster ja Bertram, 2016). Kõige rohkem TA-süsteeme arvatakse olevat *Mycobacterium tuberculosis*'el – üle 80 (Ramage *et al.*, 2009), kusjuures vähemalt 37 neist on aktiivsed (Sala *et al.*, 2014). TA-süsteeme on uuritud ka *Pseudomonas*'e perekonna liikmetel. Näiteks on inimese patogeenil *P. aeruginosa*'l kirjeldatud lähemalt kahte TA-süsteemi – HicAB-d (Li *et al.*, 2016) ja HigBA-d (Wood ja Wood, 2016). Ka meie laboris uuritava bakteri *P. putida* PaW85 (isogeenne täielikult sekveneeritud KT2440 tüvega) genoomist on leitud mitmeid potentsiaalseid TA-süsteeme. Erinevate ennustuste kohaselt võib neid olla kas 8 (Pandey ja Gerdes, 2005), 9 (Molina *et al.*, 2016), 12 (Makarova *et al.*, 2009) või 15 (Shao *et al.*, 2011), kusjuures need ennustused ei kattu omavahel täielikult. Seni on eksperimentaalselt uuritud vaid kahte *P. putida* TA-süsteemi, *graTA* (Tamman *et al.*, 2014; Ainelo *et al.*, 2016; Tamman *et al.*, 2016) ning *mazEF* süsteeme (Miyamoto *et al.*, 2016). Teiste *P. putida* ennustatud TA-süsteemide funktsionaalsuse kohta andmed puuduvad.

1.4. TA-süsteemide funktsioonid

Plasmiidsete TA-süsteemide funktsioon on väga selge – neid on vaja plasmiidide säilitamiseks rakupopulatsioonis (Joonis 1). Vaatamata intensiivsetele uuringutele pole aga kromosomaalsetele TA-süsteemidele ühtset funktsiooni leitud. Siiski viitab nende laialdane levik bakterite genoomides sellele, et neil peab olema mingisugune tähtsus (Pandey ja Gerdes, 2005) ning paljud tulemused lubavad genoomseid TA-süsteeme seostada erinevate stressitaluvuse mehhanismidega. Järgnevas peatükis käsitlem lähemalt TA-süsteemide arvatavaid funktsioone.

1.4.1. Genoomse mobiilse DNA stabiliseerimine

TA-süsteeme on leitud mõnede genoomsete mobiilsete elementide koosseisust, nagu näiteks transposoonidest (Wozniak ja Waldor, 2009; Bustamante *et al.*, 2014) ja profaagidest (DeShazer, 2004; Wang ja Wood, 2016). On mitmeid viiteid, et need TA-süsteemid võivad,

analoogselt plasmiidsete süsteemidega (Joonis 1) mängida tähtsat rolli mobiilse DNA püsimisel kromosoomis (Magnuson, 2007). Nii on *Vibrio cholerae*'l näidatud, et konjugatiivses transposoonis SXT paiknev MosAT TA-süsteem stabiliseerib genoomis SXT elementi (Wozniak ja Waldor, 2009). Ka *Acidithiobacillus ferrooxidans*'il mängivad kaks TA-süsteemi rolli konjugatiivse transposooni ICEAfe1 säilitamisel genoomis (Bustamante *et al.*, 2014). Lisaks konjugatiivsetele transposoonidele aitavad TA-süsteemid säilitada genoomis ka profaage, nagu näiteks ParAB süsteem, mis stabiliseerib *E. coli*'s profaagi N15 (Grigoriev ja Lobočka, 2001; Dziewit *et al.*, 2007). Peale selle stabiliseerivad TA-süsteemid ka patogeensussaari: näiteks kui sigade patogeeni *Streptococcus suis*'e SezAT süsteem on inaktiveeritud, toimuvad rakujagunemisel patogeensussaares SsPI-1 ulatuslikud deletsioonid (Yao *et al.*, 2015). Ka *Salmonella enterica* SgiAT süsteem on vajalik, et säilitada genoomset saart SGI1 (Huguet *et al.*, 2016).

1.4.2. Programmeeritud rakusurm

Üheks intrigeerivamaks TA-süsteemide ülesandeks on pikka aega peetud rakkude suunamist apoptoosi ehk osalemist programmeeritud rakusurmas (PCD, ingl. k. *programmed cell death*). Eelkõige on sellisele TA-süsteemide rollile viidanud mõningad *E. coli* MazEF süsteemiga tehtud uuringud (Kolodkin-Gal *et al.*, 2007; Kolodkin-Gal *et al.*, 2008). Aminohapete nälja korral kuhjuvad rakus laadimata tRNA-d, mis ribosoomiga seondudes aktiveerivad (p)ppGpp süntetaasi RelA (Wendrich *et al.*, 2002; Hauryliuk *et al.*, 2015). (p)ppGpp hulga suurenemine inhibeerib transkriptsiooni *mazEF* operonilt ning antitoksiini ei saa juurde toota. Kuna MazE antitoksiin laguneb kiiremini, siis vabaneb toksiin antitoksiini kontrolli alt ning rakud surevad (Aizenman *et al.*, 1996; Sat *et al.*, 2001). PCD mehhanismi peetakse populatsiooni seisukohast kasulikuks, sest kui nälja tingimustes osad bakterid surevad, saavad ülejäänud rakud surnud rakkudest vabanevate toitainete arvelt kasvada ja populatsioon tervikuna jääb püsima (Aizenman *et al.*, 1996). Lisaks aminohapete näljale on leitud ka mitmeid teisi tegureid, mille tõttu aktiveerub *mazEF*-vahendatud PCD. Näiteks põhjustavad MazF-sõltuvat rakkude suremist erinevad transkriptsiooni ja/või translatsiooni inhibeerivad antibiootikumid, nagu rifampitsiin, klooramfenikool, spektinomütsiin (Sat *et al.*, 2001), kõrge temperatuur, oksüdatiivne stress ning erinevad DNA kahjustused, mida tekitavad näiteks UV-kiirgus või mitomütsiin C (Hazan *et al.*, 2004).

Kuigi MazF toksiini rolli rakkude suunamisel apoptoosi on näidatud ka *Myxococcus xanthus*'el (Søgaard-Andersen ja Yang, 2008), on siiski viimasel ajal hakatud TA-süsteemide poolt vahendatud PCD-s kahtlema, sest teised uurimisgrupid ei ole suutnud korrata algseid

E. coli's ja *M. xanthus*'es saadud tulemusi (Tsilibaris *et al.*, 2007; Boynton *et al.*, 2013; Ramisetty *et al.*, 2016b). Lisaks leiti, et *E. coli* tüvel, millega algsed tulemused saadi (Sat *et al.*, 2001), on mutatsioon *relA* geenis ning deletsioon *mazG* geenis (Tsilibaris *et al.*, 2007). *M. xanthus*'e tüvel, millega algsed tulemused saadi (Søgaard-Andersen ja Yang, 2008) on mutatsioon *pilQ* geenis, mis muudab ta metsiktüvest antibiootikumidele tundlikumaks (Boynton *et al.*, 2013). Näidati, et tegelikult põhjustab see mutatsioon *M. xanthus*'es fenotüüpe, mis algselt omistati MazF-ile, samas kui *mazF* geeni puudumine metsiktüve PCD-d ei mõjuta (Lee *et al.*, 2012; Boynton *et al.*, 2013). Seega seavad need tulemused kahtluse alla pikalt tunnustatud hüpoteesi, et TA-süsteemid osalevad PCD-s.

1.4.3. Biofilmi moodustumine

Mikroobid moodustavad tihti biofilmi, mis tekib bakterite kogunemisel kas mingile tahkele või vedelale pinnale. Biofilmi areng on hästi kontrollitud protsess ja algab bakterite kinnitumisega pinnale või üksteise külge. Edasi toimub biofilmi kasv ja küpsemine ning lõpuks vabanevad bakterid küpsest biofilmist jälle planktilisse olekusse. Baktereid kooshoidva biofilmi maatriksi moodustavad polüsahhariidid, glükoproteiinid ja rakuväline DNA. Biofilm on bakteritele turvaline elukeskkond, mis kaitseb neid erinevate stresside eest (Karatan ja Watnick, 2009).

Mitmeid TA-süsteeme seostatakse biofilmi moodustamisega. *E. coli* *mqsRA* oli esimene TA-süsteem, millel nähti mõju biofilmile – toksiini MqsR puudumisel vähenes biofilmi hulk (Gonzalez Barrios *et al.*, 2006; Kasari *et al.*, 2010). Lisaks toksiinile mõjutab biofilmi ka antitoksiin MqsA, kuna MqsA represseerib stressivastuse regulaatori RpoS-i transkriptsiooni, mis omakorda mõjutab liikuvuse regulaatori FlhDC sünteesi (Wang *et al.*, 2011). Stressi korral lagundavad proteaasid MqsA, mille tulemusena aktiveerub transkriptsioon *rpoS* geenilt, mis omakorda surub maha FlhDC tootmise. Tulemusena väheneb bakterite liikuvus ning suureneb biofilmi moodustumine (Wang *et al.*, 2011). Lisaks *rpoS*-ile represseerib MqsA ka *csgD* geeni transkriptsiooni. CsgD on käharate piilide (ingl. k. *curli*) ja tselluloosi tootmise regulaatorvalk, mille puudumisel on biofilmi teke häiritud (Soo ja Wood, 2013).

Ka *E. coli* *hipBA* süsteemi eemaldamine vähendab biofilmi tootmist (Zhao *et al.*, 2013). HipA toksiini mõjul osad rakud lüüesuvad ning ümbritsevasse keskkonda vabaneb DNA, mis on üks oluline biofilmi maatriksi komponent. *hipA* geeni puudumisel kahaneb lüüsunud rakkude arv ning rakuvälise DNA hulk, mistõttu biofilmi moodustumine väheneb (Zhao *et al.*, 2013).

Üksikute TA-süsteemide efekt biofilmi moodustamisele on tavaliselt siiski üsna tähtsusetu (Lemos *et al.*, 2005). Küll aga on näidatud, et viie *E. coli* TA-süsteemi (*relBE*, *mazEF*, *chpBKI*, *yoeB/yefM*, *yafQ/dinJ*) puudumisel on varajase biofilmi (8 h) tootmine vähenenud, sest pinnale kinnitumist soodustavate fimbriate produktsioon on häiritud (Kim *et al.*, 2009). Samas oli aga 24 h möödudes TA-süsteemide mitmikmutandi biofilmi tootmine võrreldes metsiktüvega suurenenud, sest mutandil oli vähenenud biofilmi lagunemine (Kim *et al.*, 2009). TA-süsteemide roll biofilmi regulatsioonis tundub seega keeruline, seda enam, et samas töös näidati veel, et kui eemaldada toksiid ühekaupa, siis varajase biofilmi tootmine metsiktüvega võrreldes hoopis suureneb. Lisaks näidati ka, et toksiidide üleekspressioon vähendab ja YefM antitoksiini üleekspressioon suurendab biofilmi tootmist (Kim *et al.*, 2009).

Kuigi mitmed TA-süsteemid osalevad biofilmi tootmise regulatsioonis, on nende toimemehhanismid üsna erinevad. Biofilmi võivad mõjutada nii toksiid kui ka antitoksiin ja samuti ka nende valkude omavaheline suhe.

1.4.4. Kaitse faagide vastu

Osad genoomsed TA-süsteemid kaitsevad peremeest faagide eest. Esimest korda märgati seda *E. coli mazEF* süsteemi puhul rakkude nakatumisel faagiga P1 (Hazan ja Engelberg-Kulka, 2004). Kasutades kolme erinevat *E. coli* tüve, näitasid autorid, et metsiktüüpi bakterid toodavad vähem faagipartikleid kui ilma *mazEF* süsteemita bakterid (Hazan ja Engelberg-Kulka, 2004). Oletati, et *mazEF* süsteem võimaldab piirata faagide levikut bakteripopulatsioonis, kuna faagiga nakatumisel käivitab *mazEF* süsteem bakterites programmeeritud rakusurma (PCD) raja, mistõttu faagiga nakatunud rakud ei lüüsu ning faagipartiklid ei pääse surnud rakkudest välja (Hazan ja Engelberg-Kulka, 2004). Vaatamata sellele, et MazF-sõltuv PCD on kahtluse alla seatud, näib *mazEF* süsteem siiski faagivastases kaitstes oluline olevat. Nimelt ilmus hiljuti artikkel, kus näidati, et *mazEF* surub maha ka faagi T4 paljunemise (Alawneh *et al.*, 2016). Enamgi veel – autorid näitasid, et T4 kaitseb end MazF-i eest kodeerides toksiidini modifitseerivat ja seega inaktiveerivat ensüümi Alt (Alawneh *et al.*, 2016).

Lisaks *mazEF* süsteemile on leitud ka teisi kromosomaalseid TA-süsteeme, mis aitavad bakteritel end faagi rünnaku eest kaitsta. Näiteks T4 faagi infektsiooni korral aktiveerub *E. coli rnlAB* süsteemi toksiid, mistõttu hakatakse T4 mRNA-sid lagundama ning T4 paljunemine on häiritud (Koga *et al.*, 2011).

Faagidel omakorda on aga erinevaid mehhanisme, kuidas nad teevad kahjutuks bakterite toksiine. Nagu eespool juba mainitud modifitseerib T4 *E. coli* nakatamisel MazF toksiini, mis muudab toksiini inaktiivseks ning faag saab paljunema hakata (Alawneh *et al.*, 2016). Lisaks võivad faagid ennast kaitsta, tootes antitoksiine, mis inaktiveerivad bakteri toksiine. Näiteks kodeerib T4 antitoksiini Dmd, mis inaktiveerib *E. coli*'s LsoA ja RnlA toksiinid, võimaldades faagil paljuneda (Otsuka ja Yonesaki, 2012). Need tulemused viitavad, et nii bakterid kui faagid kasutavad TA-süsteeme omavahelises „võidurelvastumises“.

1.4.5. Kasvukiiruse kontroll

TA-süsteemid võivad olla olulised bakterite kasvukiiruse reguleerimises. *E. coli relBE* süsteemi puhul on näidatud, et toitainetevaeses keskkonnas lagundab Lon proteaas antitoksiini RelB ning toksiin RelE aktiveerub. Selle tulemusena pidurdub bakterite kasvukiirus ning translatsioonitase, kusjuures RelE ei vähenda bakterite arvukust, st RelE pole letaalne vaid üksnes bakteriostaatiline. Kui indutseerida taas transkriptsioon *relBE* operonilt, neutraliseerib sünteesitud antitoksiin toksiini ning bakteri algne kasvukiirus ja translatsioonitase taastuvad (Christensen *et al.*, 2001; Pedersen *et al.*, 2002). Samasugust efekti kasvule on näidatud ka *E. coli mazEF* süsteemi puhul (Pedersen *et al.*, 2002). Selle põhjal on pakutud välja, et TA-süsteemide ülesandeks võib olla kasvu reguleerimine aminohapetevaeses keskkonnas, mis aitab bakteril üle elada ebasoodsaid tingimusi (Gerdes *et al.*, 2005).

TA-süsteemide roll kasvukiiruse reguleerimisel on ilmselt siiski väga väike, sest on näidatud, et ka *relBE* ja *mazEF* süsteemide puudumisel langeb kasvukiirus toitainetevaeses keskkonnas (Tsilibaris *et al.*, 2007). Lisaks on näidatud, et MazE antitoksiin suudab neutraliseerida MazF toksiini mõju ainult siis, kui toksiini üleekspressioon ei ole kestnud liiga kaua, samas kui MazF toksiini pikemaajaline üleekspressioon viib rakkude surmani (Amitai *et al.*, 2004).

1.4.6. Persistorid

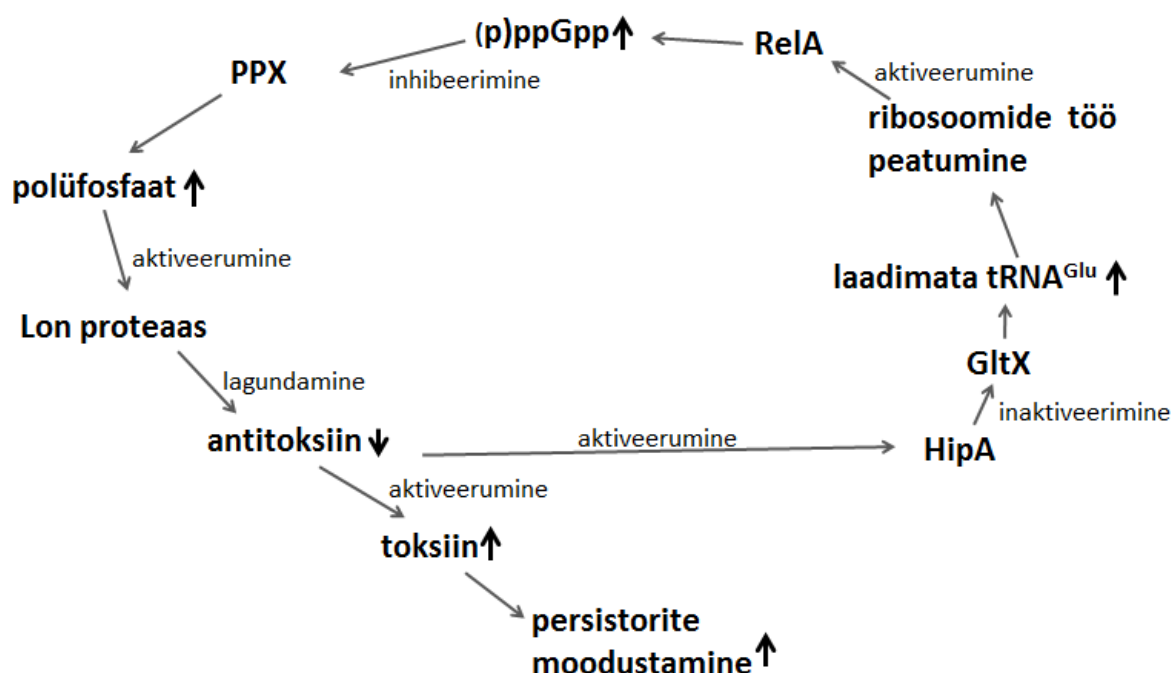
Persistorid on väike hulk rakke bakteripopulatsioonis, mis on metaboolselt väheaktiivsed ning seetõttu tundetud mitmetele antibiootikumidele. Pärast antibiootikumiga töötlust, kui aktiivselt jagunevad bakterirakud on hukkunud, suudavad persistorid bakteripopulatsiooni taastada (Bigger, 1944; Keren *et al.*, 2004a) ja seetõttu seostatakse persistoreid krooniliste infektsioonidega (Lewis, 2007). Persistorid on geneetiliselt identsed teiste, aktiivselt kasvavate bakteritega populatsioonis, kuid translatsioonitase on neis tunduvalt madalam (Shah *et al.*, 2006). Persistorite moodustumise mehhanism ei ole veel selge, kuid arvatakse, et

siingi on oluline osa TA-süsteemidel, sest persistorakkudes on mitmete TA-süsteemide geenide ekspressioon suurenenud (Keren *et al.*, 2004a; Shah *et al.*, 2006).

Seos persistorite moodustamise ja TA-süsteemide vahel tuli ilmsiks, kui leiti, et teatud mutatsioonid *E. coli* *hipA* geenis viivad suurema hulga persistorakkude tekkeni (Moyed ja Bertrand, 1983). Hiljem selgus, et *hipA* on osa tüüp II TA-süsteemi *hipBA* lookusest, kus *hipA* kodeerib toksiini ning *hipB* talle vastavat antitoksiini (Korch *et al.*, 2003; Korch ja Hill, 2006). HipA toksiini üleekspressioon peatab *E. coli* rakkude kasvu ning suurendab persistorakkude tekkimist (Korch ja Hill, 2006). Kuigi *hipBA* operoni eemaldamine ei mõjuta persistorite arvukust eksponentsiaalses faasis olevas bakteripopulatsioonis (Black *et al.*, 1991; Keren *et al.*, 2004b), vähendab see persistorite hulka statsionaarses faasis (Keren *et al.*, 2004b). Ka *Salmonella* Typhimuriumil on nähtud seost persistorite tekke ja TA-süsteemide vahel. Nimelt vähendab iga üksiku *Salmonella* Typhimuriumi TA-süsteemi eemaldamine tema persistorite hulka (Helaine *et al.*, 2014). Samas ei mõjuta aga *Staphylococcus aureus*'e kolme aktiivse tüüp II TA-süsteemi puudumine tema võimet persistoreid moodustada (Conlon *et al.*, 2016).

Enamasti ei mängi siiski üksikud TA-süsteemid persistorite arvukuse regulatsioonis kuigi suurt rolli. Ühe uuringu kohaselt on aga paljudel genoomsetel TA-süsteemidel persistoritele kumulatiivne efekt (Maisonneuve *et al.*, 2011). Nimelt näidati, et 5-10 TA-süsteemi samaaegne eemaldamine *E. coli* genoomist vähendab persistorite hulka, kusjuures mida rohkem TA-süsteeme on inaktiveeritud, seda vähem suudab bakter persistoreid moodustada (Maisonneuve *et al.*, 2011). Oma järgmises artiklis näitas sama uurimisgrupp, et alarmooni (p)ppGpp hulga suurenemine rakus aktiveerib TA-süsteeme ning ühes sellega peatub bakterite kasv ning suureneb persistorite hulk (Maisonneuve *et al.*, 2013). Germain jt (2015) pakkusid välja persistorite regulatsiooni mudeli, milles on tähtsal kohal HipA toksiin ja teised TA-süsteemid (Joonis 3). HipA on kinaas (Correia *et al.*, 2006), mis fosforüleerib glutamüül-tRNA süntetaasi (GltX), muutes GltX-i inaktiivseks (Germain *et al.*, 2013). Kuna GltX katalüüsib glutamüül-tRNA sünteesi, siis väheneb GltX inaktiveerimisel rakkudes glutamiinhappega laetud tRNA (tRNA^{Glu}) hulk. Laadimata tRNA jõudmisel ribosoomi A saiti peatub ribosoomide töö ning aktiveerub valk RelA (Germain *et al.*, 2013; Kaspary *et al.*, 2013). RelA toodab alarmooni (p)ppGpp, mille suurenenud hulk rakkudes inhibeerib polüP fosfataasi (PPX) tööd, mistõttu ei lagundata enam rakkudes polüfosfaati (Kuroda *et al.*, 1997). Polüfosfaadi kuhjumine rakkudes aktiveerib omakorda Lon proteaasi, mis lagundab tüüp II TA-süsteemide antitoksiini ning toksiinid aktiveeruvad rünnates oma märklaudu (Joonis 3).

Selle tulemusena peatub bakterite kasv ning suureneb persistorakkude hulk (Germain *et al.*, 2015).



Joonis 3. *E. coli* (p)ppGpp tasemest sõltuv persistorite moodustamise mudel (Germain *et al.*, 2015, kohandatud). HipA toksiin inaktiveerib glutamüül-tRNA süntetaasi (GltX), mistõttu kuhjuvad rakus glutamiinhappeta tRNA-d. Nende jõudmine ribosoomi peatab ribosoomide töö, mistõttu aktiveerub RelA ning hakkab tootma (p)ppGpp-d. (p)ppGpp hulga tõus inhibeerib polüP fosfataasi (PPX), mis ei lagunda enam polüfosfaati ning polüfosfaadi kuhjumine aktiveerib omakorda Lon proteaasi, mis lagundab antitoksiine. Selle tagajärjel vabanenud toksiinid ründavad oma märklauda, mistõttu moodustub rohkem persistoreid.

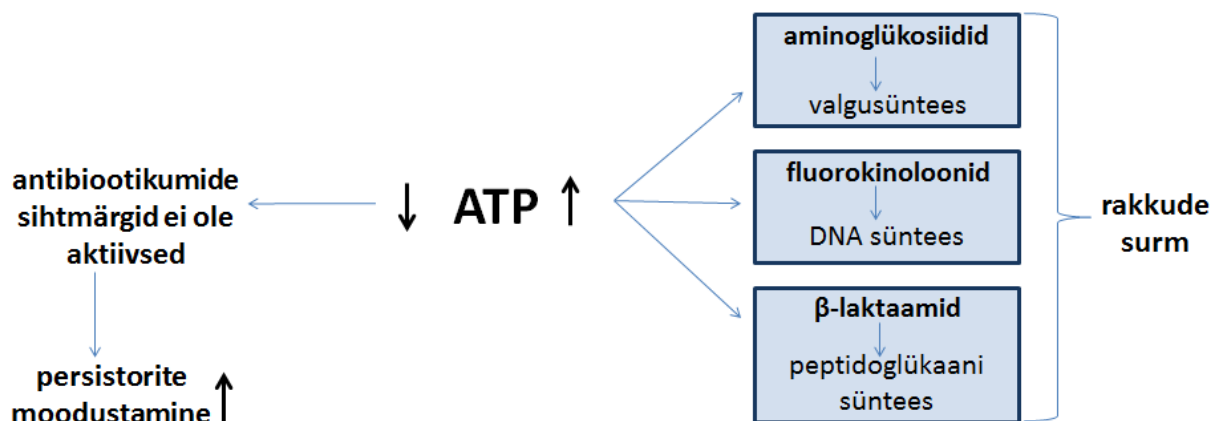
Viimasel ajal on aga Germaini jt (2015) poolt välja pakutud mudel *E. coli* persistorite moodustamise kohta kahtluse alla seatud, sest on ilmnenud mitmeid sellele mudelile vastukäivaid andmeid. Esiteks on näidatud, et YefM antitoksiini lagundamine ja YefM/YoeB TA-süsteemi aktiveerumine ei sõltu (p)ppGpp-st ja polüfosfaadist (Ramisetty *et al.*, 2016a). Veel on leitud, et Lon ja Clp proteaaside puudumisel on persistorite tekkimisele väike mõju (Chowdhury *et al.*, 2016). Samuti pole (p)ppGpp persistorite moodustumisel hädavajalik, kuigi selle puudumine siiski vähendab persistorite tekkimist (Chowdhury *et al.*, 2016). Sama uurimisgrupp näitas ka, et persistorite moodustumist indutseerivad lisaks toksiinidele ka teised rakkude kasvu pidurdavad valgud (Chowdhury *et al.*, 2016). Peale selle on ka teised uurimisgrupid näidanud, et Lon proteaasi ja polüP fosfataasi (PPX) puudumine ei mõjuta persistorite tekkimist (Shan *et al.*, 2017). Veel on leitud, et $\Delta 10$ tüvel, millega näidati

TA-süsteemide kumulatiivset efekti persistorite moodustamisele, on võrreldes metsiktüvega vähenenud kohasus ning tsiprofloksatsiini minimaalne kasvu inhibeeriv kontsentratsioon (MIC, ingl. k. *minimal inhibitory concentration*) (Ramisetty *et al.*, 2016a). Vähenenud kohasuse ja MIC-i põhjuseks võivad olla TA-süsteemide eemaldamisega kaasnevad polaarsed efektid lähedal paiknevate geenide ekspressioonile ning need võivad olla tegelikud põhjused, miks on $\Delta 10$ tüvel vähenenud persistorite moodustamine (Ramisetty *et al.*, 2016a).

Ka *Staphylococcus aureus*'e persistorite tekkimine ei järgi Germain jt (2015) poolt *E. coli* jaoks välja pakutud mudelit, sest ei tüüp II TA-süsteemide ega (p)ppGpp süntaaside eemaldamine mõjuta *S. aureus*'e persistorite moodustamist (Conlon *et al.*, 2016). *S. aureus*'el suurendab persistorrakkude arvukust hoopiski ATP hulga vähenemine rakkudes (Conlon *et al.*, 2016). Nimelt on bakteritsiidsete antibiootikumide märklauaks rakus aktiivselt toimuvad protsessid, mis vajavad ATP energiat (Lewis, 2010). ATP puudumisel on need protsessid peatunud, mistõttu ei saa antibiootikumid läbi nende rakke mõjutada (Conlon *et al.*, 2016). Üks selline protsess on rakuseina komponendi peptidoglükaani süntees, mis β -laktaamide juuresolekul ei toimu korrektselt ning see viib rakkude surmani (Cho *et al.*, 2014). On hästi teada, et β -laktaamid mõjutavad ainult kasvavaid rakke ning statsionaarse faasi rakud on β -laktaamidele tolerantid (Tuomanen *et al.*, 1986). Nii statsionaarse faasi rakkude kui persistorite tolerantus β -laktaamidele tuleneb sellest, et rakkude madala ATP taseme tõttu ei ole peptidoglükaani süntees aktiivne ning seega ei saa ka β -laktaamid neid rakke mõjutada (Conlon *et al.*, 2016; Shan *et al.*, 2017).

ATP tasemest sõltuvat persistorite hulga regulatsiooni on täheldatud lisaks *S. aureus*'ele ka *E. coli*'l (Shan *et al.*, 2017). Kui vähendada eksponentsiaalse faasi rakkude ATP tase statsionaarse faasi rakkude ATP tasemele, tõuseb persistorite arvukus ning väheneb translatsioonitase ja fluorokinoloonide poolt tekitatud DNA katkete arv (Shan *et al.*, 2017). Aminoglükosiidid põhjustavad translatsioonivigu, mille tõttu kuhjuvad rakus toksilised peptiidid (Davis, 1987). Kui ATP vähenedes translatsioon pidurdub, ei saa aminoglükosiidid rakke mõjutada ning rakud on neile tolerantid (Shan *et al.*, 2017). Fluorokinoloonid ei lase DNA güraasil ja teistel topoisomeraasidel ligeerida kokku DNA ahelaid, mistõttu tekivad kaheahelalised DNA katked (Malik *et al.*, 2006). ATP puudumisel aga pidurdub DNA güraasi ning topoisomeraaside töö, fluorokinoloonide kahjulik mõju ei saa avalduda ning rakud on neile ühenditele vastupidavamad (Shan *et al.*, 2017). Eelnevat arvesse võttes on persistorite tekkimiseks pakutud välja uus mudel (Joonis 4), mille kohaselt moodustuvad persistorid siis, kui ATP tase rakus langeb ning erinevalt Germain jt (2015) poolt välja pakutud mudelist ei

ole siin olulised (p)ppGpp tase ning Lon proteaasist sõltuv TA-süsteemide aktiveerumine (Shan *et al.*, 2017).



Joonis 4. *E. coli* ATP tasemest sõltuv persistorite moodustamise mudel (Shan *et al.*, 2017, kohandatud). Aktiivsed protsessid nagu valkude, DNA või peptidoglükaani süntees toimuvad ainult siis, kui rakkudes on ATP tase kõrge. Kui need protsessid toimuvad, saavad neile mõjuda ka mitmesugused bakteriotsiidised antibiootikumid ning rakud surevad. Kui ATP tase langeb, peatuvad ka ATP-st sõltuvad protsessid ning antibiootikumid ei saa enam läbi nende rakke mõjutada ning moodustuvad antibiootikumidele tolerantsed persistorirakud.

Selline ATP-st sõltuv mehhanism seletab üsna lihtsalt persistorirakkude tekkimist. Kõrge ATP tasemega eksponentsiaalse faasi rakkude hulgas leidub üksikuid madala ATP tasemega persistorirakke. Kuigi ei ole teada, miks on osadel rakkudel kasvavas populatsioonis ATP tase palju madalam kui teistel bakteritel (Shan *et al.*, 2017), seletab ATP madalam tase statsionaarses faasis ära fenomeni, miks on statsionaarse faasi rakkude hulgas rohkem persistoreid kui eksponentsiaalse faasi rakkude hulgas (Shan *et al.*, 2017). Nendele andmetele tuginedes tundub, et TA-süsteemide roll persistorite moodustumisel ei ole sugugi nii tähtis, kui pikka aega on arvatud.

1.5. *Pseudomonas putida* TA-süsteemid

Nagu juba eespool mainitud on *P. putida*'l erinevate ennustuste kohaselt 8 (Pandey ja Gerdes, 2005) kuni 15 (Shao *et al.*, 2011) TA-süsteemi ning neist enamiku puhul ei ole teada, kas nad on funktsionaalsed. Vaid kahte *P. putida* TA-süsteemi, GraTA-d ja MazEF-i on eksperimentaalselt uuritud (Tamman *et al.*, 2014; Miyamoto *et al.*, 2016).

1.5.1. GraTA süsteem

GraTA on *P. putida* esimene põhjalikult kirjeldatud TA-süsteem, mis sai oma nime selle järgi, et GraT toksiin mõjutab bakteri kasvukiirust (ingl. k. *growth rate-affecting TA-system*) (Tamman *et al.*, 2014). Vastupidiselt klassikalisele tüüp II TA-süsteemi operoni ehitusele, kus antitoksiini geen on operonis esimene (Joonis 1), paikneb *graTA* operonis toksiini geen antitoksiini geenist eespool (Tamman *et al.*, 2014). Sarnane geenide asetus on ka näiteks *V. cholerae higBA* operonis (Christensen-Dalsgaard ja Gerdes, 2006) ja kooskõlas sellega on nii GraT toksiin kui ka GraA antitoksiin kõige sarnasemad just HigBA perekonna valkudega (Tamman *et al.*, 2014).

GraT on mitmetel põhjustel varem kirjeldatud toksiinidest erinev. Esiteks, kui enamasti ei ole võimalik antitoksiini geeni genoomist eemaldada, sest aktiivne toksiin peatab bakterite kasvu (Budde *et al.*, 2007; Fivian-Hughes ja Davis, 2010), siis *graA* geeni puudumisel on rakkude kasvukiirus tavatingimustel (30 °C) vaid vähesel määral pidurdunud (Tamman *et al.*, 2014). Seega on GraT mõõdukas toksiin. Teiseks, GraT mõju sõltub temperatuurist, sest madalamatel temperatuuridel mõjutab toksiin bakteri kasvukiirust oluliselt tugevamalt (Tamman *et al.*, 2014). Näiteks on antitoksiini deletsioontüvel (Δ graA) vedelsöötmes temperatuuril 20 °C viis korda väiksem kasvukiirus kui metsiktüvel ning agarsöötme tassidel ei suuda Δ graA tüvi sel temperatuuril kolooniaid üldse moodustadagi (Tamman *et al.*, 2014). Sarnaselt paljudele tüüp II TA-süsteemide toksiinidele pidurdab ka GraT translatsiooni, kuid GraT toimemehhanism on eriline – ta inhibeerib ribosoomide biogeneesi, eelkõige ribosoomi subühikute viimast küpsemisfaasi (Ainelo *et al.*, 2016). Sellist mehhanismi pole siia maani teistel toksiinidel täheldatud. Kuigi meie grupi avaldamata tulemused viitavad, et sarnaselt oma lähimale sugulasele HigB-le on ka GraT RNAas (Ainelo, avaldamata andmed), pole siiski veel selge, millest tuleneb selle toksiini mõju ribosoomi biogeneesile. GraT mõjutab bakteri stressitaluvust ja on märkimisväärne, et sõltuvalt stressorist võib toksiini mõju olla nii positiivne kui ka negatiivne. Näiteks suurendab GraT bakteri tolerantsust streptomütsiinile, kanamütsiinile, tsiprofloksatsiinile ja mitomütsiin C-le, kuid väheneb tolerantsust tetratsükliinile, parakvaadile ja NaCl-le (Tamman *et al.*, 2014).

Sarnaselt teistele tüüp II TA-süsteemide antitoksiinidele seondub ka GraA GraT-ga stabiilsesse kompleksi, neutraliseerides seeläbi toksiini kahjuliku mõju (Tamman *et al.*, 2014). GraA on väga efektiivne antitoksiin, sest vaid üks genoomne *graA* koopia suudab neutraliseerida nii genoomist kui ka plasmiidilt ekspresseeritud GraT toksiini (Tamman *et al.*, 2014). Lisaks inhibeerib vaba GraA *graTA* operoni transkriptsiooni seondudes operoni

promootoralale (Tamman *et al.*, 2014). Erinevalt paljudest seni uuritud TA-süsteemidest ei toimi toksiin *graTA* operoni regulatsioonil korepressorina, vaid hoopis derepressorina, inhibeerides GraA seondumist *graTA* promootoralale (Tamman, 2016). GraA on teiste antitoksiinidega võrreldes väga stabiilne, tema poolestusaeg on bakteri eksponentsiaalses ja statsionaarses kasvufaasis 4-5 tundi (Tamman *et al.*, 2016), samas kui enamasti on antitoksiinide poolestusaeg vaid 15-20 minutit (Goeders ja Van Melder, 2014). GraA stabiilsus väheneb aga üleminekul eksponentsiaalsest faasist statsionaarsesse faasi, mis lubab spekuloida, et GraT-sõltuv kasvukiiruse pidurdumine võib aidata bakteritel kohaneda toitainetevaesema keskkonnaga (Tamman *et al.*, 2016). Lisaks erineb GraA paljudest antitoksiinidest ka seetõttu, et teda ei lagunda Lon ja Clp proteaasid. Tänapäevaks ei ole veel teada, mis proteaas GraA-d lagundab, kuid on viiteid, et GraA lagundamise algatab endoproteaas, sest GraA lagundamisel lõigatakse GraA kaheks ning seejärel lagundatakse lõplikult (Tamman *et al.*, 2016).

Kuigi Tamman jt (2014) on näidanud, et GraTA on funktsionaalne TA-süsteem ning antitoksiini puudumine mõjutab bakteri kohasust, siis terve *graTA* süsteemi või toksiini puudumine ei mõjuta bakteri stressitaluvust, kasvukiirust ega anna bakterile konkurentsieelist metsiktüve ees (Tamman *et al.*, 2014).

1.5.2. MazEF süsteem

Teine *P. putida* TA-süsteem, mille funktsionaalsust on uuritud, on lookuse PP0770-0771 poolt kodeeritud MazEF süsteem. Oma nime sai see lookus sarnasuse järgi *E. coli* MazEF süsteemiga (Miyamoto *et al.*, 2016). Sarnaselt *E. coli* MazF toksiiniga on ka *P. putida* MazF ribosoomist sõltumatu mRNA-s, mida neutraliseerib vastav antitoksiin MazE (Zhang *et al.*, 2003; Miyamoto *et al.*, 2016). *E. coli* ja *P. putida* MazF toksiinide identsus on vaid 34,8% ja seepärast pole üllatav, et nad lõikavad mRNA-sid erinevatest kohtadest (Miyamoto *et al.*, 2016). Kui *E. coli* MazF tunneb ära ja lõikab ACA järjestust (Zhang *et al.*, 2003), siis *P. putida* MazF lõikab mRNA-d UAC järjestusest (Miyamoto *et al.*, 2016). Kuigi on näidatud, et *P. putida* MazF toksiin on funktsionaalne mRNA-s (Miyamoto *et al.*, 2016), pole seni andmeid kas ja mil määral mõjutab MazEF süsteem *P. putida* kohasust ja stressitaluvust.

II EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Enamiku bakterite genoomist võib leida TA-süsteeme ning tihti on neid ühe bakteri genoomis mitmeid (Pandey ja Gerdes, 2005). TA-süsteemide laialdane levik tõstatab aga küsimuse – mis on nende süsteemide funktsioon? Enamasti arvatakse, et TA-süsteemid aitavad bakteritel üle elada stressirohkeid tingimusi. Kirjanduses on palju arutletud, et TA-süsteemid võivad olla olulised persistorrakkude moodustamisel (Helaine *et al.*, 2014; Germain *et al.*, 2015), kasvukiiruse regulatsioonil (Christensen *et al.*, 2001; Pedersen *et al.*, 2002), rakkude suunamisel apoptoosi (Sat *et al.*, 2001; Søgaard-Andersen ja Yang, 2008), biofilmi moodustamisel (Gonzalez Barrios *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009) või aidata bakteripopulatsioonil üle elada faagide rünnakut (Hazan ja Engelberg-Kulka, 2004; Koga *et al.*, 2011). Sageli on viited neile funktsioonidele saadud toksiinide mõju uurimisest ja enamasti ei ole ühe TA-süsteemi inaktiveerimisel ei bakteri stressitaluvusele ega kohasusele olulist mõju. Samas on üksikuid viiteid, et TA-süsteemid võivad toimida sünergiliselt ja mitme TA-süsteemi puudumine võib bakteri kohasust oluliselt mõjutada (Kim *et al.*, 2009; Maisonneuve *et al.*, 2011).

P. putida'l on lisaks eelpool mainitud GraTA-le ja MazEF-ile veel vähemalt 13 arvatavat tüüp II TA-süsteemi (Pandey ja Gerdes, 2005; Makarova *et al.*, 2009; Shao *et al.*, 2011; Molina *et al.*, 2016), mida ei ole eksperimentaalselt uuritud. Ei ole teada, kas ja kuidas need 15 TA-süsteemi mõjutavad *P. putida* kohasust ja stressitaluvust. Sellest tulenevalt sai minu praktilise töö eesmärgiks välja selgitada, kas *P. putida* PaW85 genoomis kodeeritud 15 TA-süsteemi mõjutavad bakteri kohasust ja stressitaluvust. Selle eesmärgi täitmiseks otsustasin:

1. Konstrueerida *P. putida* $\Delta 15TA$ tüve, millest on eemaldatud kõik 15 oletatavat tüüp II TA-süsteemi.
2. Võrrelda $\Delta 15TA$ tüve kohasust ja stressitaluvust metsiktüvega.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Kasutatud söötmed, bakteritüved ja plasmiidid

Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid on toodud Lisas (Lisa, Tabel 1). Söötmena kasutati LB (*lysogeny broth*) söödet (1% trüptoon, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl). Tardsöötme saamiseks lisati söötmesse agarit 15 g/l. *E. coli* rakke kasvatati temperatuuril 37 °C ja *P. putida* rakke temperatuuril 30 °C. Vedelsöötmes kasvatamisel aereeriti kultuure loksutil.

Selektsiooniks kasutati antibiootikume: ampitsilliin (Amp; 100 µg/ml), kanamütsiin (Km; 50 µg/ml), bensüülpenitsilliin (Bp; 1,5 mg/ml). Tüvede stressitaluvuse hindamiseks lisati LB agarsöötmele järgnevaid kemikaale: tetratsükliin (Tet; 1,5 µg/ml või 2 µg/ml), tsiprofloksatsiin (Cipro; 0,03 µg/ml või 0,04 µg/ml), NaCl (500 mM), streptomütsiin (Sm; 15 µg/ml, 20 µg/ml või 25 µg/ml), kanamütsiin (Km; 1 µg/ml või 1,5 µg/ml), nitrokinoliin (NQO; 200 µM, 240 µM või 260 µM), parakvaat (Para; 1 µg/ml või 1,5 µg/ml), bensüülpenitsilliin (Bp; 240 µg/ml või 260 µg/ml), rifampitsiin (Rif; 4 µg/ml või 5 µg/ml).

2.2.2. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

PCR-i matriitsina kasutati kas eelnevalt eraldatud plasmiidset DNA-d või bakterirakke. Reaktsiooni mahuks oli enamasti 20 µl, mõnel juhul (kloneerimisel teostatud PCR III) 40 µl. Reaktsioonisegu sisaldas lisaks matriitsile 1 x PCR-i puhvrit (7,5 mM Tris-HCl (pH 8,8), 2 mM (NH₄)₂SO₄, 0,001% Tween 20), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,5 ühikut Taq või Pfu DNA polümeraasi ja 10 pmol mõlemat praimerit. Praimeritena kasutatud oligonukleotiidid on toodud Lisas (Lisa, Tabel 2). PCR-i reaktsioon koosnes 25 tsüklist, mis sisaldas järgnevaid etappe:

- 1) 96 °C, 1 minut
- 2) 54-56 °C, 30 sekundit
- 3) 72 °C, sünteesiaeg sõltus amplifitseeritava ala pikkusest ja kasutatud polümeraasist arvestusega, et Taq polümeraas sünteesib 1000 ja Pfu polümeraas 500 nukleotiidi minutis

Kui matriitsina kasutati rakke, eelnes tsüklitele paariminutiline kuumutamine temperatuuril 96 °C. Peale 25 tsükli järgnes 2-minutiline lisasüntees temperatuuril 72 °C.

2.2.3. Kloneerimine

Iga TA-süsteemi lookuse deletsiooni sisaldava DNA lõigu tekitamiseks viidi läbi kolm PCR-i reaktsiooni (Lisa, Tabel 2). I ja II PCR-i reaktsioonid viidi läbi paralleelselt kasutades

matriitsina *P. putida* rakke. Nende käigus amplifitseeriti umbes 500 aluspaari (ap) pikkused järjestused mõlemalt poolt eemaldatavat piirkonda. Saadud PCR-i produkte töödeldi ensüümidega Dpn I (2,5 U/μl) ja Exo I (0,4 U/μl) 15 minutit temperatuuril 37 °C, et vabaneda kromosomaalsest DNA-st ja praimeritest. Seejärel inaktiveeriti ensüümid 15 minuti jooksul temperatuuril 80 °C. I ja II PCR-i produkte kasutati seejärel matriitsina III PCR-is (nn õmblus-PCR-is), mille käigus kleebiti I ja II PCR-i reaktsioonis paljundatud DNA lõigud omavahel kokku. Tekkinud fragmenti lõigati sobivate restriктаasidega (Lisa, Tabel 2) ning kloneeriti samade restriктаasidega avatud pEMG vektorisse. Kloneerimisel kasutati firma *Thermo Scientific* ensüüme vastavalt tootja ettekirjutustele. Saadud plasmiidid on toodud Lisas (Lisa, Tabel 1).

2.2.4. Plasmiidse DNA eraldamine ja restriksioonanalüüs

Plasmiidse DNA eraldamiseks kasutati firma *Favorgen* DNA eraldamise komplekti *FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit* ja järgiti tootja protokoll. DNA elueeriti 60 μl deioniseeritud veega ning säilitati temperatuuril -20 °C.

DNA restriksiooniks kasutati firma *Thermo Scientific* ensüüme tootja poolt ettenähtud tingimustel. Restriksiooni tulemust analüüsiti geelelektroforeesiga. DNA proovile lisati 1/10 mahus markervärvi (0,04% broomfenoolsinine, 50% glütserool) ning kanti 1%-lisele etiidiumbromiidi (0,33 μg/ml) sisaldavale agarosgeelile 1 x TAE puhvris (50 mM Tris-atsetaat; 1 mM EDTA pH 8,2). Elektroforees viidi läbi toatemperatuuril pingel 100-150 volti. Geeli pildistati UV-valguses.

2.2.5. Sekveneerimine

Sekveneeritavaid PCR-i produkte töödeldi eksonukleas I (ExoI; 2,5 U/μl) ja aluselise fosfataasiga (SAP; 1 U/μl) 30 minutit temperatuuril 37 °C. Ensüümide inaktiveerimiseks hoiti reaktsioonisegusid 15 minutit temperatuuril 80 °C.

Sekveneerimiseks valmistati proovid ette *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*'iga (*Applied Biosystems*), kasutades tootjafirma modifitseeritud protokoll (J. Parik). Sekveneerimisreaktsiooni segu lõppmahuga 10 μl sisaldas: 1 μl eelnevalt töödeldud PCR-i produkti, 0,7 μl premix-i (*Big Dye PR-100 mix v3.1*), 2 μl 5 x lahjenduspuhvrit (200 mM Tris pH 9,0; 6 mM MgCl₂), 1,6 pmol praimerit ning lõppmahuni deioniseeritud vett. Reaktsioon koosnes 30 tsüklist, mis sisaldas järgmisi etappe:

- 1) 95 °C, 15 sekundit
- 2) 50 °C, 10 sekundit
- 3) 60 °C, 45 sekundit

Seejärel sadestati reaktsioonisegust DNA 2 µl dekstraani ja 30 µl 96% etanooliga 10 minuti jooksul temperatuuril -20 °C. Sadet pesti kaks korda 200 µl 75% etanooliga ning võeti üles 10 µl-s 100%-lises formamiidis. Kasutati Eesti Biokeskuse tuumiklabori sekveneermisteenust ja DNA sekveneeriti Applied Biosystems 3730x1 kapillaarsekvenaatoriga. Saadud nukleotiidseid järjestusi analüüsiti programmidega BioEdit 7.0.9.1 ja BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov).

2.2.6. Bakterite elektroporatsioon

E. coli kompetentsete rakkude saamiseks kasvatati rakke ette üleöö (~20 h) LB vedelsöötmes temperatuuril 37 °C. Üleöö kultuurist tehti 50-kordne lahjendus värskesse 5 ml LB vedelsöötmesse ning rakke kasvatati ~2 h ($OD_{580} \sim 0,2-0,3$). Seejärel tõsteti bakterikultuurid jääle ning rakud tsentrifuugiti kokku lauatsentrifuugi Sigma 1-4 abil (1 min, 16100 x g). Rakke pesti kolm korda 1 ml 10%-lise glütserooliga. Seejärel võeti rakud üles ~50 µl-s 10%-lises glütseroolis. Rakke ja töölahuseid hoiti pidevalt jääl.

P. putida kompetentsete rakkude saamiseks kasutati üleöö (~20 h) LB vedelsöötmes temperatuuril 30 °C kasvanud rakke. Üleöö kultuurist tsentrifuugiti kokku 250 µl (1 min, 16100 x g), rakke pesti kolm korda 1 ml 300 mM sahharoosiga ning suspendeeriti ~50 µl-s 300 mM sahharoosis.

Rakkudele lisati 0,1-1 µg vees lahustatud DNA-d ning segu tõsteti elektroporatsiooni küveti. Elektroporatsioon teostati BioRad-i elektroporaatoriga pingel 2500 V. Rakud pesti küvetist välja 1 ml LB vedelsöötmega ning seejärel kasvatati *E. coli* rakke üks tund temperatuuril 37 °C ja *P. putida* rakke 1-3 tundi temperatuuril 30 °C. Pärast seda tsentrifuugiti rakud söötimest välja (30 sek, 16100 x g) ning plaaditi selektiivsöötmele.

2.2.7. Deletsioonmutantide konstrueerimine

Deletsioonmutantide konstrueerimisel kasutati väikeste modifikatsioonidega Victor de Lorenzo laboris väljatöötatud metoodikat (Martinez-Garcia ja de Lorenzo, 2011). Sellele vastavalt viidi TA-süsteemi deletsiooni fragmenti sisaldav suitsiidplasmiid pEMG-ΔTA *P. putida* algtüvesse PaW85, kus plasmiid ei replitseeru. Tänu TA-süsteemi deletsiooni fragmendi ja kromosoomi vahelisele homoloogilisele rekombinatsioonile, siseneb plasmiid

bakteri kromosoomi. Moodustuvad kanamütsiiniresistentsed kointegraadid, mis sisaldavad nii metsiktüüpi kui ka deletsiooniga lookust. Seejärel viidi kointegraatidesse elektroporatsiooni abil I-SceI nukleaasi kodeeriv plasmiid pSW(I-SceI). I-SceI nukleas lõikab kromosoomi integreerunud plasmidi I-SceI restriksioonisaitidest kahelt poolt TA-süsteemi deletsioonifragmenti. Selleks, et indutseerida I-SceI nukleaasi, kasvatati rakke üleöö (~20 h) 3 mM meta-toluaati sisaldavas LB vedelsöötmes. Seejärel plaaditi rakud LB agarsöötmele ning selekteeriti välja kanamütsiinitundlikud kolooniad. Deletsiooni olemasolu kontrolliti PCR-iga. I-SceI nukleaasi kodeerivast plasmiidist vabanemiseks kasvatati deletsioontüvesid paar päeva mitteselektiivsetes tingimustes ning valiti välja bensüülpenitsilliini suhtes tundlikud kolooniad.

2.2.8. Bakterite kasvukõverate analüüs

Bakterite kasvukõvera määramiseks inokuleeriti üleöö (~20 h) LB vedelsöötmes kasvanud bakterikultuuriga värsket (antibiootikumi sisaldavat) LB söödet. Baktereid lahjendati 100 µl LB-sse kas 100 (parakvaadi ja tetratsükliini lisamisel) või 1000 (nitrokinoliini lisamisel) korda. Parakvaati, tetratsükliini ja nitrokinoliini lisati söötmesse lõppkontsentratsiooniga vastavalt 9,6 µg/ml, 1,2 µg/ml ja 0,2 mM. Baktereid kasvatati mikrotiiterplaadil temperatuuril 30 °C ning kasvava kultuuri optilist tihedust mõõdeti lainepikkusel 580 nm iga 20 minuti tagant spektrofotomeetriga Infinte M200 Pro (Tecan). Omavahel võrreldi antibiootikumiga ja ilma kasvanud rakkude kasvukõveraid.

2.2.9. Bakterirakkude hüdrofoobsuse määramine

Bakterite hüdrofoobsuse määramiseks kasutati nn BATH katset (ingl. k. *bacterial adherence to hydrocarbons assay*). Selleks kraabiti tikuga kokku 1/12 LB agarsöötme tassil üleöö (~22 h) kasvanud bakterikultuuri ning rakud suspendeeriti 500 µl steriilses 1 x M9-s. Saadud segu lahjendati 1 x M9-ga OD₅₈₀~0,3-ni ning mõõdeti selle lahjenduse täpne OD₅₈₀, mis on nn algne OD. 1 ml-le samale lahjendusele lisati 100 µl n-heksadekaani ning segati ägedalt vortexil 10 sekundit, et hüdrofoobsed bakterid liiguksid n-heksadekaani faasi. Seejärel seisis n-heksadekaaniga segu laual 30 minutit, pärast mida mõõdeti segu vesifaasi OD₅₈₀ ning saadi nn lõpp OD. Algse ja lõpp OD põhjal arvutati, kui suur hulk bakteritest liikus n-heksadekaani hüdrofoobsesse faasi, mida väljendati heksadekaanilembuse protsendina.

2.2.10. UV-taluvuse määramine

UV-taluvuse määramiseks kasvatati bakterikultuurid ette üleöö (~20 h) LB vedelsöötmes temperatuuril 30 °C. Üleöö kultuurist tehti 50-kordne lahjendus värskesse LB söötmesse ning

rakke kasvatati 2,5 tundi ($OD_{580} \sim 0,7$). Seejärel tehti rakukultuurist 10-kordsete lahjenduste rida, mis külvati LB agarsöötme tassidele 5 μ l tilkadena. Tasse kiiritati UV-kiirguse doosidega 5, 10 või 15 J/m^2 , kontrolltasse ei kiiritatud. Tasse inkubeeriti üleöö temperatuuril 30 °C. Järgmisel päeval loeti kokku söötmele tekkinud kolooniad, kusjuures lugemiseks valiti võimalikult suure rakutihedusega lahjendusest tehtud külv ning arvutati ellujäänud bakterite hulk ühe milliliitri rakukultuuri kohta.

2.2.11. Stressitaluvuse hindamine agarsöötmel

Bakteritüvede stressitaluvuse määramiseks erinevate kemikaalide suhtes kasvatati tüvesid ette üleöö (~20 h) LB vedelsöötmes temperatuuril 30 °C. Üleöö kultuurist tehti 10-kordsete lahjenduste rida, mis külvati 5 μ l tilkadena LB agarsöötme tassidele, kuhu oli lisatud erinevaid kemikaale (tetratsükliin, kanamütsiin, streptomütsiin, parakvaat, nitrokinoliin, bensüülpenitsilliin, NaCl, tsiprofloksatsiin või rifampitsiin). Kontrolltassidele kemikaale ei lisatud. Tasse hoiti 24 h temperatuuril 30 °C ning võrreldi erinevate tüvede tundlikkust vastavatele kemikaalidele.

2.2.12. Biofilmi moodustumise mõõtmine

Biofilmi mõõtmiseks kasvatati bakterikultuuri ette üleöö (~20 h) LB vedelsöötmes temperatuuril 30 °C. Üleöö kultuurist tehti polüstüreenist mikrotiiterplaadi (Greiner bio-one 655180) kannu 50-kordne lahjendus 100 μ l-sse värskesse LB vedelsöötmesse. Rakke kasvatati staatiliselt 24 h temperatuuril 30 °C. Tekkinud biofilmi hulga määramiseks värviti rakke 25 μ l 1%-lise kristallvioleti vesilahusega 15 minutit. Seejärel eemaldati värvilahus koos vabade rakkudega ning allesjäänud biofilmi pesti kaks korda 150 μ l deioniseeritud veega. Biofilmi kinni jäänud värvi välja pesemiseks lisati mikrotiiterplaadi kannu kaks korda 180 μ l 96 %-list etanooli ning saadud värvi-etanooli segu koguti puhtale mikrotiiterplaadile. Biofilmist välja pestud värvilahust lahjendati veega kolm korda ning saadud lahuse optiline tihedus mõõdeti lainepikkusel 540 nm.

2.2.13. Persistorite arvukuse määramine

Persistorite arvukuse määramiseks kasvatati rakud ette üleöö (~20 h) LB vedelsöötmes temperatuuril 30 °C. Üleöö kultuurist tehti 50-kordne lahjendus värskesse LB söötmesse ning streptomütsiiniga töötluks kasvatati rakke erineva optilise tiheduseni ($OD_{580} \sim 0,4$, 0,7-0,8 või 0,8-0,9). Bensüülpenitsilliiniga töötlemiseks kasvatati rakukultuur OD_{580} -ni 0,6-0,7. Seejärel viidi 1,4 ml bakterikultuuri eppendorfi tuubi, rakkudele lisati antibiootikum (Sm ja Bp vastavalt kontsentratsioonidega 300 μ g/ml ja 3 mg/ml) ja inkubeeriti termostaadis temperatuuril 30 °C 4-5 tundi. Iga tunni tagant võeti proov, millest tehti 10-kordsete lahjenduste rida, mis külvati LB agarsöötme tassidele 5 μ l tilkadena. Tasse inkubeeriti üleöö

temperatuuril 30 °C. Järgmisel päeval loeti kokku söötmele tekkinud kolooniad, lugemiseks valiti võimalikult suure rakutihedusega lahjendusest tehtud külv ning arvutati ellujäänud (kolooniaid moodustavate) bakterite hulk ühe milliliitri rakukultuuri kohta. Statistiliseks analüüsiks kasutati Student T-testi.

2.2.14. Konkurentsikatse

Konkurentsikatses segati kokku *P. putida* algse ja $\Delta 13TA$ tüvede üleöö (~20 h) kasvatatud bakterikultuurid OD₅₈₀ järgi suhtes 1:1. Värsket LB vedelsöödet inokuleeriti saadud segakultuuri 50-kordse lahjendusega ning kasvatati ~24 h temperatuuril 30 °C. 24 h möödudes võeti tüvede suhtelise hulga määramiseks välja proov, mis külmutati ja lisaks inokuleeriti värsket LB vedelsöödet segakultuuri 50-kordse lahjendusega. Katse kestis kokku 8 päeva ning igal päeval külvati segakultuuri edasi värskesse LB vedelsöötmesse ning võeti proov. Seejärel proovid sulatati ning tüvede suhteline hulk määrati *graTA* lookus-spetsiifilise PCR-i abil, kasutades praimereid 1585Sac ja 1585Acc. Tekkinud erineva pikkusega PCR-i produktid võimaldavad tüvesid omavahel eristada.

Erinevate tüvede suhet ilmestava kaliiber-PCR-i saamiseks segati kokku üleöö (~20 h) ette kasvatatud bakterikultuurid erinevates suhetes OD₅₈₀ järgi (10:0 – 0:10) ning tüvede suhteline hulk määrati eelpool kirjeldatud viisil *graTA* lookus-spetsiifilise PCR-i abil.

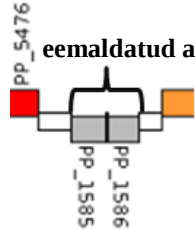
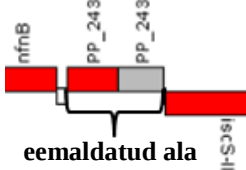
2.3 Tulemused

2.3.1. $\Delta 13TA$ tüve konstrueerimine

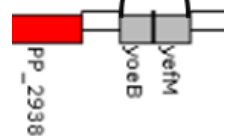
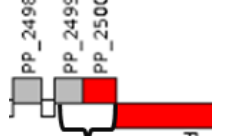
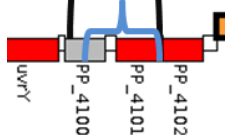
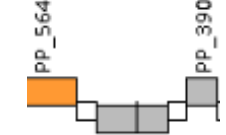
Nagu eespool mainitud on *P. putida*'l erinevate ennustuste kohaselt 8 (Pandey ja Gerdes, 2005), 9 (Molina *et al.*, 2016), 12 (Makarova *et al.*, 2009) või 15 TA-süsteemi (Shao *et al.*, 2011). Erinevaid ennustusi omavahel võrreldes valisime analüüsimiseks 14 TA-süsteemi TADB andmebaasist (Shao *et al.*, 2011) ning lisaks ühe RASTA-Bacteria algoritmiga ennustatud TA-süsteemi (Sevin ja Barloy-Hubler, 2007) ehk kokku 15 TA-süsteemi.

Selleks, et uurida TA-süsteemide mõju *P. putida* kohasusele ja stressitaluvusele otsustasime konstrueerida mitmikmutandi, mille genoomist on kõik need 15 oletatavat tüüp II TA-süsteemi eemaldatud. Tabelis 1 on toodud nende TA-süsteemide valkude perekonnad, ortoloogide arv teistes pseudomonaadides, toksiini ennustatud funktsioonid, süsteemide eemaldamise järjekord mitmikmutandis ja lookuse skemaatiline joonis. Mitmikmutandi konstrueerimist alustasime varem iseloomustatud $\Delta graTA$ tüvest (Tamman *et al.*, 2014), mille genoomist eemaldasime üksteise järel 12 süsteemi ning saime TA-süsteemide koosmõju uurimiseks mitmikmutandi $\Delta 13TA$ (Tabel 1). Süsteeme, mida kodeerivad lookused PP4100-4101 ja PP3899-3900 mitmikmutandil ei deleteeritud, sest nende eemaldamisel kaasnes TA-süsteemidest sõltumatu fenotüüp (vt järgnevaid peatükke). Lisaks konstrueerisime iga süsteemi kohta ka üksikmutandi, et oleks võimalik näha üksiku süsteemi puudumise mõju.

Tabel 1. *P. putida* oletatavad TA-süsteemid

Järjekord operonis	Lookus	Perekond	Ortoloogid pseudomonaadides ^a	Toksiini ennustatud funktsioon ^b	Mitmik-mutant	Paiknemine genoomis ^c
T	PP1586 (graT)	higB	29	Inhibeerib ribosoomi biogeneesi, ribosoom-sõltuv mRNAas	$\Delta 1TA$	
AT	PP1585 (graA)	higA	33			
AT	PP2433		15		$\Delta 2TA$	
T	PP2434		18			

T	PP1199	higB	12	Ribosoom-sõltuv mRNAas	Δ3TA	
AT	PP1198	higA	20			
T	PP1480	hicA-1	8	Ribosoom-sõltumatu mRNAas	Δ4TA	
AT	PP1479	hicB-1	12			
T	PP5435	relE	-	Ribosoom-sõltuv mRNAas	Δ5TA	
AT	PP0274	higA	14			
T	PP4205	mqsR	13	Ribosoom-sõltumatu mRNAas	Δ6TA	
AT	PP4204	mqsA	13			
AT	PP0770	mazE	6		Δ7TA	
T	PP0771	mazF	6	Ribosoom-sõltumatu mRNAas		
AT	PP1716	hipB	47		Δ8TA	
T	PP1717		43			
T	PP4530		10		Δ9TA	
AT	PP4529		9			
AT	PP4151		10		Δ10TA	
T	PP4152	vapC	9	RNAas		

AT	PP1268	relB	9		Δ11TA	eemaldatud ala 
T	PP1267	relE	8	Ribosoom-sõltuv mRNAs		
AT	PP2940	yefM	7		Δ12TA	eemaldatud ala 
T	PP2939	yoeB	6	Ribosoom-sõltuv mRNAs		
AT	PP2499		4		Δ13TA	 eemaldatud ala
T	PP2500	relE	1	Ribosoom-sõltuv mRNAs		
T	PP4101		23		-	eemaldatud ala varl 
AT	PP4100		22			
T	PP3900	hicA-2	4	Ribosoom-sõltumatu mRNAs	-	
AT	PP3899	hicB-2	4			

^a Andmed ortoloogide kohta pärinevad leheküljelt www.pseudomonas.com (Winsor *et al.*, 2009), ja GraTA, mille andmed on võetud Tamman jt artiklist (Tamman *et al.*, 2014).

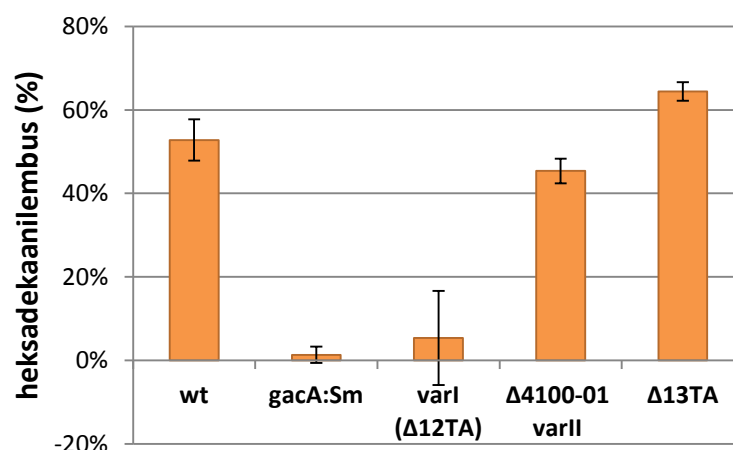
^b Katseliselt on tõestatud GraT ((Ainelo *et al.*, 2016); Ainelo, avaldamata andmed) ja MazF toksiinide funktsioon (Miyamoto *et al.*, 2016).

^c Genoomilõigud (mõõtkavad erinevad) on võetud leheküljelt www.pseudomonas.com (Winsor *et al.*, 2009). Geenid on tähistatud värviliste kastidega vastavalt kodeeritava valgu lokalisatsioonile: punane – tsütoplasma, oranž – sisemembraan, roheline – välismembraan, hall – lokalisatsiooni pole ennustatud. Ülemiselt ahelalt kodeeritud geenid paiknevad üleval, vastasahelalt kodeeritud geenid allpool horisontaalset keskjoont. Valgega on tähistatud geenidevaheline ala.

2.3.2. PP4100-4101 operoni eemaldamisel on polaarne efekt *uvrY/gacA* geenile

PP4100-4101 operon asub genoomis *uvrY/gacA* geeni (edaspidi *gacA*) ees – nende geenide vaheline ala on vaid 62 ap. GacA on GacS/GacA kahekomponendilise süsteemi regulaatorvalk, mis reguleerib *P. aeruginosa*'s ja *P. syringae*'s paljude virulentsusega seotud geenide avaldumist, sealhulgas ka biofilmi tootmist ja liikuvust (Heeb ja Haas, 2001; Parkins *et al.*, 2001; Lapouge *et al.*, 2008; Cha *et al.*, 2012). Ka *P. putidas*'s osaleb GacS/GacA süsteem biofilmi regulatsioonil (López-Sánchez *et al.*, 2016). Meie grupi varasemad uuringud

on näidanud, et GacS/GacA defektsuse üheks ilmekamaks fenotüübiks on rakupinna hüdrofoobsuse vähenemine (Putrinš ja Hõrak, avaldamata andmed), mis on mõõdetav nn BATH (*bacterial adherence to hydrocarbons*) katsega, kus baktereid töödeldakse n-heksadekaaniga. Selgus, et terve PP4100-4101 lookuse puudumine põhjustab *gacA* katkestustüvele sarnase fenotüübi (Joonis 5), kuigi Δ TA tüve *gacA* geen on terve. Kui hüdrofoobse n-heksadekaani lisamisel metsiktüüpi *P. putida* bakterikultuurile lähevad umbes pooled bakteritest vesilahusest heksadekaani faasi, siis *gacA* katkestusmutandi ja Δ PP4100-4101 mutandi (*varI*(Δ 12TA)) rakud faasi ei vaheta ning jäävad vesilahusesse (Joonis 5). Kui Δ PP4100-4101 tüvi konstrueerida nii, et genoomi jääb alles pool PP4100 antitoksiini geenist (Δ PP4100-01 *varII*, Tabel 1), käitub mutant BATH katses sarnaselt metsiktüvele (Joonis 5). Nendest tulemustest järeldasime, et PP4100-4101 operoni eemaldamisel on *gacA* geeni ekspressioonile polaarne efekt ning seepärast otsustasime TA-mitmikmutandi konstrueerimisel seda lookust mitte kaasata.

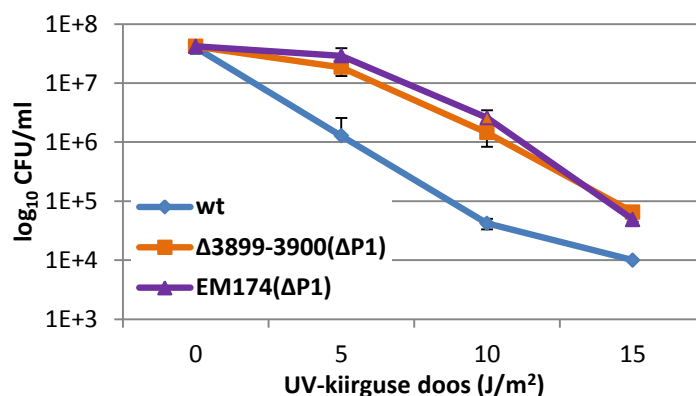


Joonis 5. Bakterikultuuri hüdrofoobsuse analüüs n-heksadekaaniga. Esitatud on *P. putida* metsiktüve (wt), *gacA* geeni katkestusmutandi (*gacA:Sm*), PP4100-4101 operoni deletsiooniga tüvede [*varI*(Δ 12TA) ja Δ 4100-01*varII*] ja Δ 13TA tüve rakupopulatsiooni hüdrofoobsuse (heksadekaanilembuse) protsent. Toodud on kolme mõõtmise keskmised tulemused koos standardhälbega.

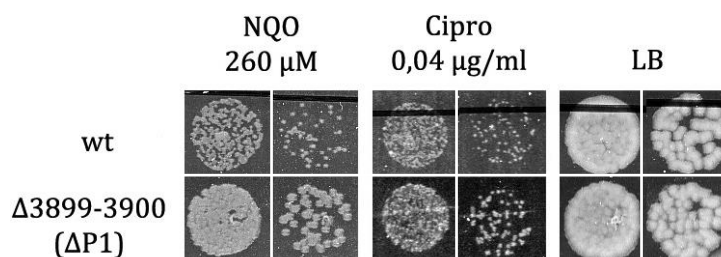
2.3.3. PP3899-3900 TA-süsteem stabiliseerib profaagi P1

PP3899-3900 operon paikneb *P. putida* genoomis profaag P1 koosseisus. *P. putida* profaag P1 on 54,7 kb pikkune ning sisaldab kokku 72 kodeerivat järjestust. On näidatud, et profaag P1 püsib *P. putida* genoomis väga stabiilselt (Martinez-Garcia *et al.*, 2015). Kui ma aga üritasin PP3899-3900 lookust genoomist eemaldada, lahkus ühtlasi ka terve P1 profaag. Kuue erineva deletsioonmutandi sekveneerimine näitas, et kõigil oli genoomist lahkunud täpselt ühesugune DNA lõik – 55 799 bp pikkune ala. Minu konstrueeritud tüvi Δ 3899-3900(Δ P1),

mille genoomist on P1 spontaanselt lahkunud, on fenotüübilt sarnane varem kirjeldatud *P. putida* EM174(Δ P1) tüvega, millest on P1 rekombinantselt eemaldatud (Martinez-Garcia *et al.*, 2015). Profaag P1 puudumisel on rakud võrreldes metsiktüvega vastupidavamad UV-kiirgusele (Joonis 6) ning taluvad veidi paremini nitrokinoliini ja tsiprofloksatsiini (Joonis 7).



Joonis 6. Δ 3899-3900(Δ P1) tüvi on UV-kiirgusele vastupidavam kui metsiktüvi. *P. putida* metsiktüve (wt) ja P1 profaagita tüvede [Δ 3899-3900(Δ P1) ja EM174(Δ P1)] eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudest tehti 10-kordsete lahjenduste rida, mis külvati LB agarsöötme tassidele. Tasse kiiritati UV-kiirguse doosidega 5, 10 või 15 J/m², kontrolltasse ei kiiritatud. Arvutati ellujäänud bakterite hulk ühe milliliitri rakukultuuri kohta. Toodud on kahe sõltumatu katse keskmised tulemused koos standardhälbega.



Joonis 7. Δ 3899-3900(Δ P1) tüvi kasvab nitrokinoliini ja tsiprofloksatsiini juuresolekul metsiktüvest paremini. *P. putida* metsiktüve (wt) ja Δ 3899-3900(Δ P1) tüvede kasv nitrokinoliini ja tsiprofloksatsiini sisaldavatel LB agarsöötme tassidel. Paneelide kohal on märgitud nitrokinoliini ja tsiprofloksatsiini lõppkontsentratsioon söötmes. Rakke on lahjenduste tilkades umbes 500 ja 50. Pilt on tehtud pärast 24 h kasvatamist temperatuuril 30 °C. Katset on korratud kaks korda.

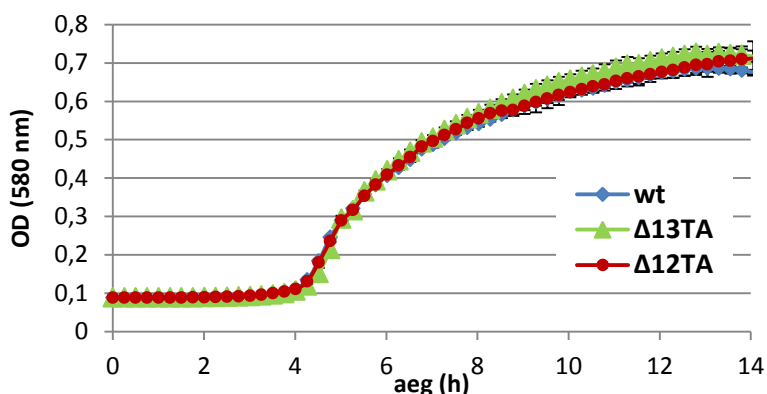
2.3.4. 13 TA-süsteemi puudumine ei mõjuta testitud tingimustel oluliselt *P. putida* kohasust

Selleks, et välja selgitada, kas TA-süsteemide eemaldamine mõjutab *P. putida* kohasust ning stressitaluvust, võrdlesin Δ 13TA ja Δ 12TA tüvesid metsiktüvega, testides bakterite kasvukiirust, stressitaluvust erinevate kemikaalide juuresolekul, tolerantust UV-kiirgusele,

persistorakkude teket, biofilmi moodustamist ja kohasust konkurentsikatses. $\Delta 12TA$ on katsetesse kaasatud kontrollina, et näidata, millisel määral kattub mitmikmutantide fenotüüp.

2.3.4.1. TA-süsteemide mitmikmutantide kasvukiirus sarnaneb algse tüvega

TA-süsteemide mitmikmutantide $\Delta 12TA$ ja $\Delta 13TA$ kasvukiiruseid võrdlesin algse tüvega, kasvatades baktereid mikrotiiterplaadil LB vedelsöötmes temperatuuril 30 °C. Tulemused joonisel 8 näitavad, et TA-süsteemide eemaldamine ei mõjuta *P. putida* kasvu rikkas söötmes.



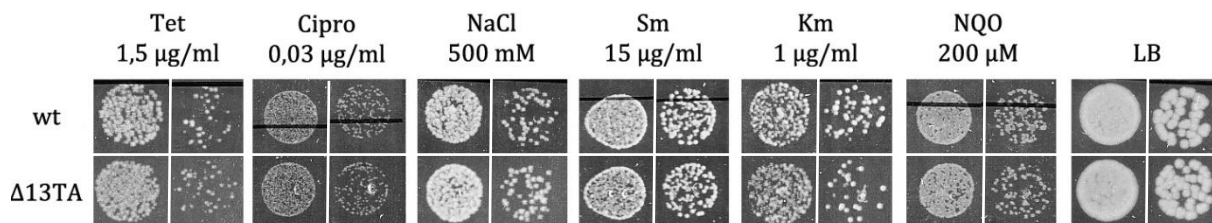
Joonis 8. TA-süsteemide mitmikmutantide kasvukiirus ei ole muutunud. *P. putida* metsiktüve (wt), $\Delta 12TA$ ja $\Delta 13TA$ tüvede kasvukõverate võrdlus. Rakke kasvatati mikrotiiterplaadil LB vedelsöötmes temperatuuril 30 °C. Iga tüve puhul on toodud kolme mõõtmise keskmised tulemused koos standardhälbega.

2.3.4.2. $\Delta 13TA$ tüve stressitaluvus ja UV-tolerantsus ei ole muutunud

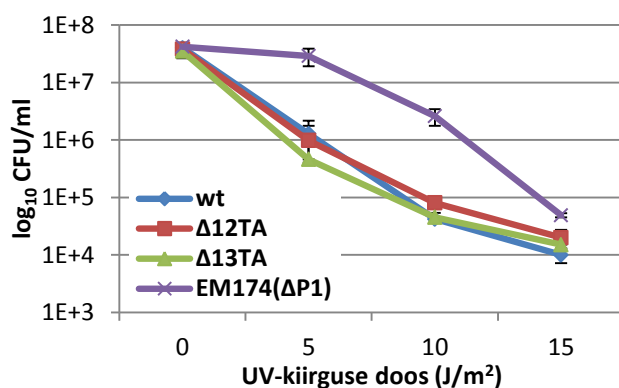
Kuna TA-süsteeme seostatakse bakterite stressitaluvuse suurendamisega (Gerdes *et al.*, 2005; Wang ja Wood, 2011), siis järgnevalt testisin $\Delta 13TA$ stressitaluvust erinevate kemikaalide juuresolekul. Selleks võrdlesin $\Delta 13TA$ ja metsiktüve kasvu LB agarsöötme tassidel, kuhu oli lisatud üks järgnevatest kemikaalidest: tetratsükliin, kanamütsiin, streptomütsiin, parakvaat, nitrokinoliin, bensüülpenitsilliin, NaCl, tsiprofloksatsiin või rifampitsiin. Valisin need ühendid, sest nad mõjutavad erinevaid protsesse rakus: tetratsükliin, kanamütsiin ja streptomütsiin inhibeerivad translatsiooni, parakvaat ja nitrokinoliin põhjustavad oksüdatiivset stressi, bensüülpenitsilliin inhibeerib peptidoglükaani sünteesi, NaCl põhjustab osmootset šokki, tsiprofloksatsiini tõttu tekivad DNA katked ning rifampitsiin inhibeerib transkriptsiooni.

Testisin nende ühendite erinevaid kontsentratsioone ning joonisel 9 on ära toodud kontsentratsioonid, mille juures oli näha selget kasvu inhibeerivat efekti. Leidsin, et nende kemikaalide juuresolekul ei olnud ühelgi juhul näha erinevusi $\Delta 13TA$ ja metsiktüve kasvus (Joonis 9). Ka üksikute süsteemide deletsioonmutandid talusid neid stressitingimusi

metsiktüvega võrdväärselt (andmeid pole esitatud). Lisaks ei erinenud mitmikmutandid metsiktüvest ka UV-tolerantsuse poolest (Joonis 10).



Joonis 9. $\Delta 13TA$ tüve stressitaluvus ei ole muutunud. *P. putida* metsiktüve (wt) ja $\Delta 13TA$ kasv LB agarsöötmes, kuhu on lisatud erinevaid kemikaale. Paneelide kohal on märgitud tetratsükliini, tsiprofloksatsiini, NaCl-i, streptomütsiini, kanamütsiini ja nitrokinoliini lõppkontsentratsioon söötmes. Rakke on lahjenduste tilkades umbes 500 ja 50. Pilt on tehtud peale 24 h kasvatamist temperatuuril 30 °C. Katset on korratud kolm korda.

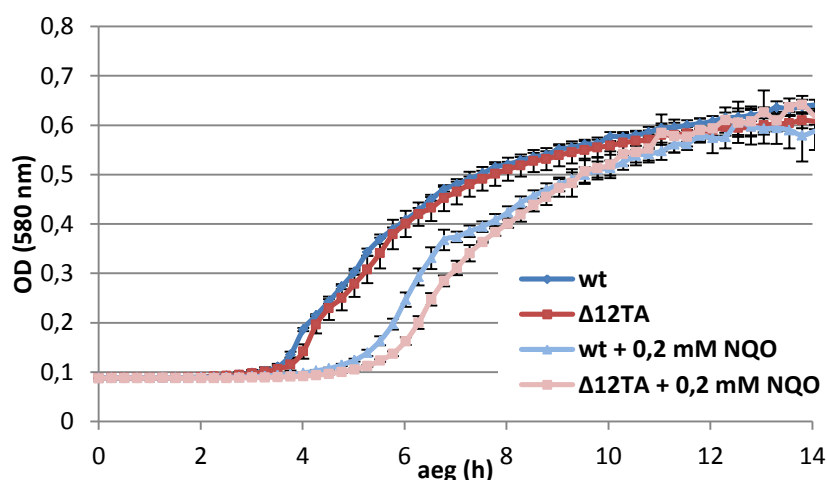


Joonis 10. TA-süsteemide mitmikmutantide UV-tolerantsus on võrreldav *P. putida* metsiktüvega. *P. putida* metsiktüve (wt), $\Delta 12TA$, $\Delta 13TA$ ja EM174($\Delta P1$) tüvede eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudest tehti 10-kordsete lahjenduste rida, millest külvati 5 µl LB agarsöötme tassidele. Tasse kiiritati UV-kiirguse doosidega 5, 10 või 15 J/m², kontrolltasse ei kiiritatud. Ellujäänud bakterite hulk arvutati ühe milliliitri rakukultuuri kohta. Võrdlusena kaasati katsesse EM174($\Delta P1$) tüvi, millel on P1 profaagi puudumise tõttu suurenenud tolerantsus UV-kiirgusele. Toodud on kahe sõltumatu katse keskmised tulemused koos standardhälbega.

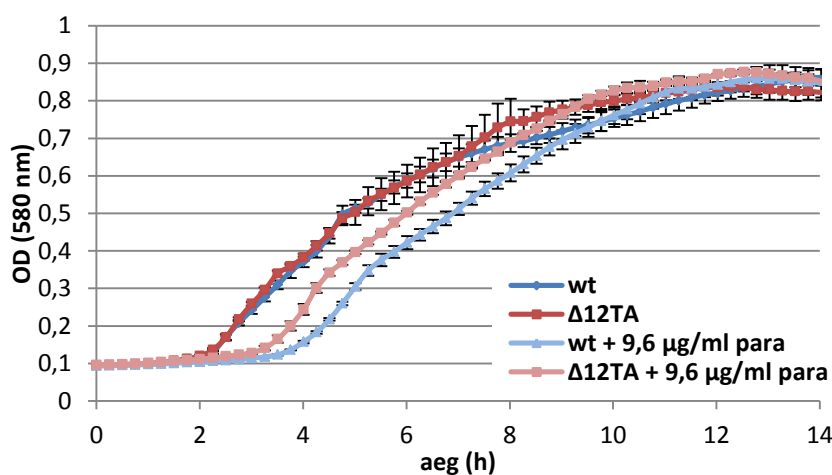
2.3.4.3. Nitrokinoliini ja parakvaadi juuresolekul kasvava $\Delta 12TA$ tüve lag-faasi pikkus erineb *P. putida* metsiktüvest

Kuigi agarsöötmes polnud antibiootikumidel TA-süsteemide mitmikmutantide kasvule märgatavat mõju, otsustasin testida antibiootikumide mõju bakteri kasvule ka vedelkultuuris. Selleks kasvasin baktereid vedelsöötmes mikrotiiterplaadil antibiootikumi juuresolekul. Antibiootikumidest kasutasin nitrokinoliini, parakvaati ning tetratsükliini, mida oli lisatud söötmesse erinevates kontsentratsioonides. Selgus, et nitrokinoliini juuresolekul on $\Delta 12TA$

lag-faas pikem kui metsiktüvel (Joonis 11), samas kui parakvaadiga söötmes on tulemus vastupidine ja $\Delta 12TA$ alustab kasvu varem kui metsiktüvi (Joonis 12). Tetratsükliini lisamisel söötmesse metsiktüve ja $\Delta 12TA$ kasvukõverates erinevusi polnud (tulemusi pole näidatud).



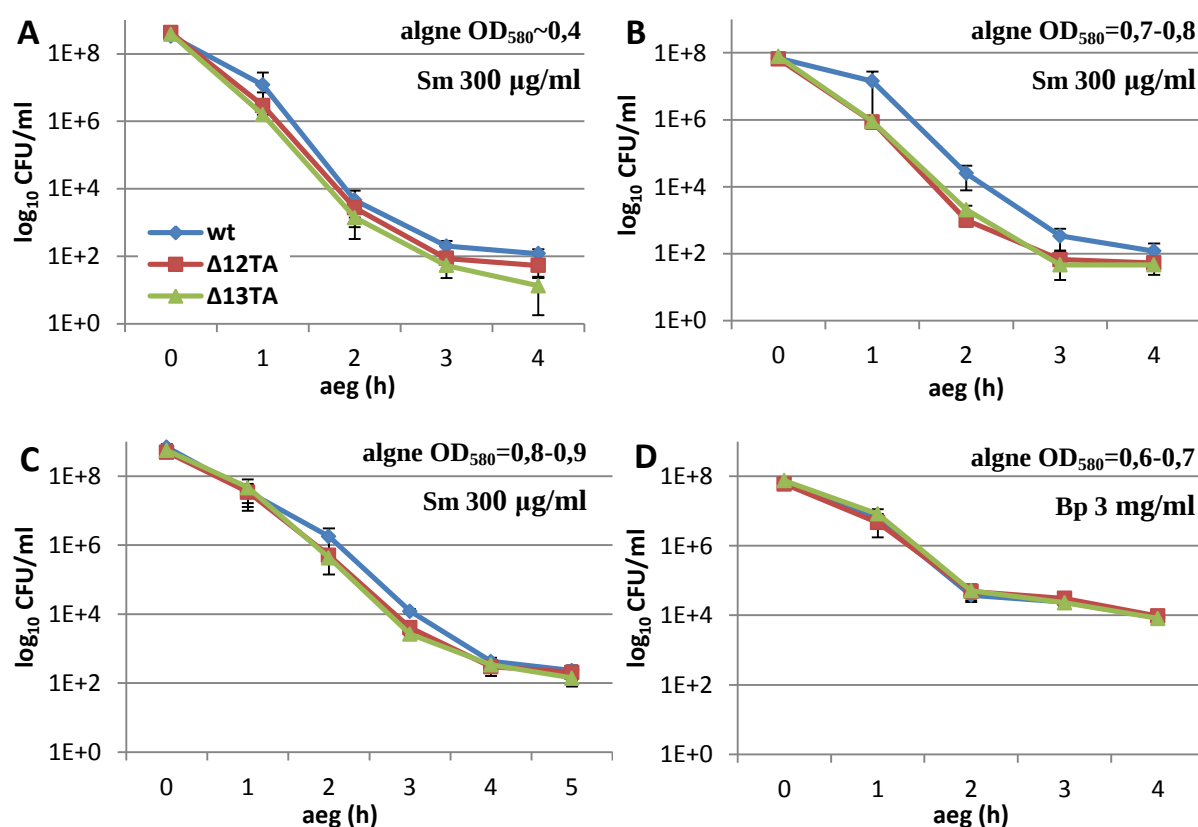
Joonis 11. Nitrokinoliini juuresolekul on $\Delta 12TA$ lag-faas pikem kui metsiktüvel. *P. putida* metsiktüve (wt) ja $\Delta 12TA$ kasvukõverate võrdlus nitrokinoliini juuresolekul (lõppkontsentratsioon 0,2 mM). Rakud kasvasid mikrotiiterplaadil LB vedelsöötmes temperatuuril 30 °C. Iga tüve puhul on toodud nelja mõõtmise keskmised väärtused koos standardhällbega. Katset on korratud kaks korda, esitatud on ühe katse tulemused.



Joonis 12. Parakvaadi juuresolekul on $\Delta 12TA$ lag-faas lühem kui metsiktüvel. *P. putida* metsiktüve (wt) ja $\Delta 12TA$ kasvukõverate võrdlus parakvaadi juuresolekul (lõppkontsentratsioon 9,6 μg/ml). Rakud kasvasid mikrotiiterplaadil LB vedelsöötmes temperatuuril 30 °C. Iga tüve puhul on toodud nelja mõõtmise keskmised väärtused koos standardhällbega. Katset on korratud kaks korda, esitatud on ühe katse tulemused

2.3.4.4. 13 TA-süsteemi ei mõjuta *P. putida* persistorite hulka

TA-süsteeme peetakse oluliseks persistorite moodustamisel (Helaine *et al.*, 2014; Germain *et al.*, 2015) ning on näidatud, et mitme TA-süsteemi puudumisel võib olla kumulatiivne efekt persistorite tekkele (Maisonneuve *et al.*, 2011). Selleks, et mõõta $\Delta 12TA$, $\Delta 13TA$ ja *P. putida* algse tüve persistorite hulka, töötlesin eksponentsiaalse kasvufaasi rakke streptomütsiini või bensüülpenitsilliiniga, mille lõppkontsentratsioonid olid vastavalt 300 $\mu\text{g/ml}$ või 3 mg/ml ning järgneva nelja-viie tunni jooksul määrasin iga tunni järel ellujäänud rakkude hulka. Nii streptomütsiini kui bensüülpenitsilliiniga tehtud tapmiskatsete põhjal võib järeldada, et $\Delta 12TA$, $\Delta 13TA$ ja metsiktüvede populatsioonid omavahel persistorite hulga poolest ei erine, sest 3.-5. tunnil pärast antibiootikumi lisamist oli ellujäänud bakterite hulk sarnane (Joonis 13).

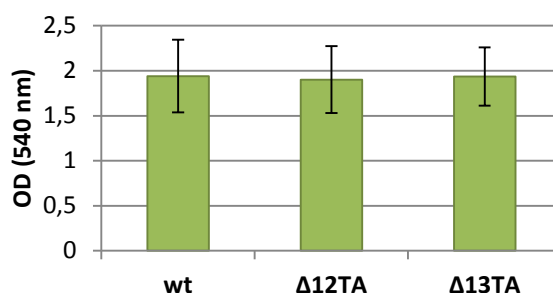


Joonis 13. TA-süsteemide eemaldamine ei mõjuta persistorite hulka. *P. putida* metsiktüve (wt), $\Delta 12TA$ ja $\Delta 13TA$ tüvede eksponentsiaalse kasvufaasi rakke töödeldi streptomütsiiniga (A, B, C) (Sm; lõppkontsentratsioon 300 $\mu\text{g/ml}$) või bensüülpenitsilliiniga (D) (Bp; lõppkontsentratsioon 3 mg/ml). Antibiootikumi lisamisel oli rakkude OD₅₈₀ järgnev: (A) OD~0,4 (B) OD=0,7-0,8 (C) OD=0,8-0,9 (D) OD=0,6-0,7. Ellujäänud rakkude hulk määrati iga tunni tagant. Iga tüve kohta on toodud vähemalt kolme katse keskmised tulemused koos standardhällbega.

Küll aga täheldasin kolmes sõltumatus katses tendentsi, et streptomütsiiniga töötlemisel langeb $\Delta 12TA$ ja $\Delta 13TA$ elusrakkude arvukus esimestel tundidel pärast antibiootikumi lisamist metsiktüvest natukene kiiremini, kusjuures see erinevus näis sõltuvat rakukultuuri tihedusest antibiootikumi lisamise hetkel (Joonis 13, paneelid A, B, C). Siiski näitas statistiline analüüs, et ühelgi juhul polnud erinevused metsiktüve ning mitmikmutantide tapmiskiirustes statistiliselt olulised (p väärtused $>0,13$).

2.3.4.5. $\Delta 13TA$ biofilmi moodustamine ei ole muutunud

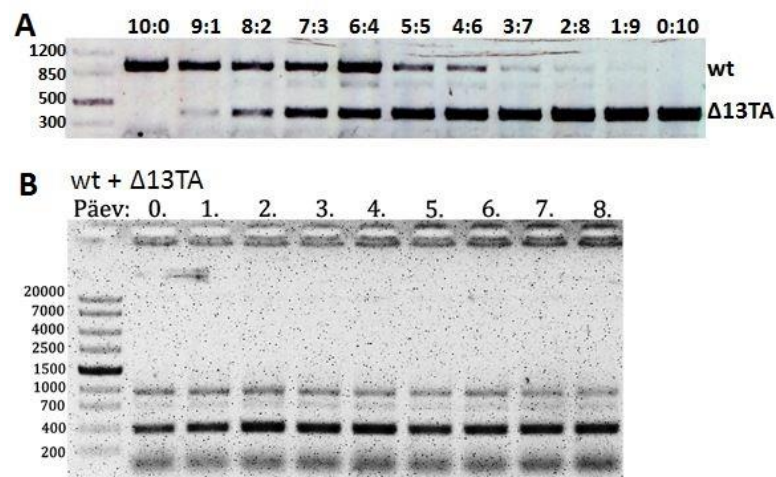
Kuna on näidatud, et mõned TA-süsteemid on olulised ka biofilmi regulatsioonis (Gonzalez Barrios *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009), võrdlesin $\Delta 12TA$ ja $\Delta 13TA$ tüvede ja metsiktüve biofilmi moodustumist. Selgus, et TA-mitmikmutandid moodustasid 24 h jooksul biofilmi metsiktüvega võrdselt (Joonis 14).



Joonis 14. TA-süsteemide eemaldamine ei mõjuta *P. putida* biofilmi moodustumist. *P. putida* metsiktüve (wt), $\Delta 12TA$ ja $\Delta 13TA$ biofilmi kogus mõõdeti pärast bakterite kasvu 24 h temperatuuril 30 °C. Iga tüve puhul on esitatud vähemalt 10 paralleeli keskmised tulemused koos standardhälbega. Katset on tehtud üks kord.

2.3.4.6. TA-süsteemid ei mõjuta *P. putida* konkurentsivõimet toitaineterikkas söötmes

Et võrrelda $\Delta 13TA$ konkurentsivõimekust *P. putida* metsiktüvega, kasvasin neid tüvesid koos segakultuuris. Eeldasin, et kui TA-süsteemide olemasolu peaks andma kasvueelise metsiktüvele, siis konkureeritakse segakultuurist välja $\Delta 13TA$ tüvi. Kui aga TA-süsteemid peaksid olema bakterile koormaks, siis konkureeritakse segakultuurist välja metsiktüvi. Selgus, et vähemalt toitaineterikkas söötmes kasvades ei mõjuta TA-süsteemide puudumine *P. putida* konkurentsivõimet ei positiivselt ega negatiivselt, sest $\Delta 13TA$ ja metsiktüve vahekord jäi segakultuuris 8 päeva jooksul muutumatuks (Joonis 15).



Joonis 15. TA-süsteemide puudumine ei mõjuta *P. putida* konkurentsivõimet. (A) *P. putida* metsiktüve (wt) ja $\Delta 13TA$ suhet ilmestav kaliiber-PCR. Metsiktüve-spetsiifiline PCR-i fragment on umbes 1050 ap ning $\Delta 13TA$ oma 450 ap pikkune. (B) *P. putida* metsiktüve (wt) ja $\Delta 13TA$ segakultuuri kasvatati LB vedelsöötmes temperatuuril 30 °C. Iga 24 h järel tehti kultuurist 50-kordne lahjendus värskesse söötmesse ning määrati *graTA* lookus-spetsiifilise PCR-i abil tüvede suhteline hulk. Katse kestis 8 päeva. Katset on tehtud üks kord.

2.3.5. Toksiinide funktsionaalsuse analüüs antitoksiini deletsioonmutantidega

Kuna TA-süsteemide puudumine ei mõjutanud *P. putida* kasvu ega stressitaluvust, tekkis küsimus, kas nende TA-süsteemide toksiinid on üldse funktsionaalsed. Vaid GraTA ja MazEF süsteemide puhul on teada, et nende toksiinid on aktiivsed (Tamman *et al.*, 2014; Miyamoto *et al.*, 2016) ning *graA* geeni puudumine mõjutab bakteri kasvukiirust ja stressitaluvust ning häirib ribosoomi biogeneesi (Tamman *et al.*, 2014; Ainelo *et al.*, 2016). Selleks, et testida teiste TA-süsteemide toksiinide funktsionaalsust, kavatsesime konstrueerida kõigi käesolevas töös uuritud TA-süsteemide antitoksiinide deletsioontüved (Tabel 2). Kuigi tavaliselt tehakse toksiini funktsionaalsuse uurimiseks plasmiidseid konstrukte, millelt ekspresseeritakse toksiini (Amitai *et al.*, 2004; Keren *et al.*, 2004b; Korch ja Hill, 2006), pooldasime meie genoomses lookuses deletsioonide tegemist kui loomulikumat lähenemist. Eeldasime, et kui antitoksiini geeni on võimalik eemaldada, siis on antud toksiin kas ainult mõõdukalt toksiline (sarnaselt GraT-le) või pole funktsionaalne ning kui antitoksiini geeni eemaldada ei saa, viitab see tugevale toksiini mõjule.

Tabelis 2 on ära toodud kõik konstrueeritud antitoksiini deletsioontüved. Süsteemide HigBA, RelE/HigA ning PP4151-4152 antitoksiini geeni ei õnnestunud meil genoomist eemaldada kolmel sõltumatul proovimisel, mis viitab sellele, et nende süsteemide toksiin on bakterile väga toksiline ning ilma seda neutraliseeriva antitoksiinita ei suuda bakter kasvada. Lisaks

oleme proovinud eemaldada ka profaagis P1 asuvat PP3899-3900 süsteemi antitoksiini geeni (Rita Hõrak), kuid kuna selle käigus lahkus terve profaag, on alust arvata, et ka PP3900 toksiin on funktsionaalne. Süsteemide PP4529-4530, YefM/YoeB ja PP2499-2500 antitoksiini ei õnnestunud meil esimesel katsel eemaldada ning süsteemil PP4100-4101 ei ole me veel antitoksiini katkestada proovinud. Küll aga on antitoksiin edukalt eemaldatud lisaks varem kirjeldatud GraTA süsteemile ka PP2433-2434, HicAB-1, MqsRA, MazEF, PP1716-1717 ja RelBE operonidest nii, et toksiini geen jäi terveks.

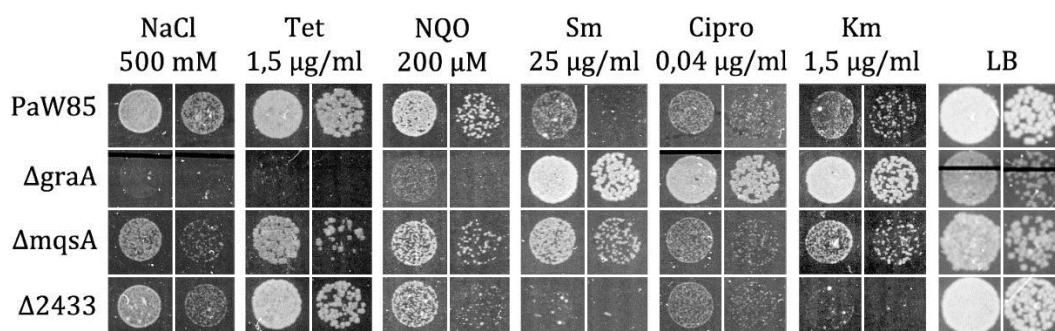
Toksiinide funktsionaalsust olen jõudnud testida lisaks varem uuritud GraTA süsteemile vaid nelja süsteemi puhul (PP2433-2434, HicAB-1, MqsRA, MazEF), kui võrdlesin antitoksiini deletsioontüvede ja metsiktüve kasvu LB agarsöötme tassidel erinevate kemikaalide juuresolekul. Sarnaselt Tamman jt (2014) saadud tulemustele, nägin *graA* deletsioontüvel metsiktüvest aeglasemat kasvu LB agarsöötmel ning NaCl, tetratsükliini ja nitrokinoliini sisaldavatel söötmetel, samas kui streptomütsiini, tsiprofloksatsiini ja kanamütsiini juuresolekul kasvas mutant metsiktüvest paremini (Joonis 16).

Lisaks selgus, et *mqsA* antitoksiini geeni eemaldamisel on mutandi kolooniad metsiktüvest LB agarsöötmel veidi väiksemad (Joonis 16), mis tähendab, et *mqsA* deletsioontüve kasvukiirus on tahkel söötmel sarnaselt *graA* deletsioontüvega metsiktüvest aeglasem. Veel leidsin, et $\Delta mqsA$ tüvi kasvab metsiktüvest paremini streptomütsiini juuresolekul, kuid metsiktüvest kehvemini NaCl ja tetratsükliini lisamisel kasvukeskkonda (Joonis 16). PP2433 antitoksiini geenita bakter talub aga nitrokinoliini, streptomütsiini ja kanamütsiini halvemini kui metsiktüvi (Joonis 16). *mazE* ja *hicB-1* antitoksiinide geenide eemaldamine bakteri kasvu ja stressitaluvust nendes tingimustest ei mõjutanud (tulemusi pole näidatud).

Tabel 2. Antitoksiini deletsioontüved

TA-süsteem	Antitoksiini deletsioontüvi	Efekt
GraTA (PP1585-1586)	$\Delta graA$	temperatuurist sõltuv kasvu pärssumine, muutunud stressitaluvus, ribosoomi biogeneesi defekt
PP2433-2434	$\Delta 2433$	muutunud stressitaluvus
HigBA (PP1198-1199)	ei saa teha	
HicAB-1 (PP1479-1480)	$\Delta 1479$	testitud tingimustel ei ole
RelE/HigA (PP5435/ PP0274)	ei saa teha	

MqsRA (PP4204-4205)	Δ mqsA	muutunud stressitaluvus, kolooniate veidi aeglasem kasv agarsöötmel
MazEF (PP0770-0771)	Δ mazE	testitud tingimustel ei ole
PP1716-1717	Δ 1716	ei ole analüüsitud
PP4529-4530	proovitud 1x	
PP4151-4152	ei saa teha	
RelBE (PP1267-1268)	Δ 1268	ei ole analüüsitud
YefM/YoeB (PP2939-2940)	proovitud 1x	
PP2499-2500	proovitud 1x	
PP4100-4101	ei ole proovitud	
HicAB-2 (PP3899-3900)	Δ 3899(Δ P1)	profaag P1 lahkub genoomist



Joonis 16. Antitoksiini deletsioontüvede kasv agarsöötmel erinevate kemikaalide juuresolekul. *P. putida* metsiktüve (wt), *graA*, *mqsA* ja PP2433 deletsioontüvede kasv LB agarsöötmel, kuhu on lisatud erinevaid kemikaale. Paneelide kohal on märgitud NaCl, tetratsükliini, nitrokinoliini, streptomütsiini, tsiprofloksatsiini ja kanamütsiini lõppkontsentratsioon söötmes. Rakke on lahjenduste tilkades umbes 500 ja 50. Pilt on tehtud pärast 24 h kasvatamist temperatuuril 30 °C. Katset on tehtud kolm korda.

3. Arutelu

3.1. *P. putida* TA-süsteemid

Kromosomaalsete TA-süsteemide roll ei ole selge ning kirjanduses leidub vastuolulisi andmeid selle kohta, kas TA-süsteemid võiksid töötada ühtse võrgustikuna (Tsilibaris *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009; Maisonneuve *et al.*, 2011; Shan *et al.*, 2017). Sellest tulenevalt oli käesoleva töö peamiseks eesmärgiks välja selgitada, kas mitme TA-süsteemi puudumisel on mõju *P. putida* PaW85 kohasusele ja stressitaluvusele.

P. putida’l on ennustatud mitmeid kromosomaalseid TA-süsteeme ning erinevaid ennustusi võrreldes valisime välja 15 TA-süsteemi (Sevin ja Barloy-Hubler, 2007; Shao *et al.*, 2011), mida lähemalt analüüsida. Sarnaselt teistele bakteritele (Leplae *et al.*, 2011) on ka *P. putida* genoomis kõige rohkem RelE perekonna toksiine (Tabel 1). RelE perekonda kuuluvad lisaks RelE-le ka näiteks YoeB, HigB ja MqsR toksiinid ning neid on *P. putida*’l kokku seitse. Ka VapC perekonna toksiinid on bakterites väga levinud (Leplae *et al.*, 2011), kuid *P. putida* genoomis on neid vaid üks (Tabel 1). Lisaks on *P. putida*’l kaks HicA perekonna toksiini ja üks MazF perekonna toksiin ning neli oletatavat toksiini, mis ei kuulu ühtegi teadaolevasse toksiiniperekonda (Tabel 1). Kõige rohkem on *P. putida*’l HigA perekonna antitoksiine (HigA ja HipB) – kokku neli (Tabel 1). HigA perekonna antitoksiinid ongi bakterites kõige enam levinud (Leplae *et al.*, 2011). *P. putida* genoomis on ka kaks HicB perekonna antitoksiini geeni ning RelB, MqsA, MazE ja Phd (YefM) perekonna antitoksiine on kõiki vaid üks (Tabel 1). Viie *P. putida* antitoksiini perekonnad ei ole teada. *P. putida*’l on kokku kolm uut tüüpi TA-süsteemi, mille toksiinid ja antitoksiinid ei kuulu ühtegi teadaolevasse TA-valkude perekonda (Tabel 1).

Klassikalise TA-süsteemi operonis paikneb antitoksiini geen toksiini geenist eespool (Joonis 2), kuid leidub ka vastupidise geenide järjestusega TA-süsteemide operone (Gerdes *et al.*, 2005). *P. putida* 15 TA-süsteemist on vaid seitse süsteemi klassikalise operoni ülesehitusega ning lausa kaheksal süsteemil on toksiini geen operonis esimene (Tabel 1).

Mõnel *P. putida* TA-süsteemil on palju ortolooge ka teistes pseudomonaadides. Näiteks on PP1716-1717 süsteemil üle 40 ortoloogi ning PP4100-4101 süsteemil üle 20 ortoloogi erinevates *Pseudomonas*’e liikides (Tabel 1). Samas leidub ka süsteeme, mis on peamiselt levinud vaid *P. putida*’s, näiteks PP0770-0771, mille ortolooge leidub lisaks *P. putida*’le vaid *P. syringae*’s. Süsteemid, nagu PP1716-1717 ja PP4100-4101, mis on levinud paljudes pseudomonaadides, on tõenäoliselt evolutsiooniliselt vanemad ning levinud erinevatesse

pseudomonaadidesse nende ühisest eellasest. Kuna need süsteemid on pika aja jooksul paljudes pseudomonaadides püsima jäänud, võib see tähendada, et need süsteemid on bakterile suhteliselt tähtsamad kui väheste ortoloogidega süsteemid. Liigispetsiifilised süsteemid, nagu PP0770-0771, võivad aga olla genoomi suhteliselt hiljuti sattunud, näiteks mobiilsete elementide koosseisus, kus nende funktsioon võis olla nende elementide stabiliseerimine.

TA-süsteemid võivad erineda ka liigisiselt erinevate tüvede vahel. Kirjanduses on viiteid, et mõned TA-süsteemid võivad olla tähtsad eelkõige kindlates kasvutingimustes. Uuringus, kus võrreldi *P. putida* kliinilistes isolaatides ja keskkonnatüvedes leiduvaid TA-süsteeme, leiti, et kuigi mõned TA-süsteemid (PP0770-0771 ja PP2433-2434) on väga levinud nii kliinilistes isolaatides kui keskkonnatüvedes, leidub ka TA-süsteeme, mis on omased vaid keskkonnatüvedele (PP4204-4205 ja PP1479-1480) või kliinistele isolaatidele (Molina *et al.*, 2016). Võib arvata, et need TA-süsteemid, mida leidub vaid keskkonnatüvedes või kliinistes isolaatides, võivad olla bakterile vajalikud vastavas keskkonnas.

3.2. TA-süsteemide eemaldamisega kaasnevad polaarsed efektid

Deletsioonmutantide tegemisel on oluline jälgida, et ei rikutaks naabergeeni ekspressiooni. Kui eemaldatavale lookusele järgneb genoomis samasuunaline geen, võib selle lookuse eemaldamine rikkuda järgneva geeni avaldumist. Näiteks kahtlustatakse, et TA-süsteemide eemaldamine *E. coli* $\Delta 10$ mitmikmutandis on põhjustanud polaarseid efekte. Võrreldes metsiktüvega on mitmikmutandil vähenenud lisaks persistorite moodustumisele ka kohasus ning tsiprofloksatsiini MIC (Maisonneuve *et al.*, 2011; Ramisetty *et al.*, 2016a). Kuna lausa kuuetele *E. coli* TA-süsteemile kümnest järgneb genoomis samasuunaline geen, mille avaldumine võib olla mõjutatud TA-süsteemi eemaldamisest, oletataksegi, et $\Delta 10$ mitmikmutandi muutunud persistorite hulga põhjuseks võivad olla just polaarsed efektid (Ramisetty *et al.*, 2016a).

Nägin oma katsetes, et ühe *P. putida* TA-süsteemi eemaldamine genoomist mõjutas naabergeeni avaldumist. Nimelt selgus, et PP4100-4101 lookuse eemaldamine mõjutab kõrvalasuva *gacA* geeni ekspressiooni – vaatamata sellele, et *gacA* geen oli terve, avaldus PP4100-4101 lookuseta mutandil *gacA* defektsele tüvele sarnane vähenenud hüdrofoobsuse fenotüüp (Joonis 5). Samas ei esinenud sellist fenotüüpi mutandil, mille genoomi oli alles jätud pool PP4100 antitoksiini geenist (Joonis 5, Tabel 1). Need tulemused viitavad, et

PP4100 geeni tagaosas on *gacA* geeni avaldumist mõjutav promootor ning ilmselt vähendab terve PP4100-4101 lookuse eemaldamine oluliselt *gacA* geeni avaldumist.

Enamiku teiste *P. putida* TA-süsteemide eemaldamisel pole polaarseid efekte vaja karta, sest nendele lookustele ei järgne samasuunalisi geene. Siiski on lisaks PP4100-4101 süsteemile, mille täieliku eemaldamisega kaasnevad polaarsed efektid *gacA* avaldumisele, *P. putida*’l veel viis TA-süsteemi, mille eemaldamine võib mõjutada talle järgneva geeni avaldumist, sest nende lookuste taga paikneb samasuunaline geen (Tabel 1). PP2939-2940 lookusele järgneb samasuunaline geen PP2938 (Tabel 1). Samas on aga nende geenide vaheline ala üle 300 ap, mistõttu asuvad nad üksteisest tõenäoliselt piisavalt kaugel, et PP2939-2940 lookuse eemaldamine võiks mõjutada talle järgneva geeni avaldumist.

Süsteemi PP1198-1199 taga, 199 ap kaugusel, paikneb geen *rimO*, mis kodeerib ribosoomi metüültransferaasi ning süsteemi PP4151-4152 taga paikneb klass 3 aminotransferaasi kodeeriv geen PP4154, mis asub PP4151-4152 lookusest 212 ap kaugusel. Kuna nende TA-süsteemide ja neile järgnevate geenide vahe genoomis ei ole eriti pikk, on võimalik, et nad kuuluvad ühte operoni või kattub TA-süsteemidele järgnevate geenide promootorala süsteemi lookusega.

PP0770-0771 lookusele järgnev geen PP0772 kodeerib metallobeetalaktamaaside perekonda kuuluvat valku ning nende geenidevaheline ala on vaid 17 ap, mistõttu kuuluvad need geenid suure tõenäosusega ühte operoni. Ka hüpoteetilist valku kodeeriv PP4528 geen kuulub tõenäoliselt talle genoomis eelneva PP4529-4530 süsteemiga ühte operoni, sest nende geenide vahele jääb vaid 39 ap. Kuna PP0772 ja PP4528 geenid paiknevad tõenäoliselt TA-süsteemidega ühes operonis, võib neile eelneva TA-süsteemi lookuse eemaldamine suure tõenäosusega mõjutada nende geenide avaldumist.

Kuigi potentsiaalselt võib nelja viimasenamainitud süsteemi eemaldamisega kaasneda polaarseid efekte, ei näinud ma ühegi deletsioonmutandi puhul fenotüübilisi iseärasusi minu poolt testitud tingimustes. See võib tähendada, et TA-süsteemi taga paikneva geeni ekspressioon pole mutandis muutunud või kui geeni ekspressioon on muutunud, ei ilmne see testitud tingimustes. Kindlalt saab vaid öelda, et *P. putida* PP4100-4101 süsteemi eemaldamisega kaasnevad polaarsed efektid.

3.3. PP3899-3900 stabiliseerib genoomset profaagi

Kirjanduses on mitmeid näiteid, et analoogselt plasmiidsetele TA-süsteemidele, mis aitavad plasmidi populatsioonis säilitada, võib ka mõni genoomne TA-süsteem olla oluline mobiilse DNA, sh ka profaagide, kromosoomis säilitamisel (vt ptk 1.4.1). Minu saadud tulemused näitavad, et lookuse PP3899-3900 poolt kodeeritud HicAB-2 süsteemi funktsiooniks ongi P1 profaagi stabiliseerimine *P. putida* kromosoomis. Varem on näidatud, et P1 püsib *P. putida* genoomis väga stabiilselt (Martinez-Garcia *et al.*, 2015). Kui ma üritasin PP3899-3900 lookust eemaldada, lahkus P1 genoomist, kusjuures iga kord deleteerus täpselt sama 55 799 aluspaari pikkune DNA lõik. P1 lookuse analüüs näitas, et kummalgi pool faagi genoomi on 67 ap pikkune identne otsene kordusjärjestus ning võib oletada, et nende järjestuste vahel toimuva rekombinatsiooni tõttu profaag genoomist lahkubki. Tekkinud profaagita mutandil nägin sarnast fenotüüpi varem kirjeldatud EM174(Δ P1) tüvega, millest on P1 rekombinantset deleteeritud (Martinez-Garcia *et al.*, 2015). P1 profaagita rakud on võrreldes metsiktüvega vastupidavamad UV-kiirgusele (Joonis 6) ning veidi tolerantsemad nitrokinoliinile ja tsiprofloksatsiinile (Joonis 7), mis viitab, et profaagita bakterid tulevad paremini toime DNA kahjustuste ja oksüdatiivse stressiga (Martinez-Garcia *et al.*, 2015). Seega näitavad minu tulemused, et lookus PP3899-3900 kodeerib funktsionaalset TA-süsteemi, mille ülesandeks on analoogselt plasmiidsetele TA-süsteemidele mobiilse DNA, antud juhul profaagi stabiliseerimine.

3.4. TA-süsteemide eemaldamise mõju *P. putida* kohasusele

TA-süsteemide mõju uurimiseks konstrueerisin *P. putida* PaW85 Δ 13TA tüve, millest oli eemaldatud 13 tüüp II TA-süsteemi (Tabel 1) ning võrdlesin saadud tüve kohasust ja stressitaluvust erinevatel tingimustel *P. putida* PaW85 metsiktüvega. Sarnaselt *E. coli* Δ 10 tüvele, mille kasvukiirus ei ole metsiktüvega võrreldes muutunud (Maisonneuve *et al.*, 2011), ei näinud ka mina *P. putida* mitmikmutantidel ja metsiktüvel kasvukiiruses erinevusi rikkas söötmes (Joonis 8).

Kirjanduses on mitmeid viiteid, et TA-süsteemid aktiveeruvad stressi olukorras, näiteks translatsiooni või transkriptsiooni inhibeervate antibiootikumide lisamisel kasvukeskkonda (Sat *et al.*, 2001; Budde *et al.*, 2007; Jorgensen *et al.*, 2009; Christensen-Dalsgaard *et al.*, 2010). Kuna on ka viiteid, et TA-süsteemide kodeeritud toksiidid aitavad bakteritel stressitingimustega toime tulla (Ren *et al.*, 2014; Tamman *et al.*, 2014), võiks arvata, et TA-süsteemide eemaldamine võib mõjutada bakteri stressitaluvust. Mina aga ei näinud *P. putida* mitmikmutandi ja metsiktüve kasvus erinevusi LB agarsöötmel, kuhu oli lisatud

erinevaid antibiootikume või tekitatud osmootse stressi tingimused NaCl-ga (Joonis 9). Samuti ei olnud ka mitmikmutandi UV-tolerantsus võrreldes metsiktüvega muutunud (Joonis 10). Küll aga nägin, et teatud antibiootikumide lisamine vedelsöötmesse võib võrreldes metsiktüvega mitmikmutandi lag-faasi pikkust mõjutada. Nimelt pikenes mitmikmutandi lag-faas võrreldes metsiktüvega nitrokinoliini (Joonis 11) ning vähenes parakvaadi (Joonis 12) lisamisel söötmesse, kuid tetratsükliini lisamisel oli mitmikmutandi ja metsiktüve kasvukõver sarnane. Lisaks nägin, et streptomütsiiniga töötlemisel surevad mitmikmutandid metsiktüvest veidi kiiremini kates, kus mõõtsin persistorite hulka (Joonis 13, paneelid A, B, C). Tuleb siiski rõhutada, et need erinevused olid väikesed ja statistiliselt ebaolulised ning näiteks bensüülpenitsilliiniga töötlemisel ma erinevusi metsiktüve ja mitmikmutandi tapmiskiirustes ei näinud (Joonis 13, paneel D). Seega näitavad esialgsed tulemused, et TA-süsteemidel pole *P. putida* stressitaluvusele olulist mõju. Kui üldse, siis vaid teatud stressitingimustes võivad TA-süsteemid vähesel määral *P. putida* kohasust mõjutada. Seejuures vajab veel lähemalt uurimist, kas nähtud mõju on põhjustatud mõne üksiku süsteemi eemaldamisest või on oluline mitme süsteemi üheaegne puudumine.

Kirjanduses on näidatud, et *P. aeruginosa* ja *P. putida* ortoloogsete süsteemide HigBA ja GraTA toksiidid mõjutavad antitoksiini puudumisel bakteri biofilmi (Tamman, 2016; Wood ja Wood, 2016). Vaatamata sellele, ei mõjuta aga biofilmi tootmist *P. putida*’l terve GraTA süsteemi eemaldamine (Tamman, 2016). *E. coli*’s on aga näidatud, et viie TA-süsteemi puudumine mõjutab biofilmi teket, sest mutandil on vähenenud varajase (8 h) biofilmi moodustamine ning suurenenud 24 h jooksul toodetud biofilmi hulk (Kim *et al.*, 2009). Sellest lähtuvalt võrdlesin ma *P. putida* metsiktüve ning mitmikmutantide 24 h jooksul moodustunud biofilmi ning erinevusi nende tüvede biofilmi hulgas ei täheldanud (Joonis 14). Seega võib näha, et kuigi üksikud toksiidid võivad antitoksiini puudumisel mõjutada biofilmi tootmist, siis terve süsteemi või mitmete süsteemide puudumisel ei ole bakteri biofilmi tekkele tähtsust. Siiski ei saa täiesti kõrvale jätta ka võimalust, et põhjus miks ma mitmikmutandil biofilmi tekkel metsiktüvega erinevust ei näinud, võib seisneda selles, et ühe süsteemi eemaldamine suurendab ning teise süsteemi eemaldamine vähendab biofilmi moodustumist, mistõttu summaarselt pole efekti biofilmi tekkele näha.

TA-süsteemide tähtsusest persistorrakkude arvukusele on kirjanduses palju vastandlikke arvamusi. Kui ühelt poolt peetakse TA-süsteemi persistorite tekkimisel üheks peamiseks teguriks (Germain *et al.*, 2015) ning on näidatud ka TA-süsteemide kumulatiivset efekti persistorite moodustamisele *E. coli*’s (Maisonneuve *et al.*, 2011), siis teiste teadlaste

tulemused on seda arvamust paljuski vaidlustanud (Chowdhury *et al.*, 2016; Ramisetty *et al.*, 2016a). Kõige uuemad uuringud ei pea TA-süsteeme persistorakkude tekkel üldsegi esmatahtsaks (Shan *et al.*, 2017). Et selgitada, kas TA-süsteemid mõjutavad *P. putida* persistorakkude teket, võrdlesin metsiktüve ja mitmikmutantide persistorite hulka. Testitud tingimustes ei erinenud metsiktüve ning mitmikmutantide persistorite hulk (Joonis 13), mis viitab sarnaselt Shan jt (2017) saadud tulemustele *E. coli*'s, et ka *P. putida*'s ei ole TA-süsteemid persistorite moodustamisel olulised.

Kokkuvõtlikult võib öelda, et 13 tüüp II TA-süsteemi puudumine ei mõjuta enamasti *P. putida* kohasust ning stressitaluvust, sest mitmikmutantide ja metsiktüve kasvukiirus, konkurentsuvõimekus, tolerantsus erinevatele kemikaalidele ja UV-kiirgusele ning biofilmi ja persistorite hulk ei ole võrreldes algse tüvega muutunud. Küll aga viitavad mitmikmutandi veidi kiirem suremine persistorite mõõtmise katses ning muutunud lag-faasi pikkus mõnede antibiootikumide lisamisel söötmesse, et teatud stressitingimustel võivad TA-süsteemid siiski *P. putida* kohasust mõjutada ja pole välistatud, et nende olulisus võib ilmnedagi mingis kindlas stressiolukorras või konkurentsisis teiste bakteritega.

3.5. Toksiinide funktsionaalsus

Vaid kahe *P. putida* TA-süsteemi (GraTA ja MazEF) kohta on kirjandusest teada, et nende toksiinid on aktiivsed. GraA puudumisel inhibeerib GraT bakteri kasvukiirust ja ribosoomi biogeneesi ning mõjutab bakteri stressitaluvust (Tamman *et al.*, 2014; Ainelu *et al.*, 2016). MazF on ribosoomist sõltumatu mRNAs (Miyamoto *et al.*, 2016), kuid erinevalt GraT-st on MazF-iga tehtud katseid vaid *in vitro* ning *in vivo* pole MazF-i funktsionaalsust *P. putida*'s uuritud. Teiste TA-süsteemide kohta ei ole andmeid, kas nende toksiinid on funktsionaalsed või on nad aja jooksul oma toksilisuse kaotanud. Et seda välja selgitada, planeerisime konstrueerida antitoksiindeletsioontüved kõigile süsteemidele.

Antitoksiinide eemaldamise ebaõnnestumine viitab, et *P. putida* HigBA, RelE/HigA ja PP4151-4152 süsteemide toksiinid on aktiivsed ning bakterile nii toksilised, et ilma toksiini neutraliseeriva antitoksiinita bakter kasvada ei suuda. Tundub, et ka profaagis P1 paikneva PP3899-3900 süsteemi toksiin HicA2 võib *P. putida*'le toksiline olla, sest püüdes katkestada selle süsteemi antitoksiini geeni, lahkus terve profaag P1. Samas viitab profaagita mutantide tuvastamine sellele, et HicA2 toksiin ei ole bakterile letaalne. Tõenäoliselt tekitab antitoksiini eemaldamine rakkudele nii tugeva stressi, et välja on võimalik selekteerida vaid P1-ta rakud.

Kuna süsteemide PP2433-2434, HicAB-1, MqsRA ja MazEF antitoksiin õnnestus meil eemaldada ilma toksiini geeni rikkumata, viitab see, et nende süsteemide toksiinid on kas mõõdukalt toksilised või pole nad funktsionaalsed. Sarnaselt GraT-le nägime, et ka MqsR toksiin võib suurendada *P. putida* stressitaluvust mõnedele antibiootikumide (streptomütsiin) suhtes ning vähendada tundlikkust teistele kemikaalidele (NaCl, tetratsükliin). MqsR-i mõõdukale toksilisusele viitab ka see, et ta pidurdab vähesel määral bakterikolooniate kasvu (Joonis 16). PP2434 toksiin kolooniate kasvu ei mõjutanud, aga ilmselt on ta siiski vähemalt osaliselt aktiivne, sest PP2433 antitoksiini eemaldamine vähendab bakteri taluvust mõne antibiootikumi suhtes (nitrokinoliin, streptomütsiin, kanamütsiin; Joonis 16).

Kuigi *in vitro* katsete kohaselt on MazF aktiivne toksiin (Miyamoto *et al.*, 2016), ei näinud ma esialgsete katsete põhjal, et teda neutraliseeriva antitoksiini puudumine mõjutaks *P. putida* kasvu või stressitaluvust testitud tingimustes. On võimalik, et kui MazF-i ekspresseeritakse genoomist vaid ühe koopiana, ei olegi ta toksiline. Samas on ka võimalik, et me ei näe MazF-i toksilisust seetõttu, et ta ekspressioonitase on minu poolt testitud tingimustes väga madal ning teistes tingimustes võib toksiini mõju siiski avalduda, näiteks võib toksiini ekspressioon suureneda hoopis SOS-vastuse raames või aminohapete nälja korral (Christensen *et al.*, 2001; Vogel *et al.*, 2004). Ka toksiin HicA1 ei mõjutanud *P. putida* tolerantsust testitud tingimustel. Kuna seda toksiini pole varem uuritud, võib fenotüübiliste efektide puudumine viidata sellele, et antud toksiin ei olegi funktsionaalne. Siiski on nende tulemuste kinnitamiseks vaja teha lisakatseid.

Seega viitavad meie esialgsed tulemused, et enamik seni testitud *P. putida* toksiinidest on aktiivsed, mis ahvatleb spekulerima, et neil võiks olla bakterile mingisugune tähtsus. Kuna aga TA-süsteemide mitmikmutantidel polnud *P. putida* kohasusele olulisi efekte, ei saa kõrvale heita ka võimalust, et TA-süsteemid on vaid iseka DNA jupid ning tegelikult bakterile neist kasu ei olegi (Van Melder ja Saavedra De Bast, 2009). Kuna konkurentsikatse viitab, et nad ei põhjusta bakterile ka erilist lisakoormat (Joonis 15), ei põhjusta ka nende olemasolu bakterile selektiivset survet, mis nad evolutsiooni käigus genoomist eemaldaks. Edasiste uuringute peamiseks eesmärgiks on täpsemalt välja selgitada, millised *P. putida* toksiinid on aktiivsed ja uurida lähemalt nende funktsiooni ning mõju bakteri kohasusele.

KOKKUVÕTE

Vaatamata väga paljudele toksiin-antitoksiin süsteemide (TA-süsteemide) funktsionaalsust puudutavatele uuringutele ei ole siiani teada, miks on paljudel bakteritel mitmeid kromosomaalseid TA-süsteeme. Üldiselt seostatakse TA-süsteeme stressitaluvusega, kuid erinevate uuringute tulemused on vastuolulised, mistõttu ei olegi lõplikult selge, mil määral on tegelikult genoomsed TA-süsteemid bakteritele olulised.

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja selgitada, kas *Pseudomonas putida* 15 ennustatud TA-süsteemi osalevad bakteri kohasuse ja stressitaluvuse regulatsioonis. Tulemused näitasid, et:

1. PP3899-3900 kodeerib funktsionaalset TA-süsteemi, mis stabiliseerib *P. putida* genoomis leiduvat P1 profaagi.
2. Vähemalt ühe *P. putida* TA-süsteemi tervikliku eemaldamisega genoomist kaasnevad polaarsed efektid – süsteemi PP4100-4101 eemaldamine mõjutab talle järgneva globaalse transkriptsioonifaktori *uvrY/gacA* geeni avaldumist.
3. 13 TA-süsteemi puudumine ei mõjuta oluliselt *P. putida* kohasust ja stressitaluvust. Kui üldse, on mõju kohasusele väike ning ilmneb vaid teatud stressitingimustel.
4. Enamik seni testitud *P. putida* toksiinidest on kas toksilised (antitoksiini ei ole võimalik genoomist eemaldada) või mõõduka aktiivsusega (antitoksiini saab küll eemaldada, kui sellega kaasnevad efektid kasvule ja/või stressitaluvusele).

Käesolev töö on üks esimesi, mis uurib süstemaatiliselt ja laiapõhjaliselt TA-süsteemide koosmõju bakteri kohasusele. Kuigi TA-süsteeme seostatakse stressitaluvusega, ei panusta 13 *P. putida* TA-süsteemi olulisel määral ei bakteri stressitaluvuse ega kohasuse tagamisse. Seda tulemust ei saa selgitada toksiinide mittefunktsionaalsusega, sest enamik testitud toksiinidest tunduvad olevat (vähemalt osaliselt) aktiivsed. Seega ei toeta minu tulemused hüpoteesi, et kromosomaalsed TA-süsteemid toimivad stressivastuse elementidena nagu on palju sellealases kirjanduses diskuteeritud (Gerdes *et al.*, 2005; Wang ja Wood, 2011). Vähemalt *P. putida* kohasust ei näi nad oluliselt mõjutavat, va PP3899-3900, mis analoogselt plasmiidsetele TA-süsteemidele stabiliseerib mobiilset DNA-d (profaagi), mille lahkumine mõjutab *P. putida* kohasust.

The effects of toxin-antitoxin systems to the fitness and stress tolerance of *Pseudomonas putida*

Sirli Luup

SUMMARY

Bacteria live in fluctuating environments and thus may encounter various stressors. To deal with stress from the environment, bacteria require different stress-coping mechanisms. In general, it is thought that toxin-antitoxin systems (TA-systems) help bacteria survive stressful times. TA-systems are genetic elements that consist of a harmful toxin and a corresponding antitoxin that neutralizes it. During times of stress, antitoxin is degraded and toxin is free to attack its target (Gerdes *et al.*, 2005). As a result, important cellular processes like translation or replication are affected (Schuster ja Bertram, 2013). This leads to cell growth inhibition, which can help the cell to survive stressful times.

Although TA-systems are thought to be involved in stress management, their actual physiological importance is far from being understood. Still, TA-systems have been associated with programmed cell death (Sat *et al.*, 2001), regulation of growth-rate (Christensen *et al.*, 2001), biofilm and persister cell formation (Gonzalez Barrios *et al.*, 2006; Germain *et al.*, 2015), protection against phages (Hazan ja Engelberg-Kulka, 2004) and stabilization of genomic mobile DNA (Wozniak ja Waldor, 2009). In addition, there are implications that TA-systems might act in a synergistic manner (Kim *et al.*, 2009; Maisonneuve *et al.*, 2011).

Pseudomonas putida PaW85 is predicted to encode 15 TA-systems in its genome, but only a little is known about these systems as only two of them (GraTA and MazEF) have been studied previously (Tamman *et al.*, 2014; Miyamoto *et al.*, 2016). Thus, the aim of this study was to determine whether TA-systems affect fitness and/or stress tolerance of *P. putida*. Results of this work show that:

1. PP3899-3900 encodes a functional TA-system that stabilizes prophage P1 in the genome of *P. putida*.
2. The deletion of at least one TA-system from *P. putida* genome causes polar effects – deleting the system PP4100-4101 resulted in decreased expression of the downstream gene *uvrY/gacA*.

3. Deletion of 13 TA-systems from the genome of *P. putida* does not affect the bacteria's fitness or stress tolerance considerably. Any effect, if at all, is relatively minor and requires further studies.
4. Most of the tested *P. putida*'s toxins are toxic (deletion of antitoxin gene from genome is not possible) or moderately active (deletion of antitoxin gene is possible, but will result in changes of growth and/or stress tolerance).

These results indicate that although TA-systems are thought to be involved in stress management, the 13 TA-systems of *P. putida* do not significantly contribute to its fitness and stress tolerance. Notably, this result cannot be explained by non-functional toxins, as most of the tested toxins seem to be at least partly active. Thus, my current results do not support the hypothesis that chromosomal TA-systems are involved in stress management as has been frequently stated. Still, in this stage of studies I cannot exclude the possibility that in some undefined conditions TA-systems can be important for *P. putida*. Therefore, it is meaningful to further research the functions of the TA-systems of *P. putida*.

TÄNUSÕNAD

Eelkõige sooviksin tänada oma juhendajaid Hedvigit ja Ritat suurepärase juhendamise eest. Suur tänu ka kõikidele toredatele laborikaaslastele, kes probleemide korral olid alati valmis abistama.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

- Aakre, C. D., Phung, T. N., Huang, D. and Laub, M. T. (2013). A bacterial toxin Inhibits DNA replication elongation through a direct interaction with the beta sliding clamp. Mol Cell **52**(5): 617-628.
- Afif, H., Allali, N., Couturier, M. and Van Melderen, L. (2001). The ratio between CcdA and CcdB modulates the transcriptional repression of the ccd poison-antidote system. Mol Microbiol **41**(1): 73-82.
- Ainelo, A., Tamman, H., Leppik, M., Remme, J. and Hõrak, R. (2016). The toxin GraT inhibits ribosome biogenesis. Mol Microbiol **100**(4): 719-734.
- Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H. and Glaser, G. (1996). An *Escherichia coli* chromosomal "addiction module" regulated by guanosine [corrected] 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 6059-6063.
- Alawneh, A. M., Qi, D., Yonesaki, T. and Otsuka, Y. (2016). An ADP-ribosyltransferase Alt of bacteriophage T4 negatively regulates the *Escherichia coli* MazF toxin of a toxin-antitoxin module. Mol Microbiol **99**(1): 188-198.
- Amitai, S., Yassin, Y. and Engelberg-Kulka, H. (2004). MazF-mediated cell death in *Escherichia coli*: a point of no return. J Bacteriol **186**(24): 8295-8300.
- Bayley, S. A., Duggleby, C. J., Worsey, M. J., Williams, P. A., Hardy, K. G. and Broda, P. (1977). Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2. Mol Gen Genet **154**(2): 203-204.
- Bernard, P., Kézdy, K. E., Van Melderen, L., Steyaert, J., Wyns, L., Pato, M. L., . . . Couturier, M. (1993). The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. J Mol Biol **234**(3): 534-541.
- Bigger, J. W. (1944). Treatment of staphylococcal infections with penicillin. Lancet **244**(6320): 497-500.
- Black, D. S., Kelly, A. J., Mardis, M. J. and Moyed, H. S. (1991). Structure and organization of hip, an operon that affects lethality due to inhibition of peptidoglycan or DNA synthesis. J Bacteriol **173**(18): 5732-5739.
- Boynton, T. O., McMurtry, J. L. and Shimkets, L. J. (2013). Characterization of *Myxococcus xanthus* MazF and implications for a new point of regulation. Mol Microbiol.
- Budde, P. P., Davis, B. M., Yuan, J. and Waldor, M. K. (2007). Characterization of a *higBA* toxin-antitoxin locus in *Vibrio cholerae*. J Bacteriol **189**(2): 491-500.
- Bustamante, P., Tello, M. and Orellana, O. (2014). Toxin-antitoxin systems in the mobile genome of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. PLoS One **9**(11): e112226.
- Castro-Roa, D., Garcia-Pino, A., De Gieter, S., van Nuland, N. A., Loris, R. and Zenkin, N. (2013). The Fic protein Doc uses an inverted substrate to phosphorylate and inactivate EF-Tu. Nat Chem Biol **9**(12): 811-817.
- Cha, J. Y., Lee, D. G., Lee, J. S., Oh, J. I. and Baik, H. S. (2012). GacA directly regulates expression of several virulence genes in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 11528. Biochem Biophys Res Commun **417**(2): 665-672.
- Cho, H., Uehara, T. and Bernhardt, T. G. (2014). Beta-Lactam Antibiotics Induce a Lethal Malfunctioning of the Bacterial Cell Wall Synthesis Machinery. Cell **159**(6): 1300-1311.
- Chowdhury, N., Kwan, B. W. and Wood, T. K. (2016). Persistence increases in the absence of the alarmone guanosine tetraphosphate by reducing cell growth. Sci Rep **6**: 20519.

- Christensen-Dalsgaard, M. and Gerdes, K. (2006). Two *higBA* loci in the *Vibrio cholerae* superintegron encode mRNA cleaving enzymes and can stabilize plasmids. Mol Microbiol **62**(2): 397-411.
- Christensen-Dalsgaard, M., Jorgensen, M. G. and Gerdes, K. (2010). Three new RelE-homologous mRNA interferases of *Escherichia coli* differentially induced by environmental stresses. Mol Microbiol **75**(2): 333-348.
- Christensen, S. K. and Gerdes, K. (2003). RelE toxins from bacteria and Archaea cleave mRNAs on translating ribosomes, which are rescued by tmRNA. Mol Microbiol **48**(5): 1389-1400.
- Christensen, S. K., Maenhaut-Michel, G., Mine, N., Gottesman, S., Gerdes, K. and Van Melderen, L. (2004). Overproduction of the Lon protease triggers inhibition of translation in *Escherichia coli*: involvement of the yefM-yoeB toxin-antitoxin system. Mol Microbiol **51**(6): 1705-1717.
- Christensen, S. K., Mikkelsen, M., Pedersen, K. and Gerdes, K. (2001). RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. Proc Natl Acad Sci U S A **98**(25): 14328-14333.
- Conlon, B. P., Rowe, S. E., Gandt, A. B., Nuxoll, A. S., Donegan, N. P., Zalis, E. A., . . . Lewis, K. (2016). Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion. Nat Microbiol **1**.
- Correia, F. F., D'Onofrio, A., Rejtar, T., Li, L., Karger, B. L., Makarova, K., . . . Lewis, K. (2006). Kinase activity of overexpressed HipA is required for growth arrest and multidrug tolerance in *Escherichia coli*. J Bacteriol **188**(24): 8360-8367.
- Davis, B. D. (1987). Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. Microbiol Rev **51**(3): 341-350.
- DeShazer, D. (2004). Genomic Diversity of *Burkholderia pseudomallei* Clinical Isolates: Subtractive Hybridization Reveals a *Burkholderia mallei*-Specific Prophage in *B. pseudomallei* 1026b. J Bacteriol **186**(12): 3938-3950.
- Donegan, N. P., Thompson, E. T., Fu, Z. and Cheung, A. L. (2010). Proteolytic regulation of toxin-antitoxin systems by ClpPC in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol **192**(5): 1416-1422.
- Dziewit, L., Jazurek, M., Drewniak, L., Baj, J. and Bartosik, D. (2007). The SXT conjugative element and linear prophage N15 encode toxin-antitoxin-stabilizing systems homologous to the *tad-ata* module of the *Paracoccus aminophilus* plasmid pAMI2. J Bacteriol **189**(5): 1983-1997.
- Dy, R. L., Przybilski, R., Semeijn, K., Salmond, G. P. and Fineran, P. C. (2014). A widespread bacteriophage abortive infection system functions through a Type IV toxin-antitoxin mechanism. Nucleic Acids Res **42**(7): 4590-4605.
- Fivian-Hughes, A. S. and Davis, E. O. (2010). Analyzing the regulatory role of the HigA antitoxin within *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol **192**(17): 4348-4356.
- Garcia-Pino, A., Balasubramanian, S., Wyns, L., Gazit, E., De Greve, H., Magnuson, R. D., . . . Loris, R. (2010). Allostery and intrinsic disorder mediate transcription regulation by conditional cooperativity. Cell **142**(1): 101-111.
- Gerdes, K., Christensen, S. K. and Lobner-Olesen, A. (2005). Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. Nat Rev Microbiol **3**(5): 371-382.
- Germain, E., Castro-Roa, D., Zenkin, N. and Gerdes, K. (2013). Molecular mechanism of bacterial persistence by HipA. Mol Cell **52**(2): 248-254.

- Germain, E., Roghanian, M., Gerdes, K. and Maisonneuve, E. (2015). Stochastic induction of persister cells by HipA through (p)ppGpp-mediated activation of mRNA endonucleases. Proc Natl Acad Sci U S A **112**(16): 5171-5176.
- Goeders, N. and Van Melderen, L. (2014). Toxin-antitoxin systems as multilevel interaction systems. Toxins (Basel) **6**(1): 304-324.
- Gonzalez Barrios, A. F., Zuo, R., Hashimoto, Y., Yang, L., Bentley, W. E. and Wood, T. K. (2006). Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). J Bacteriol **188**(1): 305-316.
- Gotfredsen, M. and Gerdes, K. (1998). The *Escherichia coli* *relBE* genes belong to a new toxin-antitoxin gene family. Mol Microbiol **29**(4): 1065-1076.
- Grigoriev, P. S. and Łobocka, M. B. (2001). Determinants of segregational stability of the linear plasmid-prophage N15 of *Escherichia coli*. Mol Microbiol **42**(2): 355-368.
- Hansen, S., Vulic, M., Min, J., Yen, T. J., Schumacher, M. A., Brennan, R. G. and Lewis, K. (2012). Regulation of the *Escherichia coli* HipBA toxin-antitoxin system by proteolysis. PLoS One **7**(6): e39185.
- Hazan, R. and Engelberg-Kulka, H. (2004). *Escherichia coli* *mazEF*-mediated cell death as a defense mechanism that inhibits the spread of phage P1. Mol Genet Genomics **272**(2): 227-234.
- Hazan, R., Sat, B. and Engelberg-Kulka, H. (2004). *Escherichia coli* *mazEF*-mediated cell death is triggered by various stressful conditions. J Bacteriol **186**(11): 3663-3669.
- Haurlyuk, V., Atkinson, G. C., Murakami, K. S., Tenson, T. and Gerdes, K. (2015). Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. Nat Rev Microbiol **13**(5): 298-309.
- Hayes, F. (2003). Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. Science **301**(5639): 1496-1499.
- Heeb, S. and Haas, D. (2001). Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. Mol Plant Microbe Interact **14**(12): 1351-1363.
- Helaine, S., Cheverton, A. M., Watson, K. G., Faure, L. M., Matthews, S. A. and Holden, D. W. (2014). Internalization of *Salmonella* by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. Science **343**(6167): 204-208.
- Huguet, K. T., Gonnet, M., Doublet, B. and Cloeckaert, A. (2016). A toxin antitoxin system promotes the maintenance of the IncA/C-mobilizable *Salmonella* Genomic Island 1. Sci Rep **6**: 32285.
- Jensen, R. B. and Gerdes, K. (1995). Programmed cell death in bacteria: proteic plasmid stabilization systems. Mol Microbiol **17**(2): 205-210.
- Jorgensen, M. G., Pandey, D. P., Jaskolska, M. and Gerdes, K. (2009). HicA of *Escherichia coli* defines a novel family of translation-independent mRNA interferases in bacteria and archaea. J Bacteriol **191**(4): 1191-1199.
- Jurénas, D., Chatterjee, S., Konijnenberg, A., Sobott, F., Droogmans, L., Garcia-Pino, A. and Van Melderen, L. (2017). AtaT blocks translation initiation by N-acetylation of the initiator tRNA^{fMet}. Nat Chem Biol **advance online publication**.
- Karatan, E. and Watnick, P. (2009). Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. Microbiol Mol Biol Rev **73**(2): 310-347.

- Kasari, V., Kurg, K., Margus, T., Tenson, T. and Kaldalu, N. (2010). The *Escherichia coli* *mqsR* and *ygiT* genes encode a new toxin-antitoxin pair. J Bacteriol **192**(11): 2908-2919.
- Kaspy, I., Rotem, E., Weiss, N., Ronin, I., Balaban, N. Q. and Glaser, G. (2013). HipA-mediated antibiotic persistence via phosphorylation of the glutamyl-tRNA-synthetase. Nat Commun **4**: 3001.
- Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y. and Lewis, K. (2004a). Persister cells and tolerance to antimicrobials. FEMS Microbiol Lett **230**(1): 13-18.
- Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N. and Lewis, K. (2004b). Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. J Bacteriol **186**(24): 8172-8180.
- Kim, Y., Wang, X., Ma, Q., Zhang, X. S. and Wood, T. K. (2009). Toxin-antitoxin systems in *Escherichia coli* influence biofilm formation through YjgK (TabA) and fimbriae. J Bacteriol **191**(4): 1258-1267.
- Koga, M., Otsuka, Y., Lemire, S. and Yonesaki, T. (2011). *Escherichia coli* *rnIA* and *rnIB* compose a novel toxin-antitoxin system. Genetics **187**(1): 123-130.
- Kolodkin-Gal, I., Hazan, R., Gaathon, A., Carmeli, S. and Engelberg-Kulka, H. (2007). A linear pentapeptide is a quorum-sensing factor required for mazEF-mediated cell death in *Escherichia coli*. Science **318**(5850): 652-655.
- Kolodkin-Gal, I., Sat, B., Keshet, A. and Engelberg-Kulka, H. (2008). The communication factor EDF and the toxin-antitoxin module mazEF determine the mode of action of antibiotics. PLoS Biol **6**(12): e319.
- Koonin, E. V. and Wolf, Y. I. (2008). Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. Nucleic Acids Res **36**(21): 6688-6719.
- Korch, S. B., Henderson, T. A. and Hill, T. M. (2003). Characterization of the *hipA7* allele of *Escherichia coli* and evidence that high persistence is governed by (p)ppGpp synthesis. Mol Microbiol **50**(4): 1199-1213.
- Korch, S. B. and Hill, T. M. (2006). Ectopic overexpression of wild-type and mutant *hipA* genes in *Escherichia coli*: effects on macromolecular synthesis and persister formation. J Bacteriol **188**(11): 3826-3836.
- Kuroda, A., Murphy, H., Cashel, M. and Kornberg, A. (1997). Guanosine Tetra- and Pentaphosphate Promote Accumulation of Inorganic Polyphosphate in *Escherichia coli*. J Biol Chem **272**(34): 21240-24243.
- Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F. H. and Haas, D. (2008). Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. Mol Microbiol **67**(2): 241-253.
- Lee, B., Holkenbrink, C., Treuner-Lange, A. and Higgs, P. I. (2012). *Myxococcus xanthus* Developmental Cell Fate Production: Heterogeneous Accumulation of Developmental Regulatory Proteins and Reexamination of the Role of MazF in Developmental Lysis. J Bacteriol **194**(12): 3058-3068.
- Lemos, J. A., Brown, T. A. J., Abranches, J. and Burne, R. A. (2005). Characteristics of *Streptococcus mutans* strains lacking the MazEF and RelBE toxin-antitoxin modules. FEMS Microbiol Lett **253**(2): 251-257.
- Leplae, R., Geeraerts, D., Hallez, R., Guglielmini, J., Dreze, P. and Van Melderen, L. (2011). Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. Nucleic Acids Res **39**(13): 5513-5525.

- Lewis, K. (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. Nat Rev Microbiol **5**(1): 48-56.
- Lewis, K. (2010). Persister cells. Annu Rev Microbiol **64**: 357-372.
- Li, G., Shen, M., Lu, S., Le, S., Tan, Y., Wang, J., . . . Li, M. (2016). Identification and Characterization of the HicAB Toxin-Antitoxin System in the Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. Toxins (Basel) **8**(4).
- Lobato-Marquez, D., Moreno-Cordoba, I., Figueroa, V., Diaz-Orejas, R. and Garcia-del Portillo, F. (2015). Distinct type I and type II toxin-antitoxin modules control *Salmonella* lifestyle inside eukaryotic cells. Sci Rep **5**: 9374.
- López-Sánchez, A., Leal-Morales, A., Jiménez-Díaz, L., Platero, A. I., Bardallo-Pérez, J., Díaz-Romero, A., . . . Govantes, F. (2016). Biofilm formation-defective mutants in *Pseudomonas putida*. FEMS Microbiol Lett **363**(13).
- Magnuson, R. D. (2007). Hypothetical functions of toxin-antitoxin systems. J Bacteriol **189**(17): 6089-6092.
- Maisonneuve, E., Castro-Camargo, M. and Gerdes, K. (2013). (p)ppGpp Controls Bacterial Persistence by Stochastic Induction of Toxin-Antitoxin Activity. Cell **154**(5): 1140-1150.
- Maisonneuve, E., Shakespeare, L. J., Jorgensen, M. G. and Gerdes, K. (2011). Bacterial persistence by RNA endonucleases. Proc Natl Acad Sci U S A **108**(32): 13206-13211.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I. and Koonin, E. V. (2009). Comprehensive comparative-genomic analysis of type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes. Biol Direct **4**: 19.
- Malik, M., Zhao, X. and Drlica, K. (2006). Lethal fragmentation of bacterial chromosomes mediated by DNA gyrase and quinolones. Mol Microbiol **61**(3): 810-825.
- Martinez-Garcia, E. and de Lorenzo, V. (2011). Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. Environ Microbiol **13**(10): 2702-2716.
- Martinez-Garcia, E., Jatsenko, T., Kivisaar, M. and de Lorenzo, V. (2015). Freeing *Pseudomonas putida* KT2440 of its proviral load strengthens endurance to environmental stresses. Environ Microbiol **17**(1): 76-90.
- Masuda, H., Tan, Q., Awano, N., Wu, K. P. and Inouye, M. (2012a). YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*. Mol Microbiol **84**(5): 979-989.
- Masuda, H., Tan, Q., Awano, N., Yamaguchi, Y. and Inouye, M. (2012b). A novel membrane-bound toxin for cell division, CptA (YgfX), inhibits polymerization of cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB, in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett.
- Miyamoto, T., Kato, Y., Sekiguchi, Y., Tsuneda, S. and Noda, N. (2016). Characterization of MazF-Mediated Sequence-Specific RNA Cleavage in *Pseudomonas putida* Using Massive Parallel Sequencing. PLoS One **11**(2): e0149494.
- Molina, L., Udaondo, Z., Duque, E., Fernandez, M., Bernal, P., Roca, A., . . . Ramos, J. L. (2016). Specific gene loci of clinical *Pseudomonas putida* isolates. PLoS One **11**(1): e0147478.
- Moyed, H. S. and Bertrand, K. P. (1983). *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. J Bacteriol **155**(2): 768-775.

- Mutschler, H., Gebhardt, M., Shoeman, R. L. and Meinhart, A. (2011). A novel mechanism of programmed cell death in bacteria by toxin-antitoxin systems corrupts peptidoglycan synthesis. PLoS Biol **9**(3): e1001033.
- Ogura, T. and Hiraga, S. (1983). Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. Proc Natl Acad Sci U S A **80**(15): 4784-4788.
- Otsuka, Y. and Yonesaki, T. (2012). Dmd of bacteriophage T4 functions as an antitoxin against *Escherichia coli* LsoA and RnlA toxins. Mol Microbiol **83**(4): 669-681.
- Overgaard, M., Borch, J., Jorgensen, M. G. and Gerdes, K. (2008). Messenger RNA interferase RelE controls *relBE* transcription by conditional cooperativity. Mol Microbiol **69**(4): 841-857.
- Page, R. and Peti, W. (2016). Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. Nat Chem Biol **12**(4): 208-214.
- Pandey, D. P. and Gerdes, K. (2005). Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. Nucleic Acids Res **33**(3): 966-976.
- Parkins, M. D., Ceri, H. and Storey, D. G. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation. Mol Microbiol **40**(5): 1215-1226.
- Pedersen, K., Christensen, S. K. and Gerdes, K. (2002). Rapid induction and reversal of a bacteriostatic condition by controlled expression of toxins and antitoxins. Mol Microbiol **45**(2): 501-510.
- Ramage, H. R., Connolly, L. E. and Cox, J. S. (2009). Comprehensive functional analysis of *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxin systems: implications for pathogenesis, stress responses, and evolution. PLoS Genet **5**(12): e1000767.
- Ramisetty, B. C., Ghosh, D., Roy Chowdhury, M. and Santhosh, R. S. (2016a). What Is the Link between Stringent Response, Endoribonuclease Encoding Type II Toxin-Antitoxin Systems and Persistence? Front Microbiol **7**: 1882.
- Ramisetty, B. C., Raj, S. and Ghosh, D. (2016b). *Escherichia coli* MazEF toxin-antitoxin system does not mediate programmed cell death. J Basic Microbiol.
- Ren, D., Kordis, A. A., Sonenshine, D. E. and Daines, D. A. (2014). The ToxAvapA toxin-antitoxin locus contributes to the survival of nontypeable *Haemophilus influenzae* during infection. PLoS One **9**(3): e91523.
- Sala, A., Bordes, P. and Genevaux, P. (2014). Multiple toxin-antitoxin systems in *Mycobacterium tuberculosis*. Toxins (Basel) **6**(3): 1002-1020.
- Sat, B., Hazan, R., Fisher, T., Khaner, H., Glaser, G. and Engelberg-Kulka, H. (2001). Programmed cell death in *Escherichia coli*: some antibiotics can trigger *mazEF* lethality. J Bacteriol **183**(6): 2041-2045.
- Schifano, J. M., Cruz, J. W., Vvedenskaya, I. O., Edifor, R., Ouyang, M., Husson, R. N., . . . Woychik, N. A. (2016). tRNA is a new target for cleavage by a MazF toxin. Nucleic Acids Res **44**(3): 1256-1270.
- Schifano, J. M., Edifor, R., Sharp, J. D., Ouyang, M., Konkimalla, A., Husson, R. N. and Woychik, N. A. (2013). Mycobacterial toxin MazF-mt6 inhibits translation through cleavage of 23S rRNA at the ribosomal A site. Proc Natl Acad Sci U S A **110**(21): 8501-8506.
- Schuster, C. F. and Bertram, R. (2013). Toxin-antitoxin systems are ubiquitous and versatile modulators of prokaryotic cell fate. FEMS Microbiol Lett **340**(2): 73-85.
- Schuster, C. F. and Bertram, R. (2016). Toxin-Antitoxin Systems of *Staphylococcus aureus*. Toxins (Basel) **8**(5).

- Sevin, E. W. and Barloy-Hubler, F. (2007). RASTA-Bacteria: a web-based tool for identifying toxin-antitoxin loci in prokaryotes. Genome Biol **8**(8): R155.
- Shah, D., Zhang, Z., Khodursky, A., Kaldalu, N., Kurg, K. and Lewis, K. (2006). Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. BMC Microbiol **6**: 53.
- Shan, Y., Gandt, A. B., Rowe, S. E., Deisinger, J. P., Conlon, B. P. and Lewis, K. (2017). ATP-Dependent Persister Formation in *Escherichia coli*. MBio **8**(1): e02267-02216.
- Shao, Y., Harrison, E. M., Bi, D., Tai, C., He, X., Ou, H. Y., . . . Deng, Z. (2011). TADB: a web-based resource for Type 2 toxin-antitoxin loci in bacteria and archaea. Nucleic Acids Res **39**(Database issue): D606-611.
- Short, F. L., Pei, X. Y., Blower, T. R., Ong, S. L., Fineran, P. C., Luisi, B. F. and Salmond, G. P. (2013). Selectivity and self-assembly in the control of a bacterial toxin by an antitoxic noncoding RNA pseudoknot. Proc Natl Acad Sci U S A **110**(3): E241-E249.
- Søgaard-Andersen, L. and Yang, Z. (2008). Programmed cell death: role for MazF and MrpC in *Myxococcus* multicellular development. Curr Biol **18**(8): R337-R339.
- Soo, V. W. and Wood, T. K. (2013). Antitoxin MqsA represses curli formation through the master biofilm regulator CsgD. Sci Rep **3**: 3186.
- Zhang, Y., Zhang, J., Hoeflich, K. P., Ikura, M., Qing, G. and Inouye, M. (2003). MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. Mol Cell **12**(4): 913-923.
- Zhang, Y., Yamaguchi, Y. and Inouye, M. (2009). Characterization of YafO, an *Escherichia coli* toxin. J Biol Chem **284**(38): 25522-25531.
- Zhao, J., Wang, Q., Li, M., Heijstra, B. D., Wang, S., Liang, Q. and Qi, Q. (2013). *Escherichia coli* toxin gene *hipA* affects biofilm formation and DNA release. Microbiology **159**(Pt 3): 633-640.
- Tagel, M., Tavita, K., Hõrak, R., Kivisaar, M. and Ilves, H. (2016). A novel papillation assay for the identification of genes affecting mutation rate in *Pseudomonas putida* and other pseudomonads. Mutat Res **790**: 41-55.
- Tamman, H. (2016). The GraTA toxin-antitoxin system of *Pseudomonas putida*: regulation and role in stress tolerance. Doktoritöö, Tartu Ülikool.
- Tamman, H., Ainelo, A., Ainsaar, K. and Hõrak, R. (2014). A Moderate Toxin, GraT, Modulates Growth Rate and Stress Tolerance of *Pseudomonas putida*. J Bacteriol **196**(1): 157-169.
- Tamman, H., Ainelo, A., Tagel, M. and Hõrak, R. (2016). Stability of the GraA antitoxin depends on the growth phase, ATP level, and global regulator MexT. J Bacteriol **198**(5): 787-796.
- Tan, Q., Awano, N. and Inouye, M. (2011). YeeV is an *Escherichia coli* toxin that inhibits cell division by targeting the cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB. Mol Microbiol **79**(1): 109-118.
- Thisted, T., Sørensen, N. S., Wagner, E. G. and Gerdes, K. (1994). Mechanism of post-segregational killing: Sok antisense RNA interacts with Hok mRNA via its 5'-end single-stranded leader and competes with the 3'-end of Hok mRNA for binding to the *mok* translational initiation region. EMBO J **13**(8): 1960-1968.
- Tsilibaris, V., Maenhaut-Michel, G., Mine, N. and Van Melderen, L. (2007). What is the benefit to *Escherichia coli* of having multiple toxin-antitoxin systems in its genome? J Bacteriol **189**(17): 6101-6108.

- Tuomanen, E., Cozens, R., Tosch, W., Zak, O. and Tomasz, A. (1986). The rate of killing of *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth. J Gen Microbiol **132**(5): 1297-1304.
- Wagner, E. G. and Unoson, C. (2012). The toxin-antitoxin system *tisB-istR1*: Expression, regulation, and biological role in persister phenotypes. RNA Biol **9**(12): 1513-1519.
- Van Melderren, L. (2010). Toxin-antitoxin systems: why so many, what for? Curr Opin Microbiol **13**(6): 781-785.
- Van Melderren, L. and Saavedra De Bast, M. (2009). Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities? PLoS Genet **5**(3): e1000437.
- Wang, X., Kim, Y., Hong, S. H., Ma, Q., Brown, B. L., Pu, M., . . . Wood, T. K. (2011). Antitoxin MqsA helps mediate the bacterial general stress response. Nat Chem Biol **7**(6): 359-366.
- Wang, X., Lord, D. M., Cheng, H. Y., Osbourne, D. O., Hong, S. H., Sanchez-Torres, V., . . . Wood, T. K. (2012). A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. Nat Chem Biol **8**(10): 855-861.
- Wang, X. and Wood, T. K. (2011). Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response. Appl Environ Microbiol **77**(16): 5577-5583.
- Wang, X. and Wood, T. K. (2016). Cryptic prophages as targets for drug development. Drug Resist Updat **27**: 30-38.
- Wendrich, T. M., Blaha, G., Wilson, D. N., Marahiel, M. A. and Nierhaus, K. H. (2002). Dissection of the Mechanism for the Stringent Factor RelA. Mol Cell **10**(4): 779-788.
- Vesper, O., Amitai, S., Belitsky, M., Byrgazov, K., Kaberdina, A. C., Engelberg-Kulka, H. and Moll, I. (2011). Selective translation of leaderless mRNAs by specialized ribosomes generated by MazF in *Escherichia coli*. Cell **147**(1): 147-157.
- Winsor, G. L., Van Rossum, T., Lo, R., Khaira, B., Whiteside, M. D., Hancock, R. E. and Brinkman, F. S. (2009). Pseudomonas Genome Database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. Nucleic Acids Res **37**: D483-488.
- Vogel, J., Argaman, L., Wagner, E. G. and Altuvia, S. (2004). The small RNA IstR inhibits synthesis of an SOS-induced toxic peptide. Curr Biol **14**(24): 2271-2276.
- Wong, S. M. and Mekalanos, J. J. (2000). Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A **97**(18): 10191-10196.
- Wood, T. L. and Wood, T. K. (2016). The HigB/HigA toxin/antitoxin system of *Pseudomonas aeruginosa* influences the virulence factors pyochelin, pyocyanin, and biofilm formation. Microbiologyopen.
- Wozniak, R. A. and Waldor, M. K. (2009). A toxin-antitoxin system promotes the maintenance of an integrative conjugative element. PLoS Genet **5**(3): e1000439.
- Yamaguchi, Y., Park, J. H. and Inouye, M. (2009). MqsR, a crucial regulator for quorum sensing and biofilm formation, is a GCU-specific mRNA interferase in *Escherichia coli*. J Biol Chem **284**(42): 28746-28753.
- Yamaguchi, Y., Park, J. H. and Inouye, M. (2011). Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea. Annu Rev Genet **45**: 61-79.
- Yao, X., Chen, T., Shen, X., Zhao, Y., Wang, M., Rao, X., . . . Li, M. (2015). The chromosomal SezAT toxin-antitoxin system promotes the maintenance of the SsPI-1 pathogenicity island in epidemic *Streptococcus suis*. Mol Microbiol.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, www.ncbi.nlm.nih.gov (15.05.2017)

Pseudomonas Genome Database, www.pseudomonas.com (10.05.2017)

LISAD

Tabel 1. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Bakteritüvi	Iseloomustus	Viide allikale
<i>Escherichia coli</i>		
DH5αpir	<i>supE44, ΔlacU169 (φ80 lacZΔM15), hsdR17 (rk-mk+), recA1, endA1, thi1, gyrA, relA, λpir</i>	(Martinez-Garcia ja de Lorenzo, 2011)
<i>Pseudomonas putida</i>		
PaW85	Algne tüvi, isogeenne täielikult sekveneeritud <i>P. putida</i> KT2440 tüvega	(Bayley <i>et al.</i> , 1977)
ΔgraTA	PaW85, millest on eemaldatud <i>graTA</i> (PP1585-1586) lookus	(Tamman <i>et al.</i> , 2014)
Δ2433-2434	PaW85, millest on eemaldatud PP2433-2434 lookus	Hedvig Tamman
ΔhigBA	PaW85, millest on eemaldatud <i>higBA</i> (PP1198-1199) lookus	Hedvig Tamman
ΔhicAB-1	PaW85, millest on eemaldatud <i>hicAB-1</i> (PP1479-1480) lookus	Hedvig Tamman
ΔrelE/higA	PaW85, millest on eemaldatud <i>relE/higA</i> (PP5435/PP0274) lookus	Hedvig Tamman
ΔmqsRA	PaW85, millest on eemaldatud <i>mqsRA</i> (PP4204-4205) lookus	Hedvig Tamman
ΔmazEF	PaW85, millest on eemaldatud <i>mazEF</i> (PP0770-0771) lookus	Hedvig Tamman
Δ1716-1717	PaW85, millest on eemaldatud PP1716-1717 lookus	käesolev töö
Δ4529-4530	PaW85, millest on eemaldatud PP4529-4530 lookus	käesolev töö
Δ4151-4152	PaW85, millest on eemaldatud PP4151-4152 lookus	käesolev töö
ΔrelBE	PaW85, millest on eemaldatud <i>relBE</i> (PP1297-1268) lookus	käesolev töö
ΔyefM/yoeB	PaW85, millest on eemaldatud <i>yefM/yoeB</i> (PP2939-2940) lookus	käesolev töö
Δ2499-2500	PaW85, millest on eemaldatud PP2499-2500 lookus	käesolev töö
Δ4100-01 (varI(Δ12TA))	PaW85, millest on eemaldatud PP1585-1586, PP2433-2434, PP1198-1199, PP1479-1480, PP5435/PP0274, PP4204-4205, PP0770-0771, PP1716-1717, PP4529-4530, PP4151-4152, PP1267-1268, PP4100-4101 lookused	käesolev töö
Δ4100-01(varII)	PaW85, millest on eemaldatud terve PP4101 geen ja pool PP4100 geenist	käesolev töö
Δ3899-3900(ΔP1)	PaW85, millest <i>hicAB-2</i> (PP3899-3900) lookuse eemaldamise käigus lahkus profaag P1	käesolev töö
Δ2TA	ΔgraTA, millest on eemaldatud PP2433-2434 lookus	Hedvig Tamman
Δ3TA	Δ2TA, millest on eemaldatud PP1198-1199 lookus	Hedvig Tamman
Δ4TA	Δ3TA, millest on eemaldatud PP1479-1480 lookus	Hedvig Tamman
Δ5TA	Δ4TA, millest on eemaldatud PP5435/PP0274 lookus	Hedvig Tamman
Δ6TA	Δ5TA, millest on eemaldatud PP4204-4205 lookus	Hedvig Tamman
Δ7TA	Δ6TA, millest on eemaldatud PP0770-0771 lookus	Hedvig Tamman

Δ8TA	Δ7TA, millest on eemaldatud PP1716-1717 lookus	käesolev töö
Δ9TA	Δ8TA, millest on eemaldatud PP4529-4530 lookus	käesolev töö
Δ10TA	Δ9TA, millest on eemaldatud PP4151-4152 lookus	käesolev töö
Δ11TA	Δ10TA, millest on eemaldatud PP1267-1268 lookus	käesolev töö
Δ12TA	Δ11TA, millest on eemaldatud PP2939-2940 lookus	käesolev töö
Δ13TA	Δ12TA, millest on eemaldatud PP2499-2500 lookus	käesolev töö
ΔgraA	PaW85, millest on eemaldatud antitoksiini <i>graA</i> (PP1585) geen	(Tamman <i>et al.</i> , 2014)
Δ2433	PaW85, millest on eemaldatud antitoksiini PP2433 geen	käesolev töö
Δ1479	PaW85, millest on eemaldatud antitoksiini PP1479 geen	Rita Hõrak
ΔmqsA	PaW85, millest on eemaldatud antitoksiini <i>mqsA</i> (PP4204) geen	Hedvig Tamman
ΔmazE	PaW85, millest on eemaldatud antitoksiini <i>mazE</i> (PP0770) geen	Hedvig Tamman
Δ1716	PaW85, millest on eemaldatud antitoksiini PP1716 geen	Rita Hõrak
ΔrelB	PaW85, millest on eemaldatud antitoksiini <i>relB</i> (PP1268) geen	Rita Hõrak
Δ3899(ΔP1)	PaW85, millest <i>hicB-2</i> (PP3899) antitoksiini eemaldamise käigus lahkus profaag P1	Rita Hõrak
<i>gacA::Sm</i>	PaW85 <i>gacA::Sm^r</i>	(Tagel <i>et al.</i> , 2016)
EM174(ΔP1)	KT2440, millel puudub profaag P1	(Martinez-Garcia <i>et al.</i> , 2015)
Plasmiidid		
pEMG	Suitsiidplasmiid deletsioontüvede tegemiseks, sisaldab I-SceI endonukleaasi lõikesaite (Km ^r)	(Martinez-Garcia ja de Lorenzo, 2011)
pEMG/Δ1716-1717	Δ1716-1717 lookust sisaldav pEMG	käesolev töö
pEMG/Δ4529-4530	Δ4529-4530 lookust sisaldav pEMG	käesolev töö
pEMG/Δ4151-4152	Δ4151-4152 lookust sisaldav pEMG	käesolev töö
pEMG/Δ1267-1268	Δ1267-1268 lookust sisaldav pEMG	käesolev töö
pEMG/Δ2939-2940	Δ2939-2940 lookust sisaldav pEMG	käesolev töö
pEMG/Δ2499-2500	Δ2499-2500 lookust sisaldav pEMG	käesolev töö
pEMG/Δ4100-01(varI)	Δ4100-01(varI) lookust sisaldav pEMG	käesolev töö
pEMG/Δ4100-01(varII)	Δ4100-01(varII) lookust sisaldav pEMG	Hedvig Tamman
pEMG/Δ3899-3900	Δ3899-3900 lookust sisaldav pEMG	käesolev töö
pEMG/Δ2433	Δ2433 lookust sisaldav pEMG	Hedvig Tamman
pSW(I-Sce-I)	I-SceI endonukleaasi kodeeriv plasmiid deletsioontüvede tegemiseks	(Wong ja Mekalanos, 2000)

Tabel 2. Töös kasutatud oligonukleotiidid

Dele-tsioon	Oligont. nimi	Nukleotiidne järjestus (5'-3')	PCR, kus kasutati	Kasutamine	Kasutatud restriктаasid
Δ1716-1717	1716Sac	AAGAGCTCGGCCAACTGC GTGAAG	I, III	pEMG/Δ1716-1717 konstrueerimine, deletsioonmutandi kontrollimine	SacI, BamHI
	1716TAdel pikk	GGAATGGGCAACGCTTC GCAGCATGTAATCCGTAGG CA	I	pEMG/Δ1716-1717 konstrueerimine	
	1716stop	CTGAAGCGTTGCCCATTC	II	pEMG/Δ1716-1717 konstrueerimine	
	1718Bam	TTGGATCCTGGTGCAGGGC TATTTG	II, III	pEMG/Δ1716-1717 konstrueerimine, deletsioonmutandi kontrollimine	
Δ4529-4530	4531Sac	TTGAGCTCTGCCTGTTTCA ACTCCT	I, III	pEMG/Δ4529-4530 konstrueerimine, deletsioonmutandi kontrollimine	SacI, XbaI
	4530ees	TTGCGGATATTGCTCTGGT T	I	pEMG/Δ4529-4530 konstrueerimine	
	4528pikk	AACCAGAGCAATATCCGC AACCTTGGCAGGTCCCA	II	pEMG/Δ4529-4530 konstrueerimine	
	4258Xba	CGTCTAGAAGCTACCGATT ATCGGG	II, III	pEMG/Δ4529-4530 konstrueerimine, deletsioonmutandi kontrollimine	
Δ4151-4152	4151Eco	ACGAATTCTGCTGGATGAA CCCAC	I, III	pEMG/Δ4151-4152 konstrueerimine, deletsioonmutandi kontrollimine	EcoRI, KpnI
	4151-52del pikk	GGAAC TTGAATGCTGAAA GCACATGGCTAGAGAGGT	I	pEMG/Δ4151-4152 konstrueerimine	
	4151-52del	TGCTTTCAGCATTCAAGTT CC	II	pEMG/Δ4151-4152 konstrueerimine	
	4152Kpn	ACGGGTACCGGCAAACCTT G	II, III	pEMG/Δ4151-4152 konstrueerimine, deletsioonmutandi kontrollimine	

Δ1267-1268	1269Bam	AGGGATCCTCTGCCAAGG ATTCCAA	I, III	pEMG/Δ1267-1268 konstrueerimine, deletsioonmutandi kontrollimine	BamHI, SacI
	1268start	GTGCATTACCACGGTGATG	I	pEMG/Δ1267-1268 konstrueerimine	
	1267TAdel pikk	CATCACCGTGGTAATGCAC AGATGATGCGGGAGGC	II	pEMG/Δ1267-1268 konstrueerimine	
	1266Sac	AGGAGCTCAAGCGTACGC ACATCG	II, III	pEMG/Δ1267-1268 konstrueerimine, deletsioonmutandi kontrollimine	
Δ2939-2940	2940Xba	ATTCTAGAGACAGAATAC ACCGCTG	I, III	pEMG/Δ2939-2940 konstrueerimine, deletsioonmutandi kontrollimine	XbaI, SacI
	2940start	GTAAGGGTTGCTCTTTGGA C	I	pEMG/Δ2939-2940 konstrueerimine	
	2939TAdel pikk	GTCCAAAGAGCAACCCTTA CGCGGTCCTTTTGTAACGG	II	pEMG/Δ2939-2940 konstrueerimine	
	2938Sac	TAGAGCTCCAATTTACGGT GACAGCG	II, III	pEMG/Δ2939-2940 konstrueerimine, deletsioonmutandi kontrollimine	
Δ2499-2500	2498EcoRI	TAGAATTCCAGATTCGTCC TGCAAC	I, III	pEMG/Δ2499-2500 konstrueerimine, deletsioonmutandi kontrollimine	EcoRI, XbaI
	2499TAdel pikk	CTGTCCAGTCTCAGTAGCC CCCGTTATCTAAAGG	I	pEMG/Δ2499-2500 konstrueerimine	
	2500stop	GGCTACTGAGACTGGACA G	II	pEMG/Δ2499-2500 konstrueerimine	
	2501Xba	CATCTAGAAAGGCACCTG GTTTCATC	II, III	pEMG/Δ2499-2500 konstrueerimine, deletsioonmutandi kontrollimine	
Δ4100-4101(var I)	4102Xba	GCTCTAGACACCCATGATT CGCTG	I, III	pEMG/Δ4100-4101(varI) konstrueerimine, deletsioonmutandi kontrollimine, Δ4100-01(varII) deletsioonmutandi kontroll	XbaI, EcoRI

	4101start	TCATTGGGCATAACAAACT G	I	pEMG/Δ4100-4101(varI) konstrueerimine	
	4100TAdel pikk	CAGTTTGTTATGCCCAATG AATCGCCCTGCTGACGAGG	II	pEMG/Δ4100-4101(varI) konstrueerimine	
	4099EcoRI	TAGAATTCCCGTTCGGACA ACGCG	II, III	pEMG/Δ4100-4101(varI) konstrueerimine, deletsioonmutandi kontrollimine, Δ4100-01(varII) deletsioonmutandi kontroll	
Δ3899-3900	3901Bam	GTGGATCCGGTGATGGAG CGAGT	I, III	pEMG/Δ3899-3900 konstrueerimine, deletsioonmutandi kontrollimine	BamHI, EcoRI
	3900start	TAGTTGCGATGCTATGACA G	I	pEMG/Δ3899-3900 konstrueerimine	
	3899TAdel pikk	CTGTCATAGCATCGCAACT AGGGAAGCGGATGAGCCT	II	pEMG/Δ3899-3900 konstrueerimine	
	3899EcoRI	CGGAATTCTACATAGCCGC CCTGG	II, III	pEMG/Δ3899-3900 konstrueerimine, deletsioonmutandi kontrollimine	
Δ2433	2433Sac	GAGAGCTCGCACGTGATTG TGTTCT	-	Δ2433 deletsioonmutandi kontrollimine	-
	2434Xba	GGTCTAGATGTCTTTTTTCG GCGCACA	-	Δ2433 deletsioonmutandi kontrollimine	
	pp3848	ACACCAGCCAGCACCTTTC	-	profaagi P1 lahkumise kontrollimine	-
	3922-r	ATCGTCAGTGCCCCATTCTG	-		
	1585Sac	ACCGAGCTCAGCAGGATG AGAACGGTG	-	graTA lookus- spetsiifilise PCR konkurentsikatses	-
	1585Acc	ATGGTACCGTTTTTCGATG TCAGTCG	-		-
	Fw	GTAACGACGGCCAGT	-	kloneerimise kontrollimine	-
	Rev	AACAGCTATGACCATG	-		

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Sirli Luup

(sünnikuupäev: 15.04.1993)

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

Toksiin-antitoksiin süsteemide mõju *Pseudomonas putida* kohasusele ja stressitaluvusele

mille juhendajad on Hedvig Tamman ja Rita Hõrak,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **8.06.2019** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 31.05.2017