TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

GENEETIKA ÕPPETOOL

Poomisvastuse mõju *Pseudomonas putida* mõõdukate faagide infektsioonitsükli valikule

Magistritöö

Biomeditsiin

30 EAP

Elise Mägi

Juhendajad PhD Hedvig Tamman, PhD Sirli Rosendahl

TARTU 2025

INFOLEHT

Poomisvastuse mõju *Pseudomonas putida* mõõdukate faagide infektsioonitsükli valikule

Mõõdukad bakteriofaagid (faagid) võivad viljeleda nii lüsogeenset kui ka lüütilist elutsüklit ning on võimelised ühelt elutsüklilt teisele üle minema. Infektsioonitsükli valiku eelistust kujundavad mitmesugused nii bakterist kui ka keskkonnast lähtuvad mõjurid. Leidub viiteid, et üheks selliseks elutsükli mõjuteguriks võiks olla ka bakteri poomisvastus, mille vallandab stressitingimustes alarmoon ppGpp. On teada, et *P. putida* PaW85 genoom sisaldab nelja krüptilist profaagi, kuid seni pole isoleeritud ühtegi seda bakterit nakatavat mõõdukat faagi, mistõttu pole olnud võimalik ppGpp mõju neile uurida. Käesoleva töö eesmärk oli välja selgitada ppGpp ja ühtlasi ka poomisvastuse mõju *P. putida* profaagide lahkumissagedusele bakteri genoomist ning isoleerida keskkonnatüvedest nakatamisvõimelisi mõõdukaid faage. Tulemused näitavad, et poomisvastus soodustab lüsogeensust profaagidel P1 ja P4, kuid profaagide P2 ja P3 lahkumissagedusele ppGpp mõju ei avalda. Samuti õnnestus KAR37 tüvest isoleerida esimene *P. putida* PaW85 nakatav mõõdukas faag ViKa.

Märksõnad: *Pseudomonas putida*, profaag, mõõdukas faag, ppGpp, poomisvastus

CERCS kood: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Stringent response in the life cycle choice of *Pseudomonas putida*'s temperate phages

Temperate bacteriophages (phages) may reproduce via either the lysogenic or the lytic infection cycle and may transition from one to the other. The life cycle preference of these phages is influenced by various effectors of both environmental and bacterial origin. The ppGpp dependent stringent response, induced in response to bacterial stress, is suggested to be one of these life cycle choice determinants. The genome of *P. putida* PaW85 is known to contain four cryptic prophages, but so far no temperate phages capable of lysing this host have been isolated, which has impeded research into the effect ppGpp has on the phages. The aim of this study was to determine the effect ppGpp and stringent response have on the excision frequency of *P. putida*'s prophages and to isolate temperate phages capable of infecting this bacteria. The results show that stringent response promotes the lysogenization of prophages P1 and P4, but has no effect on the excision frequencies of prophages P2 and P3. Additionally, ViKa, the first temperate phage capable of infecting *P. putida* PaW85, has been isolated.

Keywords: *Pseudomonas putida*, prophage, temperate phage, ppGpp, stringent response

CERCS code: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Sisukord

INFOLEHT 2
Kasutatud lühendid 5
SISSEJUHATUS 6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE 7
1.1. Bakteriofaagid 7
1.1.1. Faagide elutsüklid 9
1.1.2. Mõõdukate faagide elutsüklivaliku mõjutegurid 11
1.1.3. Poomisvastus ja selle mõju faagi elutsüklivalikule 14
1.2. *Pseudomonas putida* profaagid 16
2. EKSPERIMENTAALOSA 18
2.1. Töö eesmärgid 18
2.2. Materjal ja metoodika 19
2.2.1. Kasutatud söötmed ja lahused 19
2.2.2. Kasutatud bakteritüved 19
2.2.3. qPCR poomisvastuse mõju uurimiseks profaagide lahkumissagedusele 20
2.2.4. Mõõdukate faagide indutseerimine 22
2.2.5. Mõõduka faagi DNA eraldamine 24
2.2.6. Mõõduka faagi ViKa järjestuse determineerimine 25
2.3. Tulemused 26
2.3.1. Poomisvastuse mõju *Pseudomonas putida* krüptiliste profaagide lahkumissagedusele 26
2.3.1.1. Poomisvastuse puudumine suurendab profaag P1 lahkumissagedust 26
2.3.1.2. ppGpp puudumine ei mõjuta profaag P2 lahkumissagedust 28
2.3.1.3. Profaag P3 lahkumissagedusele poomisvastus mõju ei avalda 30
2.3.1.4. Poomisvastus vähendab profaag P4 lahkumist 32
2.3.2. *P. putida* KAR37 genoomis on nakkusvõimeline profaag 34
2.3.3. Profaagi indutseerimisel puhastub üle 10 kbp pikkune faagi DNA 35
2.3.4. Sekveneerimine tuvastas KAR37 genoomis kolm profaagiregiooni 35
2.3.5. ViKa on tõenäoliselt 45,9 kbp suurune mõõdukas faag 36
3. Arutelu 39
3.1. Poomisvastus ei mõjuta *Pseudomonas putida* profaagide lahkumissagedusi samaväärselt 39
3.2. Profaagide lahkumine *P. putida* genoomist 40
3.3. *P. putida* keskkonnatüvedest on võimalik indutseerida nakatamisvõimelisi mõõdukaid faage 41
Kokkuvõte 43
Summary 44
Tänusõnad 45

Kasutatud kirjandus..... 46
Lisa 1. Profaagide lahkumissagedused..... 57

Kasutatud lühendid

bp – aluspaari (*base pairs*)

CELMS – Keskkonnast pärinevate ja laboratoorsete bakteritüvede kollektsioon (*Collection of Environmental and Laboratory Microbial Strains*)

Cip – tsiprofloksatsiin (*ciprofloxacin*)

EDTA – etüleendiamiintetraäädikhape (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

LB – lüsogeenne sööde (*Lysogeny Broth*)

OD – optiline tihedus (*Optical Density*)

ppGpp – guanosiintetrafosfaat

pppGpp – guanosiinpentafosfaat

ΔR – RelA deletsioontüvi ehk tüvi ΔRelA

ΔRS – RelA ja SpoT deletsioontüvi ehk tüvi ΔRelASpoT

RSH – RelA ja SpoT homoloogid

SAH – väike alarmooni hüdrolaas (*Small Alarmone Hydrolase*)

SAS – väike alarmooni süntetaas (*Small Alarmone Synthetase*)

SDS – naatriumdodetsüülsulfaat (sodium dodecyl sulfate)

SM puhver – puhver, mille koostises on Tris-HCl, NaCl ja $MgSO_4$ (*Sodium magnesium buffer*)

TAE puhver – puhver, mille koostises on Tris-atsetaat ja EDTA

TES puhver – puhver, mille koostises on Tris-HCl, EDTA (etüleendiamiintetraäädikhape), ja SDS (naatriumdodetsüülsulfaat)

WT – metsiktüvi (*wild type*)

SISSEJUHATUS

Bakteriofaage ehk baktereid nakatavaid viiruseid leidub arvukalt kõikjal, kus bakterid elutsevad. Obligaatsete parasiitidena mõjutavad faagid paljusid erinevaid bakterite vahendatud biokeemilisi protsesse nii lokaalsel kui ka globaalsel skaalal. Selle mõju väljendus sõltub sellest, milline on faagi viljeletud infektsioonitsükkel: lüütiline või lüsogeenne. Lüütiline tsükkel lõppeb bakteri lüüsiga, vabastades taas ringlusesse bakteris sisalduva bioloogilise tooraine. Mõõdukate faagide lüsogeense tsükli tulemusena inserteerub aga faagigenoom peremeesraku DNA-sse ning talletub seal profaagina, mille kodeeriv järjestus on bakteri rakulistele mehhanismidele koormaks, kuid võib sisaldada ka peremehele kasulikke, antibiootikumi- ning faagitaluvust tõstvaid geene. Mõõdukad ehk lüsogeensed faagid võivad lüsogeenselt elutsüklilt üle minna lüütilisele või ka vastupidi ning ühe elutsükli eelistamist teisele suunavad mitmesugused nii bakterist kui ka keskkonnast lähtuvad mõjurid. Üheks selliseks mõjuteguriks võiks olla bakteri poomisvastus.

Poomisvastus on bakteritel peamiselt aminohappenälja või ka mõne muu bakterile ebasoodsa nähtuse poolt esile kutsutud stressivastus, mille vallandab alarmoonide ppGpp ehk guanosiintetrafosfaadi ja pppGpp ehk guanosiinpentafosfaadi kontsentratsiooni tõus rakus. Poomisvastuse eesmärk on aidata bakteril halbades keskkonnatingimustes ellu jääda, muutes selleks bakteri geeniekspressiooni mustrit ja seeläbi modifitseerides metabolismi ja füsioloogiat. Bakteris kui faagi peremehes suurte ümberkorralduste põhjustajana võiks poomisvastusel olla mõju ka seda nakatavatele faagidele ja nende infektsioonitsükli-eelistusele.

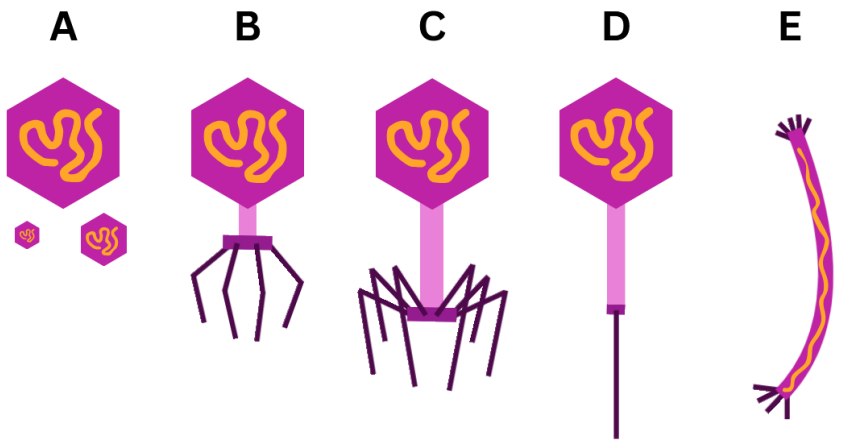
Varasemate uurimuste kohaselt sõltub teatud *Escherichia coli* mõõdukate faagide lüsogeensus (p)ppGpp kontsentratsioonist, kuid selle mõju ulatus on jäänud ebaselgeks. Poomisvastus näib *E. coli* profaagidel soodustavat lüsogeenset tsüklit, vähendades lüütilise tsükli indutseerimise efektiivsust. Uurimusi poomisvastuse mõju teiste bakteriliikide, sealhulgas *Pseudomonas putida*, mõõdukatele faagidele ei ole seni läbi viidud.

Bioremediatsioonis ja tööstuses olulise *P. putida* laboritüve PaW85 genoomis on neli krüptilist profaagi, mis võivad spontaanselt genoomist lahkuda, kuid ei ole võimelised bakterit lüüsima. Alles hiljuti on kirjeldatud kollektsioon *P. putida* lüütilisi faage, kuid tema nakatamiseks võimelisi mõõdukaid faage ei ole aga seni ühtegi isoleeritud. Seetõttu on käesoleva töö eesmärk selgitada välja poomisvastuse mõju *P. putida* krüptiliste profaagide lahkumissagedusele genoomist ning isoleerida *P. putida*t nakatavaid mõõdukaid faage, et selgitada välja üldisem poomisvastuse mõju mõõdukate faagide elutsükli valikule.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Bakteriofaagid

Bakteriofaagid (lühidalt faagid) ehk baktereid nakatavad viirused on nii geneetiliselt kui ka morfoloogiliselt väga mitmekesised. Ligi 50% seni sekveneeritud faagide genoomidest jäävad pikkusevahemikku 30-50 kbp (bp – aluspaari, *base pairs*), kuid osade bakteriviiruste genoomid ulatuvad ka 300 kbp-ni (Hatfull, 2008). Bakteriofaagi genoomiks võib olla nii ühe- kui ka kaheahelaline RNA või DNA ning faagipartiklite morfoloogia varieerub näiteks *Myoviridae*-le iseloomulikust „pea ja sabaga“ partiklist kuni ikosaheedriliste ja filamentsete virionideni (Joonis 1). Kuigi isoleeritud faagide mitmekesisus on märkimisväärne, on sekveneeritud faagide arv väike võrreldes sekveneeritud bakterigenoomide hulgaga ning suur osa neist faagidest on seotud väheste bakteriliikidega (Hatfull ja Hendrix, 2011). Seega on tegelik oodatav mitmekesisus veelgi suurem arvestades faagide ennustatavat koguhulka biosfääris. Metagenoomika areng on põhjustanud ka viiruste metagenoomsete uuringute hoogustumise ning aastast aastasse avastatakse järjest enam uusi taksoneid ja täiendatakse eri bakteriliikide faagiraamatukogusid (Dion *et al*., 2020)



Joonis 1. Erinevate faagipartiklite lihtsustatud näiteid. Kujutatud on ikosaheedriline (A), eristuva „pea“ ja „sabaosaga“ (B, C, D) ning filamentne (E) struktuur. Kollasega on tähistatud faagigenoomi paiknemine. Nagu jooniselt on näha, võivad faagipartiklid muu hulgas erineda ka näiteks suuruse või sabakiudude poolest. Filamentsel faagil on piilid. Ikosaheedriline on näiteks *Pseudomonas sp*. faag ϕ6, pea ja sabaga *Escherichia coli* faag Lambda ning filamentne *E. coli* faag M13.

Bakteriofaage leidub biosfääris hinnanguliselt 10^{31} partiklit ning ainuüksi ookeanides on nende arvukus 10^{7} partiklit milliliitri kohta, mistõttu võib järeldada, et faagid avaldavad arvestatavat mõju bakteripopulatsioonidele (Suttle, 2005). Baktereid lüüsides vähendavad faagid bakterite arvukust, ent vabastavad ka seekaudu ühendeid, mida järgmised bakterid saavad kasutada elutegevuseks, kujundades nii lokaalsete kui ka globaalsete bakteripopulatsioonide dünaamikat (Sanmukh *et al.*, 2015; Lindell *et al.*, 2005). Üks faag ei ole võimeline nakatama kõiki bakteriliike: faagid omavad tavaliselt kitsast peremeesringi ning moodustavad bakteritega komplekse interaktsioonide võrgustiku (Flores *et al.*, 2011).

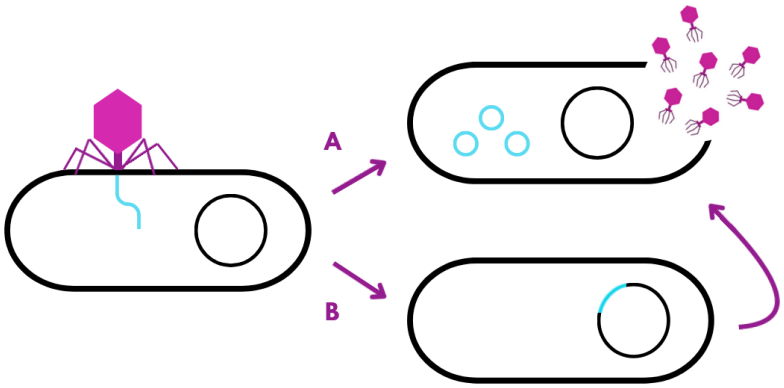
Bakteriofaagi peremeesring ehk selle faagi nakkusele vastuvõtlike bakteriliikide arv on väga väike. Faagid on peremees-spetsiifilised, nakatades tavaliselt vaid kindlat bakteriliiki või koguni kindlat bakteritüve, mis viitab spetsiifilisele nakatamismehhanismile. On oletatud, et parasiitidel (sealhulgas ka viirustel) esineb lõivsuhe peremeesringi suuruse ja nakatamisefektiivsuse vahel, kus peremees-spetsiifilisus võimaldab täpsemat nakatamismehhanismi ja seega efektiivsemat nakatamist kui laiema peremeesringi puhul, sest mitut peremeest saab nakatada vaid üldisema mehhanismi kaudu (Straub *et al.*, 2011). Sellist lõivsuhet on ka kirjeldatud *Pseudomonas fluorescens* faagi ϕ2 ja ϕ6 puhul, kus spontaansete mutatsioonide tõttu laiema peremeesringiga faagide nakatamisefektiivsus oli langenud (Poullain *et al.*, 2008; Duffy *et al.*, 2006).

Bakteri nakatamiseks peab bakteriofaag seonduma bakteriraku pinnale ning sisestama bakterisse oma genoomi, mida edasi järgneva infektsioonitsükli jooksul paljundatakse. Bakterite vastuvõtlikkust faaginakkusele on teoreetiliselt võimalik mõjutada kõikides infektsioonitsükli etappides: näiteks retseptori struktuuri muutus takistab faagi antiretseptori seondumist (Hampton *et al*., 2020) või bakteris sünteesitud ensüümid lagundavad faagigenoomi (Loenen *et al*., 2014). Faag aga omakorda juhuslike mutatsioonide kaudu kohastub muutustele – toimub pidev evolutsiooniline võidurelvastumine bakterite ja faagide vahel, mille tulemusena on bakteril välja kujunenud mitmed erinevad kaitsesüsteemid. Neist vaieldamatult üks tuntumaid, paljuski tänu selle süsteemi biotehnoloogilistele rakendustele, on CRISPR-Cas, mis põhineb võõra DNA lühikeste kordusjärjestustena talletamisel ja tuvastamisel, et korduval nakatumisel võõras DNA lagundamisele suunata (Loenen *et al*., 2014). Faagiresistentsust võivad näiteks suurendada ka bakteriaalsed toksiin-antitoksiin süsteemid (LeRoux ja Laub, 2022), bakterigenoomi integreerunud profaagid (Owen *et al.*, 2021) ning ka üldisemad bakterite stressivastused, näiteks poomisvastus (Nowicki *et al.*, 2013; Mägi, 2023).

1.1.1. Faagide elutsüklid

Juhusliku kokkupuute tulemusena seondub faagi antiretseptor bakteriraku pinnal oleva retseptoriga (kutsutakse adsorptsiooniks), mille tagajärjel sisestab bakteriofaag oma genoomi bakteri tsütoplasmasse. Faagigenoomi bakterisse sisenemise järgselt paljundatakse seda, kasutades bakteriaalseid transkriptsiooni- ja translatsioonimehhanisme, sest faagid, nagu ka teised viirused, ei ole võimelised iseseisvalt paljunema. Paljunemise meetodi ehk elutsükli (infektsioonitsükli) alusel jaotuvad faagid peamiselt lüütilisteks ning mõõdukateks ehk lüsogeenseteks (Joonis 2), kuid on võimalikud ka täpsemad alajaotused faagide infektsioonitsüklite iseärasuste, näiteks faagipartiklite kokkupakkimise viisi või ajastuse, välja toomiseks (Hobbs ja Abedon, 2016).

Lüütilise tsükli puhul (Joonis 2A) inhibeeritakse bakteriofaagi genoomilt kodeeritud ensüümide poolt kõigepealt bakteri valkude ning DNA ja RNA süntees, et vabastada ribosoomid ja ensüümid sünteesimaks faagipartikli kokkupanekuks tarvilikke valke ja paljundamaks faagigenoomi (Gerovac *et al.*, 2024; Mahata *et al.*, 2021). Selleks bakteri DNA sageli ka lagundatakse (Powell *et al.*, 1992; Kutter *et al.*, 1968). Võib juhtuda, et faagipartiklisse pakitakse ka bakteriaalset DNA-d. See DNA võib faagi uude rakku sisenemisel integreeruda uue peremeesraku genoomi, panustades bakterite horisontaalsesse geeniülekandesse (Thierauf *et al.*, 2009). Nii valmis virionide kokkupaneku ajastus kui ka paigutus rakus erineb faagiti. *E. coli* obligaatselt lüütilise faagi T4 puhul pakitakse sünteesitud faagivalgud ümber faagigenoomi bakteri sees (Leiman *et al.*, 2003), ent faagipartikli kokkupanek võib toimuda ka rakumembraanil (Russel, 1995). Rakust bakteriofaagide väljutamine on mitmeetapiline protsess, mille tulemusena bakter lüüsub (Young, 2014). Erandiks on filamentsed faagid, mis paljunevad küll lüütilisele tsüklile sarnaselt, kuid ei tapa peremeesrakku, moodustades hoopis adhesiooni tsoonid, mille kaudu faagipartiklid väljutatakse (Russel, 1995).

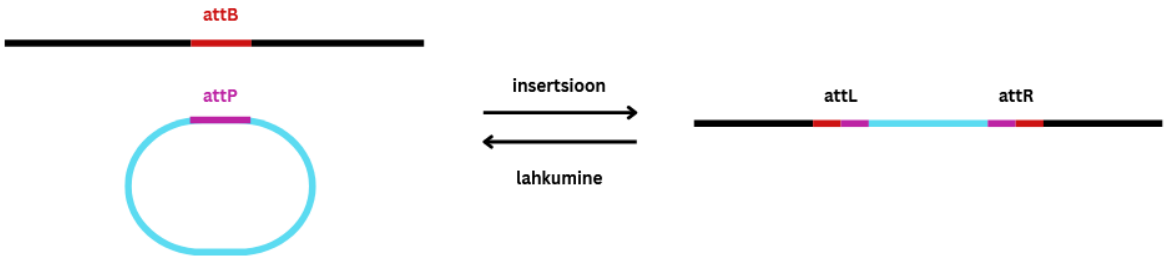


Joonis 2. Lüütiline ja lüsogeenne tsükkel. Pärast adsorptsiooni sisestab bakteriofaag oma genoomi bakteri tsütoplasmasse. A) Lüütilises tsüklis paljundatakse bakteriaalsete mehhanismide abil faagi genoomi ning sünteesitakse faagipartikli kokkupanekuks vajalikke valke. Lüütilise tsükli lõpptulemuseks on peremeesraku lüüs ning valmis faagide vabanemine ümbritsevasse keskkonda. B) Lüsogeenses tsüklis siseneb faagigenoom (sinine) integraasi abil järjestusspetsiifiliselt bakteri kromosoomi (must) ning pärandub koos kromosoomiga tütarrakkudele. Mõõdukad faagid võivad lüsogeensest tsüklist lülituda lüütilisse, lahkudes bakteri genoomist.

Lüsogeensed faagid on võimelised oma geneetilist materjali sisestama bakteri kromosoomi (Joonised 2B ja 3) ning sel juhul ei toimu genoomi bakterisse sisenemise järgselt selle kohest paljundamist ega kapsiidivalkude sünteesi, samuti ei lagundata bakteri DNA-d. Mõõduka infektsioonitsükli tulemusena bakterit ei lüüsita, vaid genoomi paljundamine toimub bakteri jagunemise kaudu, pärandudes tütarrakkudele bakteri kromosoomi koostises. Need bakteri genoomi integreerunud faagigenoomid ehk profaagid sisaldavad tihti geene, mis aitavad bakteril ebasoodsates keskkonnatingimustes ellu jääda, näiteks antibiootikumresistentsust tagavad (Boyd, 2012), biofilmi moodustamist soodustavad (Li *et al.*, 2024) või teiste faagide vastast kaitset tagavad geenid (Bondy-Denomy *et al.*, 2016). On ka näidatud, et kodeerivate järjestustena võivad profaagid olla bakterile koormaks, vähendades teatud tingimustes profaagi kandva bakteri ehk lüsogeeni kasvuedukust (Herron ja Wellington, 1994; Quesada *et al.*, 2012). Selline mõju näib mõõduka faagi leviku seisukohast ebasoodne, seega peavad profaagi poolt pakutavad hüved üles kaaluma selle negatiivse efekti või on sellisel strateegial hoopis pikaajaline eelis. Profaagist tingitud bakteri aeglasem kasvukiirus tähendab vähemat ressursikasutust ning ilmselt seega ka suurenenud võimekust faagipartiklite sünteesiks.

Mõõdukad faagid võivad ka bakterikromosoomist lahkumisel viljeleda lüütilist tsüklit (Joonised 2B ja 3). Spontaanse või keskkonnatingimustest sõltuva indutseerumise tulemusena lõikub profaag bakterigenoomist välja ning järgneb lüütilisele tsüklile omane genoomi paljundamine ja faagipartiklite moodustumine, mis võib viia bakteri lüüsini (Spriewald *et al.*, 2020). Nii genoomi inserteerumine kui ka lahkumine vajab faagi kodeeritud integraasi, mis

võimaldab järjestus-spetsiifilist DNA rekombinatsiooni (Fogg *et al.*, 2014). Faagigenoomi lahkumisel võib juhuslikult kaasa tulla ka osa bakteri DNA-d, mis võib integreeruda järgmise peremehe genoomi. Nii levivad bakterite vahel näiteks toksiine kodeerivad või antibiootikumresistentsuse eest vastutavad geenid (Boyd, 2012). Faagid võivad levitada nii *Vibrio cholerae* kooleratoksiini (Pham *et al.*, 2018) kui *Corynebacterium diphteriae* difteeria toksiini (Holmes, 2000) kodeerivaid järjestusi. Profaag võib aga ka kaotada paljunemiseks või faagipartiklite sünteesiks vajalikud geenid, mistõttu kaob tal võimekus siseneda lüütilisse tsüklisse ning talletub bakteri genoomis krüptilise profaagina (Bobay *et al.*, 2014).



Joonis 3. Faagigenoomi sisenemine ja lahkumine bakterikromosoomist. Faagigenoomi (sinine) insertsioon bakterikromosoomi (must) toimub faagi seondumisjärjestuse (attP, *attachement*; roosa) vahendusel bakteriaalsesse seondumisjärjestusse (attB; punane). Selle tulemusena moodustuvad faagigenoomi piiravad järjestused *attL* ja *attR*, mis on sisaldavad poolt *attP* ja *attB* järjestustest. Profaagi lahkumisel taastub endine olukord, kus faagigenoomil on terve *attP* järjestus ja kromosoomil terve *attB* järjestus. Nii genoomi sisenemine kui ka lahkumine vajab faagi kodeeritud integraasi, mis võimaldab järjestus-spetsiifilist DNA rekombinatsiooni.

1.1.2. Mõõdukate faagide elutsüklivaliku mõjutegurid

Elutsüklivaliku mehhanisme on põhjalikumalt uuritud vaid üksikutel faagidel, kuid on laiemalt teada, et lüsogeensest tsüklist lüütilisse üleminekut ehk profaagi indutseerumist võivad esile kutsuda muutused nii keskkonnatingimustes kui ka bakteri füsioloogilistes protsessides. Tihti on sellisteks mõjuriteks bakterile stressi põhjustavad muutused või toksilised ühendid ümbritsevas keskkonnas. Järgnevates lõikudes on välja toodud mõned tuntuimad tegurid, mis suunavad mõõdukate faagide infektsioonitsükli valikut lüütilises või lüsogeenses suunas.

Lüsogeensus on eelistatud näiteks anaeroobses keskkonnas, sealhulgas sügavamal maapinnas ja süvameres hajusvooluga hüdrotermiliste lõõride läheduses (Williamson ja Paul, 2006; Liang *et al.*, 2020; Williamson *et al.*, 2008). Aereeritus tundub olevat oluline efektiivseks lüüsiks, mistõttu võib see suunata mõõduka faagi elutsükli valikut (Kudva *et al.*, 1999). Ka kõrgem temperatuur seostub eelkõige lüütilise tsükli indutseerimisega (Jiang ja Paul, 1996). On

kirjeldatud mitmeid temperatuuritundlikke bakteriofaage, kes kõrgemal temperatuuril eelistavad lüütilist ja madalamal lüsogeenset tsüklit (Shan *et al.*, 2014). Infektsioonitsükli-eelistust tundub aga mõni tegur, näiteks bakterite tihedus, suunavat nii lüütilises kui ka lüsogeenses suunas (McDaniel ja Paul, 2005; Tan *et al.*, 2020). Sealjuures on kirjeldatud peremehe kvoorumitundlikkuse mõju profaagide induktsioonile (Tan *et al.*, 2020; Silpe ja Bassler 2019).

Muutunud toitainete kättesaadavus on samuti üks neist keskkonnateguritest, millel on varieeruv mõju lüsogeensusele. Mitmes uurimuses seostatakse fosforivaest keskkonda lüsogeense elutsükli eelistusega, kus fosfaatidega rikastatud piirkondades või fosfori lisamisel kirjeldati suuremat faagipartiklite arvu ja edukamat lüüsi võrreldes fosforivaeste tingimustega (Wilson *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 1998). Teistes uurimustes aga fosfori lisamine faagide arvukust ei mõjutanud (Säwström *et al.*, 2007) või suurendas seda vaid üksikutel juhtudel (McDaniel ja Paul, 2005), viidates tegurite paljususele profaagide indutseerimisel. Veel on mõõdukate faagide lüütilisus mõjutatud süsiniku, lämmastiku ja klorofüll α kontsentratsioonist, kus nende ühendite rohkus on positiivses korrelatsioonis bakterite lüüsi ja faagipartiklite arvukusega (Tuomi ja Kuuppo, 1999; Tsiola *et al.*, 2021). Need tulemused viitavad, et bakterite paremad kasvutingimused ja produktiivsus soodustavad faagide lüütilist paljunemist, mistõttu on neil ka arvestatav mõju mõõdukate faagide elutsükli valikule.

Ka keskkonna soolsus kujundab infektsioonitsükli valikut. Vastanduvad tulemused seostavad suuremat soolsust nii lüütilise tsükli kui ka lüsogeense tsükli eelistamisega. Tavalisest kõrgem soolasisaldus (NaCl ja $MgSO_4$ kontsentratsiooni tõus) suurendab *Listonella pelagia* faagi φHSIC indutseerumist, seda oletatavalt faagi lüütilise tsükli repressori DNA-le seondumise inhibeerimisega (Williamson ja Paul, 2006). Veekogude võrdlemisel on samuti nähtud faagide arvukuse positiivset korrelatsiooni keskkonna soolsusega, ent väga kõrge soolsus soodustab hoopis lüsogeense tsükli eelistamist (Bettarel *et al.*, 2011). Seda põhjendatakse peremehe morfoloogia muutumisega, kus atüüpiliste rakkude arvukus tugevalt korreleerus lüsogeensuse esinemisega (Bettarel *et al.*, 2011). Varieeruv efekt elutsükli valikule võib olla seotud ka soolsuse mõjuga erinevate viiruste adsorptsiooni efektiivsusele: näiteks tõhustades halofaag SNJ1 adsorptsiooni, kuid vähendades seda bakteriofaag Hs1 puhul (Mei *et al.*, 2015; Torsvik ja Dundas, 1980). Samuti tuleb arvestada teiste keskkonnateguritega, sest suvisel ja vihmasemal perioodil ehk madalama soolsuse tingimustes soolsuse näiline negatiivne korrelatsioon lüütilisusega (Jiang ja Paul, 1994) võib viidata näiteks temperatuuri või vihmavee sisaldiste kompenseerivale taustmõjule.

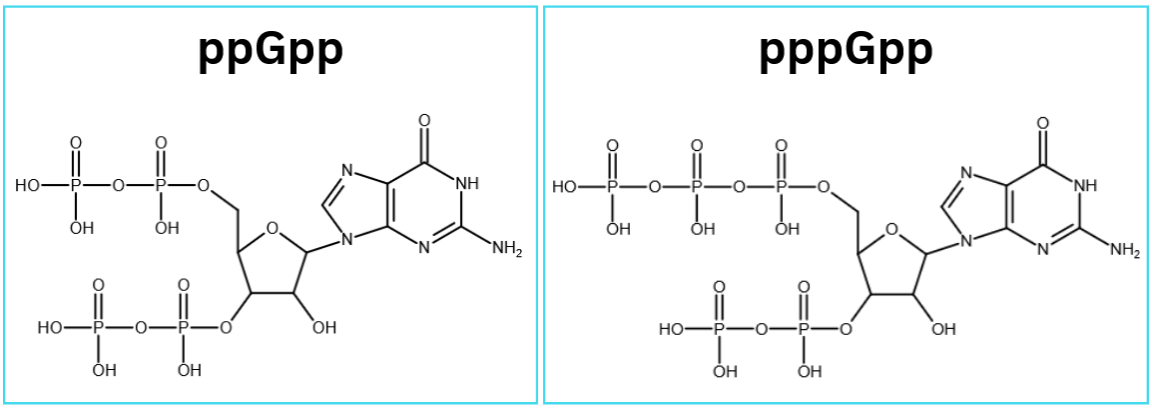
Vihmaga võivad veekogusse sattuda näiteks raskemetallid ja muud keskkonda saastavad ained, mis elutsükli valikut mõjutavad. Vase-ioonidel on arvestatav profaage indutseeriv efekt, kuid see väheneb aja möödudes (Lee *et al.*, 2006; Marei *et al.*, 2013). Vaskoksiid indutseerib näiteks *Pseudomonas aeruginosa* profaagi (Guo *et al.*, 2017) ning nii kroom, kaaliumtsüaniid kui ka happelisus (madal pH) indutseerivad profaagi *Nitrospira multiformis* tüves 25196 (Choi *et al.*, 2010). Raskemetallidega saastunud piirkonna metagenoomses analüüsis leiti aga vastupidiselt, et kroomi kontsentratsioon ja profaage kandvate bakterite hulk on positiivses korrelatsioonis (Huang *et al.*, 2021). Kuna tegu on pikaaegse saastusega, siis võib olla profaage indutseeriv efekt ajapikku vähenenud, nagu on nähtud vase-ioonide puhul (Lee *et al.*, 2006). Nimelt kodeerivad mõõdukad faagid metallide resistentsusgeene, mis annavad lüsogeensetele bakteritele eelise (Lee *et al.*, 2006). Ka mitmesugused teised keskkonda saastavad ühendid nagu polütsüklilised naftaleen ja püreen või kloori sisaldavad aromaatsed ühendid indutseerivad edukalt profaage (Jiang ja Paul, 1996; Cochran *et al*., 1998). Leiti, et päikesekreemides ja päikeseõlides sisalduvate saasteainete profaage indutseeriv mõju on pikaaegne (kuni kolm kuud) ning päikesekreem indutseerib tugevalt zooksantellide profaage, millede lüüs omakorda põhjustab korallide pleekimist (Danovaro *et al*., 2008). Selline tugev keskkonnamõju aitab illustreerida mõõdukate faagide elutsüklite uurimise olulisust muutuva kliimaga planeedil.

Keskkonda saastavad ained, sealhulgas erinevad kantserogeenid, indutseerivad profaage valdavalt bakteriaalse SOS-vastuse vallandamise kaudu (Moreau *et al*., 1976). SOS-vastus on bakterite stressivastus, mille kutsuvad esile DNA ahela kahjustused (Maslowska *et al.*, 2019). Ka ultraviolettkiirgus (UV) soodustab lüütilisse tsüklisse üleminekut just SOS-vastuse kaudu, kahjustades peremeesraku DNA-d ja aktiveerides sellega SOS-vastuse, mis omakorda indutseerib profaagi (Bunny *et al*., 2002). SOS-vastuse mõju profaagide induktsioonile on põhjalikult uuritud *E. coli* λ faagi puhul. UV põhjustatud DNA kahjustus *Escherichia coli* genoomis aktiveerib valgu RecA, mis põhjustab LexA ja profaag λ repressori lagundamise, mis omakorda viib lüütilise tsükli aktiveerumiseni (Brady *et al*., 2021). λ repressor on vajalik lüsogeenseks elutsükliks, sest blokeerib lüütiliseks tsükliks vajalike geenide ekspressiooni (Takeda *et al*., 1977). SOS-vastust aktiveerivad ka mitmed DNA kahjustusi põhjustavad antibiootikumid, näiteks mitomütsiin C (Choudhary *et al*., 2024) ja tsiprofloksatsiin (Goerke *et al.*, 2006).

1.1.3. Poomisvastus ja selle mõju faagi elutsüklivalikule

Poomisvastus on kaitsemehhanism, mis aitab bakteritel stressitingimustes, näiteks nälja esinemisel ellu jääda (Zhu ja Dai, 2023) ning tõstab bakteri faagi- ning antibiootikumitaluvust (Mägi, 2023; Rikberg 2023; Nguyen *et al*., 2014). Poomisvastuse vallandab stressorist tingitud alarmoonide guanosiintetrafosfaadi (ppGpp) ja guanosiinpentafosfaadi (pppGpp) kontsentratsiooni tõus rakus (ühiselt nimetatakse (p)ppGpp-ks, struktuurid kujutatud joonisel 4), mille tulemusena muutuvad bakteri geeniekspressioon ning metabolism, et stress üle elada (Wu *et al*., 2020).

Stressitingimustes ressursikasutuse optimeerimiseks inhibeerib (p)ppGpp akumuleerumine rakus translatsiooni (Svitil *et al.*, 1993) ja replikatsiooni (Wang *et al*., 2007), mõjutades seega bakteri kasvu (Potrykus *et al.*, 2011). DNA replikatsiooni reguleerib (p)ppGpp mitmel erineval moel, näiteks praimerite sünteesi või transkriptsiooni inhibeerimisega. (p)ppGpp on praimerite sünteesi otsene inhibiitor, seondudes DNA praimaasi *DnaG* aktiivtsentrisse (Wang *et al*., 2007). Samuti takistab (p)ppGpp kaudselt DNA replikatsiooniks vajaliku DnaA seondumist *oriC* järjestusele, sest transkriptsiooni inhibeerides vähendab (p)ppGpp sealset DNA negatiivset superspiralisatsiooni (Kraemer, 2019). Translatsiooni takistab (p)ppGpp nii rRNA-de sünteesi vähendamise kui ka translatsioonikompleksi moodustumise inhibeerimisega (Kästle *et al*., 2015; Corrigan *et al.*, 2016). Lisaks vähendab alarmoonmolekul ka translatsiooni initsiatsiooni- ja elongatsioonifaktorite aktiivsust, takistades või aeglustades seekaudu kogu translatsiooniprotsessi (Diez et al., 2020; Hamel ja Cashel, 1974).



Joonis 4. Alarmoonide ppGpp ja pppGpp struktuurid. Guanosiintetrafosfaat (ppGpp) põhineb guanosiindifosfaadi (GDP) molekulil ja guanosiinpentafosfaat (pppGpp) guanosiintrifosfaadi (GTP) molekulil, mille 3’ hüdroksüülrühmale on (p)ppGpp süntetaasi poolt lisatud ATP-lt pärinev pürofosfaatrühm.

Nagu eelnevalt mainitud, vallandab poomisvastuse eelkõige bakteri elukeskkonnast tingitud stress. (p)ppGpp kontsentratsiooni regulatsiooni eest rakusiseselt vastutavad RSH (RelA/SpoT homoloog) superperekonna valgud ehk *E. coli* RelA ja SpoT valkude homoloogid (Atkinson *et al.*, 2011). Nende ensüümide nimetus, arv ja funktsioon võib bakteriliigiti erineda: RelA ja Rsh (*Streptomyces clavuligerus*), Rel, YwaC ja YjbM (*Bacillus Subtilis*), Rel_{Mtb} (*Mycobacterium tuberculosis*) (Jin *et al.*, 2004; Ababneh ja Herman, 2015; Weiss ja Stallings, 2013). Kui üldiselt on bakterites üks mitmedomeenne RSH ensüüm, millel on kaks vastandlikku funktsionaalsust (nii ppGpp süntees kui ka hüdrolüüs) (Atkinson *et al.*, 2011), siis γ- ja β-proteobakterites on kaks spetsialiseerunud mitmedomeenset RSH valku: RelA ja SpoT. Need valgud on mõlemad võimelised (p)ppGpp-d sünteesima GDP-st (guanosiindifosfaat) ja ATP-st (adenosiintrifosfaat) või GTP-st (guanosiintrifosfaat) ja ATP-st, kuid ensüümide sünteesiaktiivsused ja aktivatsioonitingimused on erinevad (Lopez *et al.*, 1981). Ribosoom-seoseline RelA on efektiivsem (p)ppGpp sünteesija kui SpoT ning vastutab (p)ppGpp sünteesi eest peamiselt aminohapete puuduse korral, aktiveerudes ribosoomi A-saiti seonduvate laadimata tRNA-de tõttu (Haseltine ja Block, 1973). Ka näiteks kuumašokk võib indutseerida RelA-d tootma (p)ppGpp-d (Gallant *et al.*, 1977) ning (p)ppGpp ise on positiivse tagasiside alusel RelA allosteeriline aktivaator, seondudes ensüümi katalüütilise subühiku külge ning stabiliseerides seekaudu RelA valgu konformatsiooni (Roghanian *et al.*, 2021). Maksimaalse katalüütilise aktiivsuse saavutamiseks peab RelA kindlasti seonduma ka ribosoomile (Shyp *et al.*, 2012). Kuigi RelA omab ka hüdrolüüsi domeeni, on see inaktiivne ning (p)ppGpp lagundamise eest vastutab SpoT (Atkinson *et al.*, 2011).

SpoT ensüümil on lisaks funktsionaalsele sünteesi domeenile ka aktiivne hüdrolüüsi domeen, mis tagab vajadusel (p)ppGpp lagundamise (Atkinson *et al.*, 2011). (p)ppGpp sünteesiaktiivus on bifunktsionaalsel SpoT-l madalam kui RelA-l, ent see mängib siiski olulist rolli rasvhapete- või süsinikunälja poolt vallandatud poomisvastuses (Seyfzadeh *et al.*, 1993; Sarubbi *et al.*, 1989). Mõnel bakteriliigil (näiteks *Acinetobacter baumannii*) on SpoT monofunktsionaalne, olles kaotanud oma sünteesiaktiivsuse (Tamman *et al.*, 2023). Hüdrolüüsiaktiivsus on oluline tasakaalu hoidmiseks ja stressieelse seisundi taastamiseks, vähendades lagundamisega alarmooni kontsentratsiooni rakus. SpoT puudumine on bakterile letaalne, sest kaob tasakaal sünteesi ja hüdrolüüsi vahel ning toimub kontrollimatu (p)ppGpp kontsentratsiooni kasv (Xiao *et al.*, 1991). Vähemal määral osalevad (p)ppGpp kontsentratsiooni regulatsioonis ka väikesed alarmooni süntetaasid (SAS) ja hüdrolaasid (SAH), mis omavad vastavalt vaid sünteesi või hüdrolüüsi domeeni (Atkinson *et al.*, 2011). (p)ppGpp sünteesi ja hüdrolüüsi vahekorda muutes reguleeritakse seega RSH ensüümide abil alarmooni kontsentratsiooni raku tasandil, et

vallandada poomisvastus. Suurema sünteesiaktiivsuse võrreldes hüdrolüüsiga võib bakter saavutada (p)ppGpp intensiivsema sünteesiga, selle vähesema lagundamisega või ka mõlema protsessi alla reguleerimisega, sealjuures inhibeerides hüdrolüüsi rohkem kui sünteesi (Murray, 1996).

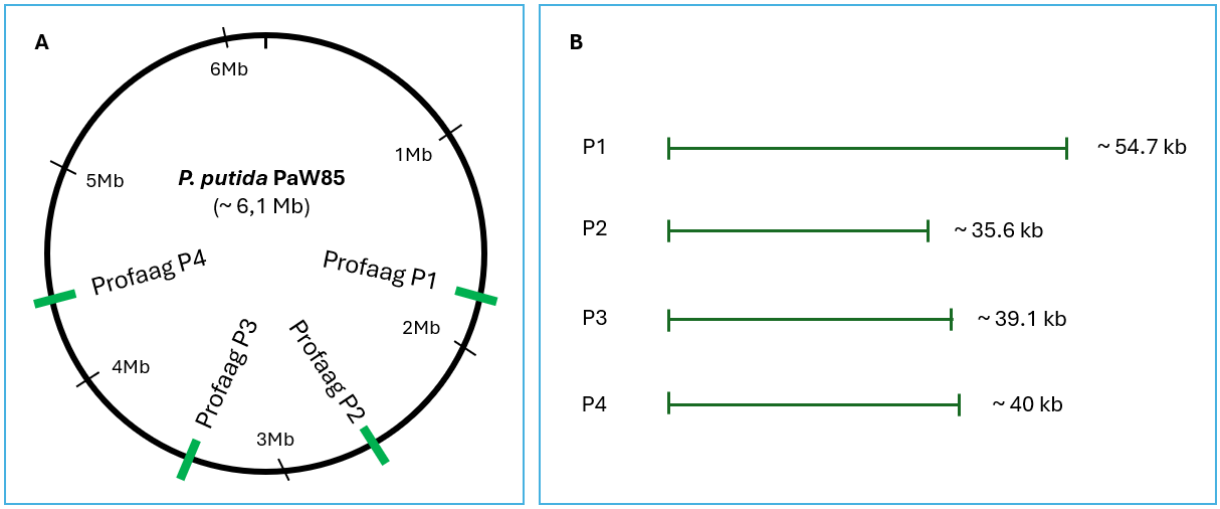
On teada, et poomisvastus võib tõsta bakteri resistentsust osade faagide vastu (Mägi, 2023; Rikberg 2023), kuid selle stressivastuse mõjust mõõdukate faagide elutsükli valikule ei ole palju teada. Kuna poomisvastus mõjutab nii replikatsiooni kui ka geeniekspressiooni (Wang *et al*., 2007; Svitil *et al.*, 1993), siis ehk on sellel mõju ka bakteri genoomis olevatele profaagidele. Faag λ kohta on teada, et lüsogeensust soodustavate promootorite aktivaatorit (CII) lagundava proteaasi (HflB/FtsH) kogus rakus sõltub ppGpp kontsentratsioonist (Slomińska *et al.*, 1999). Uurimuses leiti, et liiga kõrge ja liiga madal ppGpp tase vähendavad faagi insertsiooni efektiivsust peremeesgenoomi, kuid ei mõjutanud oluliselt juba integreerunud profaagi ega lüütilist elutsüklit (Slomińska *et al.*, 1999). Samuti on leitud, et *Escherichia coli* Shiga toksiini kodeerivad profaagid indutseeruvad palju edukamalt ppGpp puudumisel, mis viitab, et poomisvastusel on teatav roll mõõduka faagi elutsükli valikus (Nowicki *et al.*, 2013).

1.2. *Pseudomonas putida* profaagid

Pseudomonas putida, tähtis mudelorganism biotehnoloogias, on gramnegatiivne pulgakujuline proteobakter. *P. putida* on kohastunud eluks erinevates ökoloogilistes niššides ning teda võib näiteks looduses leida arvukalt mullast ja veest (Wu *et al.*, 2011). *P. putida* on väga vastupidav ning tema võimekus lagundada keskkonda saastavaid ühendeid on teinud *P. putida* bioremediatsioonis oluliseks liigiks (Raghavan ja Vivekanandan, 1999; Jiménez *et al.*, 2002; Tasleem *et al.*, 2023). Alles hiljuti on põhjalikumalt kirjeldatud *P. putida* lüütilisi faage ning näidatud tema profaagide faagikaitsevõimekust (Piirmets, 2022; Lipu, 2023; Brauer *et al.*, 2024). Profaagide puudumine aga seevastu parandab bakteri üldist elumust ning tõstab UV- ja tsiprofloksatsiini-taluvust (Martínez-García *et al*., 2015). On teada, et *P. putida* tüve KT2440 (PaW85) genoomis on neli krüptilist profaagi (Wu *et al.*, 2011) (Joonis 5), kuid *P. putida* lüüsiks võimelisi mõõdukaid faage pole seni isoleeritud.

P. putida profaagidest on pikim P4 (54,7 kb) ja lühim P2 (35,6 kb) ning kokku moodustavad kõik profaagid ligikaudu 2,6 % *P. putida* genoomist (Martínez-García *et al*., 2015). Varasemates uuringutes on tuvastatud profaagide P1, P3 ja P4 spontaanset lahkumist *P. putida* genoomist ning P4 lahkumisel on kirjeldatud faagipartikli-laadsete produktide moodustumist (Brauer *et al*., 2024; Martínez-García *et al*., 2015; Quesada *et al*., 2012). Profaag P2 spontaanset lahkumist ei ole tuvastatud. Nii P3 kui ka P4 lahkusid *P. putida* genoomist sagedamini

stressitingimustes (statsionaarne kasvufaas, UV, nälg), mis viitab stressivastuse mõjule profaagide lahkumisel (Martínez-García *et al*., 2015). Samuti on nähtud poomisvastuse indutseerimisel profaagide poolt kodeeritavate geenide üleekspressiooni (Abella *et al.*, 2007). *P. putida* poomisvastuse mõju profaagide lahkumissagedusele pole aga seni uuritud.



Joonis 5. Profaagid *P. putida* genoomis. A) Kujutatud on nelja profaagi (P1, P2, P3, P4) asukohad *P. putida* tüve PaW85 genoomis. Profaagide ligikaudseid asukohti tähistavad roheliste kastide ja *P. putida* genoomi (must rõngas) ristumiskohad. Brauer *et al*., 2024, muudetud. B) *P. putida* profaagide pikkused. Joonte pikkused visualiseerivad profaagide suhtelist pikkust üksteisega võrreldes ning joonte kõrval on toodud profaagide pikkused.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Poomisvastuse mõju *P. putida* mõõdukatele faagidele pole varasemalt uuritud, sest ei ole isoleeritud seda bakterit nakatavaid mõõdukaid faage. Minu töögrupi poolt on alles hiljuti isoleeritud ja iseloomustatud kollektsioon *P. putida* PaW85 lüütilisi faage (Brauer *et al*., 2024) ning tuvastatud poomisvastuse mõju nende faagide nakatamisefektiivsusele (Mägi, 2023; Rikberg, 2023). On ka teada, et *P. putida* PaW85 genoomis leidub neli krüptilist profaagi, mis on kaotanud võime bakterit lüüsida, kuid võivad peremehe genoomist lahkuda (Martínez-García, 2015). Poomisvastuse lüsogeensust soodustavat efekti on kirjeldatud *E. coli* lüsogeensete faagide puhul (Slomińska et al., 1999), kuid ei ole teada, kas need tulemused on üle kantavad *P. putida* mõõdukatele faagidele. Minu töö eesmärk oli selgitada välja, kas *P. putida* poomisvastus mõjutab ppGpp vahendusel tema mõõdukate faagide infektsioonitsükli valikut. Selle eesmärgi täitmiseks oli vaja:

1) Uurida poomisvastuse mõju *P. putida* nelja krüptiliste profaagi lahkumisele bakteri genoomist;

2) Isoleerida *P. putida*t nakatavaid mõõdukaid bakteriofaage, et edaspidi uurida mõõdukate faagide integreerumise ja lahkumise sõltuvust ppGpp-st.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Kasutatud söötmed ja lahused

Bakterite kasvatamiseks kasutati LB (*Lysogeny Broth*) söödet (1% trüptoon, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl). Lisaks vedelale LB söötmele, kasutati LB agarit (lisakoostisosa 1,5% agar) ning LB pehmet agarit (lisakoostisosa 0,3% agar) koos $CaCl_2$-ga (lõppkontsentratsioon 10 mM). Sõltuvalt katsest lisati LB agarisse tsiprofloksatsiini (cip) lõppkontsentratsiooniga 0,03 µg/ml (kui pole mainitud teisiti). Cip on oluline faagide lüütilise tsükli aktivatsiooniks ning $CaCl_2$ tõhustab virioni adsorptsiooni ja faagigenoomi sisestamist bakterisse (Goerke *et al.*, 2006; Chhibber *et al.*, 2014). Lahjendusi tehti SM puhvris (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 8 mM $MgSO_4$, 0,01% želatiin) ning TES puhvrit (100 mM M Tris.HCl (pH 8,2), 100 mM EDTA (etüleendiamiintetraäädikhape), 0,3% [w/v] SDS (naatriumdodetsüülsulfaat)) kasutati faagigenoomi eraldamisel.

2.2.2. Kasutatud bakteritüved

Töös kasutatud *P. putida* tüved on välja toodud Tabelis 1. Tavalises kirjas on välja toodud PaW85 metsiktüvel baseeruvad tüved. Poomisvastuses osalevate ensüümide RelA ja SpoT deletsioontüvede (ΔRelA ja ΔRelASpoT) abil on võimalik hinnata poomisvastuse puudumise mõju. Kaitsesüsteemidevaene deletsioontüvi ΔDef8 on vajalik tuvastamaks mõõdukaid faage, mis bakteriaalsete kaitsesüsteemide taustal ei pruugi bakterirakku lüüsida – välistatakse olukord, et bakterite nakatumine jääb tuvastamata bakterit kaitsvate faagikaitsesüsteemide tõttu. Tabelis 1 rasvases kirjas välja toodud tüved pärinevad Tartu Ülikooli Molekulaar- ja rakubioloogia instituudi keskkonnast pärinevate ja laboratoorsete bakteritüvede kollektsioonist CELMS (*Collection of Environmental and Laboratory Microbial Strains*) ning neid kasutati mõõdukate faagide indutseerimisel.

Tabel 1. Töös kasutatud *P. putida* tüved. Tavalises kirjas tüved põhinevad PaW85 metsiktüvel. Rasvases kirjas tüvesid kasutati mõõdukate faagide indutseerimisel.

Tüvi	Kirjeldus	Viide allikale
PaW85	Metsiktüvi	Bayley *et al.*, 1977
ΔRelA (ΔR)	PaW85, milles puudub ensüüm RelA; ppGpp süntees osaliselt tagatud valgu SpoT poolt	Hedvig Tamman
ΔRelASpoT (ΔRS)	PaW85, milles puuduvad ensüümid RelA ja SpoT; bakter ei sünteesi ppGpp-d	Hedvig Tamman

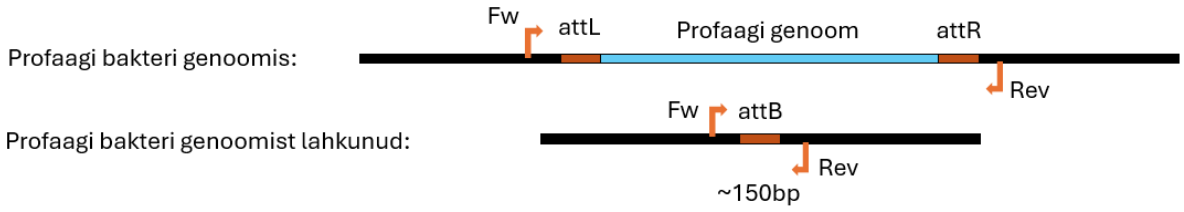
ΔDef8 ehk Δ13TAΔ4φ ΔWaΔGaΔRM-I ΔHerA/DUF4297 ΔRM-II/ ΔPD-T7-1	PaW85, milles puuduvad kaheksa ennustatud kaitsesüsteemi gruppi: 13 toksiin-antitoksiin süsteemi (Δ13TA), 4 profaagi (Δ4φ), Wadjet (ΔWa), Gabija (ΔGa), tüüp I restriktsiooni-modifikatsiooni süsteem (ΔRM-I), HerA koos DUF4297-ga, tüüp II restriktsiooni-modifikatsiooni süsteem (ΔRM-II) ning PD-T7-1	Sirli Rosendahl
A8	Isoleeritud Tallinna lahest, Balti meres	Eeva Heinaru, 2008
Ad1	Isoleeritud Tallinna lahest, Balti meres	Signe Viggor, 2008
G7	Isoleeritud USA-s	Dunn ja Gunsalus, 1973
KAR35	Kartulist isoleeritud tüvi nr 35	Viia Kõiv, 2013
KAR36	Kartulist isoleeritud tüvi nr 36	Viia Kõiv, 2013
KAR37	Kartulist isoleeritud tüvi nr 37	Viia Kõiv, 2013
KP49	Isoleeritud Tartu reoveepuhastusjaama väljavoolukulglast	Kaja Asi ja Signe Viggor, 2017
PC13	Isoleeritud Kohtla jõe veest	Eeva Heinaru, 1994
PJK7	Isoleeritud Porijõest	Merike Jõesaar, 2022
P63a	Isoleeritud fenooliga saastunud jõeveest Kohtla-Järvel	Eeva Heinaru, 1994
Sal3V	Isoleeritud Vilsandi lähistelt Balti mere veest	Eeva Heinaru, 2008
T9	Isoleeritud tehistiigist Tartus	Merike Jõesaar, 2021
Vas-1	Isoleeritud Vasula jõe puhkeala lähistelt	Merike Jõesaar, 2022
1S7	Isoleeritud Atlandi ookeanist (Marino de Glome, Brasiilia)	Eeva Heinaru ja Sulev Kuuse, 2019
1VP8B	Isoleeritud puhasti õhupaagist	Signe Viggor, Merike Jõesaar, Eeva Heinaru; 2023
3VB7	Isoleeritud Kohtla-Järve settetiigi veest	Signe Viggor, Merike Jõesaar, Eeva Heinaru; 2023
5SP6	Isoleeritud fenool-soo settest	Signe Viggor, Merike Jõesaar, Eeva Heinaru; 2023

2.2.3. qPCR poomisvastuse mõju uurimiseks profaagide lahkumissagedusele

Poomisvastuse mõju uurimiseks profaagide lahkumissagedusele võrreldi faagigenoomi lahkumissagedust kvantitatiivselt kasutades qPCR metoodikat. Selleks eraldati tootja protokolli järgi (*Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit*) kõigepealt DNA üleöö LB söötmes temperatuuril 30 °C nii cip (0,03 µg/ml) juuresolekul kui ka ilma kasvanud metsiktüvest PaW85 ning poomisvastuse deletsioontüvedest ΔRelA ja ΔRelASpoT. Saades

igale kuuele proovile kolm bioloogilist kordust (I, II ja III). Nende tüvedega viidi läbi qPCR, lähtudes tootja protokollist (*Thermo Scientific Maxima SYBR Green qPCR Master Mix*). Sealjuures järgiti kolme-sammulist tsükliprotokolli (*three-step cycling protocol*), kust jäeti välja valikuline UDG (uratsiil-DNA glükosülaas) eeltöötlus. UDG eeltöötlus on vajalik vaid siis, kui on oht UTP (uratsiiltrifosfaat) saastuseks.

Kasutatud qPCR praimerid on toodud Tabelis 2. qPCR praimerid profaagide lahkumissageduse määramiseks disainiti seonduma DNA järjestusele, mis ennustatavalt ümbritseb faagi genoomi bakteri DNA-s ning jääb bakteri genoomi alles pärast faagi lahkumist (Joonis 6). Profaagi genoomi mõlemas otsas on sünonüümsed *att* (*attachement*) järjestused *attL* (L – vasak, ing. k *left*) ja *attR* (R – parem, ing. k *right*), millest vaid üks jääb bakteri genoomi alles, kui profaag bakterigenoomist lahkub. Profaagi lahkumise detekteerimiseks disainitud praimerid seonduvad alles jäänud *attB* järjestuse lähedale või osaliselt selle peale. Kui profaagi genoom ei ole bakterigenoomist lahkunud, siis praimerite vahele jääv produkt on liiga pikk, et seda edukalt paljundada.



Joonis 6. Profaag bakteri genoomis. Profaag (sinine) on bakteri genoomis (must) ümbritsetud kahe sünonüümse *att* ehk *attachement* järjestuse poolt (tähistatud punasega). Kui profaag lahkub bakteri genoomist, jääb järele vaid üks *att* järjestus (attB). Profaagi lahkumise detekteerimiseks disainiti mõlemale DNA ahelale praimerid (Fw – *forward* ja Rev – *reverse*; oranžid nooled), mis seonduvad *att* järjestuse kõrvale või osaliselt selle peale.

Taustkontrolliks paljundati *rpoD* geeni, sest see geen kodeerib bakteriaalseks transkriptsiooniks olulist sigma-faktorit (Shimada *et al*., 2014). Bakterile eluliselt oluline *rpoD* on olemas seega igas genoomis ühe koopiana, võimaldades hinnata profaagi lahkumissagedust üldpopulatsioonis. Profaagi kohta iga eraldatud genoomi tulemus jagati vastava genoomi rpoD tulemusega, saades profaagi lahkumissageduse. Enne seda tehti qPCR tulemustele baasväärtuse korrektsioon, kasutades programmi LinRegPCR, et eemaldada taustsignaali mõju. Tulemuste statistiliseks analüüsiks kasutati mitteparameetrilist Kruskal-Wallise testi, mis võimaldab mitmese võrdluse korrektsiooni (*GraphPad Prism* versioon 10.0.0).

Tabel 2. *P. putida* profaagide lahkumissageduse määramiseks kasutatud qPCR praimerid

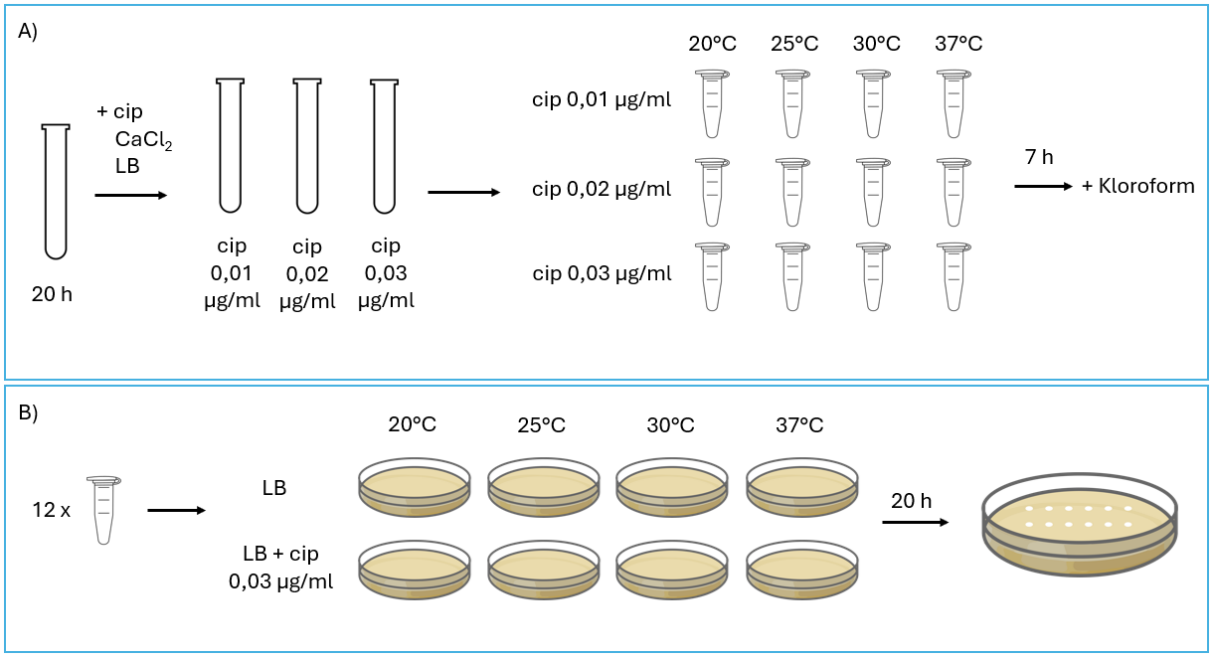
Selgitus	Nimi	Järjestus 5'-3'	Viide allikale
Profaag P1 lahkumise detekteerimiseks qPCRiga	delP1_qPCR_Fw	AGTTTCGGAACTCTTGCCTTT	Rita Hõrak
	delP1_qPCR_Rev	GCCGAGTAGCAAAGTGGTTAT	Rita Hõrak
Profaag P2 lahkumise detekteerimiseks qPCRiga	delP2_qPCR_Fw	CTCGCCTGACGTCTCGTAT	Käesolev töö
	delP2_qPCR_Rev	ATGCTCGACACGCCGA	Käesolev töö
Profaag P3 lahkumise detekteerimiseks qPCRiga	delP3_qPCR_Fw	CCCTTAGAGACATCCTTAGAAATGAT	Martínez-García *et al*. 2015
	delP3_qPCR_Rev	GCCTACTCTGCCCGAGCCACG	Martínez-García *et al*. 2015
Profaag P4 lahkumise detekteerimiseks qPCRiga	delP4_qPCR_Fw	AGGCGATGGCTTTGTCTTCGAG	Martínez-García *et al*. 2015
	delP4_qPCR_Rev	CAATGTACACAATGACCTACACG	Martínez-García *et al*. 2015
rpoD geeni qPCRi jaoks	rpoDqFw	GCAACAGCAGTCTCGTATCA	Tamman *et al.*, 2014
	rpoDqRev	ATGATGTCTTCCACCTGTTCC	Tamman *et al.*, 2014

2.2.4. Mõõdukate faagide indutseerimine

Mõõdukate faagide tuvastamiseks valiti CELMS kollektsioonist 17 *P. putida* tüve (Tabel 1, rasvases kirjas tüved), teadmata, kas nende genoomis profaage esineb. Mõõdukate faagide indutseerimiseks (skemaatiline indutseerimisprotsess kujutatud joonisel 7) kasvatati kõigepealt uuritavat bakteritüve ning ΔDef8 tüve üleöö (20 h) aereerides LB vedelsöötmes temperatuuril 20 °C. Seejärel segati kokku kolm erineva cip kontsentratsiooniga indutseerimissöödet, kuhu lisati 1 ml LB söötme kohta: $CaCl_2$ (lõppkontsentratsioon 10 mM), uuritava tüve üleöökultuuri arvutuslikult OD_{580} (rakukultuuri tihedus, *Optical Density* lainepikkusel 580 nm) 0,1 ning cip vastavalt soovitud lõppkontsentratsioonile 0,01 µg/ml, 0,02 µg/ml või 0,03 µg/ml. Et suurendada mõõduka faagi indutseerumise tõenäosust, kasvatati kõiki kolme erineva cip kontsentratsiooniga indutseerimissegu neljal erineval temperatuuril (20 °C, 25 °C, 30 °C ja 37 °C) 7 h aereerides, saades kokku 12 erinevate kasvutingimustega lahust. 3,5 h pärast

värskendati ΔDef8 üleöö kultuuri, et saada eksponentsiaalses kasvufaasis rakke: 350 µl üleöökultuuri lisati 5 ml LB söötmesse ning kasvatati aereerides 4 h temperatuuril 20 °C.

Seitsme tunni möödudes lisati lahustele (1 ml kohta) 20 µl kloroformi ja segati, et rakud lüüsuksid ning indutseerunud faag vabaneks kindlasti rakust. Seejärel fuugiti lahus 3 min täispööretel (*Eppendorf minispin*) põhja ning vedelik eraldati sademest (lahust säilitati temperatuuril 4 °C). Kõigist saadud lüüsilahustest (12 tüve kohta) külvati 2 µl tilk LB ja LB + cip (0,03 µg/ml) Petri tassidele, mis olid kaetud tahenenud ΔDef8 bakterimuruga (Petri tassi kohta: 200 µl värskendatud (eksponentsiaalses kasvufaasis, $OD_{580} \approx 1$) ΔDef8 bakterikultuuri, 10 mM $CaCl_2$ ning LB 0,3% agarit kuni 5 ml-ni). Kui lüüsitilgad olid kuivanud, inkubeeriti Petri tasse üleöö (20 h) neljal erineval temperatuuril (20 °C, 25 °C, 30 °C ja 37 °C), saades kokku 8 erinevate kasvutingimustega Petri tassi. Järgmisel päeval (20 h möödudes) hinnati lüüsilaikude tekkimist visuaalselt.



Joonis 7. Mõõdukate faagide indutseerimise katse skeem. A) Üleöö (20 h) kasvanud bakterikultuuri lahjendus, $CaCl_2$ ja cip (kolm erinevat cip kontsentratsiooni – 0,01 µg/ml, 0,02 µg/ml ja 0,03 µg/ml) segati kokku ning kasvatati neljal erineval temperatuuril (20 °C, 25 °C, 30 °C ja 37 °C) 7 tundi. Seitsme tunni möödudes lisati igale 12-le lahusele kloroformi, et rakud lüüsida ja vabastada indutseerunud faagid. Rakud sadestati fuugimisega ning faagidega vedelik (lüüsilahus) eraldati sademest. B) Kõigist saadud lüüsilahusest (iga tüve kohta 12) külvati 2 µl tilk LB ja LB + cip (0,03 µg/ml) Petri tassidele, mis olid kaetud tahenenud ΔDef8 bakterimuruga. Neid inkubeeriti üleöö (20 h) neljal erineval temperatuuril (20 °C, 25 °C, 30 °C ja 37 °C), mille järel hinnati lüüsilaikude tekkimist visuaalselt.

2.2.5. Mõõduka faagi DNA eraldamine

Mõõduka faagi eraldamiseks kasutati bakteritüve lüsaati, mille tilgast tekkis lüüsilaik ΔDef8 bakterimurule. Selleks viidi läbi indutseerimine sarnaselt eelnevalt kirjeldatud protokollile, kuid suuremas koguses (100 ml), ning kasvatati indutseerimissegu vaid tekkinud suurimale lüüsilaigule vastaval temperatuuril ja cip kontsentratsioonil. KAR37 tüve puhul oli selleks temperatuuriks 20 °C ja cip kontsentratsioon 0,03 µg/ml. Seitsme tunni möödudes lisati 100 ml segule 2 ml kloroformi ning fuugiti 5000 rpm pööretel 20 minutit (*Hettich Universal 320R*). Sellest 80 ml lüsaati jagati võrdselt kahe 50 ml tuubi vahel ning alustati DNA sadestamisega.

Esmalt, faagipartiklite sadestamiseks (proovimahu vähendamiseks) lisati mõlemasse tuubi 1 ml 2 M $ZnCl_2$ ning segati ja inkubeeriti 30 min temperatuuril 37 °C. Seejärel fuugiti segu põhja 15 min 7000 g ning valati sademe pealt ära kogu vedelik. Sademed resuspendeeriti 1 ml SM puhvris ning lahustuv osa eraldati jäänud lahustumatust sademest. Saadud kahele lahusele lisati RNA lagundamiseks 4 µl RNaasi (10 mg/ml) ja DNA lagundamiseks 2 µl DNaasi (10 mg/ml) ning inkubeeriti 1 h toatemperatuuril (22 °C). Inkubeerimise järel, teistkordseks faagipartiklite sadestamiseks, lisati segule 20 µl 2M $ZnCl_2$. Seejärel inkubeeriti lahust 10 min temperatuuril 37 °C, fuugiti 1 min täispööretel (*Eppendorf minispin*) põhja ja resuspendeeriti 200 µl TES puhvris (100 mM M Tris.HCl (pH 8,2), 100 mM EDTA (etüleendiamiintetraäädikhape), 0,3% [w/v] SDS (naatriumdodetsüülsulfaat). Nüüd tõsteti kaks lüsaati kokku ja lisati segule 4 µl proteinaas K (20 mg/ml), et lõhkuda lüsaadis sisalduvad faagipartiklid. Lüsaati inkubeeriti 1 h temperatuuril 60 °C, mille järel lisati valkude sadestamiseks 40 µl 3 M K-atsetaati ja inkubeeriti jääl 15 min, fuugiti sadenenud valgud põhja (1 min 10 000 g) ja lahustuv osa eraldati sademest.

Seejärel sadestati lahusest DNA: lüsaadile lisati võrdne maht (ligikaudu 400 µl) isopropanooli (100%), mille järel inkubeeriti lahust 5 min jääl ning fuugiti 8 min täispööretel (*Eppendorf minispin*), et DNA põhja sadeneks. Sadet pesti kaks korda 80% etanooliga: eemaldati vedelik, lisati 200 µl 80% etanooli, segati ja fuugiti 5 min. Lõpuks eemaldati vedelik, kuivatati DNA sade ja lahustati 60 µl puhtas vees. Edasi lisati *Zymo search Kit*i sidumispuhvrit ja puhastati läbi kolonni (*Norgen Biotec Corp. - Phage DNA Isolation Kit*) ning elueeriti tootja protokolli järgi (*Omega Bio-Tek MicroElute Cycle – Pure & Gel Extraction Kit*). Eraldatud DNA puhtust kontrolliti, kandes 5 µl proovi etiidiumbromiidi sisaldavale (0,5 µg/ml) 1% agaroosgeelile, viidi läbi elektroforees 15 minutit pingel 130 V 1% TAE puhvris. DNA visualiseeriti UV valguses. Faagi genoomi DNA kontsentratsioon määrati NanoDrop spektrofotomeetriga lainepikkusel 260 nm. Eraldatud DNA saadeti sekveneerimisele (nanopoor meetodil) firmasse Seqvision.

2.2.6. Mõõduka faagi ViKa järjestuse determineerimine

KAR37 tüvest indutseeritud mõõduka faagi nimeks sai peremeestüve isoleerija ja isoleerimiskoha järgi ViKa (Vi – Viia Kõiv, Ka – kartul). Eelneva protokolli järgi isoleeritud ViKa faagi DNA sekveneerimise tulemus ei olnud puhas – proov sisaldas liiga palju bakteri DNA-d, mistõttu ei olnud võimalik määrata indutseerunud mõõduka faagi järjestust. Sekveneerimistulemuste põhjal disainiti faagigeenide-rikaste regioonide tuvastamiseks praimerid (Tabel 3). DNA-d paljundati PCR (polümeraasi ahelreaktsiooni) meetodil indutseerimiskatse tulemusena tekkinud lüüsilaigust pärinevast materjalist. Kogutud materjal lahustati eelnevalt 50 µl SM puhvris, sellele lisati 3 µl kloroformi, segati ning fuugiti põhja. PCR segusse pipeteeriti supernatandist 1 µl. Kontrollina kasutati sekveneerimisele saadetud DNA-d, mida lisati segusse 0,5 µl. Komponendid ühe PCR reaktsioonisegu kohta: 1 x puhver (*Thermo Scientific* 10 x *DreamTaq Green Buffer*, sisaldab 20 mM $MgCl_2$), desoksüribonukleotiidid lõppkontsentratsiooniga 0,2 mM, mõlemat praimerit 10 pmol, Taq polümeraasi 1 U, vesi lõppmahuni (20 µl). PCR viidi läbi programmiga: 96 °C denaturatsioon (30 sekundit), praimerite seondumine 56 °C (30 sekundit) ja DNA süntees 72 °C (40 sekundit). Programmile eelnes eelkuumutus 5 minutit 96 °C ja järgnes lisasüntees 2 minutit 72 °C. DNA fragmendid lahutati etiidiumbromiidi sisaldavas (0,5 µg/ml) 1% agaroosgeelis elektroforeesiga 1x TAE puhvris. DNA visualiseeriti UV valguses.

Tabel 3. PCR praimerid ViKa faagi järjestuse determineerimiseks kolme faagigeenidega regiooni hulgast. Praimerid disainis Age Brauer Phastest programmi tulemuste alusel.

Selgitus	**Nimi**	**Järjestus 5'-3'**
Faagigeenidega regiooni 1 detekteerimiseks PCRiga	ViKa Reg1 L	GCGAACTGAACACCAAGGTT
	ViKa Reg1 R	CTCGCTCGACTCCTGAATCT
Faagigeenidega regiooni 2 detekteerimiseks PCRiga	ViKa Reg2 L	GCCACACCTTCAACTGGATC
	ViKa Reg2 R	TTCTGACGAGTGCCTAAGGG
Faagigeenidega regiooni 3 detekteerimiseks PCRiga	ViKa Reg3 L	AAACGCCATGCTGATGATCC
	ViKa Reg3 R	TGATTTCAAAGCCACCACCG

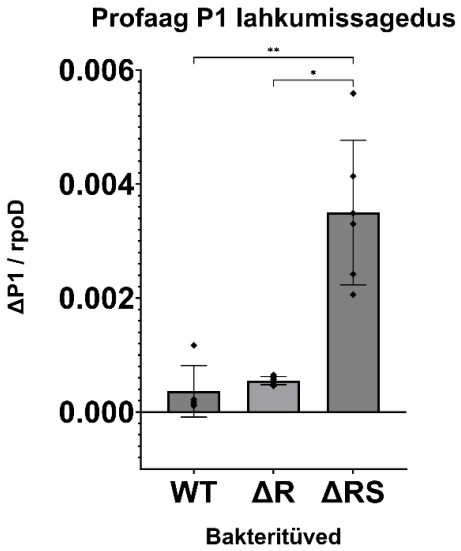
2.3. Tulemused

2.3.1. Poomisvastuse mõju *Pseudomonas putida* krüptiliste profaagide lahkumissagedusele

Poomisvastuse osaluse uurimiseks *P. putida* profaagide elutsükli valikule viidi läbi qPCR analüüs. Kõigi nelja profaagi lahkumissageduse sõltuvuse määramiseks ppGpp-st võrreldi profaagide lahkumissagedusi (nii cip juuresolekul kui ka ilma) kolme erineva *P. putida* tüve puhul: metsiktüvi, ΔRelA ja ΔRelASpoT (Lisa 1, joonis 1).

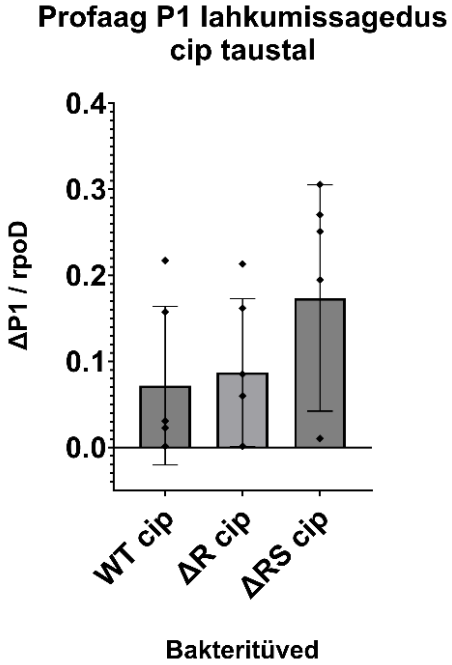
2.3.1.1. Poomisvastuse puudumine suurendab profaag P1 lahkumissagedust

Profaag P1 genoomist lahkumine on kolmel *P. putida* tüvel suurusjärgus 10^{-4}-10^{-3} (Joonis 8). Kõige sagedam on lahkumine ppGpp sünteesi võimeta tüvel ΔRelASpoT, millest toimub P1 lahkumine keskmiselt 3-4 genoomist 1000 genoomi kohta (keskmine sagedus $3{,}5 \times 10^{-3}$). Profaag P1 lahkumine tüvest ΔRelASpoT on 9,6 korda suurem kui metsiktüvest ning see erinevus on ka statistiliselt oluline (p-väärtus 0,0023). Samuti on statistiliselt oluline P1 lahkumissageduse erinevus tüvede ΔRelA ja ΔRelASpoT vahel (p-väärtus 0,0491), kus profaag P1 lahkub ΔRelASpoT tüve genoomist 6,3 korda sagedamini kui ΔRelA tüvest. Metsiktüvest ja ΔRelA tüvest on P1 lahkumissagedus sarnane, olles keskmiselt vastavalt $3{,}6 \times 10^{-4}$ ja $5{,}6 \times 10^{-4}$.



Joonis 8. ppGpp mõjutab profaag P1 lahkumissagedust. X-teljel on toodud tüvede nimetused, millest profaag P1 lahkumist määrati (WT – metsiktüvi PaW85, ΔR – *relA* deletsioontüvi, ΔRS – *relAspoT* deletsioontüvi), ning Y-teljel lahkumissagedus (ΔP1 genoomide hulk jagatud genoomide koguhulgaga, mida väljendab paljundatud *rpoD* geeni hulk). Välja on toodud veapiirid, kuue paralleeli tulemused on kujutatud mustade rombidena ning üleval kantsulu ja tärni(de)ga on välja toodud statistiliselt olulised erinevused tüvede vahel.

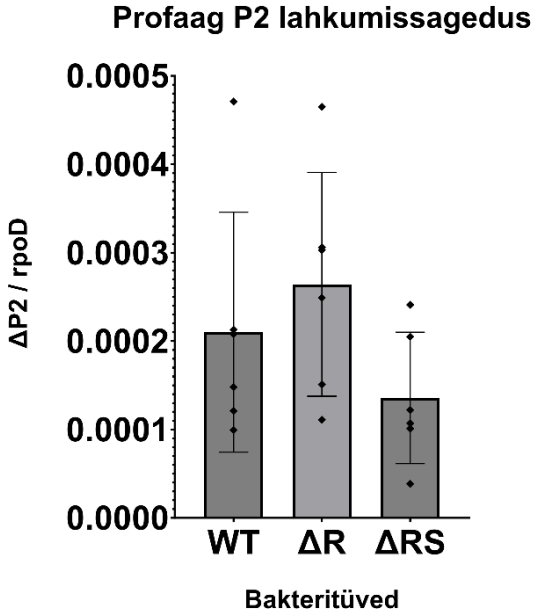
Cip-i juuresolekul lahkub kõigil kolmel bakteritüvel profaag P1 sagedamini kui cip puudumisel, kuid statistiliselt olulisi erinevusi tüvede vahel ei ole (Joonis 9; Lisa 1, joonis 1). Cip-i juuresolekul lahkub profaag P1 metsiktüve genoomist ligi 200 korda (~197,8) sagedamini kui cip-i puudumisel, lahkudes genoomist sagedusega 7,2 korda iga saja raku kohta. ΔRelA tüvest indutseerib cip profaag P1 lahkuma umbes üheksast genoomist saja genoomi kohta ($8{,}7 \times 10^{-2}$), mis on 158 korda sagedamini kui cip-i puudumisel. ΔRelASpoT tüve genoomist lahkus profaag P1 cip juuresolekul ~50 korda sagedamini kui ilma cip-ita (lahkumissagedus $1{,}7 \times 10^{-1}$).



Joonis 9. Poomisvastuse mõju profaag P1 lahkumissagedusele tsiprofloksatsiini (cip) juuresolekul ei tuvastatud. X-teljel on toodud tüvede nimetused, millest profaag P1 lahkumist määrati (WT – metsiktüvi PaW85, ΔR – *relA* deletsioontüvi, ΔRS – *relAspoT* deletsioontüvi), ning Y-teljel lahkumissagedus (ΔP1 genoomide hulk jagatud genoomide koguhulgaga, mida väljendab paljundatud *rpoD* geeni hulk). Välja on toodud veapiirid, kuue paralleeli tulemused on kujutatud mustade rombidena.

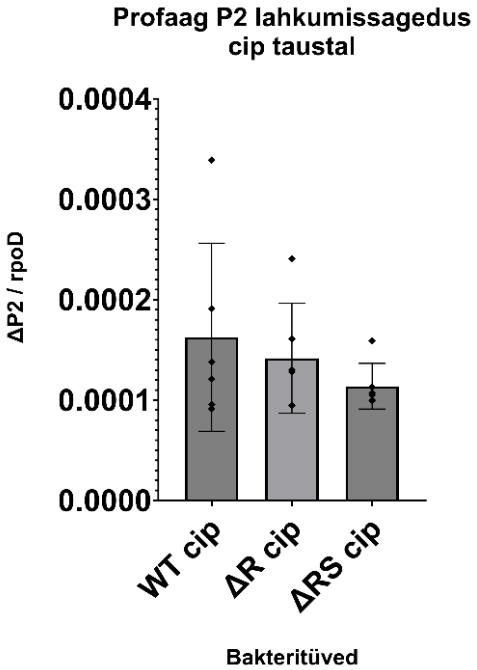
2.3.1.2. ppGpp puudumine ei mõjuta profaag P2 lahkumissagedust

Poomisvastuse puudumisel ei ole mõju profaag P2 lahkumissagedusele, kuid tema lahkumine genoomist on siiski detekteeritav (Joonis 10). Profaag P2 lahkumine ei erine oluliselt kolme uuritud *P. putida* tüve vahel ning lahkumissagedus on kõigi tüvede puhul suurusjärgus 10^{-4} ehk ligikaudu üks spontaanne lahkumine iga 10 000 genoomi kohta. Keskmiselt toimub profaag P2 lahkumine metsiktüvest sagedusega $2{,}1 \times 10^{-4}$, ΔRelA tüvest sagedusega $2{,}7 \times 10^{-4}$ ning ΔRelASpoT tüvest sagedusega $1{,}3 \times 10^{-4}$. Keskmine lahkumissagedus erineb küll vähesel määral, ent see tulemus pole statistiliselt oluline. Samuti on veapiirid väga väikeste väärtuste taustal võrdlemisi suured.



Joonis 10. Poomisvastus ei avalda mõju profaag P2 lahkumissagedusele. X-teljel on toodud tüvede nimetused, millest profaag P2 lahkumist määrati (WT – metsiktüvi PaW85, ΔR – *relA* deletsioontüvi, ΔRS – *relAspoT* deletsioontüvi), ning Y-teljel lahkumissagedus (ΔP2 genoomide hulk jagatud genoomide koguhulgaga, mida väljendab paljundatud *rpoD* geeni hulk). Välja on toodud veapiirid, kuue paralleeli tulemused on kujutatud mustade rombidena.

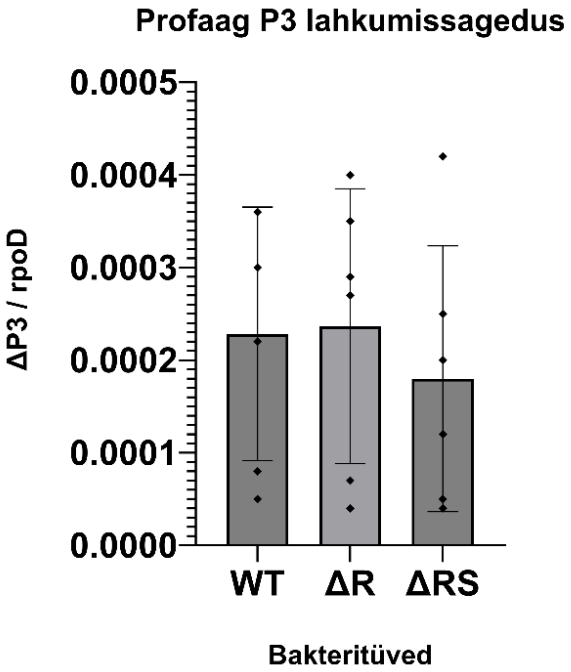
Profaag P2 lahkumissagedus ei suurene cip-i lisamisel ning samuti ei näita tulemused selle profaagi lahkumissageduse sõltuvust ppGpp-st (Joonis 11). Lahkumissagedus on endiselt suurusjärgus 10^{-4}, kuid cip vähesel määral vähendab profaag P2 lahkumissagedust kõigil kolmel uuritud tüvel (Lisa 1, joonis 1). Cip-i lisamisel on selle profaagi keskmine lahkumissagedus metsiktüvel $1{,}6 \times 10^{-4}$ (~75% cip puudumisel esinevast lahkumissagedusest ehk tavalisest lahkumissagedusest), ΔRelA tüvel $2{,}6 \times 10^{-4}$ (~52% tavalisest lahkumissagedusest) ning ΔRelASpoT tüvel $1{,}1 \times 10^{-4}$ (~86% tavalisest lahkumissagedusest).



Joonis 11. Poomisvastuse puudumine ei muuda profaag P2 lahkumissagedust ka tsiprofloksatsiini (cip) juuresolekul. X-teljel on toodud tüvede nimetused, millest profaag P2 lahkumist määrati (WT – metsiktüvi PaW85, ΔR – *relA* deletsioontüvi, ΔRS – *relAspoT* deletsioontüvi), ning Y-teljel lahkumissagedus (ΔP2 genoomide hulk jagatud genoomide koguhulgaga, mida väljendab paljundatud *rpoD* geeni hulk). Välja on toodud veapiirid, kuue paralleeli tulemused on kujutatud mustade rombidena.

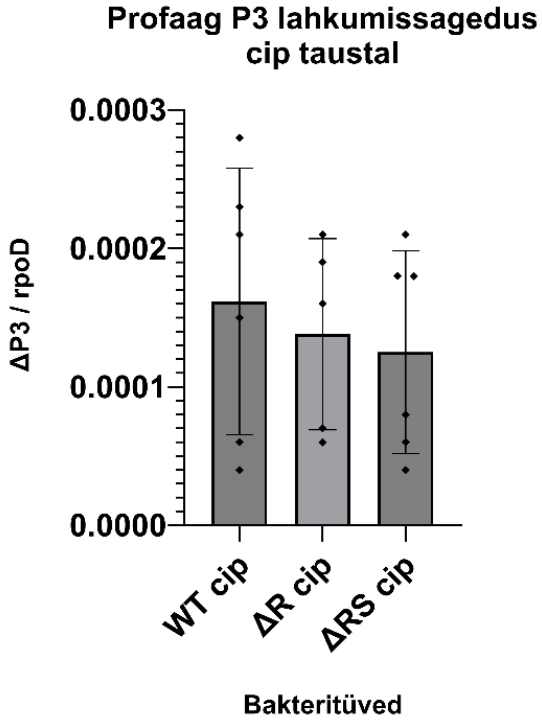
2.3.1.3. Profaag P3 lahkumissagedusele poomisvastus mõju ei avalda

Profaag P3 lahkumissagedus poomisvastuse deletsioontüve ΔRelASpoT genoomist ei erine oluliselt selle profaagi lahkumissagedusest ei metsiktüvest ega ΔRelA tüvest (Joonis 12). Kolme uuritava *P. putida* tüve genoomist lahkub profaag P3 spontaanselt suurusjärgus 10^{-4} lahkumist genoomi kohta, mis tähendab, et profaag P3 lahkub vähemalt korra iga 10 000 bakterigenoomi kohta. Metsiktüve puhul on selleks lahkumissageduseks keskmiselt $2{,}3 \times 10^{-4}$, ΔRelA tüvel $2{,}4 \times 10^{-4}$ ning ΔRelASpoT tüve puhul $1{,}8 \times 10^{-4}$.



Joonis 12. Poomisvastusel puudub mõju profaag P3 lahkumissagedusele. X-teljel on toodud tüvede nimetused, millest profaag P3 lahkumist määrati (WT – metsiktüvi PaW85, ΔR – *relA* deletsioontüvi, ΔRS – *relAspoT* deletsioontüvi), ning Y-teljel lahkumissagedus (ΔP3 genoomide hulk jagatud genoomide koguhulgaga, mida väljendab paljundatud *rpoD* geeni hulk). Välja on toodud veapiirid, kuue paralleeli tulemused on kujutatud mustade rombidena.

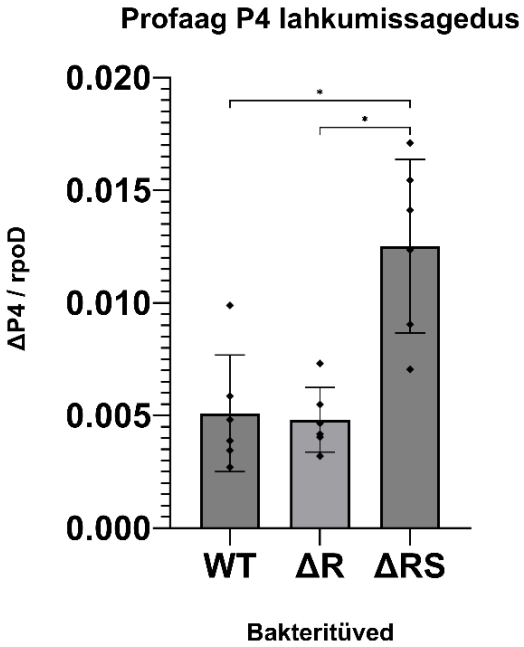
Ka cip-i juuresolekul kasvanud rakkudes ei esine poomisvastuse mõju profaag P3 lahkumissagedusele (Joonis 13). Kusjuures, ka profaag P3 lahkumissagedus on keskmiselt vähesel määral väiksem cip juuresolekul kui cip-i puudumisel kasvanud rakkudes (Lisa 1, joonis 1). Profaag 3 lahkub cip-i lisamisel kolme uuritava tüve genoomist iga 10 000 bakterigenoomi kohta ehk keskmiselt suurusjärgus 10^{-4}. Cip-i lisamisel on metsiktüve genoomist profaag P3 lahkumissagedus keskmiselt $1{,}6 \times 10^{-4}$ (~71% cip puudumisel esinevast lahkumissagedusest ehk tavalisest lahkumissagedusest), ΔRelA genoomist $1{,}4 \times 10^{-4}$ (~58% tavalisest lahkumissagedusest) ning ΔRelASpoT genoomist $1{,}2 \times 10^{-4}$ (~70% tavalisest lahkumissagedusest).



Joonis 13. Ka tsiprofloksatsiini (cip) juuresolekul ei avalda ppGpp puudumine mõju profaag P3 lahkumissagedusele. X-teljel on toodud tüvede nimetused, millest profaag P3 lahkumist määrati (WT – metsiktüvi PaW85, ΔR – *relA* deletsioontüvi, ΔRS – *relAspoT* deletsioontüvi), ning Y-teljel lahkumissagedus (ΔP3 genoomide hulk jagatud genoomide koguhulgaga, mida väljendab paljundatud *rpoD* geeni hulk). Välja on toodud veapiirid, kuue paralleeli tulemused on kujutatud mustade rombidena.

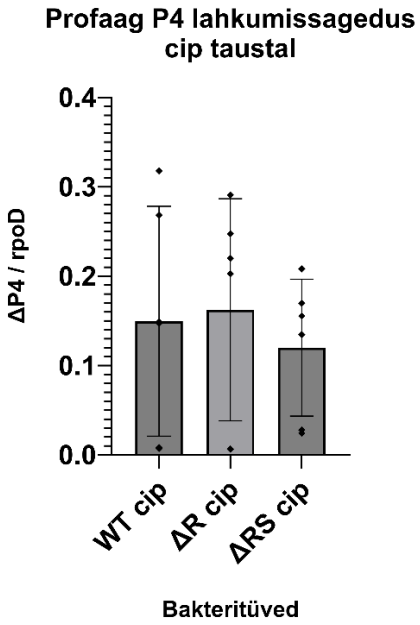
2.3.1.4. Poomisvastus vähendab profaag P4 lahkumist

Profaag P4 lahkumissagedus on suurim uuritud profaagide lahkumissagedustest. Lahkumine poomisvastuse deletsioonitüve ΔRelASpoT genoomist ka erineb oluliselt ppGpp sünteesiks võimelisest tüvest (Joonis 14). Profaag P4 lahkub ΔRelASpoT tüve genoomist 2,5 korda sagedamini kui metsiktüvest ning 2,7 korda sagedamini kui ΔRelA tüvest. Selle profaagi lahkumissagedus ΔRelASpoT genoomist on keskmiselt $1{,}2 \times 10^{-2}$ ehk profaag P4 on lahkunud vähemalt ühest genoomist iga saja genoomi kohta. Metsiktüve ja ΔRelA tüve puhul on selleks suurusjärguks 10^{-3}. Metsiktüvest lahkub profaag P4 sagedusega $5{,}1 \times 10^{-3}$ ning ΔRelA tüvest sagedusega $4{,}6 \times 10^{-3}$. Lahkumissageduste erinevus nii ΔRelASpoT ja metsiktüve vahel (p-väärtus 0,0206) kui ka ΔRelASpoT ja ΔRelA vahel (p-väärtus 0,0242) on statistiliselt olulised.



Joonis 14. Poomisvastus vähendab profaag P4 lahkumissagedust. X-teljel on toodud tüvede nimetused, millest profaag P4 lahkumist määrati (WT – metsiktüvi PaW85, ΔR – *relA* deletsioontüvi, ΔRS – *relAspoT* deletsioontüvi), ning Y-teljel lahkumissagedus (ΔP4 genoomide hulk jagatud genoomide koguhulgaga, mida väljendab paljundatud *rpoD* geeni hulk). Välja on toodud veapiirid, kuue paralleeli tulemused on kujutatud mustade rombidena ning üleval kantsulu ja tärniga on välja toodud statistiliselt olulised erinevused tüvede vahel.

Cip-i juuresolekul kasvanud rakkudes ei ole näha tüvede vahelist statistilist olulist erinevust profaag P4 lahkumissagedustes (Joonis 15), kuid lahkumissagedus on suurem võrreldes cip-lisandita katsega (Lisa 1, joonis 1). Cip-i juuresolekul lahkub profaag P4 metsiktüve genoomist sagedusega $1{,}5 \times 10^{-1}$ (lahkumine toimub sagedamini kui ühes genoomis saja kohta) ja seda 29 korda sagedamini kui cip puudumisel. ΔRelA tüvest lahkub cip lisamisel profaag P4 35 korda sagedamini kui cip puudumisel, lahkumissagedusega $1{,}6 \times 10^{-1}$. Kolmest tüvest väikseim keskmine lahkumissagedus cip-i juuresolekul oli P4 profaagil ΔRelASpoT tüvest (sagedusega $1{,}2 \times 10^{-1}$), mis oli siiski 9,5 korda suurem kui cip puudumisel.

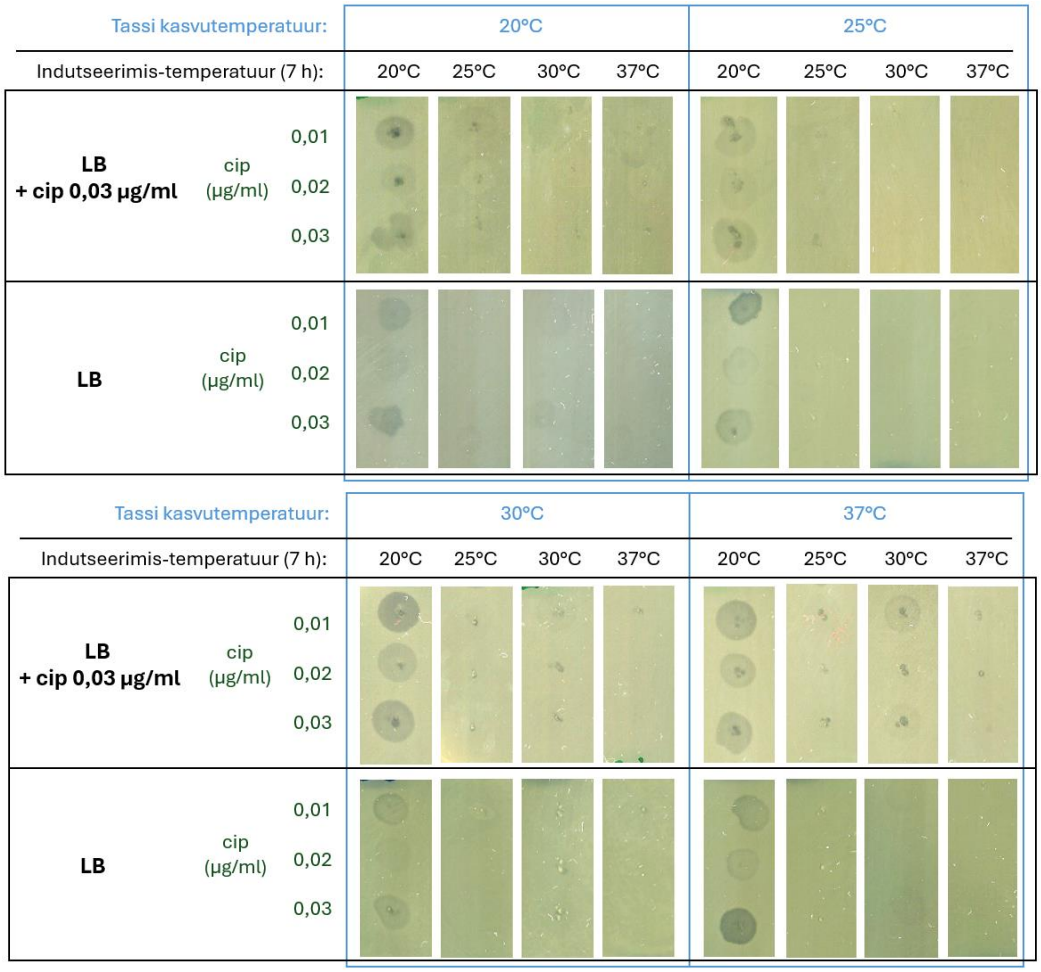


Joonis 15. Tsiprofloksatsiini (cip) lisamisel poomisvastuse mõju profaag P4 lahkumissagedusele ei tuvastatud. X-teljel on toodud tüvede nimetused, millest profaag P4 lahkumist määrati (WT – metsiktüvi PaW85, ΔR – *relA* deletsioontüvi, ΔRS – *relAspoT* deletsioontüvi), ning Y-teljel lahkumissagedus (ΔP4 genoomide hulk jagatud genoomide koguhulgaga, mida väljendab paljundatud *rpoD* geeni hulk). Välja on toodud veapiirid, kuue paralleeli tulemused on kujutatud mustade rombidena.

Nii profaagide spontaanne lahkumissagedus kui ka ppGpp mõju profaagide lahkumissagedustele on erinev (Lisa 1, joonis 1). Keskmise spontaanse lahkumise määra alusel metsiktüvest järjestuvad profaagid selliselt: P4 (lahkumissagedus $5{,}1 \times 10^{-3}$), P1 (sagedusega $3{,}6 \times 10^{-4}$) ning P3 (sagedusega $2{,}3 \times 10^{-4}$) ja P2 (sagedusega $2{,}1 \times 10^{-4}$). Profaagide P1 ja P4 lüsogeensusele on poomisvastusel tugev positiivne mõju, kuid profaagide P2 ja P3 lahkumissagedustele see mõju puudub. Lisaks varieerus profaagiti ka tsiprofloksatsiini lahkumissagedust indutseeriv efekt – cip suurendas P1 ja P4 lahkumissagedust, kuid ei mõjutanud P2 ega P3 profaagide lahkumist. Kõige enam suurenes cip-i mõjul profaag P1 lahkumissagedus.

2.3.2. *P. putida* KAR37 genoomis on nakkusvõimeline profaag

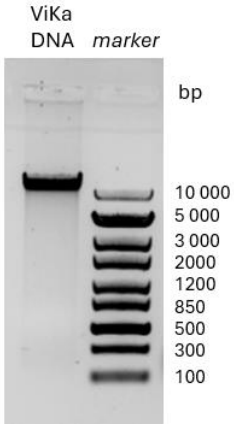
Selleks, et uurida poomisvastuse olulisust aktiivsete mõõdukate faagide elutsükli valikus, otsustasin neid isoleerida *P. putida* keskkonnatüvedest. 17 CELMS kollektsiooni keskkonnatüve indutseerimisel saadud lüsaatidest enamasti nõrgestatud *P. putida* ΔDef8 bakterimurule lüüsilaike ei tekkinud (tulemusi pole esitatud). KAR37 tüvest aga indutseerus temperatuuril 20 °C mõõdukas faag ViKa (nimi tuletatud bakteritüve eraldajast ja kohast: Viia Kõiv, kartul) kõigil kolmel testitud cip kontsentratsioonil (0,01, 0,02 ja 0,03 µg/ml) ning eraldatud lüsaatide tilkadest ΔDef8 bakterimurule tekkisid lüüsilaigud kõigil neljal tassi kasvutemperatuuril (20 °C, 25 °C, 30 °C ja 37 °C) (Joonis 16). Õrnemaid lüüsilaike võis näha ka temperatuuril 25 °C indutseerunud kultuuridest. Lüüsilaike tekitas ViKa faag nii LB kui ka LB cip (0,03 µg/ml) söötmega tassidel, kuid valdavalt olid cip tassidel tekkinud lüüsilaigud selgemad. LB söötmega tassidel tekkinud lüüsilaigud olid pigem hägused, nagu on mõõdukate faagide tekitatud lüüsilaikudele omane.



Joonis 16. KAR37 tüvest indutseerunud ViKa faagi lüüsilaigud temperatuuridel 20 °C**, 25** °C, **30** °C ja **37** °C **kasvanud ΔDef8 bakterimuruga LB ja LB + 0,03 µg/ml cip tassidel**. Sinisega on tähistatud ΔDef8 bakterimuruga kaetud tassi inkubeerimise temperatuur ning selle all on toodud indutseerimis-temperatuurid (neli). Vasakul on rasvases kirjas toodud tassi sööde (LB või LB + cip). Tassipiltide kõrval on välja toodud vastavate lüsaatide indutseerimisel kasutatud cip kontsentratsioon. Pilt on tehtud pärast 20 h kasvu vastaval temperatuuril.

2.3.3. Profaagi indutseerimisel puhastub üle 10 kbp pikkune faagi DNA

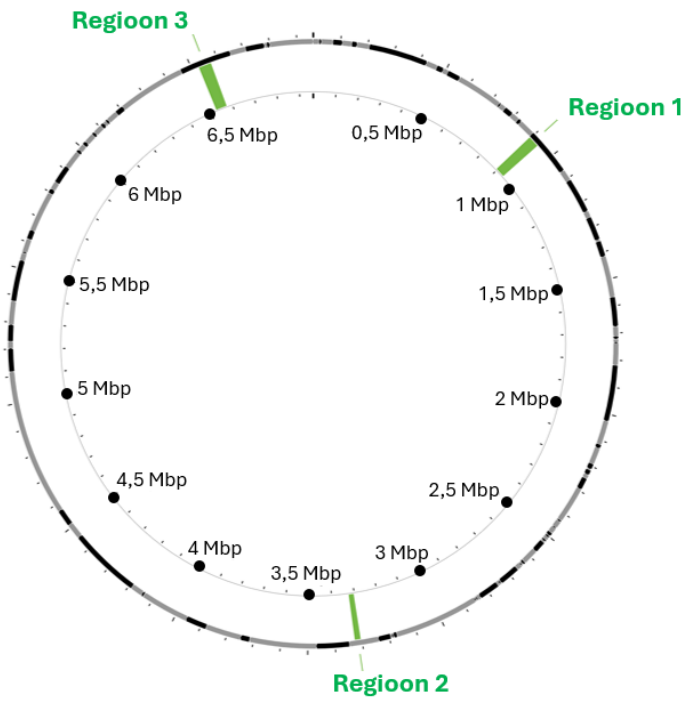
Kuna ΔDef8 tüve bakterimuruga kaetud tassidele tekkinud lüüsilaigud ei olnud selged ehk bakteri nakatumine ViKa faagiga on üsna ebaefektiivne, on suur tõenäosus, et lüüsilaigust kogutud materjalist ei ole võimalik eraldada piisavas koguses faagi. Seetõttu otsustasin ViKa faagi isoleerida otse keskkonnatüvest ja kasutada selleks faagi indutseerimise meetodit (kirjeldatud peatükis 2.2.4. Mõõdukate faagide indutseerimine), suurendades mahtu 100 korda. Genoomi eraldasin kahekordse tsingi sadestusega (2.2.5. Mõõduka faagi DNA eraldamine) ning sain kätte puhta DNA kontsentratsiooniga 50,2 ng/µl (Joonis 17).



Joonis 17. Eraldatud genoomi PCR geelelektroforeesi pilt. Vasakul on ViKa faagi DNA ning paremal pikkusmarker. Markeri juures on arvuliselt välja toodud vastavad DNA lõikude pikkused aluspaarides (bp).

2.3.4. Sekveneerimine tuvastas KAR37 genoomis kolm profaagiregiooni

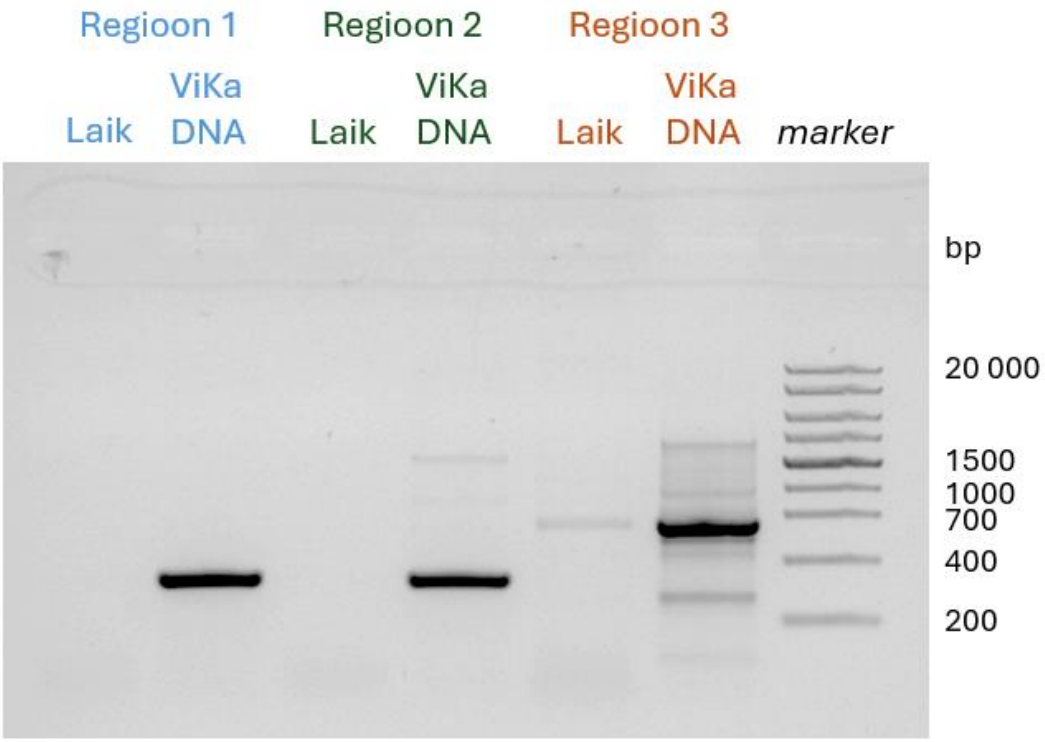
Vaatamata hoolikale eraldamisele ei sisaldanud sekveneerimisele saadetud proov vaid ViKa faagi genoomi: esines saastust bakteriaalse DNA näol. Age Brauer assambleeris sekveneerimistulemuste põhjal 6,9 Mbp suuruse kontiigi (KAR37 genoom) ning programmi Phastest (https://phastest.ca/) abil suutis ta tuvastada sekveneeritud DNA hulgas kolm faagigeenidega rikastatud regiooni (Joonis 18). Neist regioon 1 on pikkusega 40,7 kbp, sisaldab 48 valku kodeerivat järjestust ning selles regioonis on üleesindatud *Pseudomonas aeruginosa* faagi Dobby geenidega homoloogsed järjestused. Regioon 2 on 20 kbp pikk, kodeerib 27 valku, millest kõige enam on homolooge *Vibrio parahaemolyticus* faagi VP882 valkudele. Ilmselt pole aga ViKa faagi genoom seotud selle regiooniga, kuna regioon 2 ei kodeeri ei kapsiidivalku ega terminaasi. Regioon 3 pikkuseks on 45,9 kbp, kodeerib 47 valku ning sisaldab mitmeid *Vibrio parahaemolyticus* faagi VP585 valkude homolooge.



Joonis 18. Sekveneeritud DNA sisaldab kolme faagigeenidega rikastatud regiooni. Kogu sekveneeritud järjestuse pikkus on 6 960 324 bp ning selles sisalduvad faagigeenidega regioonid (Regioon 1, Regioon 2 ja Regioon 3) on kujutatud rohelisena. Järjestus sisaldab kokku 6 269 geeni, millest 94 on homoloogsed faagi päritolu geenidega. Joonis on tehtud kasutades Phastest programmi.

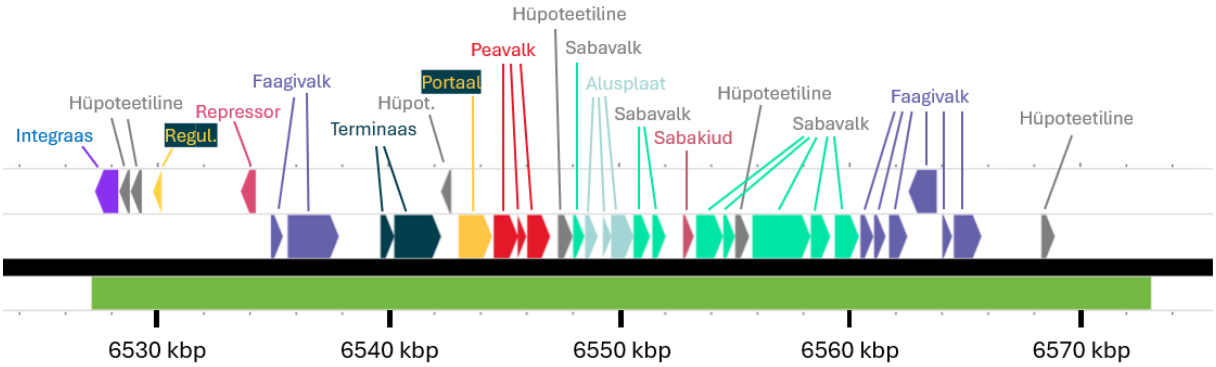
2.3.5. ViKa on tõenäoliselt 45,9 kbp suurune mõõdukas faag

Sekveneerimistulemustest ei selgunud, milline on mõõdukas faag ViKa. Et tuvastada, milline kolmest regioonist on ViKa faag, testisin regioonidele disainitud praimerite abil nende olemasolu selle faagi poolt tekitatud lüüsilaigus ΔDef8 bakterimurul. Kõigile kolmele regioonile disainitud praimeritega testisin PCR-iga regiooni esinemist lüüsilaigus, mille tulemustest järeldub, et Regioon 1 ja Regioon 2 ei ole osa ViKa genoomist. ViKa faagi tekitatud lüüsilaigust pärinevat materjali suudeti PCR-i abil paljundada vaid Regioon 3 praimeritega, mis viitab, et see regioon vastab ViKa genoomile (Joonis 19). UV valguses visualiseeritud Regioon 3 praimeritega paljundatud DNA hulk ei ole küll sama suur kui kontrollil (eraldatud puhas ViKa DNA), kuid tekkinud DNA fragmendi pikkus vastab kontroll-prooviga saadud tulemusele.



Joonis 19. PCR geelelektroforees kolmele faagigeenidega regioonile. Joonisel on näha PCR geelelektroforeesi tulemus nii lüüsilaigust pärinevale materjalile kui ka kontrollile kõigi kolme regiooni puhul (Regioon 1 – sinine, Regioon 2 – roheline, Regioon 3 – punane). Kõige paremal on näha pikkusmarkerit, mille juures on arvuliselt välja toodud vastavad DNA lõikude pikkused aluspaarides (bp). PCR meetodil amplifitseeritud materjal pärineb KAR37 20 °C cip 0,03 µg/ml lüsaadi tilga poolt tekitatud lüüsilaigust 20 °C juures kasvanud ΔDef8 bakterimurule (Laik). Positiivseks kontrolliks on sekveneerimisele saadetud ViKa faagi DNAd sisaldav materjal (ViKa DNA). Vaid Regioon 3 puhul on lüüsilaigust pärineva materjali juures näha väikese koguse DNA olemasolu.

Regioon 3 sisaldab 35 faagigeeni (Joonis 20), millest mõned on ka homoloogsed *Pseudomonas sp.* faagide geenidega. Integraasi olemasolu näitab, et tegemist on mõõduka faagi genoomiga, sest faag vajab seda oma DNA sisestamiseks bakteri genoomi. Samuti on järjestuses ka repressor-valk, mis on vajalik lüütilise tsükli inhibitsiooniks. Regioon 3 sisaldab ka faagipartikli kokkupanekuks vajalike valkude geene (pea, portaali, alusplaadi, saba ning sabakiudude valke kodeerivaid geene) ning terminaasi, mis võimaldab virioni kokkupakkimist. Lisaks sisaldab järjestus üht transkriptsiooni regulaatorgeeni ning mitmeid teiste faagidega sarnaseid (faagivalgud) kui ka hüpoteetilisi valke kodeerivaid geene.



Joonis 20. Regioon 3 kodeerib 35 faagivalku. Kujutatud on selles regioonis sisalduvate faagivalke kodeerivate järjestuste transkribeerimise suund ja kodeeritava valgu tüüp. Regioon kolm kodeerib järgmiseid valke: integraas, hüpoteetilised valgud (hüpot.), Regulatoorne valk (regul.), repressor, faagivalgud, terminaas, portaalivalk, peavalgud, sabavalgud, alusplaadivalgud, sabakiuvalk. All on toodud Regioon 3 asukoht kogu assambleeritud järjestuses (kpb). Joonis on tehtud kasutades Phastest programmi.

3. Arutelu

3.1. Poomisvastus ei mõjuta *Pseudomonas putida* profaagide lahkumissagedusi samaväärselt

Poomisvastuse vallandumiseks olulise alarmooni ppGpp metabolismiensüümide deletsioontüve ΔRelASpoT genoomist lahkusid profaagid P1 ja P4 oluliselt sagedamini kui metsiktüve ja ΔRelA tüve genoomist (Joonised 8 ja 14), mis viitab ppGpp lüsogeensust soodustavale mõjule nende profaagide suhtes. On teada, et poomisvastus võib põhjustada profaagide poolt kodeeritavate geenide ülesekspressiooni (Abella *et al.*, 2007), mistõttu on võimalik, et osadel profaagidel on seetõttu ka üle ekspresseeritud näiteks lüütilisust represseerivad või muud lüsogeensust soodustavad geenid. Edukamat lahkumist ppGpp puudumisel on ka varasemalt kirjeldatud mõne *E. coli* profaagi puhul (Nowicki *et al.*, 2013). Poomisvastuse mõju kinnitab ka asjaolu, et profaagide P1 ja P4 lahkumissagedus ΔRelA tüve ja metsiktüve vahel oluliselt ei erinenud. See oli ka eeldatav, sest antud deletsioontüvest ei ole eemaldatud ppGpp sünteesivõimelist SpoT ensüümi. ΔRelA tüvel on seega säilinud teatav ppGpp sünteesivõimekus, mis ΔRelASpoT tüvel puudub. Seega võib järeldada, et ka madal ppGpp sünteesivõimekus on piisav profaagi lahkumise vältimiseks. Veel on tulemustest võimalik järeldada, et on ensüüm SpoT on võimeline RelA puudumisel kompenseerima piisava ppGpp sünteesi profaagi lahkumissageduse hoidmiseks metsiktüve tasemel. See langeb kokku minu bakalaureusetöös (Mägi, 2023) saadud tulemustega, kus ka lüütilise faagi nakkuse olukorras esines ΔRelA tüvel sarnane SpoT poolne ppGpp sünteesi kompensatsioon.

Profaagide P2 ja P3 lahkumissagedused olid sarnased nii mõlema deletsioontüve kui ka metsiktüve vahel, mistõttu võib järeldada, et poomisvastus ei ole oluline nende profaagide *P. putida* genoomist lahkumise regulatsioonis. Mõju erinevus profaagiti näitab, et poomisvastuse lüsogeensust soodustavat efekti ei esine kõikide profaagide puhul. On võimalik, et neid profaage indutseerib genoomist lahkuma edukamalt mõni muu tegur, mistõttu ppGpp puudumisel on väiksem mõju, või ehk on nende profaagide regulaatorvalkude aktiivsus vähenenud. Samas ei saa ka välistada, et poomisvastus profaagide P2 ja P3 elutsükli valikut üldse ei mõjuta, sest hoolimata selle stressivastuse mõju puudumisest genoomist lahkumisele võib ppGpp mõjutada hoopis insertsiooni, olles siis oluline infektsioonitsüklivalikus, kuid vastupidises etapis. Varasematest katsetest *E. coli* mõõduka faagiga λ on teada, et juba integreerunud λ profaagile ppGpp olulist mõju ei avalda, kuid mõjutab selle faagi insertsiooni efektiivust peremeesgenoomi (Slomińska *et al.*, 1999). Seega oleks väga huvitav uurida ka mõõdukate faagide sisenemissageduste sõltuvust poomisvastusest.

3.2. Profaagide lahkumine *P. putida* genoomist

Profaag P4 lahkumissagedus, mis oli ka poomisvastusest sõltuv, on suurim nelja profaagi seas (Lisa 1, joonis 1): edukamailt lahkub metsiktüve genoomist profaag P4, temast 10 korda väiksema lahkumissagedusega on profaag P1 ning kõige paiksemad on profaagid P2 ja P3. Sealjuures ühtivad käesolevas töös tuvastatud profaagide P1, P3 ja P4 lahkumissagedused *P. putida* metsiktüve PaW85 genoomist ka varasemate uurimuste tulemustega, kus on nende profaagide spontaanset lahkumist mõõdetud või tuvastatud (Brauer *et al.*, 2024; Martínez-García *et al*. 2015). Kuna profaag P2 lahkumist polnud varasemalt edukalt detekteeritud, tuli mul disainida uued qPCR praimerid uute ennustatud P2 *att* järjestuste järgi (Age Brauer), mis asuvad varasemalt ennustatud P2 otstest kaugemal (väljaspool Martínez-García *et al*. artiklis kasutatud praimerite seondumiskohtadest). Nende praimeritega tuvastasin, et ka profaag P2 on võimeline spontaanselt *P. putida* genoomist lahkuma ning seda metsiktüves, tsiprofloksatsiini stressita sarnases suurusjärgus kui profaagid P3 ja P1. Arvatavasti ei tuvastanud Martínez-García kolleegidega varasemalt lahkumist, kuna eksliku *att*-saitide ennustuse tõttu lahkusid seondumisjärjestused koos profaagiga.

Testisin ka tsiprofloksatsiini mõju profaagide lahkumissagedusele, sest on teada, et see antibiootikum võib SOS-vastust aktiveerides indutseerida profaage bakterigenoomist lahkuma (Goerke *et al.*, 2006). Selgus, et tsiprofloksatsiin tõstab lahkumissagedust neljast profaagist vaid profaagide P1 ja P3 puhul ning see indutseeriv efekt metsiktüvele ja ΔRelA tüvele on niivõrd tugev, et P1 ja P4 lahkumissagedus neist tüvedest cip juuresolekul sarnaneb lahkumisega ΔRelASpoT tüvest. Seega pole cip juuresolekul poomisvastuse mõju nende profaagide lahkumissagedusele tuvastatav, ent on näha ppGpp mõju SOS-vastuse aktiveerimisele. Ka varasemates uurimustes on kirjeldatud ppGpp olulisust *E. coli* SOS-vastuses, kuna poomisvastus indutseerib geene, mille produktid osalevad ka SOS-vastuses (Durfee *et al.*, 2008). Kuna ppGpp, RNA polümeraasile seondudes, vahendab nukleotiidide väljalõike reparatsiooni (NER – *nucleotide excision repair*) *E. coli*s (Weaver *et al.*, 2023), võib järeldada, et alarmoon on oluline efektiivseks SOS-vastuseks ka cip indutseeritud mutageneesil. See võib seletada, miks ΔRelASpoT tüvest ei suurenenud cip-iga indutseerimisel lahkumissagedus nii suurel määral kui ppGpp sünteesiks võimelistel tüvedel (ΔRelA ja metsiktüvi). Siiski, võrreldes cip-i tugeva indutseeriva toimega on ppGpp mõju SOS-vastusele väike, sest tugev mõju eeldaks metsiktüvest (ppGpp olemasolul) profaagide sagedasemat lahkumist kui poomisvastuse deletsioontüvest.

Profaagide P2 ja P3 lahkumist ei suurenda cip-i juuresolekul kasvatamine aga ühestki uuritud tüvest. Need tulemused lähevad kokku PaW85 proteoomianalüüsidega pärast cip-i juuresolekul kasvamist (võrdluses ilma antibiootikumita kasvuga), kus on näidatud, et cip mõjutab profaagide P1 ja P4 geenide ekspressiooni, kuid profaagide P2 ja P3 geenidele mõju ei avalda (Rita Hõrak, avaldamata andmed). Profaagide P2 ja P3 SOS- ja poomisvastusest sõltumatu püsivalt madal lahkumine võib viidata, et nende profaagide lahkumise regulaatorid on taandarenenud ning ei pruugigi olla enam aktiveeritavad – P2 ja P3 on täielikule krüptilisusele lähemal kui P1 ja P4.

Ei ole palju teada, mis juhtub *P. putida* profaagidega pärast bakterigenoomist lahkumist peale selle, et nakkusvõimelisi faagipartikleid ei ole suudetud tuvastada, kuigi profaag P4 on võimeline moodustama faagilaadseid partikleid (Hedvig Tamman, avaldamata andmed; Martínez-García *et al*., 2015). Vaid profaag P1 kohta on ka teada, et osa lahkunud genoomidest säilivad bakteris ekstrakromosomaalselt rõngas-DNA kujul (Rosendahl, 2023). Edasi oleks huvitav uurida, kas ka teised lahkunud faagigenoomid säilivad näiteks bakteris episoomina või kaovad täielikult.

3.3. *P. putida* keskkonnatüvedest on võimalik indutseerida nakatamisvõimelisi mõõdukaid faage

Seitsmeteistkümne keskkonnatüve indutseerimisel tsiprofloksatsiiniga õnnestus isoleerida vaid üks mõõdukas faag. Varasemalt on *P. aeruginosa* tüvedest edukalt isoleeritud palju profaage (Bondy-Denomy *et al.*, 2016), mistõttu leidub neid eeldatavasti rohkem ka *P. putida* tüvedes. On ka võimalik, et profaagid testitud tüvedest küll indutseerusid, kuid ei ole võimelised katsetes kasutatud *P. putida* ΔDef8 tüve nakatama. Väikeses nakatamisefektiivuses võib rolli mängida näiteks *P. putida* faagide suur peremeesspetsiifika (Brauer *et al.*, 2024) või ka mõni faagikaitsesüsteem, mida ΔDef8 tüvest pole eemaldatud, sest lisaks neile on sel bakteril ennustatud veel üle 30 võimaliku kaitsesüsteemi. Kõike seda arvesse võttes on siiski üllatav, et indutseerus vaid üks nakatamisvõimeline mõõdukas faag.

Järgmiste mõõdukate faagide isoleerimiseks on vaja seega katsetada veelgi enam erinevaid indutseerimise võimalusi. Lisaks tsiprofloksatsiinile on profaage võimalik lahkuma indutseerida ka näiteks UV kiirgusega (Bunny *et al*., 2002), kuid nagu ka cip, kahjustab UV kiirgus bakteri DNAd ning mõjutaks profaagide lahkumissagedust SOS-vastuse kaudu. Kuigi oleks põnev uurida, kas SOS-vastus indutseerib profaagide lahkumist erineva efektiivsusega sõltuvalt sellest, kas see on esile kutsutud cip või UV kiirguse poolt, oleks võibolla etem kasutada teistsuguse toimemehhanismiga lüütilise tsükli indutseerijat.

Võimalik oleks proovida indutseerida lüütilist tsüklit näiteks madalamatel temperatuuridel kui testitud, sest isoleeritud ViKa indutseerub efektiivseimalt kõige madalama testitud temperatuuri juures (20 °C). On teada, et kõrgem temperatuur võib soodustada lüütilist tsüklit (Jiang ja Paul, 1996; Shan et al., 2014), kuid ei ole täpselt defineeritud kõrgema temperatuuri väärtust. Eesti keskkonnast eraldatud bakteri jaoks on 20 °C arvatavasti suhteliselt soe temperatuur, mistõttu võivad profaagid genoomist lahkuda teoreetiliselt ka madalamal temperatuuril ning nagu käesolevas töös ka cip-iga demonstreeritud on, ei pruugi ka kõikide mõõdukate faagide elutsüklivalikus temperatuur olulist rolli etendada. Lisaks indutseerimis-temperatuuri muutmisele oleks võimalik proovida keskkonnatüvedest profaage indutseerida ka näiteks söötmesse soolade lisamisega või kasvatades baktereid erinevate lisanditega söötmetel, kuna nii soolsusel kui ka toitainete kättesaadavusel on täheldatud mõju mõõdukate faagide infektsioonitsükli valikule (käesoleva töö kirjanduse ülevaade, Bettarel *et al.*, 2011, Tsiola *et al.*, 2021)

Siiski õnnestus KAR37 tüvest isoleerida esimene *P. putida* tüve PaW85 nakatav mõõdukas faag ViKa. KAR37 tüves on kokku kolm profaagi-sarnast järjestust, kuid ühel neist puudub integraasi kodeeriv geen, mistõttu on selles tüves ilmselt kaks profaagi. Ainult üks neist, ViKa, indutseerus ja oli võimeline nakatama PaW85 tüve. Seetõttu on oodatav, et ka teistes uuritud keskkonnatüvedes peitub profaage, mille lüütilise tsükli indutseerimiseks tuleb kasutada teistsuguseid katsetingimusi. ViKa faagi genoomi arvatav suurus on 45,9 kbp, jäädes selle poolest profaagide P4 ja P1 vahele. ViKa profaag indutseerus kõige paremini kangeima testitud cip kontsentratsiooni juures, mis viitab, et cip soodustab selle faagi lüütilisust. Samasugust cip-i mõju on kirjeldatud ka nii käesolevas töös profaagide P1 ja P4 kohta kui ka varasemalt teiste mõõdukate faagide kohta (Goerke *et al.*, 2006). Käesoleva töö valmimise ajal sai isoleeritud ja sekveneeritud ka KAR37 genoom, mistõttu on nüüd edasi võimalik uurida selle profaagi lahkumist KAR37 genoomist ning determineerida cip mõju ViKa profaagi lahkumissagedusele. Samuti saab uurida ViKa lüsogeniseerumist PaW85 tüves, isoleerides lüsogeenseid kolooniaid. Edaspidi oleks ka huvitav uurida, kas ViKa profaag kannab teiste faagide vastaseid kaitsesüsteeme nagu on sageli profaagide puhul näidatud (Owen *et al.*, 2021; Bondy-Denomy *et al.*, 2016; Brauer *et al.*, 2024).

Kokkuvõte

Käesoleva töö praktilise osa eesmärk oli välja selgitada *P. putida* poomisvastuse mõju tema krüptiliste profaagide lahkumissagedusele bakteri genoomist ning isoleerida seda bakterit nakatavaid mõõdukaid faage.

Poomisvastus soodustab profaagide P1 ja P4 lüsogeensust, vähendades mõlema lahkumissagedust bakteri genoomist. Profaag P1 lahkumissagedus oli ligi 10 korda ning profaag P4 lahkumissagedus 2,7 korda suurem ΔRelASpoT tüvest kui metsiktüvest. Vähemalt osalise ppGpp sünteesi võimekusega ΔRelA tüvest toimus lahkumine neil profaagidel metsiktüvega sarnaselt, mis kinnitab ppGpp vajalikkust profaagide indutseerumise alla surumises, kuid ilmestab ka SpoT valgu ppGpp sünteesivõimekust. Profaagide P2 ja P3 lahkumisele see stressivastus aga mõju ei avaldanud.

Tsiprofloksatsiin (cip) mõjus profaagide P1 ja P4 lüütilise tsükli aktivaatorina, suurendades nende profaagide lahkumist metsiktüvest rohkem kui ppGpp deletsioontüvest ΔRelASpoT. Cip-iga erinevaid keskkonnatüvesid indutseerides õnnestus isoleerida KAR37 tüvest esimene nakatamisvõimeline *P. putida* mõõdukas faag ViKa ning tema genoomi järjestus sekveneeriti.

Käesoleva tööga on kirjeldatud poomisvastuse lüsogeensust soodustav efekt *P. putida* PaW85 profaagide P1 ja P4 lahkumissagedustele ning näidatud ka tsiprofloksatsiini võimekus indutseerida nende profaagide lahkumist. Samuti isoleeriti ja sekveneeriti esimene *P. putida* tüve PaW85 nakatav mõõdukas faag ViKa. Saadud tulemuste põhjal võib järeldada, et poomisvastuse mõju mõõdukate faagide elutsükli valikule on varieeruv. Isoleeritud mõõduka faagi edasine uurimine näitab, kas ka faagigenoomi sisenemine võiks olla ppGpp poolt reguleeritud. Seega paneb käesolev töö tugeva aluse edasisele uurimistööle, mis võimaldab saada täielikuma pildi mõõduka faagi infektsioonitsükli valiku sõltuvusest ppGpp-st.

Stringent response in the life cycle choice of *Pseudomonas putida*'s temperate phages

Elise Mägi

Summary

The stringent response is a bacterial stress response that is triggered by cellular accumulation of the alarmone (p)ppGpp. Previous studies suggest it also has a role in the life cycle transitions of temperate bacteriophages (Nowicki *et al*., 2013; Slomińska *et al.*, 1999). These phages are capable of following both a lytic and a lysogenic reproductive cycle, the choice depending on effectors of both environmental and bacterial origin. Until now, no such phages infecting *Pseudomonas putida* PaW85 have been isolated, although the bacterial strain is known to harbour four cryptic prophages in its genome. The aim of this study was to ascertain the effect of ppGpp and stringent response on the excision frequency of *P. putida*'s prophages and to isolate temperate phages capable of infecting this bacterium.

In order to study the excision frequency of *P. putida*'s prophages, qPCR analysis was carried out for all of the four prophages. The stringent response probably induces lysogeny of prophages P1 and P4, decreasing the excision frequency by up to 10-fold for prophage P1 and 2.7-fold for prophage P4. However, ppGpp had no effect on the life cycle of prophages P2 and P3, where the excision rate was similar in both the wild type and $ppGpp^0$ strain ΔRelASpoT. Ciprofloxacin wasn't able to induce these two prophages either, yet it increased the excision rate of both prophage P1 and P4 compared to spontaneous excision from the wild type strain.

By inducing prophages from environmental *P. putida* strains from CELMS using ciprofloxacin, a single temperate phage ViKa, capable of infecting *P. putida* PaW85 was isolated from the strain KAR37. Sequencing results indicate it to be around 45,9 kbp in size. Sequencing also determined another prophage-like sequence in KAR37, suggesting the hidden existence of more prophages also in other *P. putida* environmental strains.

This study has described the lysogeny promoting effect stringent response has on the excision frequencies of prophages P1 and P4 and also showed the excision inducing property of ciprofloxacin for these prophages. Finally, a temperate phage ViKa, capable of *P. putida* PaW85 infection was isolated and sequenced. The results indicate that the stringent response influences the life cycle choices of temperate phages in a variable manner. The present study is a valuable base study that with further research into the infection cycle of the newly isolated temperate phage will elucidate all sides of ppGpp regulation in the life cycle choice of temperate phages.

Tänusõnad

Soovin eelkõige tänada oma juhendajaid, kes olid töö valmimisel väga suureks toeks – suur aitäh Hedvig ja Sirli! Samuti tänan bioinformaatilise abi eest Age Brauerit ning statistikaalase nõu eest Karl Jürgensteini. Aitäh ka kõigile teistele töögrupi liikmetele nende nõuannete ning minu elukaaslasele tema toetuse eest.

Kasutatud kirjandus

Ababneh, Q. O., & Herman, J. K. (2015). RelA inhibits Bacillus subtilis motility and chaining. *Journal of bacteriology*, *197*(1), 128–137.

Abella, M., Campoy, S., Erill, I., Rojo, F., & Barbé, J. (2007). Cohabitation of two different lexA regulons in Pseudomonas putida. *Journal of bacteriology*, *189*(24), 8855–8862.

Atkinson, G. C., Tenson, T., & Hauryliuk, V. (2011). The RelA/SpoT homolog (RSH) superfamily: distribution and functional evolution of ppGpp synthetases and hydrolases across the tree of life. *PloS one*, *6*(8), e23479.

Bettarel, Y., Bouvier, T., Bouvier, C., Carré, C., Desnues, A., Domaizon, I., Jacquet, S., Robin, A., & Sime-Ngando, T. (2011). Ecological traits of planktonic viruses and prokaryotes along a full-salinity gradient. *FEMS microbiology ecology*, *76*(2), 360–372.

Bobay, L. M., Touchon, M., & Rocha, E. P. (2014). Pervasive domestication of defective prophages by bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(33), 12127–12132.

Bondy-Denomy, J., Qian, J., Westra, E. R., Buckling, A., Guttman, D. S., Davidson, A. R., & Maxwell, K. L. (2016). Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms. *The ISME journal*, *10*(12), 2854–2866.

Boyd E. F. (2012). Bacteriophage-encoded bacterial virulence factors and phage-pathogenicity island interactions. *Advances in virus research*, *82*, 91–118.

Brady, A., Felipe-Ruiz, A., Gallego Del Sol, F., Marina, A., Quiles-Puchalt, N., & Penadés, J. R. (2021). Molecular Basis of Lysis-Lysogeny Decisions in Gram-Positive Phages. *Annual review of microbiology*, *75*, 563–581.

Brauer, A., Rosendahl, S., Kängsep, A., Lewańczyk, A. C., Rikberg, R., Hõrak, R., & Tamman, H. (2024). Isolation and characterization of a phage collection against Pseudomonas putida. *Environmental microbiology*, *26*(6), e16671.

Bunny, K., Liu, J., & Roth, J. (2002). Phenotypes of lexA mutations in Salmonella enterica: evidence for a lethal lexA null phenotype due to the Fels-2 prophage. *Journal of bacteriology*, *184*(22), 6235–6249.

Chhibber, S., Kaur, T., & Kaur, S. (2014). Essential role of calcium in the infection process of broad-spectrum methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteriophage. *Journal of basic microbiology*, *54*(8), 775-780.

Choi, J., Kotay, S. M., & Goel, R. (2010). Various physico-chemical stress factors cause prophage induction in Nitrosospira multiformis 25196--an ammonia oxidizing bacteria. *Water research*, *44*(15), 4550–4558.

Cochran, P. K., Kellogg, C. A., & Paul, J. H. (1998). Prophage induction of indigenous marine lysogenic bacteria by environmental pollutants. *Marine Ecology Progress Series*, *164*, 125-133.

Corrigan, R. M., Bellows, L. E., Wood, A., & Gründling, A. (2016). ppGpp negatively impacts ribosome assembly affecting growth and antimicrobial tolerance in Gram-positive bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(12), E1710–E1719.

Danovaro, R., Bongiorni, L., Corinaldesi, C., Giovannelli, D., Damiani, E., Astolfi, P., Greci, L., & Pusceddu, A. (2008). Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections. *Environmental health perspectives*, *116*(4), 441–447.

Diez, S., Ryu, J., Caban, K., Gonzalez, R. L., Jr, & Dworkin, J. (2020). The alarmones (p)ppGpp directly regulate translation initiation during entry into quiescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(27), 15565–15572.

Dion, M. B., Oechslin, F., & Moineau, S. (2020). Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(3), 125-138.

Duffy, S., Turner, P. E., & Burch, C. L. (2006). Pleiotropic costs of niche expansion in the RNA bacteriophage phi 6. *Genetics*, *172*(2), 751–757.

Dunn, N. W., & Gunsalus, I. C. (1973). Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in Pseudomonas putida. *Journal of bacteriology*, *114*(3), 974–979.

Durfee, T., Hansen, A. M., Zhi, H., Blattner, F. R., & Jin, D. J. (2008). Transcription profiling of the stringent response in Escherichia coli. *Journal of bacteriology*, *190*(3), 1084–1096.

Flores, C. O., Meyer, J. R., Valverde, S., Farr, L., & Weitz, J. S. (2011). Statistical structure of host-phage interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(28), E288–E297.

Fogg, P. C., Colloms, S., Rosser, S., Stark, M., & Smith, M. C. (2014). New applications for phage integrases. *Journal of molecular biology*, *426*(15), 2703–2716.

Gallant, J., Irr, J., & Cashel, M. (1971). The mechanism of amino acid control of guanylate and adenylate biosynthesis. *The Journal of biological chemistry*, *246*(18), 5812–5816.

Gallant, J., Palmer, L., & Pao, C. C. (1977). Anomalous synthesis of ppGpp in growing cells. *Cell*, *11*(1), 181–185.

Gerovac, M., Chihara, K., Wicke, L., Böttcher, B., Lavigne, R., & Vogel, J. (2024). Phage proteins target and co-opt host ribosomes immediately upon infection. *Nature microbiology*, *9*(3), 787–800.

Goerke, C., Köller, J., & Wolz, C. (2006). Ciprofloxacin and trimethoprim cause phage induction and virulence modulation in Staphylococcus aureus. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *50*(1), 171-177.

Guo, J., Gao, S. H., Lu, J., Bond, P. L., Verstraete, W., & Yuan, Z. (2017). Copper Oxide Nanoparticles Induce Lysogenic Bacteriophage and Metal-Resistance Genes in Pseudomonas aeruginosa PAO1. *ACS applied materials & interfaces*, *9*(27), 22298–22307.

Hamel, E., & Cashel, M. (1974). Guanine nucleotides in protein synthesis. Utilization of pppGpp and dGTP by initiation factor 2 and elongation factor Tu. *Archives of biochemistry and biophysics*, *162*(1), 293–300.

Hampton, H. G., Watson, B. N. J., & Fineran, P. C. (2020). The arms race between bacteria and their phage foes. *Nature*, *577*(7790), 327–336.

Haseltine, W. A., & Block, R. (1973). Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *70*(5), 1564–1568.

Hatfull G. F. (2008). Bacteriophage genomics. *Current opinion in microbiology*, *11*(5), 447–453.

Hatfull, G. F., & Hendrix, R. W. (2011). Bacteriophages and their genomes. *Current opinion in virology*, *1*(4), 298–303.

Herron, P. R., & Wellington, E.M. (1994). Population dynamics of phage-host interactions and phage conversion of streptomycetes in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, *14*, 25-32.

Hobbs, Z., & Abedon, S. T. (2016). Diversity of phage infection types and associated terminology: the problem with 'Lytic or lysogenic'. *FEMS microbiology letters*, *363*(7), fnw047.

Holmes R. K. (2000). Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the tox gene. *The Journal of infectious diseases*, *181 Suppl 1*, S156–S167.

Huang, D., Yu, P., Ye, M., Schwarz, C., Jiang, X., & Alvarez, P. J. J. (2021). Enhanced mutualistic symbiosis between soil phages and bacteria with elevated chromium-induced environmental stress. *Microbiome*, *9*(1), 150.

Jiang, S. C., & Paul, J. H. (1994). Seasonal and diel abundance of viruses and occurrence of lysogeny/bacteriocinogeny in the marine environment. *Marine Ecology Progress Series*, 163-172.

Jiang, S. C., & Paul, J. H. (1996). Occurrence of lysogenic bacteria in marine microbial communities as determined by prophage induction. *Marine Ecology Progress Series*, *142*, 27-38.

Jiménez, J. I., Miñambres, B., García, J. L., & Díaz, E. (2002). Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from Pseudomonas putida KT2440. *Environmental microbiology*, *4*(12), 824–841.

Jin, W., Ryu, Y. G., Kang, S. G., Kim, S. K., Saito, N., Ochi, K., Lee, S. H., & Lee, K. J. (2004). Two relA/spoT homologous genes are involved in the morphological and physiological differentiation of Streptomyces clavuligerus. *Microbiology (Reading, England)*, *150*(Pt 5), 1485–1493.

Kraemer, J. A., Sanderlin, A. G. & Laub, M. T. (2019). The Stringent Response Inhibits DNA Replication Initiation in E. coli by Modulating Supercoiling of *oriC*. *mBio*, *10*(4), e01330-19.

Kudva, I. T., Jelacic, S., Tarr, P. I., Youderian, P., & Hovde, C. J. (1999). Biocontrol of Escherichia coli O157 with O157-specific bacteriophages. *Applied and environmental microbiology*, *65*(9), 3767–3773.

Kutter, E. M., & Wiberg, J. S. (1968). Degradation of cytosine-containing bacterial and bacteriophage DNA after infection of Escherichia coli B with bacteriophage T4D wild type and with mutants defective in genes 46, 47 and 56. *Journal of molecular biology*, *38*(3), 395-411.

Kästle, B., Geiger, T., Gratani, F. L., Reisinger, R., Goerke, C., Borisova, M., Mayer, C., & Wolz, C. (2015). rRNA regulation during growth and under stringent conditions in Staphylococcus aureus. *Environmental microbiology*, *17*(11), 4394–4405.

Lee, L. H., Lui, D., Platner, P. J., Hsu, S. F., Chu, T. C., Gaynor, J. J., Vega, Q. C., & Lustigman, B. K. (2006). Induction of temperate cyanophage AS-1 by heavy metal--copper. *BMC microbiology*, *6*, 17.

Leiman, P. G., Kanamaru, S., Mesyanzhinov, V. V., Arisaka, F., & Rossmann, M. G. (2003). Structure and morphogenesis of bacteriophage T4. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, *60*(11), 2356–2370.

Liang, X., Zhang, Y., Wommack, K. E., Wilhelm, S. W., DeBruyn, J. M., Sherfy, A. C., ... & Radosevich, M. (2020). Lysogenic reproductive strategies of viral communities vary with soil depth and are correlated with bacterial diversity. *Soil Biology and Biochemistry*, *144*, 107767.

Li, D., Liang, W., Huang, Z., Ma, W., & Liu, Q. (2024). The spontaneously produced lysogenic prophage phi456 promotes bacterial resistance to adverse environments and enhances the colonization ability of avian pathogenic Escherichia coli strain DE456. *Veterinary research*, *55*(1), 37.

Lindell, D., Jaffe, J. D., Johnson, Z. I., Church, G. M., & Chisholm, S. W. (2005). Photosynthesis genes in marine viruses yield proteins during host infection. *Nature*, *438*(7064), 86–89.

Lipu, A. (2023). *Profaagide mõju Pseudomonas putida faagiresistentsusele*. Bakalaureusetöö. Tartu Ülikool, Bioloogia ja elustiku kaitse õppekava.

Loenen, W. A., Dryden, D. T., Raleigh, E. A., Wilson, G. G., & Murray, N. E. (2014). Highlights of the DNA cutters: a short history of the restriction enzymes. *Nucleic acids research*, *42*(1), 3–19.

Mahata, T., Molshanski-Mor, S., Goren, M. G., Jana, B., Kohen-Manor, M., Yosef, I., Avram, O., Pupko, T., Salomon, D., & Qimron, U. (2021). A phage mechanism for selective nicking of dUMP-containing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *118*(23), e2026354118.

Marei, E. M., Elbaz, R. M., & Hammad, A. M. M. (2013). Induction of temperate cyanophages using heavy metal-copper. I*nternational Journal of Microbiology Research*, *5*(5), 472.

Martínez-García, E., Jatsenko, T., Kivisaar, M., & de Lorenzo, V. (2015). Freeing Pseudomonas putida KT2440 of its proviral load strengthens endurance to environmental stresses. *Environmental microbiology*, *17*(1), 76–90.

Maslowska, K. H., Makiela-Dzbenska, K., & Fijalkowska, I. J. (2019). The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage. *Environmental and molecular mutagenesis*, *60*(4), 368–384.

McDaniel, L., & Paul, J. H. (2005). Effect of nutrient addition and environmental factors on prophage induction in natural populations of marine Synechococcus species. *Applied and environmental microbiology*, *71*(2), 842–850.

Mei, Y., He, C., Huang, Y., Liu, Y., Zhang, Z., Chen, X., & Shen, P. (2015). Salinity regulation of the interaction of halovirus SNJ1 with its host and alteration of the halovirus replication strategy to adapt to the variable ecosystem. *PloS one*, *10*(4), e0123874.

Moreau, P., Bailone, A., & Devoret, R. (1976). Prophage lambda induction of Escherichia coli K12 envA uvrB: a highly sensitive test for potential carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *73*(10), 3700–3704.

Mägi, E. (2023). *ppGpp Pseudomonas putida faagivastases kaitses*. Bakalaureusetöö. Tartu Ülikool, Bioloogia ja elustiku kaitse õppekava.

Nguyen, D., Joshi-Datar, A., Lepine, F., Bauerle, E., Olakanmi, O., Beer, K., McKay, G., Siehnel, R., Schafhauser, J., Wang, Y., Britigan, B. E., & Singh, P. K. (2011). Active

starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, *334*(6058), 982–986.

Nowicki, D., Kobiela, W., Węgrzyn, A., Wegrzyn, G., & Szalewska-Pałasz, A. (2013). ppGpp-dependent negative control of DNA replication of Shiga toxin-converting bacteriophages in Escherichia coli. *Journal of bacteriology*, *195*(22), 5007–5015.

Pham, T. D., Nguyen, T. H., Iwashita, H., Takemura, T., Morita, K., & Yamashiro, T. (2018). Comparative analyses of CTX prophage region of Vibrio cholerae seventh pandemic wave 1 strains isolated in Asia. *Microbiology and immunology*, *62*(10), 635–650.

Piirmets, K. (2022). *Kromosomaalsete toksiin-antitoksiin süsteemide ja profaagide mõju Pseudomonas putida faagiresistentsusele*. Bakalaureusetöö. Tartu Ülikool, Geenitehnoloogia õppekava.

Potrykus, K., Murphy, H., Philippe, N., & Cashel, M. (2011). ppGpp is the major source of growth rate control in E. coli. *Environmental microbiology*, *13*(3), 563–575.

Poullain, V., Gandon, S., Brockhurst, M. A., Buckling, A., & Hochberg, M. E. (2008). The evolution of specificity in evolving and coevolving antagonistic interactions between a bacteria and its phage. *Evolution; international journal of organic evolution*, *62*(1), 1–11.

Powell, I. B., Tulloch, D. L., Hillier, A. J., & Davidson, B. E. (1992). Phage DNA synthesis and host DNA degradation in the life cycle of Lactococcus lactis bacteriophage c6A. *Journal of General Microbiology*, *138*(5), 945-950.

Quesada, J. M., Soriano, M. I., & Espinosa-Urgel, M. (2012). Stability of a Pseudomonas putida KT2440 bacteriophage-carried genomic island and its impact on rhizosphere fitness. *Applied and environmental microbiology*, *78*(19), 6963–6974.

Raghavan, P. U. M., & Vivekanandan, M. (1999). Bioremediation of oil-spilled sites through seeding of naturally adapted Pseudomonas putida. *International biodeterioration & biodegradation*, *44*(1), 29-32.

Rikberg, R. (2023). *Poomisvastuse mõju Pseudomonas putida stressitaluvusele*. Bakalaureusetöö. Tartu Ülikool, Geenitehnoloogia õppekava.

Rosendahl, S. (2023). Fitness effects of chromosomal toxin-antitoxin systems in Pseudomonas putida. Doktoritöö. Tartu Ülikool.

Russel M. (1995). Moving through the membrane with filamentous phages. *Trends in microbiology*, *3*(6), 223–228.

Sanmukh, S., Khairnar, K., Paunikar, W., & Lokhande, S. (2015). Understanding carbon regulation in aquatic systems - Bacteriophages as a model. *F1000Research*, *4*, 138.

Sarubbi, E., Rudd, K. E., Xiao, H., Ikehara, K., Kalman, M., & Cashel, M. (1989). Characterization of the spoT gene of Escherichia coli. *The Journal of biological chemistry*, *264*(25), 15074–15082.

Seyfzadeh, M., Keener, J., & Nomura, M. (1993). spoT-dependent accumulation of guanosine tetraphosphate in response to fatty acid starvation in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(23), 11004–11008.

Shan, J., Korbsrisate, S., Withatanung, P., Adler, N. L., Clokie, M. R., & Galyov, E. E. (2014). Temperature dependent bacteriophages of a tropical bacterial pathogen. *Frontiers in microbiology*, *5*, 599.

Shimada, T., Yamazaki, Y., Tanaka, K., & Ishihama, A. (2014). The whole set of constitutive promoters recognized by RNA polymerase RpoD holoenzyme of Escherichia coli. *PloS one*, *9*(3), e90447.

Shyp, V., Tankov, S., Ermakov, A., Kudrin, P., English, B. P., Ehrenberg, M., Tenson, T., Elf, J., & Hauryliuk, V. (2012). Positive allosteric feedback regulation of the stringent response enzyme RelA by its product. *EMBO reports*, *13*(9), 835–839.

Silpe, J. E., & Bassler, B. L. (2019). A Host-Produced Quorum-Sensing Autoinducer Controls a Phage Lysis-Lysogeny Decision. *Cell*, *176*(1-2), 268–280.e13.

Slomińska, M., Neubauer, P., & Wegrzyn, G. (1999). Regulation of bacteriophage lambda development by guanosine 5'-diphosphate-3'-diphosphate. *Virology*, *262*(2), 431–441.

Spriewald, S., Stadler, E., Hense, B. A., Münch, P. C., McHardy, A. C., Weiss, A. S., Obeng, N., Müller, J., & Stecher, B. (2020). Evolutionary Stabilization of Cooperative Toxin Production through a Bacterium-Plasmid-Phage Interplay. *mBio*, *11*(4), e00912-20.

Suttle, C. Viruses in the sea. *Nature* **437**, 356–361 (2005).

Svitil, A. L., Cashel, M., & Zyskind, J. W. (1993). Guanosine tetraphosphate inhibits protein synthesis in vivo. A possible protective mechanism for starvation stress in Escherichia coli. *The Journal of biological chemistry*, *268*(4), 2307–2311.

Säwström, C., Laybourn-Parry, J., Granéli, W., & Anesio, A. M. (2007). Heterotrophic bacterial and viral dynamics in Arctic freshwaters: results from a field study and nutrient-temperature manipulation experiments. *Polar Biology*, ***30***, 1407–1415.

Zhu, M., & Dai, X. (2023). Stringent response ensures the timely adaptation of bacterial growth to nutrient downshift. *Nature communications*, *14*(1), 467.

Takeda, Y., Folkmanis, A., & Echols, H. (1977). Cro regulatory protein specified by bacteriophage lambda. Structure, DNA-binding, and repression of RNA synthesis. *The Journal of biological chemistry*, *252*(17), 6177–6183.

Tamman, H., Ainelo, A., Ainsaar, K., & Hõrak, R. (2014). A moderate toxin, GraT, modulates growth rate and stress tolerance of Pseudomonas putida. *Journal of bacteriology*, *196*(1), 157–169.

Tamman, H., Ernits, K., Roghanian, M., Ainelo, A., Julius, C., Perrier, A., Talavera, A., Ainelo, H., Dugauquier, R., Zedek, S., Thureau, A., Pérez, J., Lima-Mendez, G., Hallez, R., Atkinson, G. C., Hauryliuk, V., & Garcia-Pino, A. (2023). Structure of SpoT reveals evolutionary tuning of catalysis via conformational constraint. *Nature chemical biology*, *19*(3), 334–345.

Tan, D., Hansen, M. F., de Carvalho, L. N., Røder, H. L., Burmølle, M., Middelboe, M., & Svenningsen, S. L. (2020). High cell densities favor lysogeny: induction of an H20 prophage is repressed by quorum sensing and enhances biofilm formation in Vibrio anguillarum. *The ISME journal*, *14*(7), 1731–1742.

Tasleem, M., El-Sayed, A.-A. A. A., Hussein, W. M., & Alrehaily, A. (2023). Bioremediation of Chromium-Contaminated Groundwater Using Chromate Reductase from *Pseudomonas putida*: An *In Silico* Approach. *Water*, *15*(1), 150.

Thierauf, A., Perez, G., & Maloy, A. S. (2009). Generalized transduction. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *501*, 267–286.

Torsvik, T., & Dundas, I. D. (1980). Persisting phage infection in Halobacterium salinarium str. 1. *Journal of general virology*, *47*(1), 29-36.

Tsiola, A., Koutmanis, I., Pitta, P., & Tsapakis, M. (2021). First report of lytic and lysogenic viral production rates in the vicinity of fish farms (Mediterranean Sea). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *258*, 107413.

Tuomi, P., & Kuuppo, P. (1999). Viral lysis and grazing loss of bacteria in nutrient-and carbon-manipulated brackish water enclosures. *Journal of Plankton Research*, *21*(5), 923–937.

Wang, J. D., Sanders, G. M. & Grossman, A. D. (2007). Nutritional control of elongation of DNA replication by (p)ppGpp. *Cell*, *128*(5), 865–875.

Weaver, J. W., Proshkin, S., Duan, W., Epshtein, V., Gowder, M., Bharati, B. K., Afanaseva, E., Mironov, A., Serganov, A., & Nudler, E. (2023). Control of transcription elongation and DNA repair by alarmone ppGpp. *Nature structural & molecular biology*, *30*(5), 600–607.

Weiss, L. A., & Stallings, C. L. (2013). Essential roles for Mycobacterium tuberculosis Rel beyond the production of (p)ppGpp. *Journal of bacteriology*, *195*(24), 5629–5638.

Williamson, S. J., & Paul, J. H. (2006). Environmental factors that influence the transition from lysogenic to lytic existence in the phiHSIC/Listonella pelagia marine phage-host system. *Microbial ecology*, *52*(2), 217–225.

Williamson, S. J., Cary, S. C., Williamson, K. E., Helton, R. R., Bench, S. R., Winget, D., & Wommack, K. E. (2008). Lysogenic virus-host interactions predominate at deep-sea diffuse-flow hydrothermal vents. *The ISME journal*, *2*(11), 1112–1121.

Wilson W. H., Carr N. G., & Mann N. H. (1996). The effect of phosphate status on the kinetics of cyanophage infection in the oceanic cyanobacterium Synechococcus sp. WH7803. *Journal of Phycology*, *32*(3), 506–516.

Wilson W. H., Turner S., Mann N. H. (1998). Population dynamics of phytoplankton and viruses in a phosphate-limited mesocosm and their effect on DMSP and DMS production. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *46*(2), 49–59.

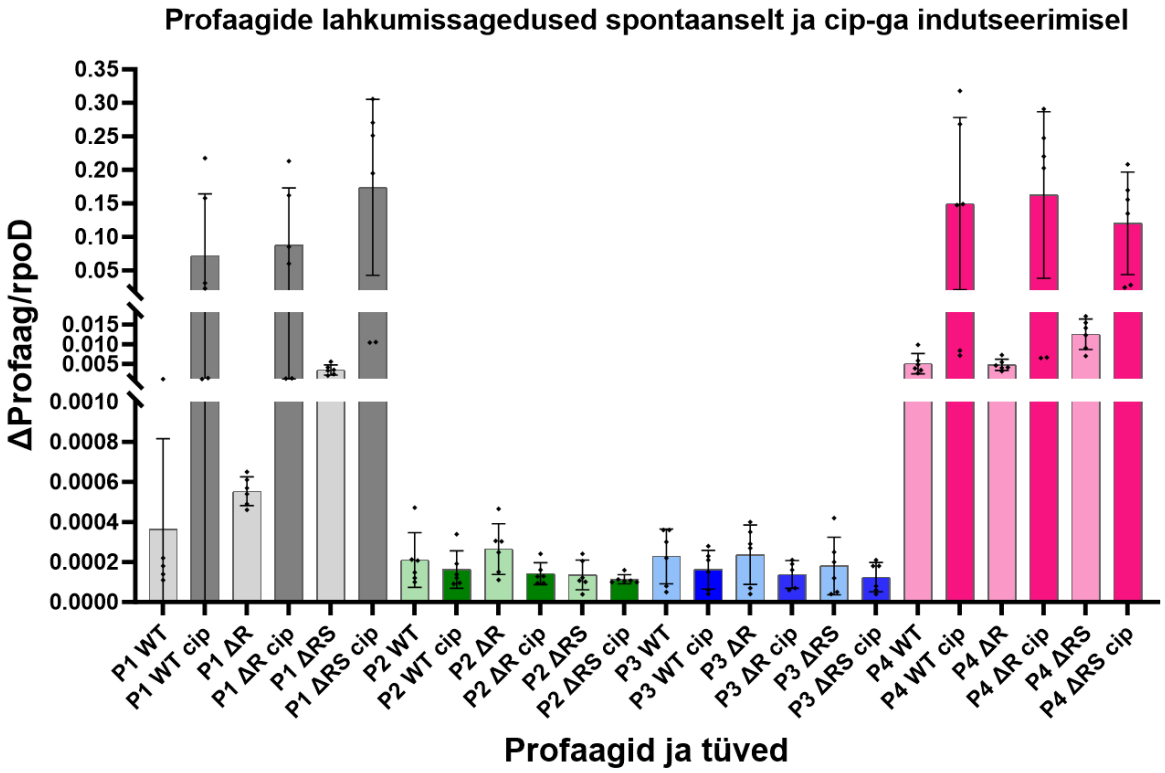
Wu, L., Wang, Z., Guan, Y., Huang, X., Shi, H., Liu, Y. & Zhang, X. (2020). The (p)ppGpp-mediated stringent response regulatory system globally inhibits primary metabolism and activates secondary metabolism in Pseudomonas protegens H78. *Applied microbiology and biotechnology*, *104*(7), 3061–3079.

Wu, X., Monchy, S., Taghavi, S., Zhu, W., Ramos, J., & van der Lelie, D. (2011). Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in Pseudomonas putida. *FEMS microbiology reviews*, *35*(2), 299–323.

Xiao, H., Kalman, M., Ikehara, K., Zemel, S., Glaser, G., & Cashel, M. (1991). Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of relA null mutants can be eliminated by spoT null mutations. *The Journal of biological chemistry*, *266*(9), 5980–5990.

Young R. (2014). Phage lysis: three steps, three choices, one outcome. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, *52*(3), 243–258.

Lisa 1. Profaagide lahkumissagedused



Joonis 1. Profaagide lahkumissagedused *P. putida* genoomist on erinevates suurusjärkudes. Kujutatud on profaagide P1 (hall), P2 (roheline), P3 (sinine) ja P4 (roosa) lahkumissagedused metsiktüve, ΔRelA ja ΔRelASpoT genoomist nii spontaanselt (heledamad) kui ka cip-iga indutseerides (tumedamad). X-teljel on kujutatud profaagide nimetused koos tüvede nimetustega (WT – metsiktüvi PaW85, ΔR – *relA* deletsioontüvi, ΔRS – *relAspoT* deletsioontüvi) ning Y-teljel profaagide lahkumissagedus vastavatest tüvedest (vastava profaagi ΔProfaag genoomide hulk jagatud genoomide koguhulgaga, mida väljendab paljundatud *rpoD* geeni hulk). Välja on toodud veapiirid, kuue paralleeli tulemused on kujutatud hallide rombidena.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Elise Mägi,

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

Poomisvastuse mõju *Pseudomonas putida* mõõdukate faagide infektsioonitsükli valikule

mille juhendajad on Hedvig Tamman ja Sirli Rosendahl,

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

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Elise Mägi
29.05.2025