

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

GENEETIKA ÕPPETOOL

**Profaagide mõju *Pseudomonas putida* faagiresistentsusele**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Anita Lipu

Juhendaja PhD Rita Hõrak

TARTU 2023

## INFOLEHT

### **Profaagide mõju *Pseudomonas putida* faagiresistentsusele**

*Pseudomonas putida* on molekulaar- ja mikrobioloogilistes uuringutes laialdaselt kasutatav mudelorganism, kuid üllatuslikult pole peaaegu üldse andmeid tema faagiresistentsusest. Töö eesmärgiks oli teada saada, kas *P. putida* genoomis leiduvad profaagid mõjutavad bakteri faagiresistentsust ning kui jah, siis millised profaagide geenid selle eest vastutavad. *P. putida* genoomis on neli profaagi, mille mõju faagiresistentsusele testisin erinevate deletsioontüvede abil. Tulemused näitasid, et profaagid suurendavad *P. putida* faagiresistentsust, kuid kaitse määr erinevate faagide vastu on erinev. Lähemalt uurisin profaage P1 ja P3, püüdes leida nende genoomidest faagiresistentsust suurendavaid lookusi. Katsetulemuste kohaselt paiknevad profaag P1 kaitseefekti eest vastutavad geenid regioonis PP\_3897-3898-5643-5644 ning profaag P3 kaitseefekti eest vastutavad geenid regioonis PP\_2292-2297.

Märksõnad: *Pseudomonas putida*, profaag, faagiresistentsus

CERCS kood: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

### **The role of prophages in phage resistance of *Pseudomonas putida***

*Pseudomonas putida* is a widely used model organism in molecular and microbiological research, but surprisingly, there is almost no data on its phage resistance. The aim of this work was to find out if the prophages found in *P. putida*'s genome affect the bacteria's phage resistance and if yes, which prophage genes are responsible. *P. putida* holds four prophages in its genome. To test their impact on phage resistance, I used different deletant variants of *P. putida*. The results showed that prophages increase *P. putida*'s phage resistance, but the effect of the protection varies depending on the phage. To map the defence loci, I took a closer look at prophages P1 and P3. According to my results, the genes that are responsible for the protective effect of prophage P1 are located in the region PP\_3897-3898-5643-5644 and for prophage P3, in the region PP\_2292-2297.

Keywords: *Pseudomonas putida*, prophage, phage resistance

CERCS code: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

## SISUKORD

INFOLEHT .....	2
SISUKORD.....	3
KASUTATUD LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Faagid.....	7
1.2 Bakterite kaitsemehhanismid faagide vastu.....	8
1.2.1 Restriktsiooni-modifikatsiooni süsteemid.....	9
1.2.2 CRISPR-Cas adaptiivne immuunsus .....	10
1.2.3 Abortiivset infektsiooni põhjustavad süsteemid.....	10
1.2.4 Profaagid.....	11
1.3 <i>Pseudomonas putida</i> genoomis leitud profaagid .....	12
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	13
2.1 Töö eesmärgid .....	13
2.2 Metoodika .....	13
2.2.2 Faagitolerantsuse testimine agarsöötmel.....	15
2.2.3 Faagitolerantsuse testimine vedelsöötmes mikrotiiterplaadil .....	16
2.3 Tulemused .....	16
2.3.1 Profaagid kaitsevad <i>P. putida</i> 't paljude faagide eest.....	16
2.3.2 Erinevad profaagid kaitsevad erinevate faagide eest .....	18
2.3.3 Profaag 1 regioon geenidega PP_3897-3898-5643-5644 annab kaitse faagi Kompost 2 ja Konnatiik vastu .....	20
2.3.4 Profaag 3 regioon geenidega PP_2292-2297 kaitseb 3. perekonna faagide vastu.....	22
2.4 Arutelu .....	23
2.4.1 Kromosomaalsete profaagide mõju <i>P. putida</i> faagiresistentsusele.....	23
2.4.2 Faagiresistentsuse eest vastutavad profaagi geenid .....	24

KOKKUVÕTE.....	26
SUMMARY .....	27
TÄNUSÕNAD.....	28
KASUTATUD KIRJANDUS.....	29

## KASUTATUD LÜHENDID

Abi – abortiivne infektsioon (ingl. k. *abortive infection*)

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

CRISPR - rühmitatud korrapäraste vahedega lühikesed palindroomsed kordusjärjestused

(ingl. k. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)

HIRAN – HIP1-sarnane nukleaaas (ingl. k. *HIP1-related nuclease*)

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

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

RM süsteem – restriksiooni-modifikatsiooni süsteem (ingl. k. *restriction-modification system*)

Sie – superinfektsiooni eksklusioon (ingl. k. *superinfection exclusion*)

TA – toksiin-antitoksiin (ingl. k. *toxin-antitoxin*)

wt – metsitüvi (ingl. k. *wild-type*)

## SISSEJUHATUS

Bakteriofaagid on arvukaim organismide rühm Maal ning oma kiire evolutsiooni tõttu survestavad nad ka baktereid kiiremini evolutsioneeruma. Kuna bakterid ja faagid on pidevas võidurelvastumises, viib see uute faagiresistentsusmehhanismide tekkimiseni bakteritel, aga samal ajal arenevad ka faagidel mehhanismid bakteri kaitsest möödahiilimiseks (Bondy-Denomy *et al.*, 2016; Labrie *et al.*, 2010). Näiteks kasutavad bakterid faagitõrjeks restriktiooni-modifikatsiooni süsteeme, CRISPR-Cas süsteeme või abortiivset infektsiooni (Hampton *et al.*, 2020; Rocha & Bikard, 2022). Viimasel ajal on kaitsemehhanisme pidevalt juurde leitud, aga ilmselt on bakterite faagivastane arsenal veel palju suurem.

Kui lüsogeense faagi genoom on profaagi kujul bakteri kromosoomi sisenenud, on profaagi huvides vältida superinfektsiooni ehk peremeesbakteri järgnevat nakatumist kas sama või mõne teise faagiga. Et vältida peremeesbakteri nakatumist uue faagiga, on profaagidel mitmesugused faagivastased kaitsemehhanismid ehk Sie (*superinfection exclusion*) süsteemid (Labrie *et al.*, 2010; Patel & Maxwell, 2023). Sie süsteemid võivad näiteks blokeerida faagi adsorptsiooni läbi pinnaretseptorite modifikatsiooni või inhibeerida faagi DNA rakku sisenemist (Bondy-Denomy *et al.*, 2016; Patel & Maxwell, 2023).

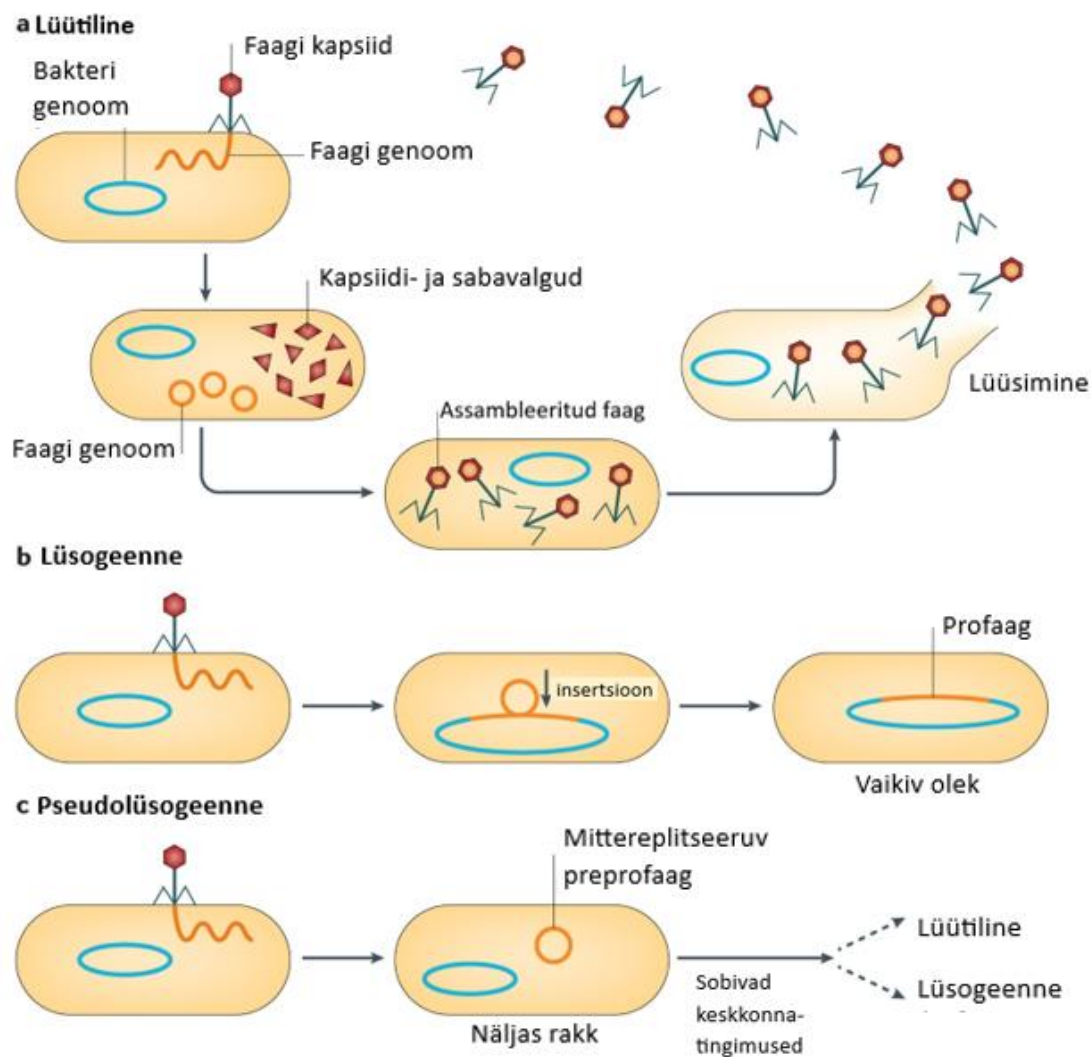
*Pseudomonas putida* genoomist on leitud neli profaagi (Martínez-García *et al.*, 2015), kuid nende faagivastast toimet pole veel põhjalikult uuritud. Siiani on seda tehtud vaid kahes meie laboris valminud bakalaureusetöös, kus oli võimalik kasutada vaid üksikuid *P. putida*'t nakatavaid faage (Kärgerberg, 2021; Piirmets, 2022). Seega oli antud töö praktilise osa eesmärgiks põhjalikumalt uurida *P. putida* profaagide mõju bakteri faagiresistentsusele ning püüda otsida profaagi gene, mis selle eest vastutavad.

## 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

### 1.1 Faagid

Bakteriofaagid ehk faagid on viirused, mis nakatavad baktereid. Faagide arvukus on umbes  $10^{31}$ , mis teeb nad arvukaimaks bioloogiliste organismide rühmaks Maal. Faagid on ülimalt mitmekesised ning neid leidub igal pool, kus on baktereid – näiteks vees, mullas ja loomade seedeelundkonnas (Bondy-Denomy *et al.*, 2016). Faagid on väga kiire evolutsiooniga, kuna nad pole pidevas võidurelvastumises mitte ainult bakteritega, vaid ka teiste omasarnaste faagidega, kes võitlevad samade ressursside eest (Mavrich & Hatfull, 2019).

Faagid jagunevad virulentseteks ja mõõdukateks, olenevalt nende elutsüklist (Joonis 1). Virulentsed faagid hakkavad kohe peale bakteriraku nakatamist oma genoomi replitseerima, kasutades selleks bakteri ressursse. Produktseeritud valgud pakitakse kokku faagipartikliteks ja valmis partiklid vallanduvad bakteriraku lüüses keskkonda. Virulentsete faagide elutsükli kutsutakse seetõttu lüütiliseks (Feiner *et al.*, 2015). Mõõdukad faagid sisestavad oma DNA bakteri genoomi ja jätkavad oma elutsükli profaagina. Niikaua kui profaagid on latentsed ja replitseeruvad koos bakteri genoomiga, on nad bakterile ohutud. Mõõdukate faagide elutsükli kutsutakse lüsogeenseks. Profaag jääb lüsogeensesse faasi kuni bakter satub DNA stressi alla, mis indutseerib faagi lüütiliste geenide ekspressiooni ja profaagi lahkumise bakteri genoomist. Peale seda hakkab faag bakteriraku ressursside kulul oma genoomi paljundama ja valke tootma, kuni rakk lüüsub ja valmis faagipartiklid vallanduvad keskkonda (Feiner *et al.*, 2015). On ka kolmas võimalus, kus faag nakatab bakterit, kuid ei suuda seal replitseeruda või genoomi lülituda (Joonis 1C). See võib juhtuda, kui bakteril pole DNA replikatsiooniks või valgusünteesiks piisavalt toitaineid. Sellisel juhul moodustab faagi DNA preprofaagi, mis sarnaneb episoomile. Kui bakter saab toitaineid juurde, saab faag oma elutsükliga edasi minna (Feiner *et al.*, 2015).



**Joonis 1. Mõõdukate faagide võimalikud replikatsioonitsüklid.** Joonisel on illustreeritud lüütiline, lüsogeenne ja pseudolüsogeenne replikatsioonitsükkel (Feiner *et al.*, 2015, kohandatud).

## 1.2 Bakterite kaitsemehhanismid faagide vastu

Kuna bakterid ja faagid on omavahel pidevas olelusvõitluses, on bakterid evolutsiooni käigus omandanud suure hulga faagivastaseid kaitsemehhanisme. Näiteks kasutavad bakterid faagitõrjeks võõr-DNA-d äratundvaid ja lagundavaid restriksioonisüsteeme, abortiivset infektsiooni põhjustavaid süsteeme, adaptiivset immuunsust tagavaid CRISPR-Cas süsteeme või takistavad faagide adsorptsiooni raku pinnale (Hampton *et al.*, 2020). Viimasel ajal on avastatud palju uusi kaitsemehhanisme, näiteks toodavad bakterid viirusevastaseid molekule, kasutavad kaitsemehhanismis retronite kodeeritud väikesi mittekodeerivaid RNA-sid ja sekundaarseid signaalmolekule (Millman *et al.*, 2022). Arvatakse, et paljud mehhanismid on veel avastamata.

Faagivastaseid mehhanisme kannavad ka profaagid. Neid faagi genoomi osi nimetatakse „*moron*“ (*more on*) lookusteks, kuna nad pole vajalikud faagi enda eluks, kuid võivad parandada peremehe ellujäämisvõimalusi (Bondy-Denomy & Davidson, 2014). Näiteks kannavad *Escherichia coli* P4-tüüpi faagid ja nende P4-tüüpi satelliidid oma genoomis erinevaid faagivastaseid süsteeme (Rousset *et al.*, 2022). Profaagide kodeeritud kaitsemehhanismid on näiteks DNA translokatsiooni inhibeerimine või abortiivset infektsiooni põhjustavad süsteemid (McGrath *et al.*, 2002; Owen *et al.*, 2021). Erinevad profaagide poolt kodeeritud kaitsemehhanismid mängivad suurt rolli ka viiruste omavahelises võitluses (Rousset *et al.*, 2022), sest võivad takistada juba mõõduka faagiga nakatunud bakteri nakatumist uue faagiga. Erinevad immuunstrateegiad toimivad nakatava faagi elutsükli erinevates faasides ja moodustavad kompleksse immuunstrateegia – näiteks võivad koostööd teha restriksiooni-modifikatsiooni (RM) süsteemid ja CRISPR-Cas süsteem. Kui RM-süsteem lõikab faagi DNAd, võib CRISPR-Cas süsteem tekkinud kaksikahelalisi katkeid uute *spacer*-regioonide moodustamiseks kasutada (Cury & Bernheim, 2022; Maguin *et al.*, 2022).

### **1.2.1 Restriksiooni-modifikatsiooni süsteemid**

Restriksiooni-modifikatsiooni (RM) süsteemid on üks enimlevinutest kaitsemehhanismidest faagide vastu, neid leidub lausa 83% prokarüootsetest genoomidest (Cury & Bernheim, 2022). RM-süsteemid koosnevad restriksiooni ja metülatiooni ensüümist. Kui RM-süsteemi kandvasse rakku satub DNA, mis pole bakterile spetsiifiliselt metüleeritud, tunneb restriksiooni-ensüüm selle ära ja võõr-DNA lagundatakse (Labrie *et al.*, 2010). Tavaliselt on restriksiooniensüüm rakus aktiivsem kui metülaas ning võõr-DNA saab edukalt lagundada. Kui juhtub, et faagi DNA jõutakse siiski metüleerida, on uued kokkupandavad virionid RM-süsteemi eest kaitstud (Labrie *et al.*, 2010).

Nagu teiste bakterite kaitsemehhanismidega, on faagidel ka RM-süsteemide vastu olemas kaitsemehhanismid. Üks nendest on endonukleaside äratundmissaitide puudumine genoomist. Sel juhul ei saa RM-süsteemi restriksiooni-ensüüm faagi DNAd lagundada (Labrie *et al.*, 2010). Samuti kodeerivad mõned faagid sama äratundmisjärjestusega metülaase nagu nende peremehed (Labrie *et al.*, 2010).

### **1.2.2 CRISPR-Cas adaptiivne immuunsus**

CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) lookus avastati algselt *Escherichia coli* genoomist, kuid teadaolevalt leidub CRISPR-Cas süsteeme umbes 45% bakterigenoomides (Millman *et al.*, 2022; Rath *et al.*, 2015). CRISPR lookus koosneb lühikestest korduvatest DNA-järjestustest ja erisugustest *spacer*-regioonidest. *Spacer*-regioonid pärinevad viiruste ja plasmiidide nukleiinhappest. Cas (CRISPR-*associated*) geenid paiknevad CRISPR lookuse kõrval ning kodeerivad valke, mis on immuunvastuse vahendajad. Kui bakterirakku nakatab viirus, mille sarnane *spacer*-regioon on CRISPR lookuses olemas, tuntakse see ära ja Cas valgud saavad viiruse hävitada (Rath *et al.*, 2015). Seetõttu on CRISPR-Cas immuunvastus bakterites ainulaadne, kuna varem nakkust põhjustanud faagidest pärinevad *spacer*-regioonid jäävad genoomi alles ning võimaldavad uuesti sama faagiga kokku puutudes kiire immuunvastuse.

### **1.2.3 Abortiivset infektsiooni põhjustavad süsteemid**

Abortiivse infektsiooni (Abi) põhimõte seisneb nakatunud bakteriraku apoptoosis enne seda, kui faagipartiklid jõuavad lõplikult küpseda ja bakterist vabaneda. Nii kaitstakse kogu bakteripopulatsiooni, ohverdades üksikud nakatunud rakud (Lopatina *et al.*, 2020). Kuna bakteritel leidub mitmeid teisi kaitsemehhanisme, mis rakku ei surma (näiteks CRISPR-Cas immuunsus ja RM-süsteemid), on Abi süsteeme mõttekas kasutada vaid siis, kui kõik teised kaitsemehhanismid on alt vedanud. Seetõttu aktiveeruvad Abi süsteemid alles nakkustsükli keskmises või hilises faasis (Lopatina *et al.*, 2020).

Igal Abi süsteemil on kaks funktsionaalset osa: üks, mis tunneb ära faagiga nakatumise ja teine, mis tapab raku või surub alla raku metabolismi (Lopatina *et al.*, 2020). Abi süsteemid tunnevad ära faagide struktuurivalke ja muid infektsioonil ekspresseeritavaid valke (Depardieu *et al.*, 2016; Schmitt & Molineux, 1991) või faagi põhjustatud bakteri geenide transkriptsiooni inhibitsiooni (Koga *et al.*, 2011). Kui Abi süsteem on infektsiooni ära tundnud, siis aktiveerub süsteemi teine pool. Rakku tappev moodul peab olema hästi kontrollitud, et see ei aktiveeruks normaalsetes oludes ja ei pärsiks bakteri kasvu. Abi süsteemi aktivatsioon peab olema aga kiire ja efektiivne, et rakk sureks enne infektsioonitsükli lõppu. Mõned Abi süsteemid degradeerivad faagi ja peremehe DNAd (Lau *et al.*, 2020), lõikavad translatsiooniks vajalikke valke (Yu & Snyder, 1994) või lagundavad faagi ja bakteri mRNA-sid (Niewoehner *et al.*, 2017).

Need mehhanismid põhjustavad raku kasvu peatumise või surma, kuid kui bakter vabaneb infektsioonist teiste mehhanismide abil, suudab ta kasvu jätkata (Lopatina *et al.*, 2020).

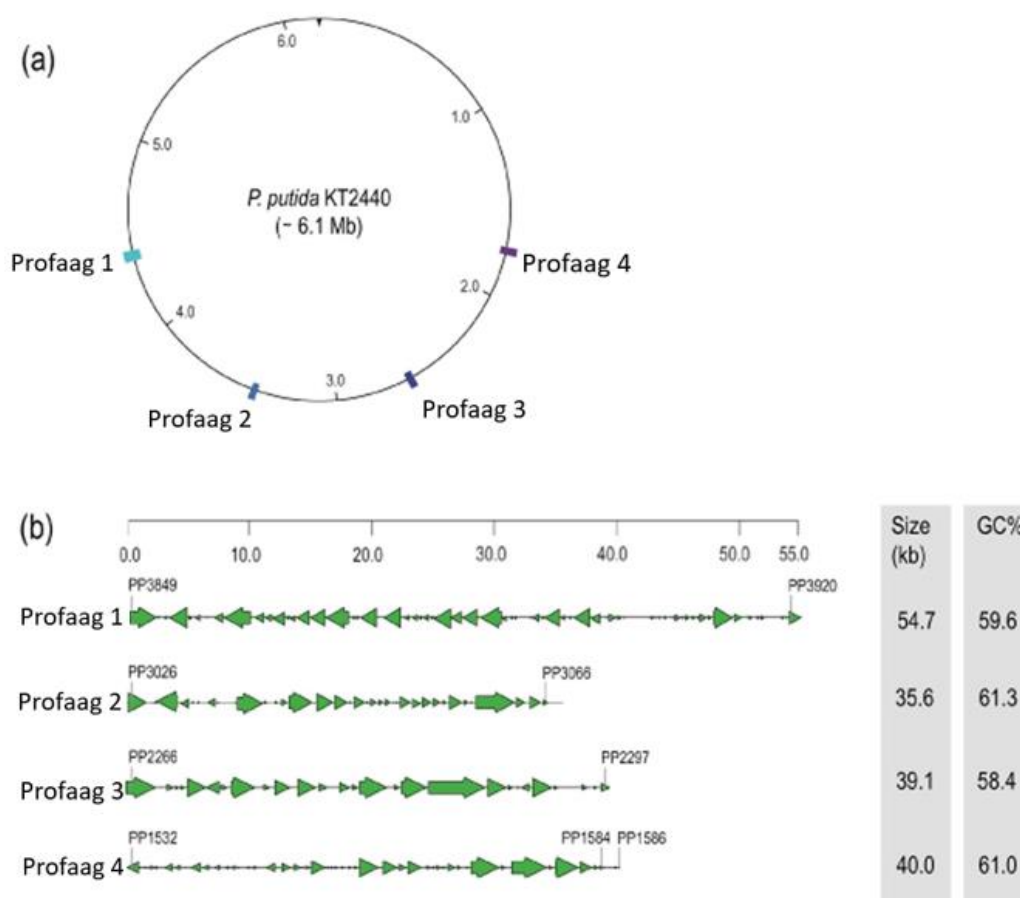
#### **1.2.4 Profagaadid**

Superinfektsiooniks nimetatakse protsessi, mille käigus eelnevalt ühe viirusega nakatunud bakter nakatub uuesti kas sama või hoopis uue viirusega. Kui esimesena nakatanud faag on bakterite genoomis latentse faasis profaagina, siis annab ta sageli sekundaarselt bakterit nakatava faagi vastu immuunsuse. Seega on profaagidel mehhanismid, millega nad kaitsevad oma peremeesbakterit teiste faagide eest ja regulaatorgeenid, mis kontrollivad profaagi omaenda lüütilisi geene (Mavrich & Hatfull, 2019). Superinfektsiooni ärahoidvaid süsteeme kutsutakse *superinfection exclusion* süsteemideks. Näiteks kodeerivad profagaadid valke, mis modifitseerivad raku pinnareseptoreid, blokeerides faagi adsorptsiooni ja valke, mis blokeerivad faagi DNA sisenemise raku (Bondy-Denomy *et al.*, 2016; Patel & Maxwell, 2023).

Owen *et al.* (2021) leidsid, et kuna profaagina eksisteerivate faagide ellujäämine sõltub täielikult peremeesraku tervisest, siis on neile väga kasulik, et nad kannavad „*moron*“ lookuseid, mille abil nad peremeesbakterit teiste faagide eest kaitsevad. Näiteks kodeerib *Salmonella enterica* profaag BTP1 valku BstA, mis käivitab nakatatud rakkudes abortiivse infektsiooni ja kaitseb bakteripopulatsiooni faaginakkuse korral (Owen *et al.*, 2021). Põhimõtteliselt võib see tekitada olukorra, kus BstA geen aktiveerub, kui lüsogeenne faag lülitub lüütilisse tsükliks, põhjustades peremeesbakteri enneaegse surma. BstA-d kodeeriv faag on aga ise BstA toime eest kaitstud, sest BstA lookus kodeerib ka anti-BstA ehk *aba* elementi, mis inhibeerib BstA aktiivsust (Owen *et al.*, 2021). Teoreetiliselt võiksid teised faagid kasutada oma *aba* elementi, et bakteris ekspresseeritava BstA aktiivsust alla suruda. Tuleb aga välja, et BstA-*aba* süsteem on spetsiifiline ehk bakterirakus profaagi toodetavat BstA valku saab maha suruda ainult sama faagi *aba* element (Owen *et al.*, 2012). Sellist tüüpi kaitsemehhanism on levinud ja leitud paljude teiste bakterite profaagidest.

### 1.3 *Pseudomonas putida* genoomis leiduvad profaagid

*P. putida* KT2440 ja meie laboris kasutatava isogeense tüve PaW85 genoomis on 4 profaagi (Joonis 2), mille tähtsust *P. putida* kohasusele on lähedamalt uuritud Martínez-Garcia ja kaasautorite artiklis (2015). Need neli profaagi moodustavad umbes 2,6% *P. putida* genoomist. Kui *P. putida* genoomist eemaldada kõik profaagid, toob see kaasa bakteri suurenenud taluvuse UV-kiirguse ja muude DNA-stressorite vastu (Martínez-García *et al.*, 2015).



**Joonis 2. *P. putida* genoomsed profaagid.** Joonisel on kujutatud *P. putida* genoom ja näidatud profaagide asukohad. Samuti on välja toodud iga profaagi struktuur (Martínez-García *et al.*, 2015, kohandatud).

Eelnevalt on profaagide võimalikku mõju *P. putida* faagiresistentsusele meie laboris uurinud oma bakalaureusetöodes Liis Kärgerberg (2021) ja Kendra Piirmets (2022). Mõlemad leidsid, et profaagid võivad mingil määral *P. putida*'t faagide eest kaitsta (Kärgerberg, 2021; Piirmets, 2022). Samas oli nende tööde tegemise ajal meie labori faagiraamatukogus faage väga vähe.

Kokku analüüsi kahe töös vaid kaheksat faagi ja vaid mõne faagiga nähti, et profaagid võivad kuni 10 korda *P. putida* faagiresistentsust suurendada (Kärgerberg, 2021; Piirmets, 2022). Seega ei võimaldanud saadud tulemused *P. putida* profaagide faagivastase kaitse kohta suuremaid üldistusi teha. Tänapäevaks on meie *P. putida* faagide raamatukogu oluliselt suurenenud ja liigiliselt mitmekesisestunud. Suurem faagide valim ning rohkem erinevalt käituvad faagiperekondi aitavad *P. putida* resistentsusmehhanisme paremini uurida ning tuvastada potentsiaalselt erinevamaid faag-profaag interaktsioone.

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärgiks oli põhjalikumalt uurida *P. putida* profaagide mõju bakteri faagiresistentsusele ning püüda leida profaagi geene, mis selle eest vastutavad.

### 2.2 Metoodika

#### 2.2.1 Kasutatud söötmed, *P. putida* tüved ja faagid

Töös kasutatud bakteritüved ja faagid on välja toodud tabelites 1 ja 2. Söötmena kasutasin LB (*lysogeny broth*) söödet (1% trüpton, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl). LB tardsööde sisaldas 1,5% agarit ja LB pehmeagari sööde 0,3% agarit. Bakterite nakatumise parandamiseks lisisin LB tardsöötmele 0,03 µg/ml tsiprofloksatsiini ja LB pehmeagarile CaCl<sub>2</sub> lõppkontsentratsiooniga 10 mM. Bakterid kasvasid LB vedelsöötmes üleöö 20 °C juures.

Tabel 1. Töös kasutatud *P. putida* tüved

Bakteritüvi	Iseloomustus	Viide allikale
<i>Pseudomonas putida</i>		
PaW85	Metsiktüvi	

$\Delta P1$	PaW85 spontaanne deletsioonmutant, millel puudub profaag P1	Sirli Rosendahl
$\Delta P2$	PaW85, millest on eemaldatud profaag P2	Kendra Piirmets
$\Delta P3$	PaW85, millest on eemaldatud profaag P3	Sirli Rosendahl
$\Delta P4$	PaW85, millest on eemaldatud profaag P4	Kendra Piirmets
$\Delta 4\phi$	PaW85, millest on eemaldatud kõik genoomsed profaagid	Kendra Piirmets, 2022
$\Delta P1_{3920}$	PaW85, millest on eemaldatud P1 profaagi integraasi geen PP_3920	Sirli Rosendahl
$\Delta P1_{left}$	PaW85, millest on deleteeritud profaag P1 vasak pool (PP_3849 kuni PP_5641)	Sirli Rosendahl
$\Delta P1_{R2}$	PaW85, millest on deleteeritud profaag P1 parem pool (PP_3900 kuni PP_3918)	Rita Hõrak
$\Delta P1_{kesk2}$	PaW85, millest on deleteeritud profaag P1 keskelt PP_3886 kuni PP_3894	Rita Hõrak
$\Delta P1_{NUCop}$	PaW85, millest on deleteeritud profaag P1 keskelt PP_3886 kuni PP_3890	Rita Hõrak
$\Delta P1_{Repop}$	PaW85, millest on deleteeritud profaag P1 keskelt PP_3891 kuni PP_3894	Rita Hõrak
$\Delta P1_{kesk4}$	PaW85, millest on deleteeritud profaag P1 keskelt PP_3897 kuni PP_5644	Rita Hõrak
$\Delta P3_{L2}$	PaW85, millest on deleteeritud profaag P3 vasak pool (PP_2266 kuni PP_2276)	Rita Hõrak

**Tabel 2. Töös kasutatud faagid**

<b>Faagid<sup>a</sup></b>		
<b>Nimi</b>	<b>Liik</b>	<b>Perekond</b>
Kassivere 2	1D	1
Aardla 1	(pole teada)	3 (PCR)

Kakumetsa 1	(pole teada)	3 (PCR)
Aura	3A	3
Suure-Kambja 4	3A	3
Pori 4	3B	3
Kõpa 5	3B	3
Kakumetsa 2	(pole teada)	5 (PCR)
Konnatiik	5B	5
Mõra 3	5B	5
Luutsna 3	5B	5
Kompost 2	7B	7
Pori 3	9A	9

<sup>a</sup> Faagid jaotati liikidesse ja perekondadesse sekveneerimistulemuste või faagi perekonnaspetsiifiliste praimeritega teostatud PCR-i alusel (teostasid Rita Hõrak, Hedvig Tamman, Age Brauer). Faagid määrati ühte liiki/perekonda, kui kogu genoomi ulatuses oli identsus 95%/70%.

### **2.2.2 Faagitolerantsuse testimine agarsöötmel**

Faagitolerantsuse testimiseks agarsöötmel kasvasin bakterikultuure üleöö 20 °C juures LB vedelsöötmes. Eksponeentsiaalse kasvufaasi rakkude saamiseks lahjendasin üleöö kasvanud bakterikultuuri värskesse LB vedelsöötmesse ja kasvasin rakke umbes 3-4 tundi 20 °C juures, kuni rakkude OD<sub>580</sub> ~1. Bakterimuruga tasside tegemiseks segasin 200 µl uuritava tüve eksponeentsiaalse kasvufaasi rakke ~5 ml 0,3% LB pehmeagariga (42 °C), millele oli lisatud CaCl<sub>2</sub> lõppkontsentratsiooniga 10 mM. Bakterimuru valasin 0,03 µg/ml tsiprofloksatsiini sisaldavatele LB agarsöötme tassile.

Igast uuritavast faagifiltraadist tegin 10<sup>-1</sup> – 10<sup>-6</sup> lahjendusread SM puhvrise (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,01% želatiin) ning pipeteerisin iga lahjendust 1,5 µl bakterimurule. Tasse inkubeerisin üleöö 20 °C juures.

### **2.2.3 Faagitolerantsuse testimine vedelsöötmes mikroitiiterplaadil**

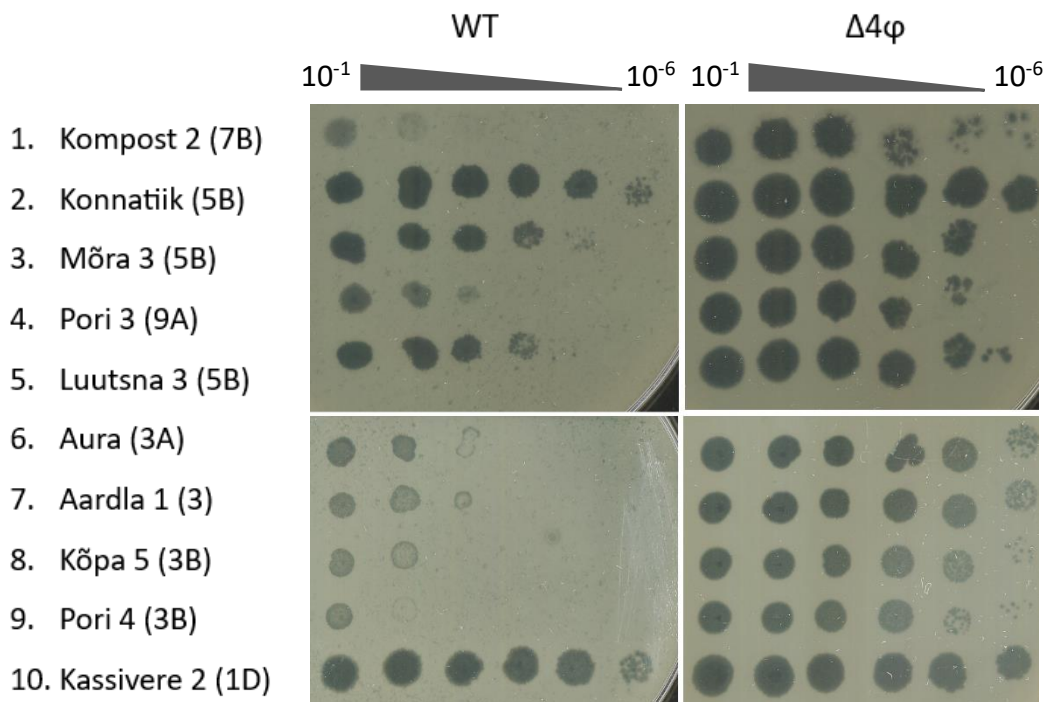
Faagitolerantsuse testimiseks vedelsöötmes kasvasin bakterikultuure üleöö 20 °C juures LB söötmes. Eksponentsiaalse kasvufaasi rakkude saamiseks lahjendasin üleöö kasvanud bakterikultuuri värskesse LB vedelsöötmesse ja kasvasin rakke umbes 3-4 tundi 20 °C juures, kuni rakkude OD<sub>580</sub> ~1.

Bakterite faagitolerantsust mõõtsin mikroitiiterplaadis. Igasse mikroitiiterplaadi kannu lisisin 80 µl LB söödet, mis sisaldas tsiprofloksatsiini (0,03 µg/ml) ja CaCl<sub>2</sub> (10 mM). Siis lisisin 10 µl uuritavate bakteritüvede eksponentsiaalse kasvufaasi rakke ja 10 µl erineva lahjendusega faagifiltraate arvestusega, et nakatamiskordaja MOI oleks 1 kuni 10<sup>-1</sup>. Kontrollkannudesse lisisin faagifiltraadi asemel 10 µl SM puhvrit. Mikroitiiterplaati inkubeerisin üleöö 20 °C juures Tecan Infinite 200 PRO või BioTek Synergy H1 mikroitiiterplaadi lugejates, mis mõõtsid iga kannu optilise tiheduse (OD<sub>580</sub>) iga 10 minuti järel.

## **2.3 Tulemused**

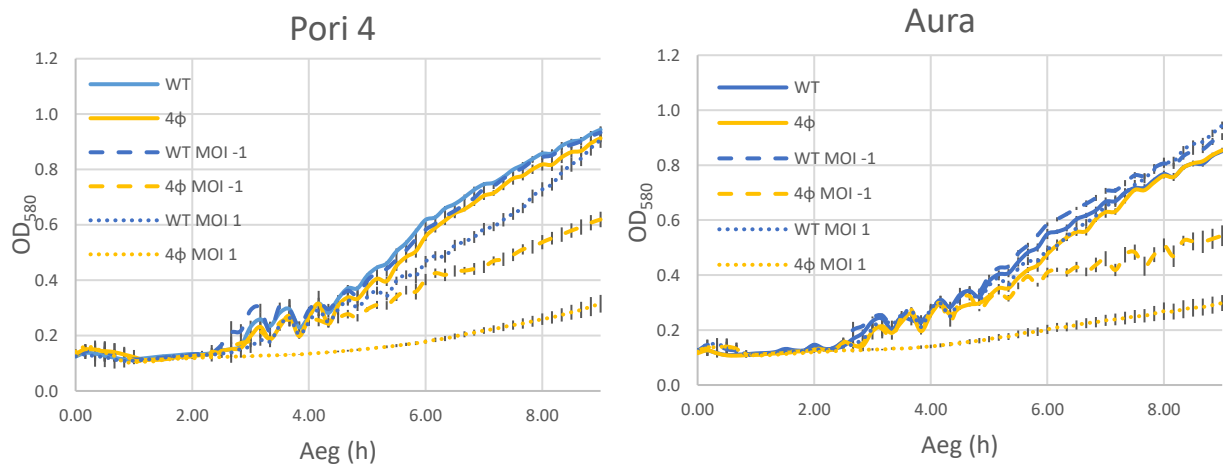
### **2.3.1 Profaagid kaitsevad *P. putida*'t paljude faagide eest**

Selleks, et hinnata profaagide mõju *P. putida* faagitolerantsusele, võrdlesin esmalt erinevate faagide võimekust lüüsida *P. putida* algset tüve PaW85 ja Δ4φ tüve, millel puuduvad kõik neli profaagi. Mitmed sõltumatud katsed näitasid, et paljud faagid nakatavad Δ4φ tüve paremini kui algset tüve – lüüsilaike on Δ4φ tüve murul rohkem ning kohati on need ka suuremad (Joonis 3). Faagid Kompost 2, Pori 3, Aura, Aardla 1, Kõpa 5 ja Pori 4 nakatavad algset tüve väga halvasti, aga Δ4φ tüve murul on lüüsilaigud suuremad ja sõltuvalt faagist on lüüsilaike 100-10 000 korda rohkem (Joonis 3). Need tulemused näitavad, et genoomsed profaagid annavad *P. putida*'le eelmainitud faagide vastu väga tugeva kaitse. Samas nakatavad faagid Konnatiik ja Kassivere 2 *P. putida* algset tüve ja Δ4φ tüve üsna võrreldavalt, ehkki ka nende faagide puhul on lüüsilaigud Δ4φ tüve murul veidi suuremad. Faagid Mõra 3 ja Luutsna 3 nakatavad Δ4φ tüve ~10 korda paremini kui algset tüve. Seega saab järeldada, et profaagid kaitsevad *P. putida*'t paljude faagide eest, aga kaitse määr on erinevate faagide puhul erinev.



**Joonis 3. Faagide lüüsilaigud *P. putida* algse tüve ja  $\Delta 4\phi$  tüve murudel.** Esitatud on 10 erineva faagi lüüsilaigud *P. putida* algse tüve (WT) ja  $\Delta 4\phi$  tüvega tassidel. Sulgudes on märgitud faagi liik või perekond kui liik pole teada. LB agarsöötmele on lisatud 0,03  $\mu\text{g/ml}$  tsiprofloksatsiini ning 0,3% pehmeagarile on lisatud 10 mM  $\text{CaCl}_2$ . Pildid on tehtud peale  $\sim 24$  h kasvatamist 20 °C juures.

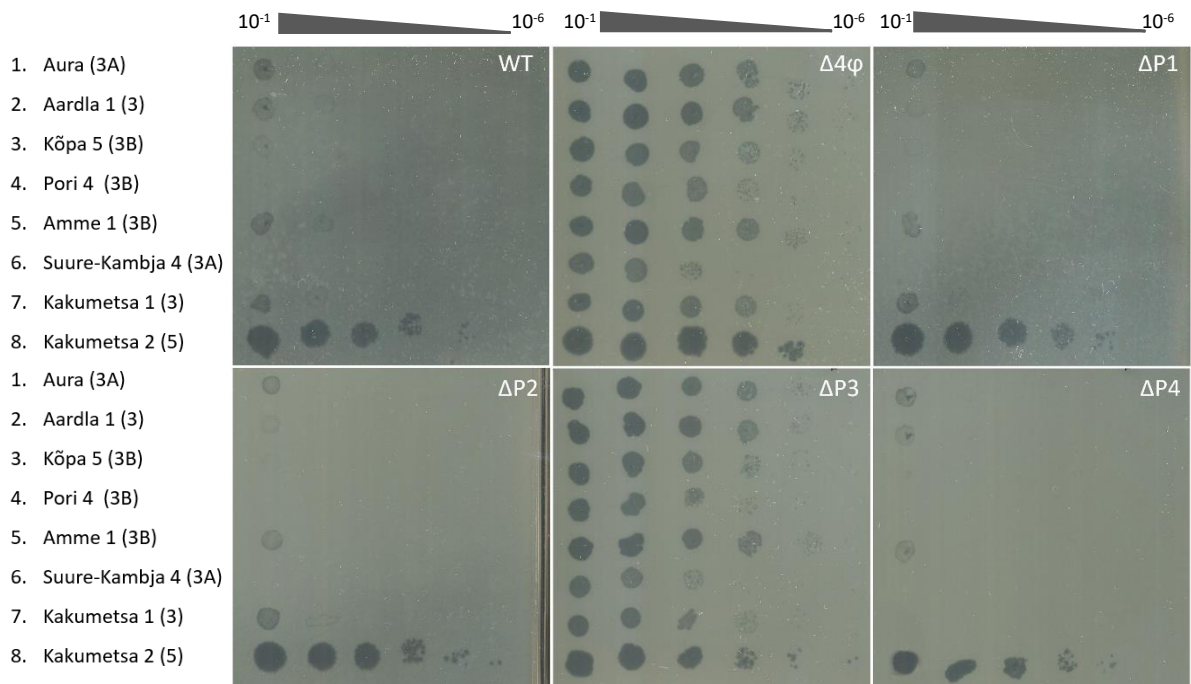
Agarsöötmele tehtud katsed näitasid, et profaagid suurendavad *P. putida* faagiresistentsust. Selleks, et analüüsida, kas sama kehtib ka bakterite kasvamisel vedelkultuuris, võrdlesin faagiga nakatatud *P. putida* algse ja  $\Delta 4\phi$  tüve kasvudünaamikat LB vedelsöötmes. Vedelkultuuris bakterite kasvatamisel lisasin söötmesse tsiprofloksatsiini ja  $\text{CaCl}_2$ , kuna see aitab faagidel baktereid paremini nakatada. Profaagide kaitseefekti hindamiseks võrdlesin *P. putida* algse tüve ja  $\Delta 4\phi$  kasvukõveraid faagidega nakatamisel erinevatel MOI väärtustel (Joonis 4). Sarnaselt agartassidel tehtud katsetele nakatasid Pori 4 ja Aura faagid  $\Delta 4\phi$  tüve kümneid kordi efektiivsemalt, kui algset *P. putida*'t. Järelikult annavad genoomsed profaagid *P. putida*'le faagide eest kaitse ka vedelkultuuris.



**Joonis 4. Profaagid suurendavad *P. putida* kaitset Pori 4 ja Aura faagide vastu.** Esitatud on *P. putida* algse tüve (WT) ja  $\Delta 4\phi$  kasvukõveraid ilma faagideta ja koos faagidega MOI 1 ja  $10^{-1}$  nakatamiskordaja korral. Bakterid kasvasid koos faagidega LB söötmes, millele oli lisatud 0,03  $\mu\text{g/ml}$  tsiprofloksatsiini ja 10 mM  $\text{CaCl}_2$ . Katset korrati kolm korda ja esitatud on ühe katse kolme tehnilise korduse keskmised tulemused ja standardhälbed.

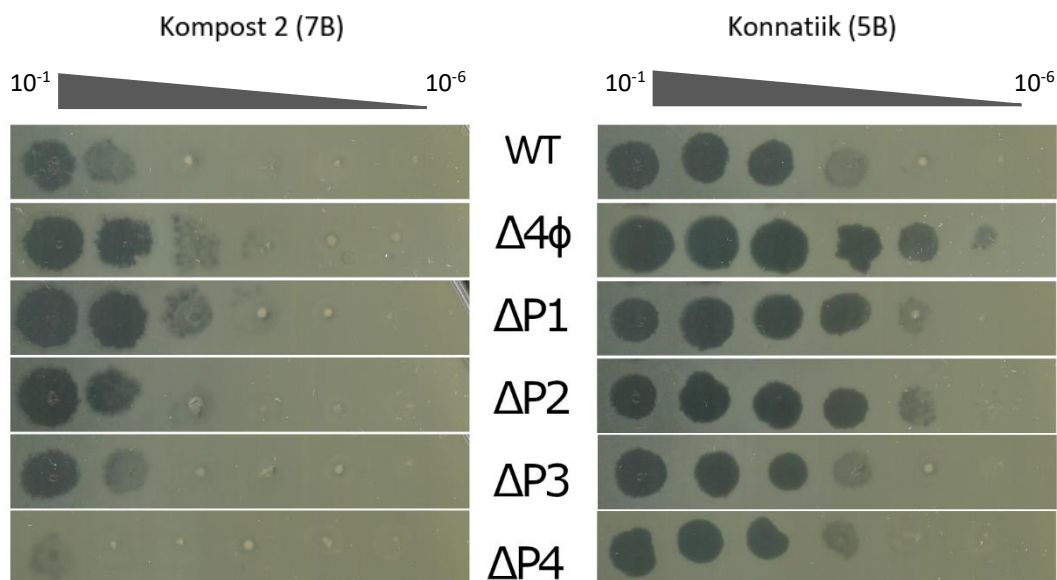
### 2.3.2 Erinevad profaagid kaitsevad erinevate faagide eest

Eelmise katse põhjal saab väita, et profaagidel on oluline roll *P. putida* faagiresistentsuses. Edasi tahtsin teada saada, kas kaitseefekti nägemiseks on vaja kõiki profaage või piisab mõnest kindlast profaagist. Selleks võrdlesin *P. putida* algse tüve,  $\Delta 4\phi$  ja üksikute profaagide suhtes defektsete tüvede nakatumiseefektiivsust bakterimuruga tassidel. Tulemustest joonisel 5 on näha, et profaag 3 pakub tugevat kaitset paljude kolmanda perekonna faagide eest, nagu Aura, Aardla 1, Kõpa 5, Pori 4, Amme 1, Suure-Kambja 4 ja Kakumetsa 1, sest need faagid lüüsiivad  $\Delta P3$  tüve sama efektiivselt kui  $\Delta 4\phi$  tüve. Samas ei mõjuta profaagide P1, P2 ja P4 puudumine nende faagide võimet *P. putida* rakke nakatada (Joonis 5).



**Joonis 5. Profaag 3 kaitseb *P. putida*'t kolmanda perekonna faagide eest** Esitatud on kaheksa erineva faagi lüüsilaidud *P. putida* algse tüve (WT),  $\Delta 4\phi$ ,  $\Delta P1$ ,  $\Delta P2$ ,  $\Delta P3$  ja  $\Delta P4$  tüvede murudel. Sulgudes on märgitud faagi liik või perekond kui liik pole teada. LB agarsöötmele on lisatud 0,03  $\mu\text{g/ml}$  tsiprofloksatiini ning 0,3% pehmeagarile on lisatud 10 mM  $\text{CaCl}_2$ . Pildid on tehtud peale ~24h kasvatamist 20°C juures.

Kuna eelmise katse tulemisest on näha, et viienda perekonna faag käitub teisest erinevalt, tegin katse viienda ja seitsmenda perekonna faagidega. Tulemused joonisel 6 näitavad, et profaag 1 kaitseb *P. putida*'t seitsmenda perekonna faagi Kompost 2 eest, kuna lüüsimiseefektiivsus tüve  $\Delta P1$  murul on võrreldav  $\Delta 4\phi$  tüvega. Profagaadid P2, P3 ja P4 aga faagi Kompost 2 nakatamisvõimet ei mõjuta. Viienda perekonna faagi Konnatiik eest kaitsevad bakterit aga mitu profaagi korraga, kuna see faag nakatab  $\Delta P1$  ja  $\Delta P2$  tüve paremini kui *P. putida* algset tüve (Joonis 6). Samas nakatab Konnatiik kõige paremini siiski  $\Delta 4\phi$  tüve ehk kui eemaldatud on nii profaag P1 kui ka P2. Profagaadid P3 ja P4 faagi Konnatiik nakatamisvõimet ei mõjuta, kuna lüüsilaidud nende profaagide puudumisel on võrreldavad algse *P. putida* tüve omadega (Joonis 6). Tulemuste põhjal võib väita, et erinevate faagide eest kaitsevad *P. putida*'t erinevad profaagid.

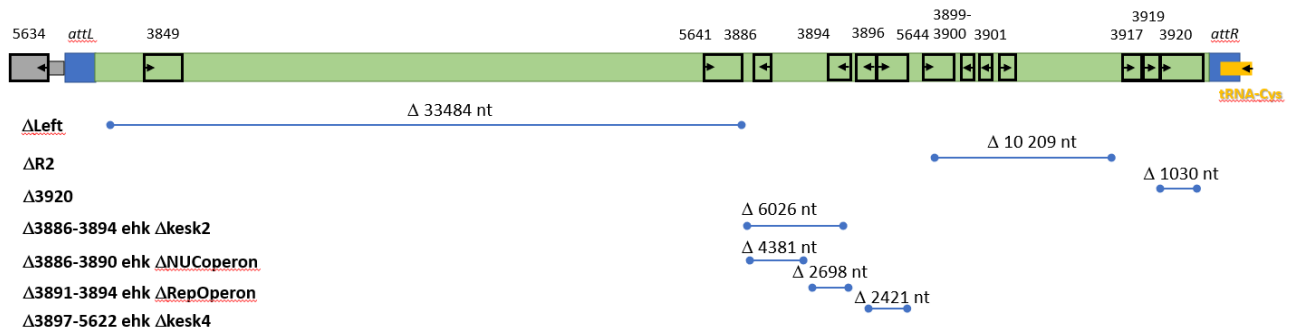


**Joonis 6. Faagide Kompost 2 (7B) ja Konnatiik (5B) eest kaitsevad erinevad profaagid.** Faagilaigud *P. putida* algasel,  $\Delta 4\phi$ ,  $\Delta P1$ ,  $\Delta P2$ ,  $\Delta P3$  ja  $\Delta P4$  tüvede murudel. LB agarsöötmele on lisatud 0,03  $\mu\text{g/ml}$  tsiprofloksatsiini ning 0,3% pehmeagarile on lisatud 10 mM  $\text{CaCl}_2$ . Pildid on tehtud peale  $\sim 24\text{h}$  kasvatamist  $20^\circ\text{C}$  juures. Katset kordasin kolm korda ning esitatud on viimase katse tulemused.

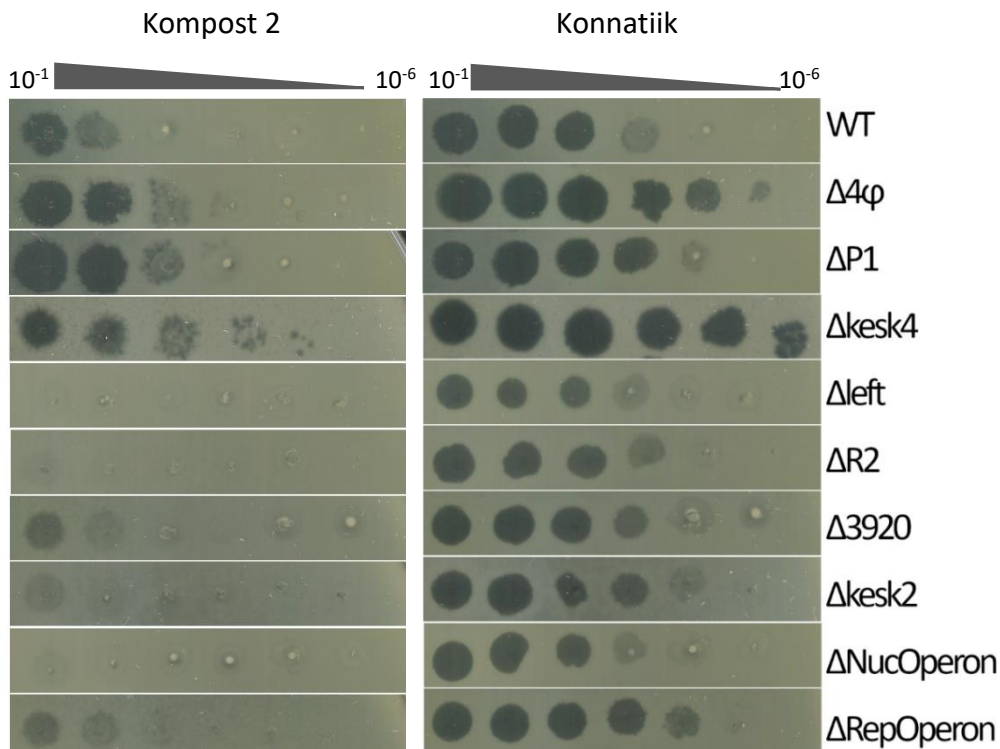
### **2.3.3 Profaag 1 regioon geenidega PP\_3897-3898-5643-5644 annab kaitse faagi Kompost 2 ja Konnatiik vastu**

Eelnevatest katsetest nägin, et profaag P1 andis tugeva (sõltuvalt katsest 100-1000-kordse) kaitse faagi Kompost 2 ja nõrgema (10-kordse) kaitse faagi Konnatiik vastu (Joonis 6). Järgmiseks seadsin eesmärgi leida profaag P1 geenid, mis selles kaitsemehhanismis olulist rolli mängivad. Selleks kasutasin labori kollektsioonis leiduvaid *P. putida* tüvesid, millest olid deleteeritud erineva pikkusega regioonid profaag P1 genoomist (Tabel 1 ja Joonis 7A). Võrdlesin Kompost 2 ja Konnatiigi lüüsimiseefektiivsust *P. putida* algse tüve ja erinevate profaag P1 deletanttüvede bakterimurudel, et näha millised P1 regioonid ja geenid kaitset mõjutavad. Jooniselt 7B on näha, et lüüsilaiigud  $\Delta P1_{\text{kesk4}}$  tüve murul on võrreldavad lüüsilaiikudega tüve  $\Delta P1$  tassidel, mis näitab  $\Delta P1_{\text{kesk4}}$  tüves deleteeritud geenide olulisust kaitseefektis. Teiste profaag P1 regioonide puudumine oluliselt kaitseefekti ei mõjutanud. Need tulemused viitavad, et profaag P1 kaitseefekti eest vastutab regioon, mis kodeerib gene PP\_3897-3898-5643-5644.

**A**



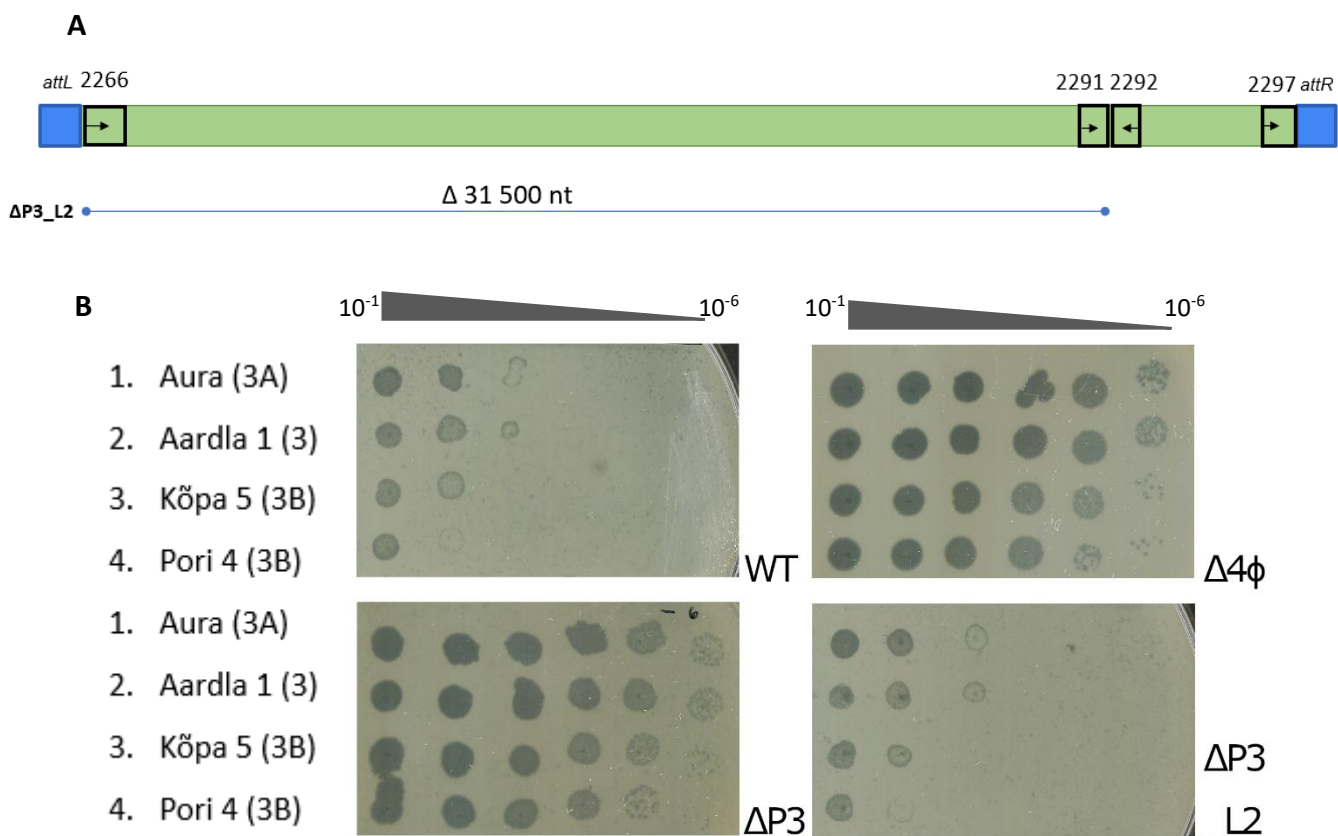
**B**



**Joonis 7. Faagide Kompost 2 ja Konnatiik vastu kaitseb profaag P1 regioon PP\_3897-3898-5643-5644.** A. Profaag P1 ja tema deletsioonmutantide skemaatiline kirjeldus. Roheline ala näitab profaagi regiooni ning sellel on osad P1 geenid märgistatud musta raamiga kastidega (suurused ei ole proportsioonis) ja näidatud nende suund noolega. Sinised alad on profaagi 67 aluspaari pikkused vasak- ja parempoolsed insertioonisaidid attL ja attR. Halliga on märgistatud *P. putida* genoomi ala, mis jääb profaagi insertioonisaidist vasakule. Kollaselt märgitud tsüsteiini tRNA (tRNA-Cys) geen kattub osaliselt P1 parema otsaga. Siniste joontega on kujutatud vastavatest deletsioontüvedest puuduvad regioonid. B. Faagide Kompost 2 ja Konnatiik lüüsilaiugud *P. putida* algse (WT),  $\Delta$ 4 $\phi$ ,  $\Delta$ P1 ja profaag P1 deletsioontüvede murudel. LB agarsöötmele on lisatud 0,03  $\mu$ g/ml tsiprofloksatiini ning 0,3% pehmeagarile on lisatud 10 mM CaCl<sub>2</sub>. Pildid on tehtud peale ~24h kasvatamist 20°C juures.

### 2.3.4 Profraag 3 regioon geenidega PP\_2292-2297 kaitseb 3. perekonna faagide vastu

Kuna paljude kolmanda perekonna faagide eest pakub tugevat kaitset profraag P3 (Joonis 4), siis soovisin leida ka selle profraagi kaitsemehhanismi eest vastutavad geenid. Profraag P3 deletsioontüve  $\Delta P3\_L2$  konstrueeris minu juhendaja Rita Hõrak ja mina analüüsisin selle tüve (Tabel 1 ja Joonis 8A) nakatumisefektiivsust 3. perekonna faagidega Aura, Aardla 1, Kõpa 5 ja Pori 4. Jooniselt 8B on näha, et lüüsilaiitud  $\Delta P3\_L2$  tüve bakterimurul on võrreldavad lüüsilaiudega algstel *P. putida* tüvel, mis tähendab et P3 vasak regiooni geenidega PP\_2266-2291 kaitseefekti ei mõjuta. Järelikult on profraag P3 kaitseefekti eest vastutavad geenid regioonis PP\_2292-2297.



**Joonis 8. Paljude kolmanda perekonna faagide eest annab *P. putida*'le kaitse profraag P3. A.** Profraag P3 ja tema skemaatiline kirjeldus. Roheline ala näitab profraagi regiooni ning sellel on osad P3 geenid märgistatud musta raamiga kastidega (suurused ei ole proportsioonis) ja näidatud nende suund noolega. Sinised alad on 79 aluspaari pikkused profraagi vasak- ja parempoolsed insertioonisaidid attL ja attR. Sinise joonega on kujutatud *P. putida*  $\Delta P3\_L2$  tüvest puuduv regioon. B. Faagilaigud *P. putida* algse (WT),  $\Delta 4\phi$ ,  $\Delta P3$  ja P3 deletsioontüve  $\Delta P3\_L2$  murudel. LB agarsöötmele on lisatud 0,03  $\mu\text{g/ml}$  tsiprofloksatsiini ning 0,3% pehmeagarile on lisatud 10 mM CaCl<sub>2</sub>. Pildid on tehtud peale ~24h kasvatamist 20°C juures.

## 2.4 Arutelu

### 2.4.1 Kromosomaalsete profaagide mõju *P. putida* faagiresistentsusele

*P. putida* on laialdaselt uuritud mudelorganism, kuid selle faagiresistentsuse kohta andmeid napib. Varasemad uuringud profaagide mõju kohta faagiresistentsusele on näidanud, et profaagid kodeerivad faagivastaseid mehhanisme, mis kaitsevad bakteriofaagide eest. Profaagide kodeeritud kaitsemehhanismid on näiteks Sie valgud ja Abi süsteemid (Patel & Maxwell, 2023).

*P. putida* profaagide puudumise mõju *P. putida* kohasusele on eelnevalt uurinud Martinez-Garcia ja kaasautorid artiklis aastal 2015 ning oma bakalaureusetöodes uurisid Liis Kärgerberg (2021) ja Kendra Piirmets (2022) ka profaagide mõju *P. putida* faagiresistentsusele. Eelnevad bakalaureusetööd viitavad, et profaagid võivad *P. putida* faagiresistentsust suurendada, sest Kendra Piirmetsa töös tuli välja, et viienda perekonna faagidega Vända F1, Vända F2, Erra M1 ja Erra M2 nakatamisel on faagide lüüsilaiugud *P. putida*  $\Delta 4\phi$  tüvega tassidel suuremad kui algse tüvega tassidel. Samas olenes efekt faagist ning neljanda perekonna Erra jõe ning Emajõe faagidega nakatamisel algse *P. putida* ja  $\Delta 4\phi$  tüve vahel erinevusi polnud. Nende kahe bakalaureusetöö kirjutamise ajal oli labori faagiraamatukogu väike. Nüüdseks on kollektsioon aga suurenenud, mis võimaldas analüüsida rohkem erinevaid faage ja profaagide mõju *P. putida* faagiresistentsusele laiemalt uurida.

Oma töös uurisin 13 faagi viiest erinevast perekonnast ja võrdlesin nende võimet nakatada erinevaid profaagdefektseid *P. putida* tüvesid. Tulemused näitasid, et suur enamus faagidest nakatab paremini *P. putida* deletsioontüve, millest on eemaldatud kõik profaagid (joonised 3 ja 4). Kuna on teada, et paljud profaagid kannavad enda genoomis faagiresistentsusgeene (Owen *et al.*, 2021; Patel & Maxwell, 2023), oli see tulemus tegelikult ootuspärane. Samas näitasid katsed ka seda, et profaagid ei kaitse bakterit kõikide faagide eest ning kaitseefekti intensiivsus oleneb faagi perekonnast. Näiteks kaitsevad profaagid *P. putida*'t hästi kolmanda perekonna faagide eest (Aura, Aardla 1 jt), kuid mitte kuigivõrd esimese perekonna faagide (Kassivere 2) eest (joonis 3). Profaagid suurendasid *P. putida* resistentsust ka osade viienda perekonna faagide suhtes (joonis 3, 5 ja 6).

Et kõigi nelja profaagi eemaldamine bakterigenoomist avaldas faagiresistentsusele suurt mõju, tekkis küsimus, kas kaitseefekti puudumise nägemiseks piisaks ka ainult mõne või ühe

profaagi eemaldamisest. Tulemused näitasid, et profaag P3 annab *P. putida*'le väga tugeva kaitse kolmanda perekonna faagide vastu (joonis 5). Eelnevalt on leitud, et profaagid pakuvad bakterile kaitset omasarnaste faagide eest (Bondy-Denomy *et al.*, 2016; Patel & Maxwell, 2023). Nende tulemuste põhjal võiks arvata, et laborikollektsioonis leiduvad kolmanda perekonna faagid sarnanevad *P. putida* P3 profaagile. Kolmanda perekonna faagid on aga nn jumbo faagid, mille genoomi suurus on >200 000 aluspaari, samas on profaag P3 suurus vaid 39,1 kb (joonis 2). Age Brauer võrdles kolmanda perekonna faagide genoomi profaag P3 järjestusega, kuid ei leidnud nende vahel mingeid sarnasusi. Järelikult pole siin tegu sellise immuunsusega, kus profaag kaitseb bakterit endasarnaste faagide eest.

#### **2.4.2 Faagiresistentsuse eest vastutavad profaagi geenid**

Profaagide P1 ja P3 täpsem uurimine näitas, et profaag P1 pakutava kaitse eest vastutavad geenid paiknevad regioonis PP\_3897-3898-5643-5644 ning P3 kaitse eest vastutavad geenid regioonis PP\_2292-2297. Leidmaks neile profaagi geenidele võimalikke funktsioone uuris Age Brauer neid gene põhjalikumalt bioinformaatiliste meetoditega.

Profaag P1 regioonis PP\_3897-3898-5643-5644 on neli geeni, millest kolm kodeerivad hüpoteetilisi valke (PP\_3897-3898-5634) ning üks membraanivalku (PP\_5644). PP\_3897 kodeerib HIRAN (*HIP1-related nuclease*) domääniga valku. HIRAN domääniga valkude funktsioone pole bakterites palju uuritud ning kirjandust selle teemal napib. Küll aga on teada, et HIRAN domään leidub paljudel pärmidest leitud helikaasidel, näiteks *Saccharomyces cerevisiae* helikaasil Rad5, mis aitab DNA kahjustuste korral peatunud replikatsioonikahvli ümber pöörata, vähendades seeläbi DNA stressist tingitud kahjustusi (Muellner & Schmidt, 2023). Võib spekuloida, et ka *P. putida* genoomis on PP\_3897 kodeeritud HIRAN domääniga valk seotud DNA replikatsiooniga ning võib kuidagi sekkuda faagi genoomi replikatsiooni. Et kontrollida, kas kaitsemehhanismi ees vastutab HIRAN domääni sisaldav valk tuleks konstrueerida tüvi, millest on eemaldatud PP\_3897. Edasi saab võrrelda, kas saadud deletsioontüvi oleks faagide Kompost 2 ja Konnatiik suhtes sama tundlikkusega nagu *P. putida*, millel on eemaldatud kogu profaag P1 genoom.

Profaag P3 regioonis PP\_2292-2297 on üheksa geeni, millest kuus kodeerivad hüpoteetilisi valke (PP\_2292, PP\_2294, PP\_5515, PP\_5516, PP\_5517, PP\_2296), üks faagi terminaasi suurt subühikut (PP\_2293), üks antirestriksioonivalku (PP\_2295) ja üks integraasi (PP\_2297).

Antirestriksioonivalgud inhibeerivad RM süsteemi võõr-DNA restriksiooni, interakteerudes otseselt endonukleasiga (Spoerel *et al.*, 1979) ja aitavad seega faagil RM süsteemi vahendatud kaitsest mööda hiilida. Need valgud on olulised profaagile endale ja arvatavasti kaitsemehhanismis ei osale. Ka integraas ja terminaas on eeldatavasti olulised profaag P3-le endale, sest aitavad vastavalt faagi genoomil bakteri kromosoomi integreeruda või faagi DNA-d kapsiidi pakkida (Passos *et al.*, 2021; Shen *et al.*, 2012). Seega vastutab ilmselt kaitse eest mõni selles regioonis olevatest hüpoteetilisi valke kodeerivatest geenidest. Tänapäevaks on laboris valminud veel deletsioontüvesid ja Rita Hõraku katsed nendega näitavad, et kaitsemehhanismi eest vastutavad geenid PP\_5515-5516-5517 ehk hüpoteetilisi valke kodeerivad geenid. Siiski pole veel teada, kas kaitseks on vajalikud kõik kolm geeni. Selle selgitamiseks tuleks konstrueerida deletsioontüved, millest on eemaldatud üksikud geenid regioonis PP\_5515-5516-5517 ning vaadata, kas kaitseefekt muutub olenevalt puuduolevast geenist.

## KOKKUVÖTE

Bakteritel on faagide vastu palju kaitsemehhanisme, näiteks restriksiooni-modifikatsiooni süsteemid, Sie valgud ja CRISPR-Cas immuunsus ning erinevaid mehhanisme leitakse pidevalt juurde (Patel & Maxwell, 2023). Neid kaitsemehhanisme kodeerivad ka faagid, et võidelda teiste faagidega, mis on eriti oluline, kui faag on integreerunud bakteri genoomi. Faage, mis on integreerunud bakteri genoomi, nimetatakse profaagideks. Kuna profaag sõltub täielikult oma peremehe ellujäämisest, on profaagidel arenenud mehhanismid, mis bakteri elukäiku parandavad. Profaagid kannavad enda genoomides „*moron*“ lookuseid, mis pole vajalikud profaagi enda elutegevuseks, kuid parandavad oma peremehe ellujäämisvõimalusi (Bondy-Denomy *et al.*, 2016).

*P. putida* genoomist on leitud neli profaagi, kuid nende mõju bakteri faagiresistentsusele on uuritud vaid kahes meie uurimisgrupis valminud bakalaureusetöös (Kärgerberg, 2021; Piirmets, 2022). Mõlema töö tulemused viitasid profaagide tähtsusele *P. putida* faagiresistentsuses. Kui nende tööde kirjutamise ajal oli meie labori faagiraamatukogu alles loomisel, siis nüüdseks on raamatukogu oluliselt täienenud ja mitmekesisem, sisaldades üle 80 *P. putida* faagi. Oma töös kasutasin viie erineva perekonna faage (tabel 2), mis käituvad *P. putida*'t nakatades erinevalt.

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja selgitada, milline on profaagide mõju *P. putida* faagiresistentsusele. Tehtud katsete tulemustest saab järeldada, et:

- 1) kromosomaalsed profaagid suurendavad *P. putida* faagiresistentsust osade faagide suhtes,
- 2) erinevate faagide eest kaitsevad bakterit erinevad profaagid,
- 3) profaag P1 kaitseb *P. putida*'t faagide Kompost 2 ja Konnatiik eest ja kaitstes osalev(ad) geen(id) paikneb(vad) regioonis PP\_3897-3898-5643-5644,
- 4) profaag P3 kaitseb *P. putida*'t faagide kolmanda perekonna eest ja kaitstes osalev(ad) geen(id) paikneb(vad) regioonis PP\_2292-2297.

Antud töö tulemused näitavad, et profaagidel on *P. putida* faagiresistentsuses väga tähtis roll.

## SUMMARY

Bacteria have many defense mechanisms against phages, such as restriction-modification systems, Sie proteins and CRISPR-Cas immunity, and different mechanisms are constantly being discovered (Patel & Maxwell, 2023). These defense mechanisms are also encoded by phages to compete with other phages, which is especially important when the phage has integrated into the bacterial genome. Phages that have integrated into the bacterial genome are called prophages. Since the prophage is completely dependent on the mechanisms of its host for survival, prophages have evolved mechanisms that improve the survival rate of the bacteria. Prophages carry “moron” loci in their genomes that are not necessary for the life of the prophage itself, but improve the survival chances of their host (Bondy-Denomy *et al.*, 2016).

Four prophages have been found in the genome of *P. putida*, but their effect on bacterial phage resistance has only been studied in two bachelor theses completed in our research group (Kärgerberg, 2021; Piirmets, 2022). Both these studies point to the importance of prophages for phage resistance in *P. putida*. However, at the time, the phage library of our laboratory was still small, as our group had just begun to study phage-prophage interactions. Today, there are more than 80 different *P. putida* phages in our collection. In my work, I used phages from five different families (table 2), which behave differently when infecting *P. putida*.

The aim of this work was to find out the effect of prophages on the phage resistance of *P. putida*. From the results of my conducted experiments, it can be concluded that:

- 1) chromosomal prophages increase the phage resistance of *P. putida* to some phages,
- 2) different prophages protect bacteria from different phages,
- 3) prophage P1 protects *P. putida* from Kompost 2 and Konnatiik phages, and the gene(s) participating in the protection is (are) located in the region PP\_3897-3898-5643-5644,
- 4) prophage P3 protects *P. putida* from the phages of third genus, and the gene(s) participating in the protection is (are) located in the region PP\_2292-2297.

The results of this work show that prophages play an important role in phage resistance of *P. putida*.

## **TÄNUSÕNAD**

Soovin tänada oma juhendajat Ritat tema lõpmatu kannatuse ja lahkuse eest. Hedvigit, kes oli alati jõu ja nõuga abiks ning kõiki teisi, kes TÜMRI ruumis 106 pesitsevad. Suur tänu ka Anule ja Annile, koos kellega me pikki õhtuid kirjutades veetsime.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Bondy-Denomy, J., & Davidson, A. R. (2014). When a virus is not a parasite: The beneficial effects of prophages on bacterial fitness. *Journal of Microbiology*, *52*(3), 235–242. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4083-3>
- Bondy-Denomy, J., Qian, J., Westra, E. R., Buckling, A., Guttman, D. S., Davidson, A. R., & Maxwell, K. L. (2016). Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms. *The ISME Journal*, *10*(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.79>
- Cury, J., & Bernheim, A. (2022). CRISPR-Cas and restriction–modification team up to achieve long-term immunity. *Trends in Microbiology*, *30*(6), 513–514. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.04.001>
- Depardieu, F., Didier, J.-P., Bernheim, A., Sherlock, A., Molina, H., Duclos, B., & Bikard, D. (2016). A Eukaryotic-like Serine/Threonine Kinase Protects Staphylococci against Phages. *Cell Host & Microbe*, *20*(4), 471–481. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.08.010>
- Feiner, R., Argov, T., Rabinovich, L., Sigal, N., Borovok, I., & Herskovits, A. A. (2015). A new perspective on lysogeny: Prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3527>
- Hampton, H. G., Watson, B. N. J., & Fineran, P. C. (2020). The arms race between bacteria and their phage foes. *Nature*, *577*(7790), Article 7790. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1894-8>
- Koga, M., Otsuka, Y., Lemire, S., & Yonesaki, T. (2011). Escherichia coli rnlA and rnlB Compose a Novel Toxin–Antitoxin System. *Genetics*, *187*(1), 123–130. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.121798>

- Kärgerberg, Liis. (2021). *Kromosoomsete profaagide ja toksiini-antitoksiini süsteemide roll Pseudomonas putida faagiresistentsuses* [Bakalaureusetöö].
- Labrie, S. J., Samson, J. E., & Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2315>
- Lau, R. K., Ye, Q., Birkholz, E. A., ... Corbett, K. D. (2020). Structure and Mechanism of a Cyclic Trinucleotide-Activated Bacterial Endonuclease Mediating Bacteriophage Immunity. *Molecular Cell*, 77(4), 723-733.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.12.010>
- Lopatina, A., Tal, N., & Sorek, R. (2020). Abortive Infection: Bacterial Suicide as an Antiviral Immune Strategy. *Annual Review of Virology*, 7(1), 371–384. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-011620-040628>
- Maguin, P., Varble, A., Modell, J. W., & Marraffini, L. A. (2022). Cleavage of viral DNA by restriction endonucleases stimulates the type II CRISPR-Cas immune response. *Molecular Cell*, 82(5), 907-919.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.01.012>
- 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. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12492>
- Mavrigh, T. N., & Hatfull, G. F. (2019). Evolution of Superinfection Immunity in Cluster A Mycobacteriophages. *mBio*, 10(3), e00971-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.00971-19>
- McGrath, S., Fitzgerald, G. F., & Sinderen, D. van. (2002). Identification and characterization of phage-resistance genes in temperate lactococcal bacteriophages. *Molecular Microbiology*, 43(2), 509–520. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02763.x>
- Millman, A., Melamed, S., Leavitt, A., Doron, S., Bernheim, A., Hör, J., Garb, J., Bechon, N., Brandis, A., Lopatina, A., Ofir, G., Hochhauser, D., Stokar-Avihail, A., Tal, N., Sharir, S., Voichek, M., Erez, Z., Ferrer, J. L. M., Dar, D., ... Sorek, R. (2022). An expanded arsenal

- of immune systems that protect bacteria from phages. *Cell Host & Microbe*, 30(11), 1556-1569.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.09.017>
- Muellner, J., & Schmidt, K. H. (2023). Helicase activities of Rad5 and Rrm3 genetically interact in the prevention of recombinogenic DNA lesions in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair*, 126, 103488. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2023.103488>
- Niewoehner, O., Garcia-Doval, C., Rostøl, J. T., Berk, C., Schwede, F., Bigler, L., Hall, J., Marraffini, L. A., & Jinek, M. (2017). Type III CRISPR–Cas systems produce cyclic oligoadenylate second messengers. *Nature*, 548(7669), Article 7669. <https://doi.org/10.1038/nature23467>
- Owen, S. V., Wenner, N., Dulberger, C. L., ... Hinton, J. C. D. (2021). Prophages encode phage-defense systems with cognate self-immunity. *Cell Host & Microbe*, 29(11), 1620-1633.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.09.002>
- Passos, D. O., Li, M., Craigie, R., & Lyumkis, D. (2021). Retroviral Integrase: Structure, Mechanism, and Inhibition. *The Enzymes*, 50, 249–300. <https://doi.org/10.1016/bs.enz.2021.06.007>
- Patel, P. H., & Maxwell, K. L. (2023). Prophages provide a rich source of antiphage defense systems. *Current Opinion in Microbiology*, 73, 102321. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102321>
- Piirmets, Kendra. (2022). *Kromosomaalsete toksiin-antitoksiin süsteemide ja profaagide mõju Pseudomonas putida faagiresistentsusele* [Bakalaureusetöö].
- Rath, D., Amlinger, L., Rath, A., & Lundgren, M. (2015). The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, 117, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.025>

- Rocha, E. P. C., & Bikard, D. (2022). Microbial defenses against mobile genetic elements and viruses: Who defends whom from what? *PLoS Biology*, *20*(1), e3001514. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001514>
- Rousset, F., Depardieu, F., Miele, S., Dowding, J., Laval, A.-L., Lieberman, E., Garry, D., Rocha, E. P. C., Bernheim, A., & Bikard, D. (2022). Phages and their satellites encode hotspots of antiviral systems. *Cell Host & Microbe*, *30*(5), 740-753.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.02.018>
- Schmitt, C. K., & Molineux, I. J. (1991). Expression of gene 1.2 and gene 10 of bacteriophage T7 is lethal to F plasmid-containing *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *173*(4), 1536–1543. <https://doi.org/10.1128/jb.173.4.1536-1543.1991>
- Shen, X., Li, M., Zeng, Y., ... Hu, F. (2012). Functional identification of the DNA packaging terminase from *Pseudomonas aeruginosa* phage PaP3. *Archives of Virology*, *157*(11), 2133–2141. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1409-5>
- Spoerel, N., Herrlich, P., & Bickle, T. A. (1979). A novel bacteriophage defence mechanism: The anti-restriction protein. *Nature*, *278*(5699), Article 5699. <https://doi.org/10.1038/278030a0>
- Yu, Y. T., & Snyder, L. (1994). Translation elongation factor Tu cleaved by a phage-exclusion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(2), 802–806. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.2.802>

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

Mina, Anita Lipu,

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

Profaagide mõju *Pseudomonas putida* faagiresistentsusele,

mille juhendaja on Rita Hõrak,

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

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons 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, alates 05.06.2025 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.

Anita Lipu

26.05.2023