

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOGIA INSTITUUT

GENEETIKA ÕPPETOOL

**Kromosomaalsed toksiini-antitoksiini süsteemid *Pseudomonas putida* faagitolerantsuses**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Sander Blei

Juhendajad MSc Sirli Rosendahl ja PhD Rita Hõrak

TARTU 2023

## INFOLEHT

### **Kromosomaalsed toksiini-antitoksiini süsteemid *Pseudomonas putida* faagitolerantsuses**

Kromosomaalsed toksiini-antitoksiini süsteemid arvatakse olevat tähtsad bakteri faagiresistentsuses, kuid *Pseudomonas putida* korral ei ole seda võimalikku funktsiooni veel palju uuritud. Sellest lähtuvalt oli käesoleva töö eesmärgiks selgitada välja *P. putida* kromosomaalsete toksiini-antitoksiini süsteemide mõju tema faagiresistentsusele ning uurida ka nende toksiini-antitoksiini süsteemide toksiinide mõju faagiresistentsusele. 23 faagi analüüs näitas, et *P. putida* kromosomaalsete toksiini-antitoksiini süsteemide olemasolu üldiselt ei mõjutanud tema faagiresistentsust. Leiti vaid üks faag (Kompost 1), kelle nakkus oli TA süsteemidest mõjutatud, aga vastu ootusi mõjus TA süsteemide olemasolu *P. putida* faagiresistentsusele negatiivselt. Antitoksiini defektsete tüvede analüüs näitas, et vaid kaks toksiini (Res ja RelE) suurendasid bakteri resistentsust üksikute faagide suhtes. Enamasti toksiinid kas ei mõjutanud või hoopis vähendasid *P. putida* faagiresistentsust.

Märksõnad: *Pseudomonas putida*, toksiini-antitoksiini süsteem, toksiin, faagiresistentsus  
CERCS kood: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

### **Chromosomal toxin-antitoxin systems in the phage resistance of *Pseudomonas putida***

One of the many proposed functions of chromosomal toxin-antitoxin systems is protection against phages. Although, in the case of *Pseudomonas putida*, it has not been widely studied. Thus, the aim of this study was to determine the effect of chromosomal toxin-antitoxin systems and to investigate the possible effect of the toxins themselves on *P. putida* phage resistance. The analysis of 24 phages showed that the presence of chromosomal toxin-antitoxin systems generally did not affect *P. putida* phage resistance, however, in the case of a single phage (Kompost 1), a decrease in phage resistance was observed. In addition, the analysis of the antitoxin deficient strains showed that only two toxins (Res and RelE) increased the phage resistance of *P. putida*, but only to some phages. Overall, the toxins were observed to either have no effect on or decrease the phage resistance of *P. putida*.

Keywords: *Pseudomonas putida*, toxin-antitoxin system, toxin, phage resistance  
CERCS code: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

## SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS .....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Bakteriofaagid.....	7
1.2. Faagide ja bakterite koevolutsoon .....	8
1.2.1. Bakteri kaitsemehhanismid faagide vastu .....	9
1.2.2. Faagide võimekusest kaitsesüsteemidest mööda hiilida .....	14
1.3. <i>Pseudomonas putida</i> toksiini-antitoksiini süsteemidest .....	14
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	19
2.1. Töö eesmärgid.....	19
2.2. Materjal ja meetodika .....	20
2.2.1. Kasutatud söötmed, faagid ja bakteritüved .....	20
2.2.2. Faagitaluvuse testimine agarsöötmel .....	22
2.3. Tulemused.....	23
2.3.1 TA süsteemide deleteerimine ei mõjuta oluliselt <i>P. putida</i> faagitaluvust.....	23
2.3.2. Antitoksiinide ja üksikute TA süsteemide puudumise efekt <i>P. putida</i> faagitaluvusele agarsöötmel .....	27
2.4 Arutelu .....	31
2.4.1. Kromosomaalsete TA süsteemide mõju <i>P. putida</i> faagiresistentsusele.....	31
2.4.2. Kromosomaalsete TA süsteemide toksiinide mõju <i>P. putida</i> faagiresistentsusele .	32
KOKKUVÕTE.....	34
SUMMARY .....	35
TÄNUSÕNAD .....	36
KIRJANDUSE LOETELU.....	37
LISAD .....	48
Lisa 1.....	48



## KASUTATUD LÜHENDID

Abi - abortiivne infektsioon (ingl. k. abortive infection)

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

CRISPR - klasterdatud, korrapäraste vahedega lühikesed palindroomsed kordusjärjestused (ingl. k. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

crRNA - CRISPR-RNA (ingl. k. CRISPR-RNA)

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

OD – optiline tihedus (ingl. k. optical density)

OMV - välimembraani vesiikulid (ingl. k. outer membrane vesicles)

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

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

wt – metsiktüüpi (ingl. k. wild-type)

## SISSEJUHATUS

Bakterid ja bakteriofaagid eksisteerivad konstantses evolutsioonilises sõjas, nõ „võidurelvastumises“ (Dy *et al.*, 2014; Hampton *et al.*, 2020; Koskella & Brockhurst, 2014). Faagide pidev surve sunnib baktereid evolveeruma, et end faagide vastu paremini kaitsta ning faagid omakorda peavad suutma neid kaitsemehhanisme ületada (Dy *et al.*, 2014; Hampton *et al.*, 2020; Koskella & Brockhurst, 2014). Bakteri kaitsemehhanisme on mitmeid: faagide pinnaretseptorite varjestamine ja muutmine, pinnaretseptorite geenide ekspressiooni faasivariatsioon, restriksiooni-modifikatsiooni tüüpi süsteemid, CRISPR-Cas süsteemid, profaagide kodeeritud kaitse ja ka abortiivse infektsiooni süsteemid (Dy *et al.*, 2014; Hampton *et al.*, 2020). Üks vahenditest, mida bakter selles sõjas enda kaitsmiseks kasutab ja mis oma mehhanismilt sarnaneb abortiivse infektsiooni süsteemide toimega, on toksiini-antitoksiini süsteemid (LeRoux & Laub, 2022).

Plasmiidsete TA süsteemide tähtsus plasmiidide stabiliseerijatena on hästi tõestatud (Gerdes *et al.*, 1986; Ogura & Hiraga, 1983), kuid kromosomaalsete TA süsteemide funktsioonid on vaatamata paljudele uuringutele ebaselged (Jurėnas *et al.*, 2022). Samas on üha rohkem kogunemas andmeid, et kromosomaalsed TA süsteemid võivad suurendada bakteri faagiresistentsust (Fraikin *et al.*, 2020; LeRoux & Laub, 2022; Zhang *et al.*, 2022). TA süsteemid võivad toimida kui Abi süsteemid, surmates nakatunud bakteri enne faagipartiklite valmimist ja seega peatades nakkuse leviku populatsioonis (Duckworth *et al.*, 1981; Hampton *et al.*, 2020). Samas on ka sellised TA süsteeme, mis kaitsevad bakterit ilma teda surmamata (LeRoux *et al.*, 2022).

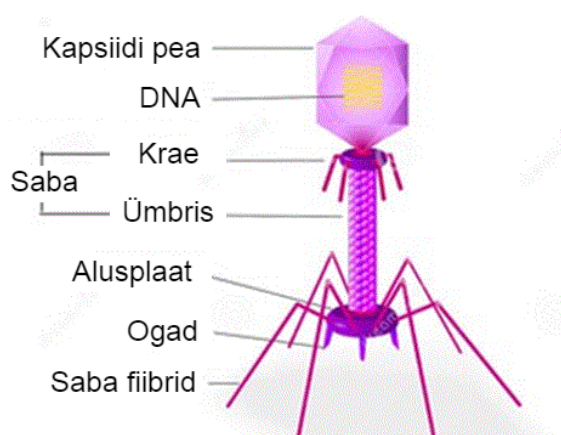
*Pseudomonas putida* kromosomaalsete TA süsteemide uurimisel leiti, et need süsteemid ei mõjuta *P. putida* kohasust stressitingimustel ning optimaalsetel kasvutingimustel tuvastati hoopis nende kahjulik mõju bakteri konkurentsivõimele (Rosendahl *et al.*, 2020). Varasemalt on *P. putida* kromosomaalsete TA süsteemide efekti bakteri faagiresistentsusele uuritud piiratud arvu faagidega vaid kahes meie laboris tehtud bakalaureusetöös (Kärgerberg, 2021; Piirmets, 2022).

Käesoleva töö eesmärk oli selgitada, kas *P. putida* kromosomaalsed TA süsteemid võiksid mõjutada bakteri faagiresistentsust ja mis on nende TA süsteemide toksiinide efekt *P. putida* faagiresistentsusele.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Bakteriofaagid

Bakteriofaagid ehk faagid on bakterite obligatoorsed parasiidid, kes sõltuvad peremehe poolt pakutud „teenusest“. Nad on ühed lihtsaima ehitusega elusorganismid (Joonis 1). Faagid on maal kõige arvukamad bioloogilised olendid ( $\sim 10^{31}$  partiklit) (Comeau *et al.*, 2008) ja bakterite lüüsijatena moodustavad nad olulise osa ookeanide aineringlusest, tappes igapäevaselt 15% kuni 40% seal elavatest bakteritest (Danovaro *et al.*, 2011).



**Joonis 1. Tüüpilise bakteriofaagi T4 struktuur** (Mansour, 2017, kohandatud).

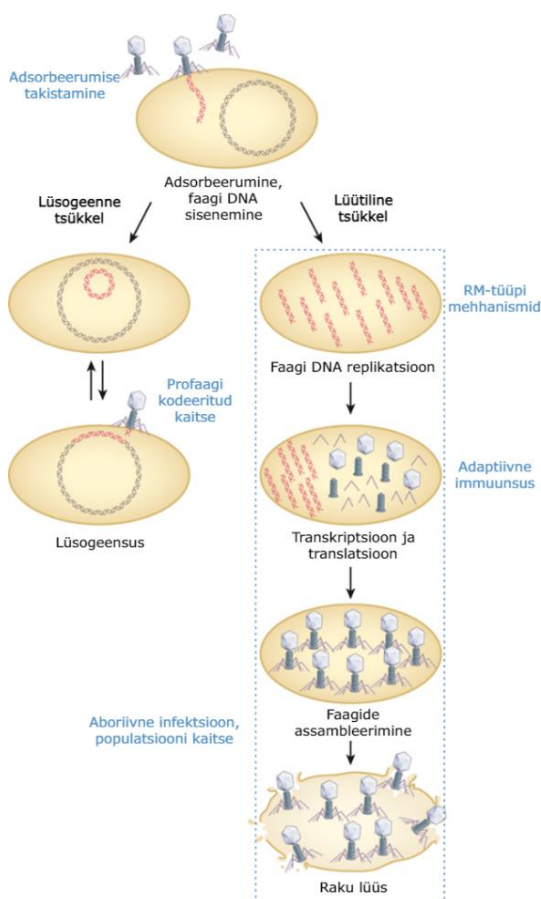
Paljusid faagide kodeeritud valke, näiteks DNA ja RNA polümeraase, ligaase ja restriktase kasutatakse laialdaselt molekulaarbioloogilistes uuringutes tavaliste töövahenditena (Sun *et al.*, 2023). Seoses antibiootikumiresistentsete bakterite esilekerkimisega loodetakse faage aina enam kasutada ka meditsiinis (Gibb *et al.*, 2021). Faagiteraapia korral kasutatakse antibiootikumiresistentsete bakterite lüüsimiseks haigustekitajale spetsiifilisi faage või mitme faagi kokteile (Moelling *et al.*, 2018). Selline meetod oli populaarne enne antibiootikumide avastamist (Moelling *et al.*, 2018), peale mida vähenes huvi faagide antimikroobsete omaduste vastu oluliselt (Summers, 2012). Lisaks faagiteraapiale saab faage rakendada ka näiteks biofilmide moodustumise takistamiseks meditsiinilistel aparaatidel (Tian *et al.*, 2021). Biotehnoloogia ja molekulaarbioloogia arengus on faagid olnud üliolulisel kohal, kuna nende uurimisel saadud teadmised olid molekulaarse bioloogia tsentraalsest dogmast (DNA $\Rightarrow$ RNA $\Rightarrow$ valk) arusaamiseks asendamatud (Keen, 2015). Näiteks avastati just faagide abiga, et informatsiooni ülekandmist DNA'lt valkudele vahendab selline molekul nagu mRNA (Brenner *et al.*, 1961). Tänapäeval kasutatakse faage biotehnoloogias näiteks kloonimise teostamisel vektoritena (Harada *et al.*, 2018) ja antikehade sarnaste peptiidide tootmisel (Jaroszewicz *et al.*, 2022).

## 1.2. Faagide ja bakterite koevolutsioon

Faagid ja bakterid eksisteerivad konstantses „võidurelvastumises“ (Dy *et al.*, 2014; Hampton *et al.*, 2020; Koskella & Brockhurst, 2014). Faagid, olles bakterite parasiidid, survestavad baktereid adapteeruma faaginakkuse üleelamiseks, kujundades välja faagivastaseid mehhanisme. Kuna tegemist on mikroorganismidega, kelle generatsiooniajad on võrreldes imetajatega väga väikesed, siis toimub bakterite ja faagide evolutsioon palju kiiremini, kui suurematel organismidel. Kui faagil tekib uus mehhanism bakterite kaitses möödahiilimiseks (Samson *et al.*, 2013), siis avaldab see bakterile evolutsioonilist survet, mille kaudu tekib bakteril omakorda uus kaitsemehhanism. Sellist üksteisele pideva selektiivse surve avaldamist ning selle mõjul adapteerumist nimetataksegi faagide ja bakterite koevolutsiooniks (Dy *et al.*, 2014; Hampton *et al.*, 2020; Koskella & Brockhurst, 2014).

## 1.2.1. Bakteri kaitsemehhanismid faagide vastu

Bakteritel on mitmeid mehhanisme faaginakkuse üleelamiseks (Dy *et al.*, 2014) ja faagivastases võitluses kasutatakse ära faagi infektsioonitsükli erinevates etappides tekkivaid võimalusi (Hampton *et al.*, 2020) (Joonis 2). Võimalikud kaitsemehhanismid, mis toimivad infektsioonitsükli erinevates etappides on näiteks faagi adsorbeerumise takistamine; faagi geneetilise materjali lagundamine restriktiooni-modifikatsiooni (RM) süsteemidega; CRISPR-Cas süsteemide vahendatud kaitse, mis peale esmast nakkust tekitab järgnevate sama faagi nakkuste vastu immuunsuse; abortiivne infektsioon, mis surmab raku enne faagipartiklite valmimist. Lüsogeenses tsükli raku genoomi integreerunud ehk profaagiks muutunud faag võib kodeerida rakule teisi kaitsemehhanisme järgnevate infektsioonide ärahoidmiseks (Hampton *et al.*, 2020).



### Joonis 2. Bakteri faagivastased kaitsemehhanismid võivad toimida faagi

**infektsioonitsükli erinevates faasides.** Faagi infektsioonitsükli etapid on toodud mustas kirjas ja võimalikud kaitsemehhanismid sinises kirjas. Lüütilises tsükli toimub esimesena faagi adsorbeerumine peremeesraku pinnale ja faagi geneetilise materjali rakku sisestamine. Siis toimub faagi geneetilise materjali replikatsioon, faagivalkude süntees ja faagipartiklite kokkupanemine. Lõpuks toimub raku lüüsimine ja faagipartiklite vabanemine keskkonda. Lüsogeenses tsükli toimub faagi geneetilise materjali sisenemine samamoodi, kuid faagi DNA integreerub raku genoomi, muutudes nõ profaagiks. Profaag jaguneb peremeesrakuga koos, kuni indutseeritakse lüütiline tsükkel (Hampton *et al.*, 2020, kohandatud).

### 1.2.1.1. Adsorbeerumise inhibitsioon

Üks viis faaginakkuse kaitseks on hoida ära faagi adsorbeerumine bakterirakule, kuna ilma selleta ei saa faag oma geneetilist materjali bakterirakku sisestada. Adsorbeerumine toimub bakteriraku pinnal olevate retseptorite kaudu ning nende retseptorite varjestamisel või muutmisel saab bakter faagi seondumist ära hoida või vähendada (Hampton *et al.*, 2020). Näiteks on tõestatud, et faagi K3 retseptori, *Escherichia coli* membraanivalgu OmpA, muteerimisel vähenes raku tundlikkus faaginakkuse vastu (Koebnik, 1999). Lisaks kasutavad osad bakterid nõ peturetseptoreid, millega seondumisel ei toimu faagi rakku sisenemist, mis vähendab produktiivsete nakkuste arvu (Hampton *et al.*, 2020). Sellise funktsiooniga on näiteks sekreteeritavad välismembraani vesiikulid (OMV-d). Nimelt on *Vibrio cholerae* puhul näidatud, et OMV-d seovad faage ja kaitsevad sellega bakteripopulatsiooni nakkuse eest (Reyes-Robles *et al.*, 2018).

### 1.2.1.2. Faasivariatsioon

Pinnaretseptorite muutmine ja varjestamine on aga bakterile kulukas, sest paljud pinnaretseptorid, millega faagid seonduvad, on eluliselt oluliste funktsioonidega (Dy *et al.*, 2014). Näiteks on faagi T4 retseptoriks olev *E. coli* välismembraani poriin OmpC (Yu & Mizushima, 1982) väga oluline selle bakteri antibiootikumide resistentsuse ja kasvukiiruse regulatsioonis (Liu *et al.*, 2012). Sellise lõivsuhte vähendamisel tuleb bakterile appi faasivariatsioon, mis võimaldab klonaalse rakupopulatsiooni individuaalsetes rakkudes mingi geeni erinevat ekspressiooni (van der Woude & Bäumler, 2004). Oluline on faasivariatsioonil ka see, et individuaalsete rakkude geeniekspressiooni tase on pärandatav ja pöörduvalt reguleeritav (van der Woude & Bäumler, 2004). Tänu pärandatavale retseptorite pöörduvale ekspressiooni sisse- ja väljalülitamisele saab tekitada heterogeense bakteripopulatsiooni, kus osa bakteripopulatsioonist ekspresseerib retseptorit kuid teised mitte (van der Woude, 2011). Nii suureneb bakteripopulatsiooni faagiresistentsus, kuid väheneb retseptorite puudumisest tingitud kahju bakteri kohasusele. Sellist kaitsemeetodit on kirjeldatud näiteks *Haemophilus influenzae* puhul, kus leiti, et kui üle 34% bakteripopulatsioonist moodustasid faagiresistentsed bakterid, suri faagipopulatsioon tihti välja (Turkington *et al.*, 2019)

### 1.2.1.3. Restriktsiooni-modifikatsiooni tüüpi süsteemid

RM-süsteemid on üks paremini uuritud osa bakteri immuunsüsteemist ning töötavad põhimõttel, et bakteri enda DNA märgistatakse spetsiifiliste järjestuste metüleerimisega ja mittemetüleeritud võõr-DNA degradeeritakse (Bertani & Weigle, 1953). Kui rakku sisenenud faagi DNA juhuslikult siiski metüleeritakse peatab see faagi DNA degradeerimise. RM süsteemid koosnevad tüüpiliselt kahest ensüümist: metüleerimist läbi viivast metüültransferaasist ja DNA'd lõikavast restriктаasist (Tock & Dryden, 2005). Restriктаase on neli põhi tüüpi: tüüp I, II, III ja IV ja pea kõik vajavad bivalentset metalliooni kofaktorina (Loenen *et al.*, 2014).

Näiteks üks RM-laadne süsteem on *Streptomyces coelicolor*'i Pgl süsteem, mille populatsiooni kaitsvat efekti faagi  $\phi$ C31 eest on uuritud ja mille omadused sarnanevad ka allpool kirjeldatavate toksiini-antitoksiini süsteemidega (Hoskisson *et al.*, 2015). Antud süsteem töötab põhimõttel, et peale infektsiooni PglX+ rakus, kus ekspresseerub PglX metüültransferaas, ei suuda sealt vabanenud virionid uuesti PglX+ rakku nakatada, sest metüleeritud faagi DNA lagundatakse. Samas on PglX-vahendatud metüleerimist läbinud faagid võimelised siiski nakatama PglX- rakke, kus Pgl süsteemi ei ekspresseerita. PglX-rakust vabanenud virionid on võimelised mõlemat tüüpi rakke nakatama. Pgl süsteem sarnaneb toksiini-antitoksiini süsteemidega, sest PglX on rakule toksiline ja tema antitoksiiniks on selle süsteemi restriктаas PglZ (Hoskisson *et al.*, 2015).

### 1.2.1.4. CRISPR-Cas süsteemid ja adaptiivne immuunsus

Sarnaselt RM süsteemidega degradeerivad CRISPR-Cas (klasterdatud, korrapäraste vahedega lühikesed palindroomsed kordusjärjestused ja nendega seotud *cas* geenid) süsteemid võõr-DNA-d järjestusspetsiifiliselt (Marraffini & Sontheimer, 2008). RM süsteemide ja CRISPR-Cas süsteemide vahe seisneb selles, et kui RM funktsioneerib justkui kaasasündinud immuunsus, siis CRISPR-Cas vastutab adaptiivse immuunsuse eest. Nimelt integreerivad CRISPR-Cas süsteemid faaginakkuse korral väikse osa faagi DNA-st oma genoomi (CRISPR aladesse) (Barrangou *et al.*, 2007) ja seda faagi DNA järjestust kasutades toodab süsteem faagi DNA-le komplementaarseid crRNA-sid (Brouns *et al.*, 2008). Need crRNA-d seonduvad spetsiifiliste Cas valkudega ja tekivad kompleksid, mis tuvastavad eelnevalt nakkust põhjustanud faagi DNA järjestuse ja lagundavad selle faagi DNA (Sorek *et al.*, 2013).

Kõikidel süsteemi toimimise etappidel on vajalikud *cas* geenide poolt kodeeritud Cas valgud (Sorek *et al.*, 2013).

#### **1.2.1.5. Profaagide kodeeritud kaitsesüsteemid**

Kui tegemist on mõõduka faagiga, mis on bakteri lüsogeniseerinud, siis on raku genoomi integreerunud profaagi huvides, et rakk ei kannataks järjestikuste faaginakkuste pärast. Sekundaarse nakatumise takistamiseks kodeerivad osad profaagid lisaks faagi enda eluolulistele valkudele ka kaitsesüsteeme superinfektsiooni vastu (Owen *et al.*, 2021). Selliseid profaagi geene leidub genoomi alades, mida nimetatakse „moroniteks“ (Cumby *et al.*, 2012). Profaagi kodeeritud kaitsesüsteemid varieeruvad laialt oma toimemehhanismilt (Bondy-Denomy *et al.*, 2016), need võivad olla näiteks RM süsteemid, toksiini-antitoksiini süsteemid või muud (Dedrick *et al.*, 2017).

#### **1.2.1.6. Abortiivne infektsioon ja populatsioonikaitse**

Kui eelpoolkirjeldatud süsteemid ei suuda bakterit faaginakkuse eest kaitsta, tulevad kasuks abortiivse infektsiooni süsteemid ehk Abi-d, mis bakteri enda arvelt tagavad altruistlikult bakteripopulatsiooni kaitse (Hampton *et al.*, 2020). Üldiselt töötavad Abi süsteemid põhimõttel, et nakatunud raku elutegevus inhibeeritakse (Dy *et al.*, 2014) ja rakk viiakse lüüsumiseni, enne kui faagipartiklid jõuavad küpseda (Hampton *et al.*, 2020). Abi süsteemid on tavaliselt inaktiivsed, kuid aktiveeritakse või ekspresseeritakse faaginakkuse korral (Dy *et al.*, 2014).

Näiteks esimene avastatud Abi süsteem RexAB, mis leiti  $\lambda$  faagist (Landsmann *et al.*, 1982), kujutab endast  $\lambda$  profaagi kodeeritud kaitsesüsteemi (Parma *et al.*, 1992). See koosneb kahest osast: RexA, mis on rakusisene sensormolekul ja RexB, mis on transmembraanne valk (Parma *et al.*, 1992). Kui  $\lambda$  faagi poolt lüsogeniseeritud bakterit nakatab faag T4, aktiveerub RexA, mis omakorda aktiveerib RexB, peale mida moodustab RexB rakumembraanis ioonkanalid, mille tagajärjel rakumembraan depolariseerub ja rakk hukkub (Parma *et al.*, 1992). Osad Abi süsteemid kujutavad endast ka toksiini-antitoksiini süsteeme (Hampton *et al.*, 2020) nagu näiteks *E. coli* CapRel<sup>SI46</sup> süsteem (Zhang *et al.*, 2022) ja *Erwinia carotovora sp. atroseptica* ToxIN süsteem (Fineran *et al.*, 2009).

### 1.2.1.7. Toksiini-antitoksiini süsteemid

Toksiini-antitoksiini süsteemid ehk TA süsteemid koosnevad toksiinist ja antitoksiinist, mis on tüüpiliselt kotranskribeeritud (Fraikin *et al.*, 2020). Toksiinid ja antitoksiinid võivad olla kas valgud või RNAd (toksiin on valdavalt valk) ning antitoksiin peab neutraliseerima toksiini (Jurėnas *et al.*, 2022). Selle põhjal, mida kujutavad endast toksiin ja antitoksiin ning kuidas nad omavahel interakteeruvad on TA süsteemid jagatud 8 gruppi (Jurėnas *et al.*, 2022). Kõige levinumad TA süsteemid on tüüp II TA süsteemid, kus antitoksiin on valk, mis neutraliseerib toksiini otsese seondumise kaudu (Fraikin *et al.*, 2020). TA süsteemid töötavad peamiselt põhimõttel, et toksiin on suurema stabiilsusega kui antitoksiin, mis viib TA operoni mittetranskribeerimisel olukorrani, kus rakus suureneb toksiini osakaal ja ei ole piisavalt antitoksiini, et kõik toksiini molekulid neutraliseerida (Gerdes *et al.*, 1988). Sellises olukorras hakkab toksiin takistama bakteri eluolulisi protsesse, milleks enamasti on valgusünteesi inhibeerimine, sest paljud toksiinid on mRNAasid (Yang & Walsh, 2017). TA süsteeme jagatakse oma asukoha järgi plasmiidseteks ja kromosomaalseteks (Jurėnas *et al.*, 2022).

Plasmiidsete TA süsteemide peamiseks ja hästi kirjeldatud funktsiooniks on plasmiidide stabiliseerimine (Gerdes *et al.*, 1986; Ogura & Hiraga, 1983). Näiteks kui TA süsteemi kodeeriv plasmiid satub pooldumisel vaid ühte tütarrakku, siis plasmiidita rakus vabaneb toksiin antitoksiini kontrolli alt ja see viib plasmiidita bakterite väljakonkureerimiseni populatsioonist (Ogura & Hiraga, 1983). Kromosomaalsetele TA süsteemidele ei ole leitud ühtset funktsiooni ja paljuski on nende tähtsus bakterile ebaselge (Jurėnas *et al.*, 2022). On viiteid, et kromosomaalsed TA süsteemid võivad mõjutada persistorite moodustumist (Dörr *et al.*, 2009; Edelmann & Berghoff, 2022), biofilmi moodustumist (Barrios *et al.*, 2006; Kasari *et al.*, 2010), stabiliseerida mobiilseid genoomielemente (Szekeres *et al.*, 2007) ja osaleda faagivastases kaitstes (Fraikin *et al.*, 2020; Kelly *et al.*, 2023; LeRoux & Laub, 2022).

Kromosomaalsed TA süsteemid võivad avaldada faagivastast kaitset mitmel moel (Kelly *et al.*, 2023). Kõige enam uuritud ja levinud kaitse mehhanism TA süsteemidel on Abi mehhanism (Hampton *et al.*, 2020; Kelly *et al.*, 2023) ehk toksiini mõjul nakatunud bakteri surmamisel kлонаalse populatsiooni kaitsmine (Duckworth *et al.*, 1981). Viimasel ajal on aina rohkem andmeid kogunenud TA süsteemide osalusest faagivastases kaitstes ja osadel juhtudel on detailselt kirjeldatud ka molekulaarseid mehhanisme (Kelly *et al.*, 2023). Näiteks leiti *E. coli* CapRel<sup>SJ46</sup> süsteemi uurimisel, et nakatava faagi kapsiidivalgu seondumine CapRel<sup>SJ46</sup>-ga vabastab valgu toksilise domääni antitoksiini kontrolli alt, mistõttu toksiin saab

pürofosforüleerida tRNA-sid, takistades nii valgusünteesi (Zhang *et al.*, 2022). Tüüpilisest Abi süsteemist erineva mehhanismiga töötab näiteks *E. coli* DarTG süsteem, mille toksiin DarT (DNA ADP-ribosüültransferaas) takistab faagi DNA replikatsiooni viraalse DNA modifitseerimisega (LeRoux *et al.*, 2022).

### **1.2.2. Faagide võimekusest kaitsesüsteemidest mööda hiilida**

Evolutsiooni käigus on faagid võidurelvastumise tõttu saanud varustatud mitmete võimalustega bakterite kaitsemehhanismidest mööda hiilimiseks (Dy *et al.*, 2014; Hampton *et al.*, 2020; Kelly *et al.*, 2023). Kuna mutatsioonid toimuvad nii bakteritel kui ka faagidel, siis adsorbeerumise inhibitsioonist saavad faagid jagu oma antiretseptorite muteerumisega, mis võimaldavad faagil muteerunud bakteriretseptorile seonduda (Hampton *et al.*, 2020). RM-laadsetest süsteemidest saavad faagid mööda mitmel viisil. Esiteks, spetsiifilise RM süsteemi poolt ära tuntavas faagi DNA järjestuses punktmutatsioonide tekkimisel ei tunne bakteri restriктаas faagi DNAd ära ja seega ei lagunda seda vaatamata sellele, et see on bakteri metüültransferaasi poolt metüleerimata (Tock & Dryden, 2005). Lisaks võib faag kodeerida ka ise metüültransferaasi (McGrath *et al.*, 1999) või kasutada ära modifitseeritud lämmastikaluseid, et peita ennast restriктаaside lagundamise eest (Kulikov *et al.*, 2014). CRISPR-Cas süsteemide vältimiseks on näiteks *Pseudomonas aeruginosa*'t nakatavatel faagidel mitu CRISPR'i vastast geeni, mis tagavad faagi nakkusvõimelisuse (Bondy-Denomy *et al.*, 2013).

*E. coli* TA süsteemide RnlAB ja LsoAB kaitsesest möödahiilimiseks kodeerib faag T4 valku Dmd, mis funktsioneerib nende süsteemide toksiinide RnlA ja LsoA antitoksiinina, inhibeerides nende toksilisuse ja võimaldades faagil bakterit edukalt nakatada (Otsuka & Yonesaki, 2012). Kuna osad TA süsteemid aktiveeruvad vastusena spetsiifilistele faagi valkudele, siis mutatsioonid neid valke kodeerivates faagi geenides takistavad samuti bakteri TA süsteemide aktiveerumist (Kelly *et al.*, 2023).

### **1.3. *Pseudomonas putida* toksiini-antitoksiini süsteemidest**

*Pseudomonas putida* on gramnegatiivne pulkbakter, kes elab peamiselt vees ja mullas. Teda kasutatakse laialdaselt biotehnoloogilise mudelorganismina, eelkõige tema kõrge stressitaluvuse ja mitmekülgse metaboolse võimekuse tõttu (Weimer *et al.*, 2020). *P. putida* genoomis on bioinformaatilise ennustuse kohaselt 15 kromosomaalset TA operoni (Xie *et al.*,

2018). Neist on uuritud 13 (Rosendahl *et al.*, 2020), kuid individuaalselt on funktsiooni põhjalikumalt uuritud neljal: *graTA* (Ainelo *et al.*, 2016, 2019; Talavera *et al.*, 2019; Tamman *et al.*, 2014, 2016), *res-xre* (Skjerning *et al.*, 2019), *mqsRA* (Sun *et al.*, 2017) ja *mazEF* (Miyamoto *et al.*, 2016).

Neljast eelnevalt mainitud süsteemist on kõige põhjalikumalt uuritud GraTA, mis on tüüp II TA süsteem ehk koosneb GraT toksiinist ja GraA antitoksiinist ning toksiooni inhibeerimine toimub nende kahe valgu omavahelise seondumise kaudu (Tamman *et al.*, 2014). Siiski on mitu omadust, mille poolest GraTA erineb tüüpilisest tüüp II TA süsteemist. Süsteemi antitoksiin GraA on ebatavaliselt stabiilne (Tamman *et al.*, 2016) ja toksiooni GraT toksilisus on optimaalsel kasvutemperatuuril 30°C ebatavaliselt nõrk (Tamman *et al.*, 2014). See tähendab, et oli võimalik antitoksiini geen *P. putida* genoomist deleteerida ja see põhjustas optimaalsel temperatuuril (30°C) vaid mõõduka kasvukiiruse defekti (Tamman *et al.*, 2014). Samas ei olnud *graA* deletant võimeline kolooniaid moodustama 20°C juures, mis viitab GraT toksilisuse temperatuurisõltuvusele (Tamman *et al.*, 2014). GraT kuulub HigB perekonna toksiinide hulka ja seepärast on ootuspärane, et GraT toimib kui ribosoom-sõltuv mRNAas (Talavera *et al.*, 2019). Samas on ebatavaline, et GraT inhibeerib ribosoomide biogeneesi (Ainelo *et al.*, 2016) ja selle fenotüübi põhjus pole seni selgunud.

Lisaks GraTA süsteemile on ühes teises artiklis uuritud ka *P. putida* MqsRA süsteemi (Sun *et al.*, 2017). Sarnaselt GraTA süsteemile said autorid antitoksiini geeni *mqsA* deleteerida ilma, et see oleks olnud *P. putida*'le toksiline, mis viitab, et sarnaselt GraT'ga on ka MqsR'i puhul tegu mõõdukalt toksilise valguga. Samas oli MqsR üleekspressioon toksiline, mis ei võimaldanud MqsR biokeemilist aktiivsust uurida (Sun *et al.*, 2017), aga sarnasuse alusel teiste selle perekonna toksiinidega võib arvata, et tegu on ribosoom-sõltumatu mRNAasiga (Merfa *et al.*, 2016; Yamaguchi *et al.*, 2009). Autorid näitasid, et MqsR mängib olulist rolli persistorrakkude moodustumisel (Sun *et al.*, 2017), sest *mqsA* deleteerimine suurendas tsiprofloksatsiinitolerantsete persistorite hulka 50 korda. Samas kogu MqsRA süsteemi deleteerimisel efekti persistorite moodustumisele ei nähtud (Sun *et al.*, 2017) ning sama tulemus saadi ka meie laboris (Rosendahl *et al.*, 2020). Samuti näidati, et MqsRA süsteem on oluline biofilmi moodustumise reguleerimisel (Sun *et al.*, 2017), kuid uuemad uuringud TA-süsteemide suhtes defektse *P. putida* tüvega seda tulemust ei toeta (Rosendahl *et al.*, 2020).

*In vivo* üleekspressiooni katsetega näidati, et *P. putida* Res-Xre süsteem kodeerib toksilist Res toksiini (Skjerning *et al.*, 2019), aga samas on genomist võimalik deleteerida antitoksiini geen *xre* ilma, et see väga oluliselt bakter kasvukiirust mõjutaks (Rosendahl *et al.*, 2020). Valkude struktuuri analüüs näitas, et Res-Xre kompleksis on valgud unikaalse stöhhiomeetriaga. Kui tavaliselt seonduvad tüüp II TA süsteemide toksiin ja antitoksiin 1:1 stöhhiomeetriaga, siis Res-Xre kompleksis leiab aset 2:4 seandumine, kus Res toksiini dimeer seob endaga kaks antitoksiini Xre dimeeri (Skjerning *et al.*, 2019). Leiti, et Res võiks funktsioneerida kui NADaas, kuna Res valgu ekspresseerimine *E. coli*'s vähendas rakkudes NAD<sup>+</sup> taset, viies bakteri kasvu pidurdumiseni (Skjerning *et al.*, 2019).

Uuritud on ka *P. putida* MazEF süsteemi, kuid ainult puhastatud MazF toksiini aktiivsust *in vitro* katsetes (Miyamoto *et al.*, 2016). MazEF on tüüp II TA süsteem ja selle toksiin MazF funktsioneerib kui ribosoom-sõltumatu RNA interferaas ehk lõikab RNA-d järjestusspetsiifiliselt, surudes alla translatsiooni (Miyamoto *et al.*, 2016). Meie laboris on näidatud, et *mazEF* operoni deleteerimine ei mõjutanud bakteri kohasust (Rosendahl *et al.*, 2020) ning ainult antitoksiini geeni *mazE* deleteerimine näitas, et toksiin MazF ei ole *P. putida*'le toksiline (Rosendahl *et al.*, 2020).

Lisaks eelpool kirjeldatud neljale *P. putida* TA süsteemile on uuritud ka teiste TA süsteemide kombineeritud efekte *P. putida* kohasusele. Selleks konstrueeriti 13 kromosomaalse TA süsteemi suhtes defektne *P. putida* tüvi  $\Delta 13TA$ , milles puudusid *graTA*, *res-xre*, *higBA*, *hicAB-1*, *relE2-higA2*, *mqsRA*, *mazEF*, *PP\_1716-1717*, *brnTA*, *PP\_4151-4152*, *relBE*, *yefM-yoeB*, *relB2-parE* operonid (Rosendahl *et al.*, 2020). Võrreldi metsiktüve ja  $\Delta 13TA$  tüve proteoome, kasvukiirusi, antibiootikumitolerantsete persistorite hulka, biofilmi moodustumist ja stressitaluvust erinevate kemikaalide ja antibiootikumide suhtes. Nähti, et kahe tüve proteoomid olid väga sarnased, ainult kahe valgu ekspressioon oli  $\Delta 13TA$  tüves suurenenud (Rosendahl *et al.*, 2020). Veel leiti, et ei kasvukiiruses, biofilmi moodustumisel, persistorite hulgas ega ka stressitaluvuses ei olnud vahet metsiktüve ja  $\Delta 13TA$  tüve vahel (Rosendahl *et al.*, 2020). Tulemustest järeldati, et TA süsteemid ei mõjuta *P. putida* stressitaluvust (Rosendahl *et al.*, 2020).

Sama töö raames uuriti ka *P. putida* TA süsteemide toksiinide toksilisuse määra. Antitoksiini geenide ükshaaval deleteerimisel leiti, et viis toksiini (HigB, RelE2, YoeB, ParE ja PP\_4152) kolmeteistkümnest uuritud TA süsteemist, olid *P. putida* 'le letaalsed, sest vaid antitoksiini

geeni deleteerimine ei olnud nende süsteemide puhul võimalik (Rosendahl *et al.*, 2020). Teistest TA operonidest oli võimalik antitoksiini geen deleteerida, mis näitas, et need TA süsteemid ei kodeeri letaalset toksiini. Kolm toksiini kolmeteistkümnest (GraT, Res ja MqsR) olid mõõdukalt toksilised – antitoksiini deleteerimine oli küll võimalik, aga mutantsete bakterite kasvukiirus oli vähenenud ja muutunud oli ka nende bakterite stressitaluvus. Viis toksiini (BrnT, RelE, HicA1, MazF ja PP\_1717) ei olnud toksilised, sest ei mõjutanud kasvukiirust, kuid BrnT ja RelE mõjutasid bakteri stressitaluvust. HicA1, MazF ja PP\_1717 ei mõjutanud ei bakteri kasvukiirust ega stressitaluvust. Need tulemused näitavad, et enamuse *P. putida* TA süsteemide toksiinidest on evolutsiooni käigus kaotanud oma surmava funktsiooni kas täielikult või osaliselt.

Kromosomaalseid TA süsteeme peetakse kasulikuks stressitingimuste korral (Hall *et al.*, 2017; Harms *et al.*, 2018). Samas ei ole meie laboris tehtud katsed näidanud *P. putida* TA süsteemidel positiivset efekti stressitaluvusele (Rosendahl *et al.*, 2020), mis läheb kokku ka teistes bakterites tehtud uuemate uuringutega (Conlon *et al.*, 2016; Goormaghtigh *et al.*, 2018; Harms *et al.*, 2017; Pontes & Groisman, 2019). On näidatud, et *E. coli* 10 TA süsteemi mitmikdeletandi ja metsiktüve vahel ei olnud persistorite hulk erinev (Goormaghtigh *et al.*, 2018; Harms *et al.*, 2017). Samuti ei mõjutanud *Staphylococcus aureuse* TA süsteemide deleteerimine (Conlon *et al.*, 2016), ega ka *Salmonella enterica* TA süsteemide deleteerimine (Pontes & Groisman, 2019) nende persistorite moodustumist.

Meie laboris leiti pigem vastupidist efekti, sest TA süsteemide olemasolu korral oli optimaalsetel kasvutingimustel näha negatiivset efekti bakterile (Rosendahl *et al.*, 2020). Leiti, et segakultuuris kasvatamisel sai eelise  $\Delta 13TA$  tüvi, kuigi ta ei suutnud metsiktüve söötimest välja konkureerida (Rosendahl *et al.*, 2020). Samas stressitingimuste korral  $\Delta 13TA$  tüve ja metsiktüüpi tüve vahel erinevusi ei nähtud. Kuna TA süsteemide negatiivne mõju bakteri kohasusele on üldiselt väike, võib see selgitada, miks nad ei ole täielikult genoomidest kadunud. Sellise püsivuse teeb veel võimalikuks TA süsteemide võime levida horisontaalse geeniülekanne kaudu ja isekalt edasi säilida (Rosendahl *et al.*, 2020).

Viimasel ajal on aina enam kogunenud andmeid TA süsteemide osalusest faagivastases kaitses (LeRoux & Laub, 2022; Song & Wood, 2020; Zhang *et al.*, 2022). *P. putida* TA süsteemide efekti faaginakkusele on siiani uuritud vaid kahes meie laboris tehtud bakalaureusetöös (Kärgerberg, 2021; Piirmets, 2022). Mõlemas töös leiti, et *P. putida* TA

süsteemid ei andnud bakterile faagivastast kaitset, vaid vastupidi, faaginakkuse korral oli näha pigem negatiivset efekti bakteri kohasusele (Kärgerberg, 2021; Piirmets, 2022). Kuid arvestades, et mõlemad tööd viidi läbi suhteliselt väikse arvu faagidega (Kärgerbergi töös kaks faagi ja Piirmetsa töös kuus faagi) ning kaitseefekt võib olla faagispetsiifiline, oleks vajalik suurema hulga faagide analüüsimine, et teha järeldusi *P. putida* TA süsteemide võimalikust efektist faagiresistentsusele. Lisaks oleks huvitav teada, kas ja milline oleks nende TA süsteemide toksiinide efekt faaginakkustele.

## **2. EKSPERIMENTAALOSA**

### **2.1. Töö eesmärgid**

Käesoleva uurimistöö eesmärkideks olid

- 1) testida hüpoteesi, mille kohaselt soodustavad *P. putida* genoomis leiduvad toksiini-antitoksiini süsteemid bakteri elumust faaginakkuse korral
- 2) võrrelda *P. putida* algse tüve PaW85 ja antitoksiinide üksikmutantsete tüvede faagitolerantsust, et selgitada toksiinide efekti nakatumiseefektiivsusele

## 2.2. Materjal ja meetoodika

### 2.2.1. Kasutatud söötmed, faagid ja bakteritüved

Baktereid kasvatati LB (lüsogeenses) söötmes (1% trüpton, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl). Tassikatsete tardsööde sisaldas 1,5% agarit ja bakterimuru valmistamiseks kasutatud pehmeagari sööde 0,3% agarit. Faagiga nakatamise katsed toimusid temperatuuril 20°C ja bakterimuru segusse lisati lüüsumise soodustamiseks tsiprofloksatsiini (0,03 µg/ml) ja CaCl<sub>2</sub> (10 mM).

Kasutatud bakteritüved on toodud Tabelis 1 ja faagid Tabelis 2. Faagid on jaotatud liikidesse ja perekondadesse sekveneerimistulemuste või faagi perekonnaspetsiifiliste praimeritega teostatud PCR-i alusel (teostasid Rita Hõrak, Hedvig Tamman, Age Brauer).

**Tabel 1. Kasutatud *P. putida* bakteritüved**

Bakteritüvi	Iseloomustus	Viide allikale
PaW85	Metsiktüvi	Bayley, <i>et al.</i> , 1977
Δ13TA	PaW85 deletsioonmutant, millest on eemaldatud 13 TA süsteemi	Rosendahl, <i>et al.</i> , 2020
ΔrelB	PaW85 deletsioonmutant, mille <i>relB-relE</i> operonist on eemaldatud antitoksiini geen <i>relB</i>	Rosendahl, <i>et al.</i> , 2020
ΔhicB	PaW85 deletsioonmutant, mille <i>hicA1-hicB1</i> operonist on eemaldatud antitoksiini geen <i>hicB1</i>	Rosendahl, <i>et al.</i> , 2020
ΔbrnA	PaW85 deletsioonmutant, mille <i>brnT-brnA</i> operonist on eemaldatud antitoksiini geen <i>brnA</i>	Rosendahl, <i>et al.</i> , 2020
ΔmazE	PaW85 deletsioonmutant, mille <i>mazE-mazF</i> operonist on eemaldatud antitoksiini geen <i>mazE</i>	Rosendahl, <i>et al.</i> , 2020
Δxre	PaW85 deletsioonmutant, millest <i>xre-res</i> operonist on eemaldatud antitoksiini geen <i>xre</i>	Rosendahl, <i>et al.</i> , 2020
ΔmqsA	PaW85 deletsioonmutant, mille <i>mqsR-mqsA</i> operonist on eemaldatud antitoksiini geen <i>mqsA</i>	Rosendahl, <i>et al.</i> , 2020
Δxre-res	PaW85 deletsioonmutant, millest on eemaldatud <i>xre-res</i> operon	Rosendahl, <i>et al.</i> , 2020
ΔmqsRA	PaW85 deletsioonmutant, millest on eemaldatud <i>mqsRA</i> operon	Rosendahl, <i>et al.</i> , 2020

**Tabel 2. Kasutatud faagid**

Faag	Perekond/liik	Iseloomustus (Eraldamise allikas, laikude suurus)	Eraldas keskkonnast
Amme 3	1/1A	Mullane vesi, $\varnothing$ 1-1,5 mm	Rita Hõrak
Kõpa 4	1/1B	Mullane vesi, $\varnothing$ 2 mm	Rita Hõrak
Nõo 2	1/1C	Vesi, $\varnothing$ 1 mm	Rita Hõrak
Kassivere 1	1/1D	Mullane vesi, $\varnothing$ 1,5-2 mm	Hedvig Tamman
IPA 4	2/2A	Mullane vesi, $\varnothing$ 5 mm	Rita Hõrak
Issaku	2/2A	Mullane vesi, $\varnothing$ 4-5 mm	Anita Lipu, Rita Hõrak
Kriimani	2/2A	Mullane vesi, $\varnothing$ 4 mm	Rita Hõrak
Mäksa 1	2/2A	Mullane vesi, $\varnothing$ 4 mm	Rita Hõrak
Rõõmu 1	2/2A	Mullane vesi, $\varnothing$ 5 mm	Rita Hõrak
Keila	2/2B	Vesi, $\varnothing$ 5 mm	Sander Blei, Sirli Rosendahl
Vasula järv	2/2C	Mullane vesi, $\varnothing$ 5 mm	Rita Hõrak, Sirli Rosendahl
Kakumetsa 1	3/3A	Liivamullane vesi, $\varnothing$ 1 mm	Rita Hõrak
Peetri tiik	3/3D	Mullane vesi, $\varnothing$ 1 mm	Hedvig Tamman
Luutsna jõgi 3	5/5B	Mullane vesi, $\varnothing$ 1,5 mm	Roger Rikberg
Kompost 1	5/5D	Muld, laigud $\varnothing$ 1-1,5 mm	Hedvig Tamman
Kaagvere 1	5	Mullane vesi, $\varnothing$ 2 mm	Rita Hõrak
Kakumetsa 2	5	Liivamullane vesi, $\varnothing$ 2,5 mm	Rita Hõrak
Laguja oja 3	5	Mullane vesi, $\varnothing$ 2,5 mm	Rita Hõrak
Savi-Peeda 2	5	Mullane vesi, $\varnothing$ 1,5–2 mm	Sirli Rosendahl
Luke 3	6/6A	Vesi, $\varnothing$ 1-1,5 mm	Rita Hõrak
Kallioja	7/7A	Mullane vesi, $\varnothing$ 2 mm	Rita Hõrak, Hedvig Tamman
Kompost 2	7/7B	Muld, $\varnothing$ 1,5 mm	Hedvig Tamman
Kurepalu 1	8/8A	Mullane vesi, $\varnothing$ 1,5 mm	Rita Hõrak
Mudajõgi	9/9B	Mullane vesi, $\varnothing$ 2-2,5 mm	Rita Hõrak

### 2.2.2. Faagitaluvuse testimine agarsöötmeil

TA süsteemide mõju testimiseks *P. putida* faagitaluvusele võrreldi nakatamiskatses *P. putida* metsiktüve PaW85 ja mitmikdeletsioonmutanti  $\Delta 13TA$ . TA süsteemide toksiinide mõju testimiseks kasutati antitoksiinide deletsioontüvesid  $\Delta relB$ ,  $\Delta hicB$ ,  $\Delta mazE$ ,  $\Delta xre$ ,  $\Delta mqsA$ . Lisaks kasutati kahe spetsiifilise TA süsteemi puudumise mõju testimiseks deletsioonmutante  $\Delta xre$ -res ja  $\Delta mqsRA$ .

Kõiki tüvesid peale  $\Delta xre$  kasvatati ette üleöö (~24 h) 20°C juures ~5 ml LB vedelsöötmes.  $\Delta xre$  tüve üleöö kultuuri kasvatati 30°C juures. Eksponentsiaalses faasis olevate rakkude saamiseks lahjendati üleöö kultuure ~15 korda 5 ml värskesse LB vedelsöötmesse ning kõiki tüvesid kasvatati ~4 tundi 20°C juures (kuni  $OD_{580} \sim 1$ ).

Tabelis 2 loetletud tüvedest valati 0,03 µg/ml tsiprofloksatsiini sisaldavatele LB agarsöötme tassidele bakterimuru, milleks lisati 300 µl eksponentsiaalses faasis olevale bakterikultuurile  $CaCl_2$  (lõppkontsentratsioon 10 mM) ja kuni 8 ml 0,3% LB agarit (42°C).

Tabelis 2 loetletud faagidest tehti SM puhvrise (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 8 mM  $MgSO_4$ , 0,01% želatiin) 10-kordsed lahjendusread  $10^{-1}$  –  $10^{-6}$  ja lahjendustest pipeteeriti 1,5 µl tilgad bakterimuruga tassidele. Tasse inkubeeriti üleöö (~24 h) 20°C juures.

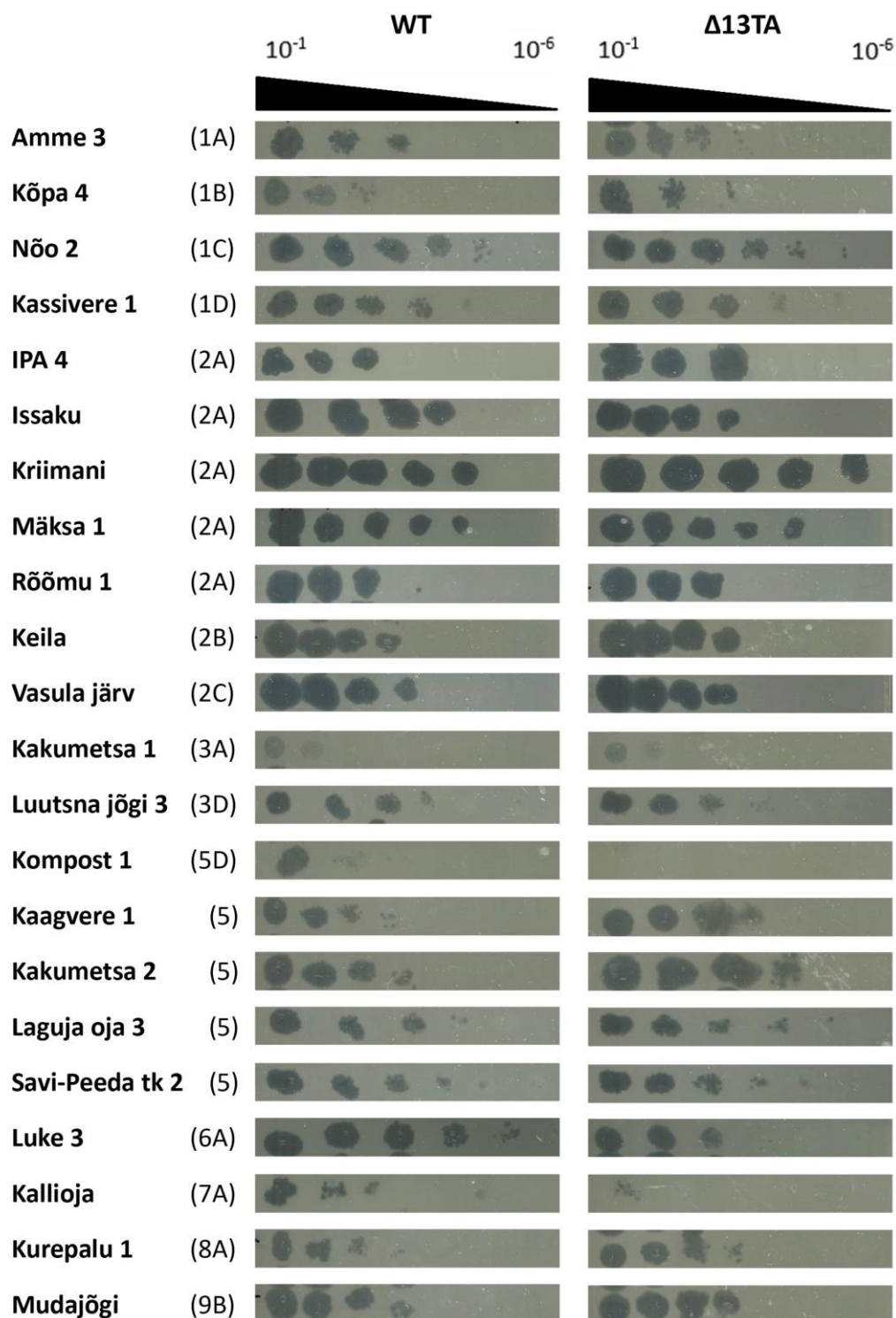
## 2.3. Tulemused

### 2.3.1 TA süsteemide deleteerimine ei mõjuta oluliselt *P. putida* faagitaluvust

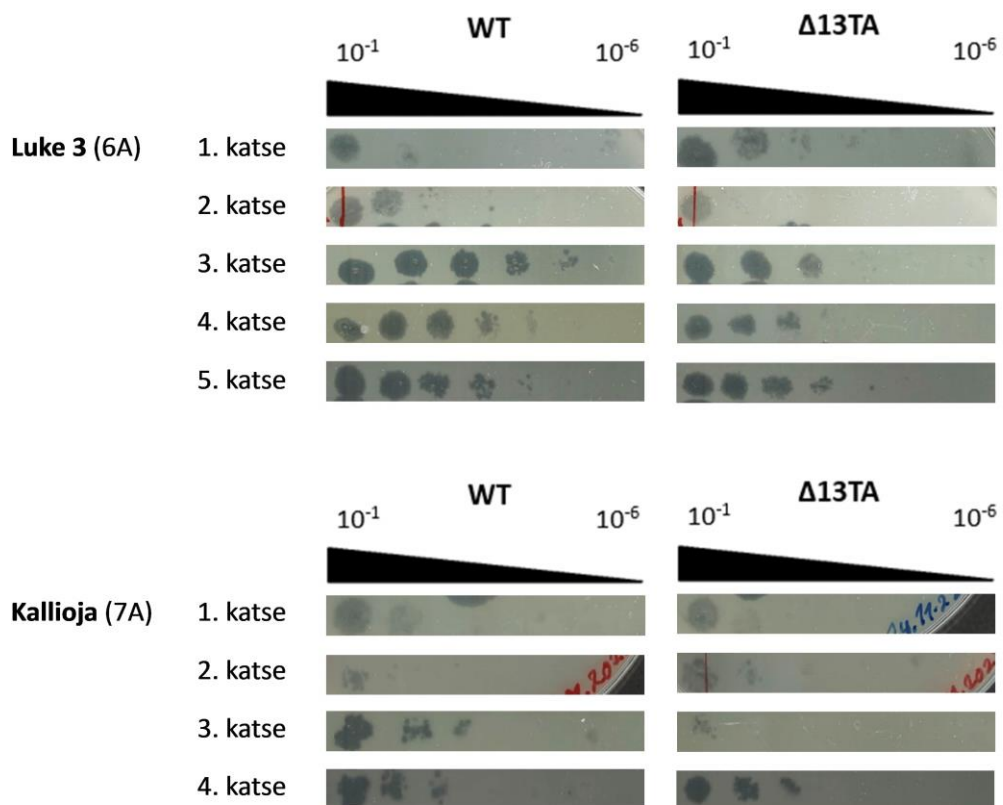
Kromosomaalsete TA süsteemide mõju selgitamiseks bakteri faagitaluvusele võrreldi agarsöötme tassidel *P. putida* metsiktüve PaW85 ja TA süsteemide mitmikdeletandi  $\Delta$ 13TA nakatumist 24 faagiga, kuid tulemusi oli võimalik välja lugeda vaid 22 faagi korral (Joonis 3), sest faagid Kompost 2 ja Peetri tiiki ei lüüsinud kumbagi tüve üheski katses. Enamus faagidega viidi läbi viis sõltumatut katset, va faagidega Amme 3, Kriimani, Rõõmu 1 ja Kallioja, kellega tehti neli sõltumatut katset (Tabel 3).

Katsed näitasid, et enamus faage nakatas *P. putida* metsiktüve (wt) ja  $\Delta$ 13TA tüve samaväärselt (Joonis 3, Tabel 3). Vaid faagi Kompost 1 korral oli korduvalt näha kahe tüve vahel erinevust, kusjuures metsiktüüpi tüvi nakatus 10 korda paremini, kui  $\Delta$ 13TA tüvi (Joonis 3). Faagidega Luke 3 ja Kallioja saadi kõikuvaid tulemusi (Joonis 4, Tabel 3), sest erinevates katsetes oli  $\Delta$ 13TA tüve murul näha nii suuremat, väiksemat kui ka samaväärset lüüsimiseefektiivsust kui metsiktüüpi bakterite murul (Joonis 4).

Katsetest võib järeldada, et *P. putida* kromosomaalsed TA süsteemid ei ole olulised bakteri faagiresistentsuses. Samas viitavad faagiga Kompost 1 saadud tulemused, et pigem võivad TA süsteemid hoopis faaginakkust soodustada.



**Joonis 3. Faagide lüüsiluugud *P. putida* metsiktüve PaW85 ja TA-deletsioontüve  $\Delta 13TA$  bakterimurudel.** Esitatud on 22 faagiga tehtud katsete tulemused. Sulgudes on märgitud faagi liik või perekond kui liik pole teada. Kõigi faagidega viidi läbi 4-5 sõltumatut katset. Esitatud on ühe katse tulemused. Katsed viidi läbi LB agarsöötmele, mis sisaldas 0,03  $\mu\text{g/ml}$  tsiprofloksatsiini ja 10 mM  $\text{CaCl}_2$ . Pildid on tehtud peale ~24 h kasvatamist 20°C juures.



**Joonis 4. Faagide Luke 3 ja Kallioja kõikide katsete lüüsilaidud *P. putida* metsiktüve PaW85 ja TA-deletsioontüve  $\Delta$ 13TA bakterimurudel.** Esitatud on faagide Luke 3 ja Kallioja kõik tehtud katsed *P. putida* metsiktüve PaW85 (wt) ja  $\Delta$ 13TA bakterimurudel. Katsed viidi läbi LB agarsöötmele, mis sisaldas 0,03  $\mu$ g/ml tsiprofloksatsiini ja 10 mM CaCl<sub>2</sub>. Pildid on tehtud peale ~24 h kasvatamist 20°C juures.

**Tabel 3. Koondandmed TA süsteemide mõjust *P. putida* faagiresistentsusele.**

Faag	Perekond/liik	TA-de olemasolu efekt bakteri faagiresistentsusele	Katsete arv
Amme 3	1/1A	0	4
Kõpa 4	1/1B	0	5
Nõo 2	1/1C	0	5
Kassivere 1	1/1D	0	5
IPA 4	2/2A	0	5
Issaku	2/2A	0	5
Kriimani	2/2A	0	4
Mäksa 1	2/2A	0	5
Rõõmu 1	2/2A	0	4
Keila	2/2B	0	5
Vasula järv	2/2C	0	5
Kakumetsa 1	3/3A	0	5
Luutsna jõgi 3	5/5B	0	5
Kompost 1	5/5D	10	5
Kaagvere 1	5	0	5
Kakumetsa 2	5	0	5
Laguja oja 3	5	0	5
Savi-Peeda tk 2	5	0	5
Luke 3	6/6A	?	5
Kallioja	7/7A	?	4
Kurepalu 1	8/8A	0	5
Mudajõgi	9/9B	0	5

- Efekt puudub; 
  - TA süsteemid soodustavad faaginakkust 10-kordselt; 
  - kõikuvad tulemused.

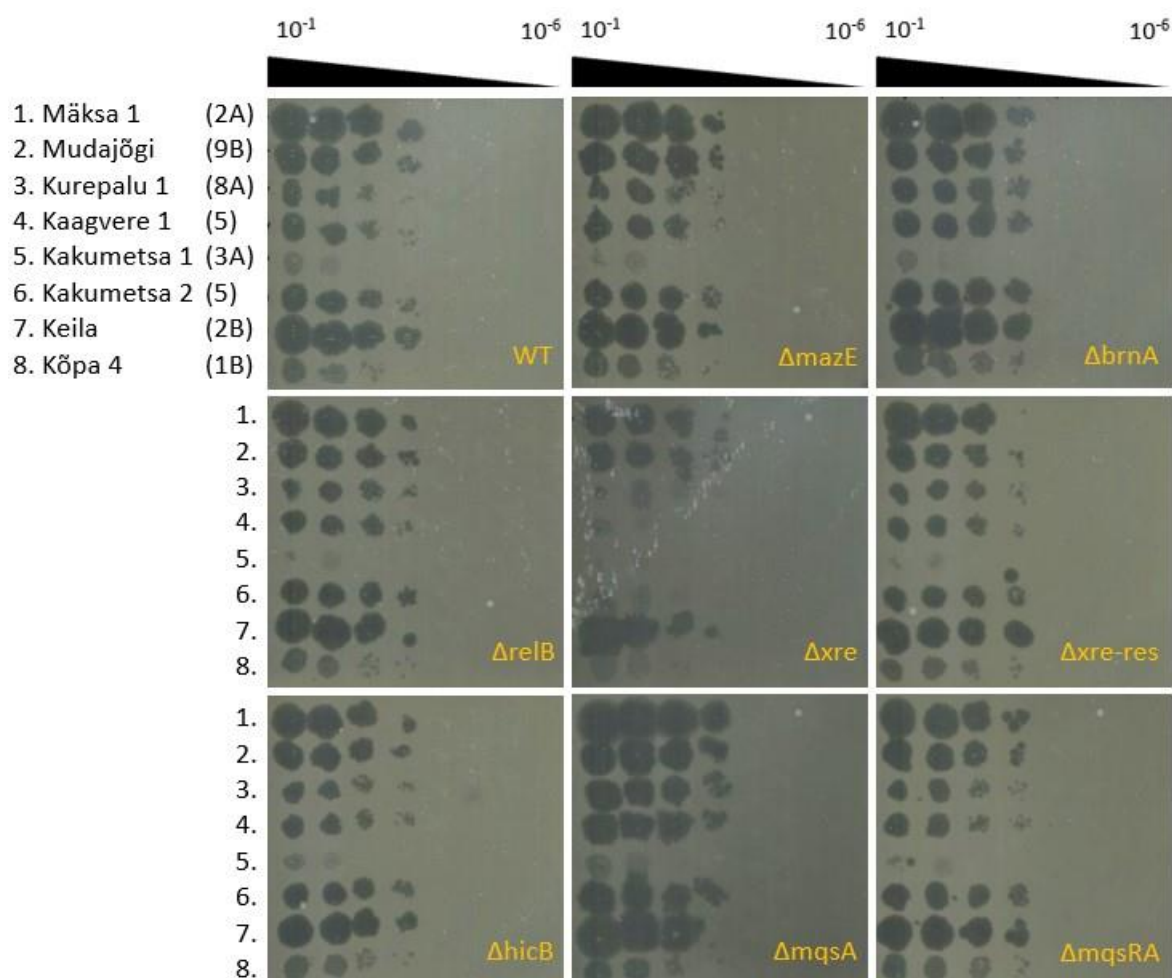
### 2.3.2. Antitoksiinide ja üksikute TA süsteemide puudumise efekt *P. putida* faagitaluvusele agarsöötmel

Kuna kromosomaalsete TA süsteemide deleteerimine ei tundunud bakteri faagiresistentsust mõjutavat, siis tekkis küsimus, et kas nende TA süsteemide toksiinid on üldse võimelised bakteri faagiresistentsusele mingit efekti avaldama. TA süsteemide toksiinide võimaliku mõju selgitamiseks bakteri faagitaluvusele võrreldi agarsöötme tassidel *P. putida* metsiktüve PaW85 ja antitoksiini deletantide  $\Delta mqsA$ ,  $\Delta xre$ ,  $\Delta mazE$ ,  $\Delta brnA$ ,  $\Delta hicB$  ja  $\Delta relB$  nakatumist 24 faagiga (Joonis 5 ja 6; Tabel 4; Lisa 1). Erinevate faagi ja bakteritüvede kombinatsioonidega viidi läbi 1-3 katset (Tabel 4). Tabelis 4 pole esitatud faagi Peetri tiik andmeid, sest ka nendes katsetes ei suutnud see faag ühtegi tüve nakatada. Erinevate katsete tulemused olid kõikuvad ja selle tõttu on koondtabelis (Tabel 4) toodud kõiki faktoreid arvestades mitme katse põhjal antud keskmised hinnangud.

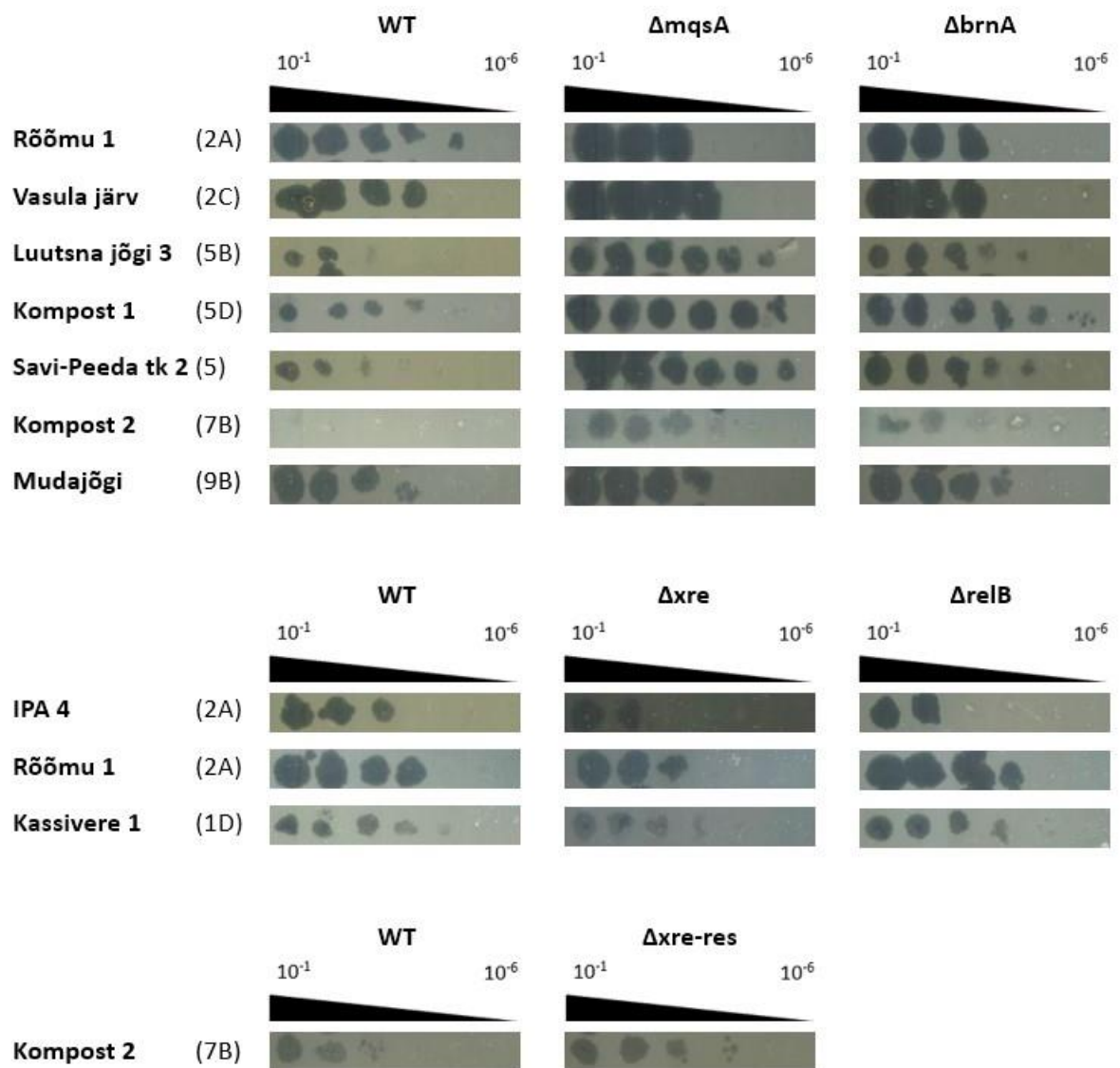
$\Delta mazE$  ja  $\Delta hicB$  tüvede faagiresistentsus ei erinenud ühelgi juhul *P. putida* metsiktüve (wt) resistentsusest (Tabel 4 ja Joonis 5).  $\Delta xre$  ja  $\Delta relB$  tüved olid aga üksikute faagide nakkusele (Kassivere 1, Rõõmu 1 ja IPA 4) vähemalt 10 korda tundetumad võrreldes metsiktüvega (Tabel 4 ja Joonis 6), kuid enamuse faagide korral tüvedevahelist faagiresistentsuse erinevust ei olnud (Tabel 4 ja Joonis 5).  $\Delta mqsA$  tüvi nakatus enamuse faagidega vähemalt 10 korda efektiivsemalt kui metsiktüvi (Joonis 6 ja Tabel 4), kuid osade faagidega nagu Savi-Peeda 2 ja Kompost 2 isegi 100 kuni 1000 korda paremini kui algne *P. putida* (Tabel 4 ja Joonis 6).  $\Delta brnA$  tüve faagiresistentsus oli samuti osade faagide puhul (Luutsna jõgi 3, Savi-Peeda 2, Kompost 1 ja Kompost 2) vähemalt 100 korda madalam kui algsel tüvel (Joonis 6). Vaid kolme faagi - Kassivere 1, IPA 4 ja Rõõmu 1 - korral oli näha toksiinide võimalikku kaitsvat efekti, sest võrreldes *P. putida* metsiktüvega nakatasid need faagid  $\Delta xre$ ,  $\Delta mqsA$  ja  $\Delta relB$  tüvesid halvemini (Tabel 4 ja Joonis 6).

Uuriti ka MqsRA ja Xre-Res TA süsteemide puudumise efekti *P. putida* faagitolerantsusele. Selleks võrreldi *P. putida* metsiktüve faagitaluvust TA süsteemide üksikdeletantide  $\Delta mqsRA$  ja  $\Delta xre-res$  faagitaluvustega agarsöötmel. Katsed näitasid, et antud TA süsteemid ei avalda *P. putida* faagitaluvusele mingit mõju (Tabel 4 ja Joonis 5). Ainult ühe faagi (Kompost 2) korral, oli näha  $\Delta xre-res$  tüvel paremat nakatumist, kui metsiktüvel, viidates, et Xre-Res TA süsteemi võib selle faagi eest bakterit kaitsta (Tabel 4 ja Joonis 6). Samas on selline järeldus ennatlik, sest selle tüve ja faagi kombinatsiooniga on tehtud vaid üks katse.

Katsetest võib järeldada, et üldiselt ei kaitse *P. putida* TA süsteemide toksiinid bakterit faaginakkuse eest, pigem vastupidi, sest mõnede TA süsteemide nagu MqsRA ja BrnTA toksiinid hoopis suurendasid osade perekonna 5 ja 7 faagide puhul vähemalt 100-kordselt bakteri faagitundlikkust. Üksikute TA süsteemide kohta võib järeldada, et vähemalt MqsRA ja Xre-Res süsteemi puudumine ei mõjuta *P. putida* faagitolerantsust.



**Joonis 5. Faagide lüüsilaidud *P. putida* metsiktüve PaW85 (wt) ja antitoksiinidefektsete ning üksikute TA süsteemide defektsete tüvede bakterimurudel.** Esitatud on 8 faagi ühe katse tulemused (kõigi 24 faagi tulemused on esitatud Lisas 1). Kõikide faagidega viidi läbi 1-3 sõltumatut katset. Kõik katsed viidi läbi LB agarsöötmel, mis sisaldas 0,03 µg/ml tsiprofloksatsiini ja 10 mM CaCl<sub>2</sub>. Pildid on tehtud peale ~24 h kasvatamist 20°C juures.



**Joonis 6. Näiteid mõnede faagide lüüsilaukudest *P. putida* metsiktüve PaW85 ning erinevate antitoksiinideletantide ja  $\Delta xre-res$  tüve bakterimurudel.** Toodud on osade huvitavamate tulemustega faagide katsed *P. putida* metsiktüve PaW85 ning antitoksiinideletantide  $\Delta mqxA$ ,  $\Delta brnA$ ,  $\Delta xre$ ,  $\Delta relB$  ja ka TA süsteemi üksikdeletandi  $\Delta xre-res$  bakterimurudel. Kõik katsed viidi läbi LB agarsöötmele, mis sisaldas 0,03  $\mu\text{g/ml}$  tsiprofloksatsiini ja 10 mM  $\text{CaCl}_2$ . Pildid on tehtud peale ~24 h kasvatamist 20°C juures.

**Tabel 4. Koondandmed *P. putida* TA süsteemide antitoksiinide ja üksikute TA süsteemide puudumise mõjust faagiresistentsusele.**

Faag	Perekond/ liik	Antitoksiini või TA süsteemi puudumise efekt							
		$\Delta xre$	$\Delta xre-res$	$\Delta mqsA$	$\Delta mqsRA$	$\Delta relB$	$\Delta hicB$	$\Delta brnA$	$\Delta mazE$
Amme 3	1/1A	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	10 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Kõpa 4	1/1B	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Nõo 2	1/1C	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Kassivere 1	1/1D	10 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	10 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
IPA 4	2/2A	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Issaku	2/2A	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Kriimani	2/2A	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	10 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Mäksa 1	2/2A	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Rõõmu 1	2/2A	10 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	10 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Keila	2/2B	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Vasula järv	2/2C	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Kakumetsa 1	3/3A	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Luutsna jõgi 3	5/5B	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Kompost 1	5/5D	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Kaagvere 1	5	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Kakumetsa 2	5	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Laguja oja 3	5	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Savi-Peeda tk 2	5	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Luke 3	6/6A	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Kallioja	7/7A	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Kompost 2	7/7B	0 <sup>c</sup>	10 <sup>c</sup>	1000 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	10 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	100 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>
Kurepalu 1	8/8A	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Mudajõgi	9/9B	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>

 - Efekt puudub;  - tüve faagitundlikkus suurenenud 10 korda;

 - tüve faagitundlikkus suurenenud 100-korda;  - tüve

faagitundlikkus suurenenud 1000 korda ;  - tüve faagitundlikkus vähenenud 10

korda. Ülaindeks efekti suuruse juures tähistab katsete korduste arvu, mis selle tüve ja faagi

kombinatsiooniga on tehtud. a – 3 kordust; b – 2 kordust; c – 1 kordus.

## 2.4 Arutelu

### 2.4.1. Kromosomaalsete TA süsteemide mõju *P. putida* faagiresistentsusele

Kromosomaalsed TA süsteemid on bakterites väga levinud (Fraikin *et al.*, 2020), kuid nende funktsioonid on siiani vaieldavad (Jurėnas *et al.*, 2022). Üks TA süsteemidele omistatavatest funktsioonidest on faaginakkuse korral bakteripopulatsioonile kaitse andmine. Peamiselt põhineb see TA süsteemi toimimisel Abi süsteemina, kuid on ka leitud faagiresistentsust suurendavaid ning samas bakterit mitte surmavaid TA süsteeme (Kelly *et al.*, 2023).

TA süsteemide mõju *P. putida* faagiresistentsusele on uuritud varem vaid kahes meie laboris tehtud bakalaureusetöös: Kärgerberg 2021 ja Piirmets 2022. Mõlemas töös leiti, et *P. putida* TA süsteemid ei suurenda bakteri faagiresistentsust, vaid pigem hoopis mõne faagi korral suurendasid bakteri tundlikkust faaginakkusele (Kärgerberg, 2021; Piirmets, 2022). Kuna eeltoodud töodes oli uuritud faagide arv väike (vastavalt 2 ja 6 faagi), siis käesolevas töös sooviti suurema arvu faagidega (24 faagi) selgitada, kas leidub *P. putida* faage, kelle eest TA süsteemid bakterit kaitsta võivad. Käesoleva töö tulemused lähevad kokku varasemate tulemustega (Kärgerberg, 2021; Piirmets, 2022), kuna enamus testitud faagide korral ei olnud *P. putida* metsiktüve PaW85 ja TA süsteemide osas puuduliku  $\Delta 13TA$  tüve vahel faagitundlikkuses erinevusi näha (Tabel 3 ja Joonis 3). Sarnaselt Kärgerbergi ja Piirmetsa töödele, leidis ka käesolevas töös üks faag (Kompost 1), kelle nakkust TA süsteemide olemasolu hoopis suurendas (Tabel 3 ja Joonis 3). Seega viitavad minu töö tulemused *P. putida* kromosomaalsete TA süsteemide ebaolulisusele või lausa kahjulikkusele faaginakkuse korral. Kahe faagiga (Luke 3 ja Kallioja) tehtud katsete tulemused olid kõikuvad (Tabel 3 ja Joonis 4) ning nende faagide korral ei saa TA süsteemide mõju kohta selgelt midagi väita, kuid võib arvata, et tulemuste varieeruvus võib olla põhjustatud mingisugustest muutuvatest faktoritest katsete läbiviimisel. Näiteks mõnes katses faagipartiklite bakterimurule mittesattumine suurema lahjendusega faagiproovist, kuna lahjendusi kanti bakterimurule 1,5  $\mu$ l kogustes.

Käesolevas töös võrreldi ka kahe *P. putida* TA süsteemi üksikdeletandi -  $\Delta$ mq $\sigma$ RA ja  $\Delta$ xre-res - faagitundlikkust metsiktüve omaga ja leiti, et need TA süsteemid ei ole bakteri faagiresistentsuses olulised (Tabel 4 ja Joonis 5), välja arvatud ühe faagi (Kompost 2) suhtes, kus oli näha  $\Delta$ xre-res ja metsiktüve võrdlemisel justkui TA süsteemide kaitsvat efekti faagi

vastu (Tabel 4). Samas ei olnud antitoksiinideletandi  $\Delta xre$  ja metsiktüve nakatumistundlikkuses erinevusi (Tabel 4), mis tähendaks, et Xre-Res TA süsteemi korral pakuks faaginakkuse eest kaitset mitte toksiin vaid antitoksiin, mida ei ole varem kirjanduses kirjeldatud. Lisaks peab rõhutama, et katset on tehtud vaid üks kord ning efekti suurus oli ainult ühe lüüsilaigu vahe ehk 10-kordne. Arvestades ühekordset katset ja tulemuse võimalikku kallutatust katsevea tõttu (pipeteerimise viga, faagipartiklite mittesattumine bakterimurule), ei peaks ma Kompost 2 korral nähtud tulemust seni oluliseks, kuni edaspidised katsed pole korduvalt sama näidanud.

Vaatamata sellele, et kirjanduses on kirjeldatud mitmeid TA süsteeme, mis kaitsevad bakterit faaginakkuse eest (LeRoux *et al.*, 2022; Song & Wood, 2020; Zhang *et al.*, 2022) on käesoleva töö ning kahe eelnevalt tehtud bakalaureusetöö (Kärgerberg, 2021; Piirmets, 2022) alusel võimalik järeldada, et *P. putida* kromosomaalsed TA süsteemid ei tundu suurendavat tema faagiresistentsust, vaid pigem võivad TA süsteemid faagispetsiifiliselt suurendada bakteri faagitundlikkust. Siiski on faagide arv maailmas niivõrd suur (Comeau *et al.*, 2008), et on võimalik, et neid *P. putida* faage, kelle vastu TA süsteemid kaitseksid, ei ole veel isoleeritud. Edaspidi võiks uurida seda, et mis mehhanismide kaudu on *P. putida* kromosomaalsed TA süsteemid võimelised suurendama bakteri faagitundlikkust ning mis seda faagiresistentsuse vähendamist põhjustab.

#### **2.4.2. Kromosomaalsete TA süsteemide toksiinide mõju *P. putida* faagiresistentsusele**

Kuna *P. putida* kromosomaalsed TA süsteemid ei paista bakteri faagiresistentsuses osalema, siis tekkis küsimus, et kas teoreetiliselt oleksid nende TA süsteemide toksiinid üldse võimelised faagiresistentsust mõjutama, seda enam, et *P. putida* kromosomaalsete TA süsteemide toksiinide mõju faaginakkusele ei ole eelnevalt uuritud. Käesolevas töös uuriti kuue *P. putida* toksiini, MazF, Res, BrnT, MqsR, RelE ja HicA1, efekti *P. putida* faagiresistentsusele, milleks võrreldi antitoksiinideletantide  $\Delta mazE$ ,  $\Delta xre$ ,  $\Delta brnA$ ,  $\Delta mqsA$ ,  $\Delta relB$  ning  $\Delta hicB$  faagiresistentsust *P. putida* metsiktüve PaW85 omaga (Tabel 4 ja Joonis 5). Kuigi laboris oli ka  $\Delta graA$  tüvi ei saanud GraT toksiini efekti uurida, sest see on temperatuurisõltuv toksiin, mis on 20°C juures liiga toksiline ning bakteri kasv on täielikult inhibeeritud (Tamman *et al.*, 2014). Samas toimub *P. putida* faagiga nakatamine edukalt just 20°C juures. Ülejäänud TA süsteemide puhul ei olnud toksiini surmava toksilisuse pärast võimalik antitoksiinideletantset tüve konstrueerida (Rosendahl *et al.*, 2020).

Tulemustest nähti, et kaks toksiini MazF ja HicA1 ei mõjutanud faagiresistentsust ühelgi juhul; toksiinid Res ja RelE suurendasid üksikutel juhtudel üksikute faagide korral bakteri faagiresistentsust, kuid suurel enamusel juhtudest ei mõjutanud nad faagiresistentsust (Tabel 4; Joonis 5 ja Joonis 6). Olen siiski Res ja RelE faagiresistentsuse suurendamise võime interpreteerimisel ettevaatlik, sest kaitseefekt oli võrdlemisi väike (10-kordne) ja katsete suhteliselt suure kõikumuse tõttu on võimalik tulemusi kergesti valesi tõlgendada. Toksiinid MqsR ja BrnT vähendasid perekonna 5 ja 7 faagide korral *P. putida* faagiresistentsust, kusjuures MqsR suurendas suure enamuse faagide korral oluliselt bakteri faagitundlikkust (Tabel 4 ja Joonis 6). Põhjuseks võib olla see, et MqsR on toksiin, mis vähendab *P. putida* kasvukiirust ehk häirib oluliselt bakteri metabolismi (Rosendahl *et al.*, 2020). Kuigi BrnT bakteri kasvukiirust ei mõjuta, on ta näidatud mõjutama *P. putida* stressitaluvust teatud tingimustel nagu näiteks antibiootikumide tetratsükliin ja tsiprofloksatsiin tolerantsuse suurendamine (Rosendahl *et al.*, 2020). See näitab, et BrnT suudab bakteri metabolismi mõjutada, mis võib olla ka põhjuseks, miks  $\Delta brnA$  tüve faagiresistentsus osade faagide suhtes on vähenenud.

Käesoleva töö tulemused viitavad *P. putida* kromosomaalsete TA süsteemide toksiinide üldisele ebaolulisusele bakteri faagiresistentsuses, kuid kahe TA süsteemi, MqsRA ja BrnTA, toksiinide puhul on näha kahjuliku mõju *P. putida* elumusele faaginakkuse korral. Eriti MqsR-i kahjulikkusele, sest tulemused näitavad, et selle toksiini toimel väheneb bakteri resistentsus paljude faagide nakkuse suhtes.

## KOKKUVÕTE

Kromosomaalsete TA süsteemide funktsioonide suhtes puudub siiani ühene arusaam (Jurėnas *et al.*, 2022), kuid üheks pakutud ja ka mõnede konkreetsete TA lookuste puhul tõestatud funktsiooniks on bakteri faagiresistentsuse suurendamine (LeRoux *et al.*, 2022; LeRoux & Laub, 2022; Zhang *et al.*, 2022). *Pseudomonas putida* kromosomaalsete TA süsteemide mõju faagiresistentsusele on seni uuritud vaid kahes meie laboris eelnevalt tehtud bakalaureusetöös (Kärgerberg, 2021; Piirmets, 2022), kus testiti kokku vaid kaheksat faagi. Kasutades meie labori suurenenud faagikollektsiooni otsustati seepärast TA süsteemide võimalikku osalust faagikaitstes suurema arvu faagidega (24 faagi) uuesti testida.

Käesoleva töö praktilise osa eesmärkideks olid testida, kas *P. putida* kromosomaalsed toksiini-antitoksiini süsteemid soodustavad bakteri elumust faaginakkuse korral ja välja selgitada ka osade TA süsteemide toksiinide mõju faaginakkusele. Selleks võrreldi *P. putida* metsiktüve PaW85 ja antitoksiini üksikdeletantide nakatumisefektiivsust. Katsete tulemustest on võimalik järeldada järgmist:

- 1) *P. putida* kromosomaalsed TA süsteemid ei suurenda bakteri resistentsust uuritud faagide suhtes või kui neil mingi mõju üldse on, siis on see pigem bakteri faagiresistentsust vähendav (faag Kompost 1)
- 2) *P. putida* kromosomaalsete TA süsteemide toksiinid ei ole üldiselt võimelised suurendama faagiresistentsust, pigem vastupidi, sest toksiinid MqsR ja BrnT vähendasid bakteri resistentsust osade faagide (peamiselt perekondadest 5 ja 7) vastu

Tulemusi kokku võttes võib järeldada, et *P. putida* kromosomaalsed TA süsteemid ega nende toksiinid ei tundu olema tähtsad bakteri kaitsemisel faagide vastu. Pigem vastupidiselt, sest osad toksiinid hoopis vähendasid bakteri resistentsust osade faagide suhtes. Küll on need tulemused aga varieeruvad olenevalt mis faagi ja TA süsteemi suhet vaadata.

## Chromosomal toxin-antitoxin systems in the phage resistance of *Pseudomonas putida*

Sander Blei

### SUMMARY

The functions of chromosomal TA systems are still being studied and debated to this day (Jurėnas *et al.*, 2022). However, one of their proposed functions is increasing phage resistance, and some TA systems have been shown to protect bacteria from phages (Zhang *et al.*, 2022). So far, the effects of the chromosomal TA systems on *Pseudomonas putida* phage resistance have only been studied in two bachelors' theses from our lab by Liis Kärgerberg, 2021 and Kendra Piirmets, 2022, but the phage sample sizes in those studies were small (2 and 6 phages, respectively).

Hence, to gather more evidence for the possible effects of TA systems on the phage resistance of *P. putida*, a bigger sample size of phages (in this study, 24 phages) is necessary.

The objectives of the experimental part of this thesis were to determine whether the chromosomal TA systems of *P. putida* increase the phage resistance of the bacterium and also to determine the effects of the toxins of these TA systems on phage resistance. From the results, one may conclude the following:

- 1) The chromosomal TA systems of *P. putida* do not increase phage resistance of the bacterium. In fact, they generally do not participate in phage resistance or when they do, they have a negative effect on phage resistance, rather than a positive.
- 2) The toxins of these chromosomal *P. putida* TA systems are largely incapable of increasing phage resistance, quite the opposite in fact, in the case of some phage families (mostly 5 and 7), a few toxins (MqsR and BrnT) significantly decreased the phage resistance of the bacterium

In conclusion, neither the chromosomal TA systems nor their toxins enhance *P. putida* phage resistance. Rather the opposite seems to be true, because in the case of some phages and toxins, the severity of phage infection was increased. Although, these results vary depending on the TA system and phage in question.

## TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma juhendajaid Rita Hõrakut ja Sirli Rosendahli suurepärase juhendamise ja väga sõbraliku õppimis- ning eksperimenteerimiskeskonna eest. Veel soovin tänada ka Hedvig Tammanit ja teisi laboriresidente, kes olid samuti suur osa põhjusest, miks oli väga tore laboris tööd teha.

## KIRJANDUSE LOETELU

- Ainelo, A., Porosk, R., Kilk, K., Rosendahl, S., Remme, J., & Hõrak, R. (2019). *Pseudomonas putida* Responds to the Toxin GraT by Inducing Ribosome Biogenesis Factors and Repressing TCA Cycle Enzymes. *Toxins*, *11*(2), 103.  
<https://doi.org/10.3390/toxins11020103>
- Ainelo, A., Tamman, H., Leppik, M., Remme, J., & Hõrak, R. (2016). The toxin GraT inhibits ribosome biogenesis. *Molecular Microbiology*, *100*(4), 719–734.  
<https://doi.org/10.1111/mmi.13344>
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, *315*(5819), 1709–1712.  
<https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- Bayley, S. A., Duggleby, C. J., Worsey, M. J., Williams, P. A., Hardy, K. G., & Broda, P. (1977). Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2. *Molecular & General Genetics: MGG*, *154*(2), 203–204.  
<https://doi.org/10.1007/BF00330838>
- Bertani, G., & Weigle, J. J. (1953). HOST CONTROLLED VARIATION IN BACTERIAL VIRUSES. *Journal of Bacteriology*, *65*(2), 113–121.
- Bondy-Denomy, J., Pawluk, A., Maxwell, K. L., & Davidson, A. R. (2013). Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature*, *493*(7432), 429–432. <https://doi.org/10.1038/nature11723>
- Bondy-Denomy, J., Qian, J., Westra, E. R., Buckling, A., Guttman, D. S., Davidson, A. R., & Maxwell, K. L. (2016). Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms. *The ISME Journal*, *10*(12), 2854–2866.  
<https://doi.org/10.1038/ismej.2016.79>

- Brenner, S., Jacob, F., & Meselson, M. (1961). An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature*, *190*, 576–581.  
<https://doi.org/10.1038/190576a0>
- Brouns, S. J. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J. H., Snijders, A. P. L., Dickman, M. J., Makarova, K. S., Koonin, E. V., & van der Oost, J. (2008). Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, *321*(5891), 960–964. <https://doi.org/10.1126/science.1159689>
- Comeau, A. M., Hatfull, G. F., Krisch, H. M., Lindell, D., Mann, N. H., & Prangishvili, D. (2008). Exploring the prokaryotic virosphere. *Research in Microbiology*, *159*(5), 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.05.001>
- Conlon, B. P., Rowe, S. E., Gandt, A. B., Nuxoll, A. S., Donegan, N. P., Zalis, E. A., Clair, G., Adkins, J. N., Cheung, A. L., & Lewis, K. (2016). Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion. *Nature microbiology*, *1*, 16051. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.51>
- Cumby, N., Davidson, A. R., & Maxwell, K. L. (2012). The moron comes of age. *Bacteriophage*, *2*(4), e23146. <https://doi.org/10.4161/bact.23146>
- Danovaro, R., Corinaldesi, C., Dell'anno, A., Fuhrman, J. A., Middelburg, J. J., Noble, R. T., & Suttle, C. A. (2011). Marine viruses and global climate change. *FEMS Microbiology Reviews*, *35*(6), 993–1034. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00258.x>
- Dedrick, R. M., Jacobs-Sera, D., Bustamante, C. A. G., Garlena, R. A., Mavrigh, T. N., Pope, W. H., Reyes, J. C. C., Russell, D. A., Adair, T., Alvey, R., Bonilla, J. A., Bricker, J. S., Brown, B. R., Byrnes, D., Cresawn, S. G., Davis, W. B., Dickson, L. A., Edgington, N. P., Findley, A. M., ... Hatfull, G. F. (2017). Prophage-mediated defence against viral attack and viral counter-defence. *Nature Microbiology*, *2*, 16251. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.251>

- Duckworth, D. H., Glenn, J., & McCorquodale, D. J. (1981). Inhibition of bacteriophage replication by extrachromosomal genetic elements. *Microbiological Reviews*, *45*(1), 52–71.
- Dörr, T., Lewis, K., & Vulić, M. (2009). SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *PLoS Genetics*, *5*(12), e1000760. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000760>
- Dy, R. L., Richter, C., Salmond, G. P. C., & Fineran, P. C. (2014). Remarkable Mechanisms in Microbes to Resist Phage Infections. *Annual Review of Virology*, *1*(1), 307–331. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085500>
- Edelmann, D., & Berghoff, B. A. (2022). A Shift in Perspective: A Role for the Type I Toxin TisB as Persistence-Stabilizing Factor. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 871699. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.871699>
- Fineran, P. C., Blower, T. R., Foulds, I. J., Humphreys, D. P., Lilley, K. S., & Salmond, G. P. C. (2009). The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein–RNA toxin–antitoxin pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(3), 894–899. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808832106>
- Fraikin, N., Goormaghtigh, F., & Van Melderen, L. (2020). Type II Toxin-Antitoxin Systems: Evolution and Revolutions. *Journal of Bacteriology*, *202*(7), e00763-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00763-19>
- Gerdes, K., Helin, K., Christensen, O. W., & Løbner-Olesen, A. (1988). Translational control and differential RNA decay are key elements regulating postsegregational expression of the killer protein encoded by the parB locus of plasmid R1. *Journal of Molecular Biology*, *203*(1), 119–129. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90096-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90096-4)
- Gerdes, K., Rasmussen, P. B., & Molin, S. (1986). Unique type of plasmid maintenance function: Postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proceedings of the National*

*Academy of Sciences of the United States of America*, 83(10), 3116–3120.

<https://doi.org/10.1073/pnas.83.10.3116>

Gibb, B., Hyman, P., & Schneider, C. L. (2021). The Many Applications of Engineered Bacteriophages—An Overview. *Pharmaceuticals*, 14(7), 634.

<https://doi.org/10.3390/ph14070634>

González Barrios, A. F., Zuo, R., Hashimoto, Y., Yang, L., Bentley, W. E., & Wood, T. K. (2006). Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). *Journal of Bacteriology*, 188(1), 305–316. <https://doi.org/10.1128/JB.188.1.305-316.2006>

Goormaghtigh, F., Fraikin, N., Putrinš, M., Hallaert, T., Hauryliuk, V., Garcia-Pino, A., Sjödin, A., Kasvandik, S., Udekwu, K., Tenson, T., Kaldalu, N., & Van Melderen, L. (2018). Reassessing the Role of Type II Toxin-Antitoxin Systems in Formation of *Escherichia coli* Type II Persister Cells. *mBio*, 9(3), e00640-18.

<https://doi.org/10.1128/mBio.00640-18>

Hall, A. M., Gollan, B., & Helaine, S. (2017). Toxin-antitoxin systems: Reversible toxicity. *Current Opinion in Microbiology*, 36, 102–110.

<https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.02.003>

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. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1894-8>

Harada, L. K., Silva, E. C., Campos, W. F., Del Fiol, F. S., Vila, M., Dąbrowska, K., Krylov, V. N., & Balcão, V. M. (2018). Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiological Research*, 212–213, 38–58.

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.007>

- Harms, A., Brodersen, D. E., Mitarai, N., & Gerdes, K. (2018). Toxins, Targets, and Triggers: An Overview of Toxin-Antitoxin Biology. *Molecular Cell*, 70(5), 768–784.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.003>
- Harms, A., Fino, C., Sørensen, M. A., Semsey, S., & Gerdes, K. (2017). Prophages and Growth Dynamics Confound Experimental Results with Antibiotic-Tolerant Persister Cells. *MBio*, 8(6), e01964-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01964-17>
- Hoskisson, P. A., Sumbly, P., & Smith, M. C. M. (2015). The phage growth limitation system in *Streptomyces coelicolor* A(3)2 is a toxin/antitoxin system, comprising enzymes with DNA methyltransferase, protein kinase and ATPase activity. *Virology*, 477, 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.12.036>
- Jaroszewicz, W., Morcinek-Orłowska, J., Pierzynowska, K., Gaffke, L., & Węgrzyn, G. (2022). Phage display and other peptide display technologies. *FEMS Microbiology Reviews*, 46(2), fuab052. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab052>
- Jurėnas, D., Fraikin, N., Goormaghtigh, F., & Van Melderen, L. (2022). Biology and evolution of bacterial toxin–antitoxin systems. *Nature Reviews Microbiology*, 20(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00661-1>
- Kasari, V., Kurg, K., Margus, T., Tenson, T., & Kaldalu, N. (2010). The *Escherichia coli* mqsR and ygiT Genes Encode a New Toxin-Antitoxin Pair. *Journal of Bacteriology*, 192(11), 2908–2919. <https://doi.org/10.1128/JB.01266-09>
- Keen, E. C. (2015). A century of phage research: Bacteriophages and the shaping of modern biology. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 37(1), 6–9. <https://doi.org/10.1002/bies.201400152>
- Kelly, A., Arrowsmith, T. J., Went, S. C., & Blower, T. R. (2023). Toxin–antitoxin systems as mediators of phage defence and the implications for abortive infection. *Current Opinion in Microbiology*, 73, 102293. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102293>

- Koebnik, R. (1999). Structural and functional roles of the surface-exposed loops of the beta-barrel membrane protein OmpA from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *181*(12), 3688–3694. <https://doi.org/10.1128/JB.181.12.3688-3694.1999>
- Koskella, B., & Brockhurst, M. A. (2014). Bacteria–phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities. *Fems Microbiology Reviews*, *38*(5), 916–931. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12072>
- Kulikov, E. E., Golomidova, A. K., Letarova, M. A., Kostryukova, E. S., Zelenin, A. S., Prokhorov, N. S., & Letarov, A. V. (2014). Genomic sequencing and biological characteristics of a novel *Escherichia coli* bacteriophage 9g, a putative representative of a new Siphoviridae genus. *Viruses*, *6*(12), 5077–5092. <https://doi.org/10.3390/v6125077>
- Kärgerberg, L. (2021). Kromosomaalsete profaagide ja toksiin-antitoksiin süsteemide roll *Pseudomonas putida* faagiresistentsuses. *Bakalaureusetöö*.
- Landsmann, J., Kröger, M., & Hobom, G. (1982). The rex region of bacteriophage lambda: Two genes under three-way control. *Gene*, *20*(1), 11–24. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(82\)90083-x](https://doi.org/10.1016/0378-1119(82)90083-x)
- LeRoux, M., & Laub, M. T. (2022). Toxin-Antitoxin Systems as Phage Defense Elements. *Annual Review of Microbiology*, *76*, 21–43. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020722-013730>
- LeRoux, M., Srikant, S., Teodoro, G. I. C., Zhang, T., Littlehale, M. L., Doron, S., Badiee, M., Leung, A. K. L., Sorek, R., & Laub, M. T. (2022). The DarTG toxin-antitoxin system provides phage defense by ADP-ribosylating viral DNA. *Nature microbiology*, *7*(7), 1028–1040. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01153-5>
- Liu, Y.-F., Yan, J.-J., Lei, H.-Y., Teng, C.-H., Wang, M.-C., Tseng, C.-C., & Wu, J.-J. (2012). Loss of Outer Membrane Protein C in *Escherichia coli* Contributes to Both Antibiotic

- Resistance and Escaping Antibody-Dependent Bactericidal Activity. *Infection and Immunity*, 80(5), 1815–1822. <https://doi.org/10.1128/IAI.06395-11>
- Loenen, W. A. M., Dryden, D. T. F., 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt990>
- Mansour, N. (2017). Bacteriophages are natural gift, could we pay further attention! *Journal of Food Microbiology*, 1, 22.
- Marraffini, L. A., & Sontheimer, E. J. (2008). CRISPR Interference Limits Horizontal Gene Transfer in Staphylococci by Targeting DNA. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5909), 1843–1845. <https://doi.org/10.1126/science.1165771>
- McGrath, S., Seegers, J. F., Fitzgerald, G. F., & van Sinderen, D. (1999). Molecular characterization of a phage-encoded resistance system in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 1891–1899. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.5.1891-1899.1999>
- Merfa, M. V., Niza, B., Takita, M. A., & De Souza, A. A. (2016). The MqsRA Toxin-Antitoxin System from *Xylella fastidiosa* Plays a Key Role in Bacterial Fitness, Pathogenicity, and Persister Cell Formation. *Frontiers in Microbiology*, 7, 904. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00904>
- Miyamoto, T., Kato, Y., Sekiguchi, Y., Tsuneda, S., & Noda, N. (2016). Characterization of MazF-Mediated Sequence-Specific RNA Cleavage in *Pseudomonas putida* Using Massive Parallel Sequencing. *PLoS ONE*, 11(2), e0149494. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149494>
- Moelling, K., Broecker, F., & Willy, C. (2018). A Wake-Up Call: We Need Phage Therapy Now. *Viruses*, 10(12), 688. <https://doi.org/10.3390/v10120688>

- Ogura, T., & Hiraga, S. (1983). Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(15), 4784–4788. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.15.4784>
- Otsuka, Y., & Yonesaki, T. (2012). Dmd of bacteriophage T4 functions as an antitoxin against Escherichia coli LsoA and RnlA toxins. *Molecular Microbiology*, 83(4), 669–681. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.07975.x>
- Owen, S. V., Wenner, N., Dulberger, C. L., Rodwell, E. V., Bowers-Barnard, A., Quinones-Olvera, N., Rigden, D. J., Rubin, E. J., Garner, E. C., Baym, M., & 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>
- Parma, D. H., Snyder, M., Sobolevski, S., Nawroz, M., Brody, E., & Gold, L. (1992). The Rex system of bacteriophage lambda: Tolerance and altruistic cell death. *Genes & Development*, 6(3), 497–510. <https://doi.org/10.1101/gad.6.3.497>
- Piirmets, K. (2022). Kromosomaalsete toksiin-antitoksiin süsteemide ja profaagide mõju Pseudomonas putida faagiresistentsusele. *Bakalauresuetoö*. <https://dspace.ut.ee/handle/10062/86023>
- Pontes, M. H., & Groisman, E. A. (2019). Slow growth dictates non-heritable antibiotic resistance in Salmonella enterica. *Science signaling*, 12(592), eaax3938. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aax3938>
- Reyes-Robles, T., Dillard, R. S., Cairns, L. S., Silva-Valenzuela, C. A., Housman, M., Ali, A., Wright, E. R., & Camilli, A. (2018). Vibrio cholerae Outer Membrane Vesicles Inhibit Bacteriophage Infection. *Journal of Bacteriology*, 200(15), e00792-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00792-17>
- Rosendahl, S., Tamman, H., Brauer, A., Remm, M., & Hõrak, R. (2020). Chromosomal toxin-antitoxin systems in Pseudomonas putida are rather selfish than beneficial. *Scientific Reports*, 10, 9230. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65504-0>

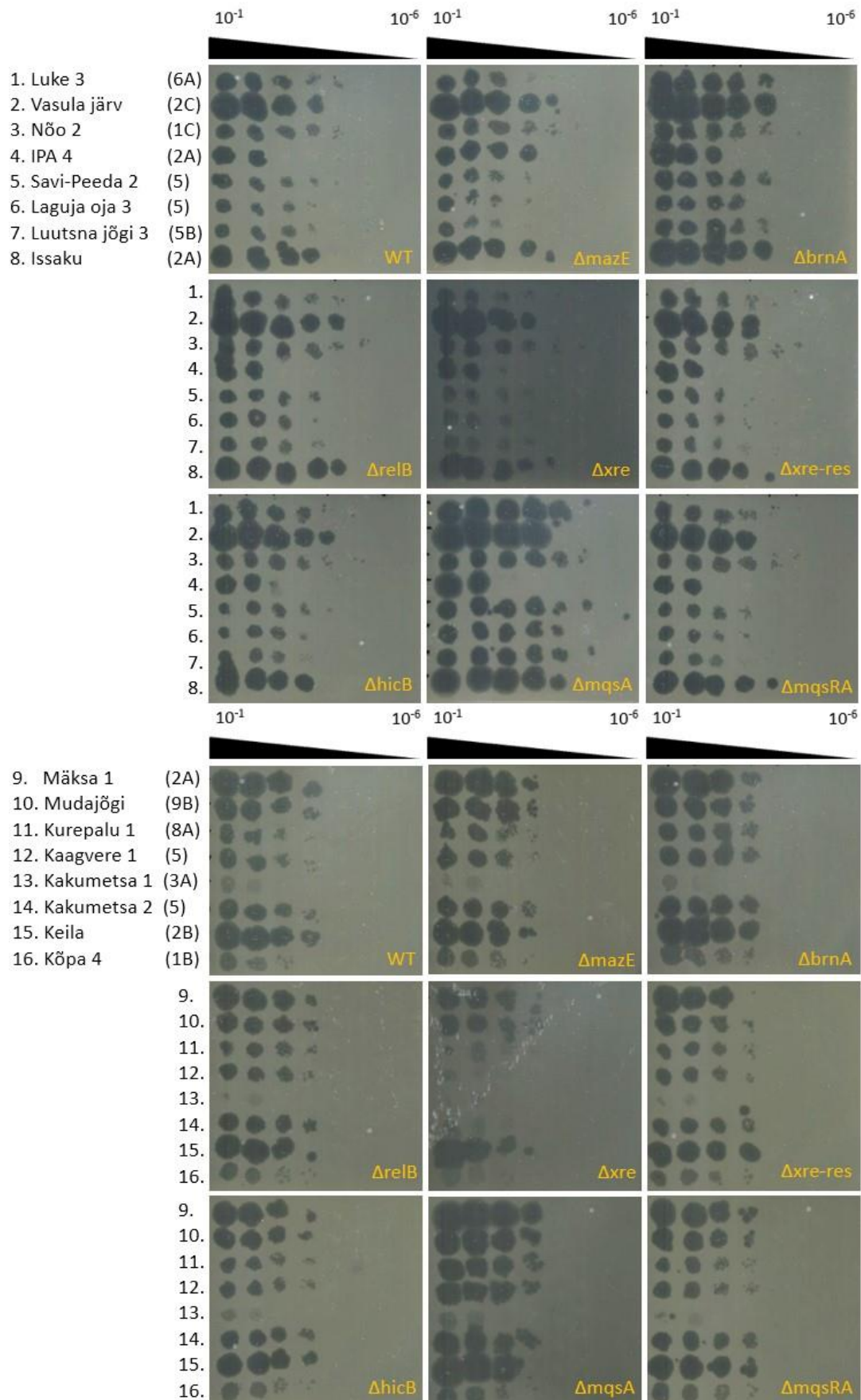
- Samson, J. E., Magadán, A. H., Sabri, M., & Moineau, S. (2013). Revenge of the phages: Defeating bacterial defences. *Nature Reviews. Microbiology*, *11*(10), 675–687.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro3096>
- Skjerning, R. B., Senissar, M., Winther, K. S., Gerdes, K., & Brodersen, D. E. (2019). The RES domain toxins of RES-Xre toxin-antitoxin modules induce cell stasis by degrading NAD<sup>+</sup>. *Molecular Microbiology*, *111*(1), 221–236.  
<https://doi.org/10.1111/mmi.14150>
- Song, S., & Wood, T. K. (2020). A Primary Physiological Role of Toxin/Antitoxin Systems Is Phage Inhibition. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1895.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01895>
- Sorek, R., Lawrence, C. M., & Wiedenheft, B. (2013). CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea. *Annual Review of Biochemistry*, *82*, 237–266.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-072911-172315>
- Szekeres, S., Dauti, M., Wilde, C., Mazel, D., & Rowe-Magnus, D. A. (2007). Chromosomal toxin-antitoxin loci can diminish large-scale genome reductions in the absence of selection. *Molecular Microbiology*, *63*(6), 1588–1605. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05613.x>
- Summers, W. C. (2012). The strange history of phage therapy. *Bacteriophage*, *2*(2), 130–133.  
<https://doi.org/10.4161/bact.20757>
- Sun, C., Guo, Y., Tang, K., Wen, Z., Li, B., Zeng, Z., & Wang, X. (2017). MqsR/MqsA Toxin/Antitoxin System Regulates Persistence and Biofilm Formation in *Pseudomonas putida* KT2440. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 840.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00840>
- Sun, Q., Shen, L., Zhang, B.-L., Yu, J., Wei, F., Sun, Y., Chen, W., & Wang, S. (2023). Advance on Engineering of Bacteriophages by Synthetic Biology. *Infection and Drug Resistance*, *16*, 1941–1953. <https://doi.org/10.2147/IDR.S402962>

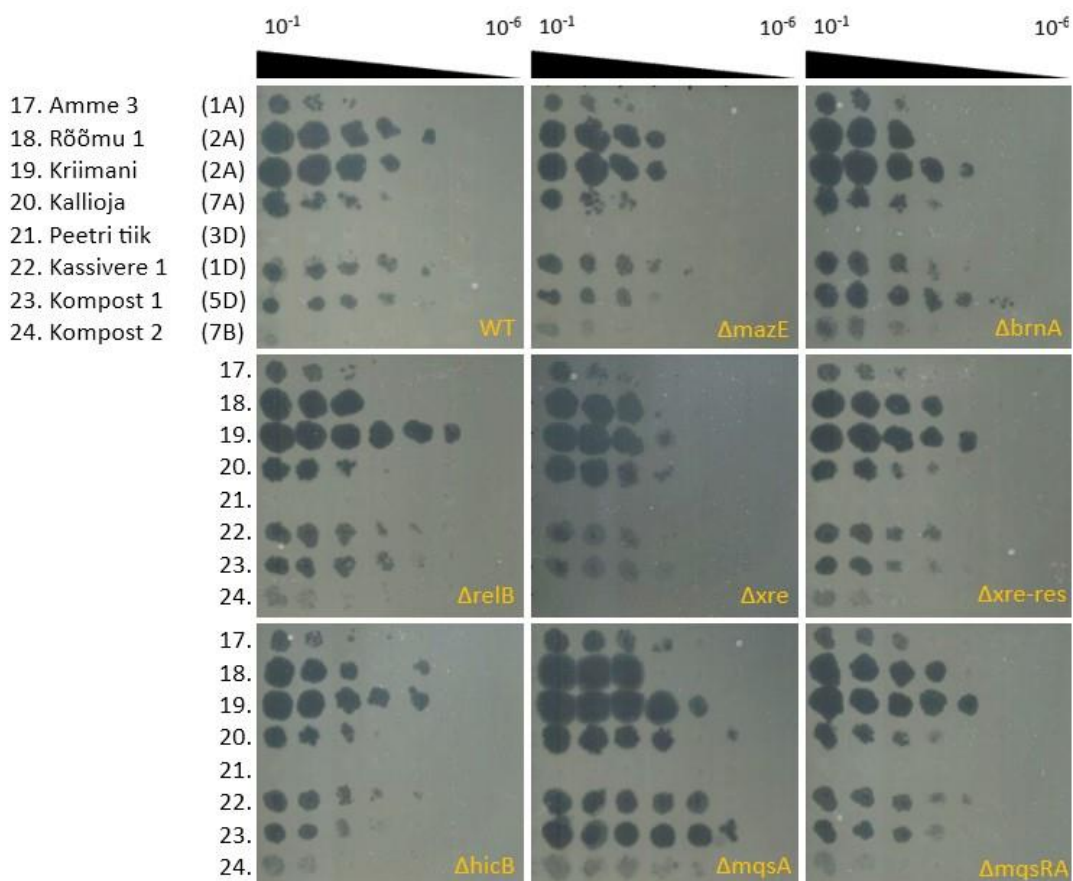
- Zhang, T., Tamman, H., Coppieters 't Wallant, K., Kurata, T., LeRoux, M., Srikant, S., Brodiazhenko, T., Cepauskas, A., Talavera, A., Martens, C., Atkinson, G. C., Hauryliuk, V., Garcia-Pino, A., & Laub, M. T. (2022). Direct activation of a bacterial innate immune system by a viral capsid protein. *Nature*, *612*(7938), 132–140. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05444-z>
- Talavera, A., Tamman, H., Ainelo, A., Konijnenberg, A., Hadži, S., Sobott, F., Garcia-Pino, A., Hōrak, R., & Loris, R. (2019). A dual role in regulation and toxicity for the disordered N-terminus of the toxin GraT. *Nature Communications*, *10*, 972. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08865-z>
- Tamman, H., Ainelo, A., Ainsaar, K., & Hōrak, R. (2014). A Moderate Toxin, GraT, Modulates Growth Rate and Stress Tolerance of *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, *196*(1), 157–169. <https://doi.org/10.1128/JB.00851-13>
- Tamman, H., Ainelo, A., Tagel, M., & Hōrak, R. (2016). Stability of the GraA Antitoxin Depends on Growth Phase, ATP Level, and Global Regulator MexT. *Journal of Bacteriology*, *198*(5), 787–796. <https://doi.org/10.1128/JB.00684-15>
- Tian, F., Li, J., Nazir, A., & Tong, Y. (2021). Bacteriophage – A Promising Alternative Measure for Bacterial Biofilm Control. *Infection and Drug Resistance*, *14*, 205–217. <https://doi.org/10.2147/IDR.S290093>
- Tock, M. R., & Dryden, D. T. F. (2005). The biology of restriction and anti-restriction. *Current Opinion in Microbiology*, *8*(4), 466–472. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.06.003>
- Turkington, C. J. R., Morozov, A., Clokie, M. R. J., & Bayliss, C. D. (2019). Phage-Resistant Phase-Variant Sub-populations Mediate Herd Immunity Against Bacteriophage Invasion of Bacterial Meta-Populations. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1473. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01473>

- van der Woude, M. W. (2011). Phase variation: How to create and coordinate population diversity. *Current Opinion in Microbiology*, *14*(2), 205–211.  
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.01.002>
- van der Woude, M. W., & Bäumlér, A. J. (2004). Phase and Antigenic Variation in Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, *17*(3), 581–611.  
<https://doi.org/10.1128/CMR.17.3.581-611.2004>
- Weimer, A., Kohlstedt, M., Volke, D., Nickel, P. I., & Wittmann, C. (2020). Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida*: Advances and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10811-9>
- Xie, Y., Wei, Y., Shen, Y., Li, X., Zhou, H., Tai, C., Deng, Z., & Ou, H.-Y. (2018). TADB 2.0: An updated database of bacterial type II toxin–antitoxin loci. *Nucleic Acids Research*, *46*(Database issue), D749–D753. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1033>
- Yamaguchi, Y., Park, J.-H., & Inouye, M. (2009). MqsR, a Crucial Regulator for Quorum Sensing and Biofilm Formation, Is a GCU-specific mRNA Interferase in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(42), 28746–28753.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.032904>
- Yang, Q. E., & Walsh, T. R. (2017). Toxin–antitoxin systems and their role in disseminating and maintaining antimicrobial resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, *41*(3), 343–353. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux006>
- Yu, F., & Mizushima, S. (1982). Roles of lipopolysaccharide and outer membrane protein OmpC of *Escherichia coli* K-12 in the receptor function for bacteriophage T4. *Journal of Bacteriology*, *151*(2), 718–722.

# LISAD

## Lisa 1.





**Joonis 7. Kõikide testitud faagide ühe katse tulemused *P. putida* metsiktüve PaW85 (wt) ja antitoksiinidefektsete ning üksikute TA süsteemide defektsete tüvede bakterimurudel.** Esitatud on 24 faagi ühe katse tulemused. 1.-8. faagide tulemused on ühest katsest, 9.-16. faagide tulemused teisest ja 17.-24. faagide tulemused kolmandast sõltumatust katsest. Kõik katsed viidi läbi LB agarsöötmele, mis sisaldas 0,03 μg/ml tsiprofloksatsiini ja 10 mM CaCl<sub>2</sub>. Pildid on tehtud peale ~24 h kasvatamist 20°C juures.

## LIHTLITSENTS

Mina, Sander Blei

(sünnikuupäev: 03.06.2001)

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

### **Kromosomaalsed toksiini-antitoksiini süsteemid *Pseudomonas putida* faagitolerantsuses**

mille juhendajad on Rita Hõrak ja Sirli Rosendahl,

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

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 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.

Sander Blei

26.05.2023