

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

GENEETIKA ÕPPETOOL

***Pseudomonas putida* RES toksiini mõju vähendavad
supressormutatsioonid**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Maria Grinkevitš

Juhendajad PhD Hedvig Tamman

PhD Rita Hõrak

TARTU 2024

INFOLEHT

***Pseudomonas putida* RES toksiini mõju vähendavad supressormutatsioonid**

Kuigi kromosomaalsete toksiin-antitoksiin süsteemide täpne roll bakterites pole veel selge, on levinud arvamus, et üks nende funktsioonidest võib olla faagiresistentsuse tagamine. Sander Blei bakalaureusetöö (2023) tulemused viitasid, et *P. putida* RES toksiin võib kaitsta bakterit üksikute faagide vastu, kuid tulemused olid kõikuvad. Sellest lähtuvalt oli käesoleva töö eesmärgiks selgitada RES toksiini võimalikku mõju faagide nakatamisefektiivsusele ja uurida toksiini supressiooni võimalusi. Tulemused näitasid, et RES toksiin suurendab bakteri faagiresistentsust. Supressormutantide analüüs viitas, et *P. putida* GroESL šaperon mõjutab RES toksiini aktiivsust.

Märksõnad: *Pseudomonas putida*, toksiin-antitoksiin süsteem, faagiresistentsus, RES-Xre, GroESL šaperon

CERCS kood: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Suppressor mutations reduce the impact of RES toxin in *Pseudomonas putida*

While the exact role of chromosomal toxin-antitoxin systems in bacteria is not yet clear, it is widely believed that one of their functions is to ensure phage resistance. The results in Sander Blei's Bachelor thesis (2023) indicate that RES toxin can protect bacteria against individual phages, but data were highly variable. Based on this, the current study aimed to elucidate the potential impact of the RES toxin on phage infections and to investigate the possibilities of toxin suppression. The results showed that the RES toxin protects bacteria against some phages. Interestingly, the suppressor mutants suggested that chaperone GroESL regulates the activity of the RES toxin.

Keywords: *Pseudomonas putida*, toxin-antitoxin system, phage resistance, RES-Xre, GroESL chaperone

CERCS code: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Toksiin-antitoksiin süsteemide ülevaade	7
1.2. Tüüp II TA süsteemid	9
1.2.1. Tüüp II TA süsteemide toksiinide sihtmärgid	11
1.3. <i>Pseudomonas putida</i> TA süsteemid	12
1.3.1. <i>Pseudomonas putida</i> RES-Xre süsteem.....	12
1.4. Bakterite kaitsemehhanismid faagide vastu	14
1.4.1. Toksiin-antitoksiin süsteemide roll faagivastases kaitses	15
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	17
2.1. Töö eesmärgid	17
2.2. Materjal ja meetoodika	17
2.2.1. Kasutatud söötmed ja bakteritüved.....	17
2.2.2. Faagitolerantsuse testimine agarsöötmel.....	18
2.2.3. Ujumiskatse Δxre supressormutantide isoleerimiseks	19
2.2.4. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)	20
2.2.5. Gelelektroforees.....	21
2.2.6. DNA sekveneerimine.....	21
2.2.7. Genoomse DNA eraldamine.....	22
2.2.8. Mutantide fenotüübiliste erinevuste kirjeldamine	22
2.3. Tulemused	23
2.3.1. Xre antitoksiini puudumine suurendab <i>P. putida</i> faagiresistentsust.....	23
2.3.2. RES toksiin inhibeerib <i>P. putida</i> kasvu	24
2.3.3. Esimesed RES toksiini supressormutandid: lisaks RES geeni muteerumisele supresseerivad Δxre tüve kasvudefekti ka mutatsioonid mujal <i>P. putida</i> genoomis.....	25
2.3.4. Supressormutandid teisest katsest: Δxre tüve mutantidel leidsid mutatsioonid GroESL šaperonis.....	27
2.3.5. GroES ja GroEL mutandid kaitsevad faagide vastu erineval määral: mutantse <i>groL</i> geeniga tüvi on faaginakkusele tundlikum kui mutantse <i>groS</i> geeniga tüvi	32
2.4. Arutelu	34
2.4.1. RES toksiin vähendab temperatuurist sõltuvalt <i>P. putida</i> kasvukiirust ja suurendab faagiresistentsust	34
2.4.2 RES toksiini aktiivsus sõltub GroESL šaperonist	35

KOKKUVÕTE	37
SUMMARY.....	38
KASUTATUD KIRJANDUS	39
Kasutatud veebiaadressid.....	49
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	50

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*)

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

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

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

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

SAP - aluseline fosfataas (ingl. k. *shrimp alkaline phosphatase*)

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

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

SISSEJUHATUS

Bakterid ja bakteriofaagid on pidevas võidurelvastumises, mistõttu on bakteritel aja jooksul välja arenenud mitmesugused kaitsemehhanismid faagide vastu. Kaitsemehhanismideks on näiteks faagi seondumise takistamine retseptorite muutmise kaudu või faagi DNA lagundamine restriksiooni-modifikatsiooni või CRISPR-Cas süsteemi abil (Garneau *et al.*, 2010; Deveau *et al.*, 2002; Wilson, 1991).

Potentsiaalselt kahjulikke toksiin-antitoksiin (TA) süsteeme on leitud nii plasmiididest (Ogura ja Hiraga, 1983) kui ka bakterite kromosoomidest (Aizenman *et al.*, 1996; Pandey ja Gerders, 2005). Kui plasmiidsete TA süsteemide roll bakteris on teada, siis kromosomaalsete süsteemide funktsioonid ja olulisus tekitab palju poleemikat ning uuringud on täis vasturääkivusi. Viimasel ajal arvatakse, et toksiin-antitoksiin süsteemid võivad osaleda faagivastases kaitstes. Peamiselt toimivad nad abortiivse infektsiooni (Abi) süsteemina, mis surmab bakteri enne, kui faag jõuab valmida ja sellega peatatakse faagide levik bakteripopulatsioonis (Hampton *et al.*, 2020). Siiski on leitud ka TA süsteeme, mis kaitsevad bakterit ilma teda surmamata (Leroux *et al.*, 2022; Song ja Wood, 2018).

Meie laboris tehtud bakalaureusetöös (Sander Blei, 2023) leiti, et kromosomaalse RES-Xre TA süsteemi RES toksiin võib osaleda faagivastases kaitstes, kuid tulemused olid väga kõikuvad. Nimelt näidati, et Δxre tüvi, milles puudub Xre antitoksiin, on veidi paremini kaitstud faagiraamatukogus olevate G1 ja G2 perekonna faagide eest. G6 perekonna faagidega tehtud katsed andsid vastakaid tulemusi, kus kaitset oli näha vaid osades katsetes. RES-Xre TA süsteemi on vähe uuritud ning seda on kirjeldatud ainult kahes teadusartiklis (Skjærning *et al.*, 2018; Rosendahl *et al.*, 2020).

Selle töö eesmärk oli selgitada RES toksiini võimalikku mõju faagi nakatamisefektiivsusele ja uurida toksiini supressioonimehhanisme.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Toksiin-antitoksiin süsteemide ülevaade

Toksiin-antitoksiin (TA) süsteemid on väikseid valke või RNAsid kodeerivad geenid, mida leidub rohkesti vabalt elavate prokarüootide, kaasa arvatud paljude patogeensete bakterite genoomides, aga ka üherakuliste seente plasmiidides või kromosoomides (Gerdes *et al.*, 2005; Schuster ja Bertram, 2013). TA süsteemi operon koosneb tavaliselt kahest geenist, millest üks kodeerib bakterile kahjulikku stabiilset toksiooni ja teine ebastabiilset antitoksiini, mis takistab toksiooni kahjulikku toimet (Harms *et al.*, 2018).

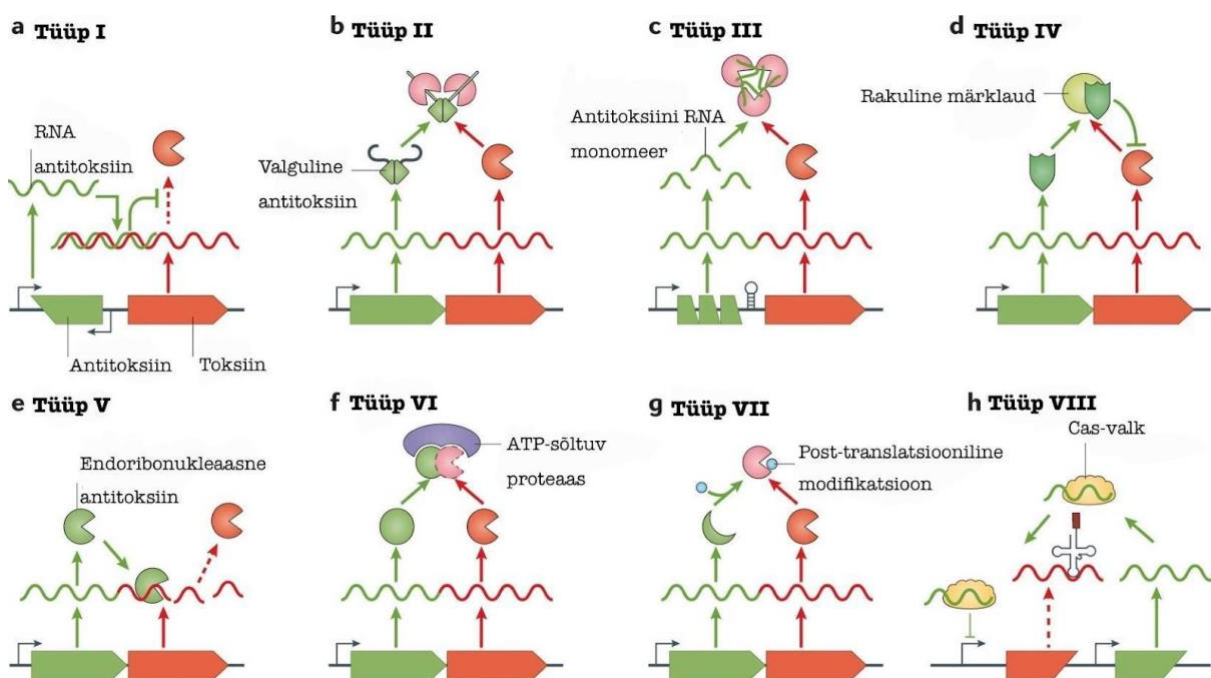
Esimene TA süsteem, *ccd*, avastati 1983. aastal *Escherichia coli* F-plasmiidis (Ogura ja Hiraga, 1983). Leiti, et *ccd* süsteem on vajalik plasmidi stabiliseerimiseks ja tagab plasmidi säilimise bakteripopulatsioonis (Gerdes *et al.*, 1986). Kui raku jagunemisel pärib tütarakk plasmidi koos TA operoniga, siis ei ole tema kasv häiritud. Juhul, kui tütarakk ei päri plasmidi või plasmiidis olev TA operon on kahjustatud, siis selliste rakkude kasv seiskub, kuna raku tsütoplasmas olevad valgulised TA kompleksid aktiveeruvad ebastabiilse antitoksiini lagunemise tagajärjel. Antitoksiini lagunemisel jääb tsütoplasmasse ainult toksioon, mis viib raku kasvu pärssimiseni või raku surmani (Goeders ja Van Melder, 2014). Hiljem leiti TA süsteemid ka bakterite kromosoomidest (Aizenman *et al.*, 1996; Pandey ja Gerders, 2005; Makarova *et al.*, 2009), sageli just kromosoomi integreerunud mobiilsetest geneetilistest elementidest (Díaz-Orejas *et al.*, 2017), mis aitavad kaasa bakterite kohanemisele (Durrant *et al.*, 2020).

Vaatamata sellele, et kromosomaalsed TA süsteemid on bakterites levinud, varieerub TA lookuste arv erinevates bakterites oluliselt. Andmed TA süsteemide andmebaasist TAFinder (TADB 3.0) näitavad, et 66% analüüsitud bakteriliikidest on üks kuni kakskümmend TA lookust, samal ajal kui 20% liikidest on neid isegi rohkem kui kakskümmend (Guan *et al.*, 2023). Pandey ja Gerdes (2005) näitasid, et TA lookusi on rohkesti vabalt elavates prokarüootides, kuid praktiliselt puuduvad peremeesorganismidega seotud obligatoorsetes parasiitides ja sümbiontides. Näiteks on vabalt elaval spiroheedil *Leptospira interrogans* ennustatud 117 TA lookust, samal ajal kui obligatoorsel rakusisesel spiroheedil *Borrelia burgdorferi*, mis on üks puukborrelioosi tekitajatest, ei ole ühtegi (Sharma *et al.*, 2015).

Kromosomaalsete TA süsteemide funktsioonid ja olulisus ei ole täpselt teada, kuna erinevates uuringutes on palju vasturääkivusi. Neid võib pidada isekateks geneetilisteks elementideks,

mis suudavad bakteri genoomis püsida vaatamata sellele, et nad ei anna rakkudele selektiivset eelist (Van Melder ja De Bast, 2009). Teisalt aga võivad TA süsteemid olla moodulid, millel on oluline mõju bakterite kasvu, füsioloogia, virulentsuse ja paljude muude funktsioonide reguleerimisele (Harms *et al.*, 2018; Guglielmini ja Van Melder, 2011). Varem arvati, et TA süsteemid võivad osaleda regulaatoritena bakteri stressivastuses, mõjutades biofilmi moodustumist, rakusurma või puhkeseisundit, sealhulgas antibiootikumile tundetute persistorite tekkimist (Wang ja Wood, 2011). Viimasel ajal aga on pigem levinud arvamus, et enamiku TA moodulite roll raku elutegevuses on väike või puudub üldse (Boss ja Kedzierska, 2023; Rosendahl *et al.*, 2020).

Praeguseks on kirjeldatud kaheksa erinevat tüüpi TA süsteemi, millest kõige paremini on uuritud tüüp II süsteeme (Joonis 1). TA moodulite klassifikatsioon põhineb sellel, kuidas toksiin ja antitoksiin üksteisega interakteeruvad ning kuidas antitoksiin toksiooni toksilisust pärsib (Singh *et al.*, 2021).



Joonis 1. TA süsteemide kaheksa tüüpi. Erinevat tüüpi TA süsteemid on esitatud joonise osadel a-h ja täpsem kirjeldus on toodud tekstis. Antitoksiin on roheline ja toksiin punane (Jurėnas *et al.*, 2022, kohandatud).

Enamasti on toksiinid valgud (v.a. VIII tüüpi kuuluvad toksiinid), kuid antitoksiinid võivad olla kas valgud või RNA molekulid (Jurėnas *et al.*, 2022). Näiteks toimib tüüp I, III ja VIII süsteemides antitoksiinina mittekodeeriv RNA (Gerdes *et al.*, 1986; Blower *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2018). Tüüp I antitoksiin on valdavalt väike mittekodeeriv antisens RNA (Joonis 1a), mis inhibeerib

toksiini translatsiooni seondudes selle mRNA-ga (Gerdes *et al.*, 1986). Kui antitoksiini RNA seondub toksiini mRNA 3' otsaga, siis toksiini RNA kas lagundatakse (Jahn ja Brantl, 2013) või blokeeritakse ribosoomide seandumine ja seega toksiini süntees (Kawano, 2012). Tüüp III süsteemide antitoksiini RNA seondub otseselt toksiiniga (Joonis 1c). Kolm antitoksiini RNA monomeeri seonduvad kolme toksiini molekuliga, moodustades trimeerse RNA-valk kompleksi, kus toksiini aktiivsus on inhibeeritud (Blower *et al.*, 2011). Ka tüüp VIII süsteemid, sarnaselt I tüübile, kodeerivad RNA antitoksiine, mis repressseerib toksiini RNA ekspressiooni (Choi *et al.*, 2018). Tüüp VIII süsteemis võib antitoksiini RNA toimida toksiini RNA antisensina (SdsR-RyeA süsteem) või mimikeerida CRISPR RNAd – seonduda Cas valguga ja tekkinud kompleksina inhibeerida toksiini transkriptsiooni (CreTA süsteem, Joonis 1h) (Choi *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2021).

Teiste TA süsteemide antitoksiinid on valgud. Tüüp II, VI ja VII antitoksiinid neutraliseerivad toksiini translatsiooni järgselt. Tüüp II süsteemide toksiini inhibeerimiseks seondub antitoksiini valk tugevalt toksiini valguga (Joonis 1b). Tüüp VI puhul on antitoksiini näol tegemist proteolüütilise adaptervalguga (Joonis 1f), mis põhjustab toksiini lagundamist proteaasi poolt (Aakre *et al.*, 2013) ja VII tüüpi süsteemides modifitseerib antitoksiin toksiini valku (Joonis 1g), mis inaktiveerib toksiini (Wang *et al.*, 2020).

Tüüp IV antitoksiin ei seonu otseselt toksiiniga vaid neutraliseerib toksiini kahjuliku mõju sellega, et kaitseb toksiini sihtmärki sellega seondudes (Joonis 1d) (Masuda *et al.*, 2012). Tüüp V süsteemi valguline antitoksiin toimib endoribonukleaaasina, mis lagundab toksiini mRNA-d (Joonis 1e) (Wang *et al.*, 2013).

1.2. Tüüp II TA süsteemid

Tüüp II TA operon kodeerib tavaliselt kahte valku – antitoksiini ja toksiini, mis omavahel seondudes moodustavad heteromeerse valgukompleksi, kus toksiin on inaktiivne (Harms *et al.*, 2018). Paljudel antitoksiinidel on lõdvalt volditud ehk mittestruktureeritud piirkond, mis muudab toksiiniga mitteseondunud antitoksiini lagundamise suhtes vastuvõtlikumaks (Kim *et al.*, 2018).

II tüüpi TA süsteemi operonis on kaks geeni lähestikku ja sageli kattuvad osaliselt (Hayes ja Kędzierska, 2014). Geenidevahelise kauguse erinevused võivad mõjutada toksiini/antitoksiini tootmise suhet, mis aitab reguleerida toksiini aktiivsust. Kusjuures geenide järjestus ei ole

fikseeritud: enamasti paikneb antitoksiini geen toksiini geenist ülesvoolu, kuid sageli võib järjekord olla ka vastupidine (Unterholzner *et al.*, 2013; Leplae *et al.*, 2011; Harms *et al.*, 2018). TA operoni võib reguleerida kas antitoksiin üksinda või terve TA kompleks (Guglielmini ja Van Melderren, 2011). Viimasel juhul võib kompleks toimida operoni transkriptsioonile nii repressori (Afif *et al.*, 2001) kui aktivaatorina (Cataudella *et al.*, 2012). Kui toksiini ja antitoksiini hulk rakus on võrdne, siis TA kompleks seondub promootorile ja surub alla operoni transkriptsiooni (Marianovsky *et al.*, 2001; Page ja Peti, 2016). Tingimustes, kus toksiini on rakus rohkem kui antitoksiini, aktiveerub TA mooduli transkriptsioon uuesti, sest toksiini ülehulk takistab antitoksiini seondumist promootorile (Afif *et al.*, 2001; Page ja Peti, 2016; Garcia-Pino *et al.*, 2010). Sellist regulatsiooni nimetatakse tingimuslikuks kooperatiivsuseks. Leidub ka kolmekomponendilisi süsteeme nagu näiteks *paaR2-paaA2-parE2*, kus operoni kolmas geen *paaR2* on peamine transkriptsiooni aktiivsuse regulaator, samal ajal kui PaaA2-ParE2 TA kompleks mõjutab operoni ekspressiooni vaid vähesel määral (Hallez *et al.*, 2010). Teise võimalusena võib kolmekomponendilise TA süsteemi kolmas osapool olla šaperonvalk, mis stabiliseerib antitoksiini ja abistab selle korrektset pakkimist (Bordes *et al.*, 2016).

Tüüp II TA süsteemid on laialt levinud nii bakterite kromosoomides kui ka plasmiidides (Kamruzzaman *et al.*, 2021). Ramisetty ja Santhosh (2016) bioinformaatiline analüüs näitas, et II tüüpi TA süsteemid liiguvad mikroobide genoomide vahel horisontaalse geeniülekanne kaudu, mis võis põhjustada II tüüpi TA süsteemide üllatavalt laia levikut ning suurt arvu arhede ja bakterite kromosoomides. On leitud, et II tüüpi TA süsteemid esinevad kromosoomides sagedamini kui plasmiidides. Goeders ja Van Melderren (2014) viitasid Peris-Bondia ja Van Melderreni (2013) avaldamata uuringule, kus selgus, et bakterikromosoom kodeerib keskmiselt 3,8 ja plasmiid 0,4 tüüp II süsteemi.

Märkimisväärne on ka see, et II tüüpi süsteemide esinemine ei sõltu kromosoomi suurusest. Pandey *et al.* (2005) läbi viidud TA süsteemide ennustamine bakterite genoomides näitas, et kuigi II tüüpi TA süsteeme on kromosoomides rohkesti, varieerub lookuste arv ja asukoht erinevates bakterites suuresti. 126st uuritud prokarüootsest genoomist ligikaudu pooltes leiti 1–5 TA lookust, samas kui neljandikul organismidest TA lookust ei tuvastatud (Pandey *et al.*, 2005).

II tüüpi TA süsteemidele on omistatud mitmesuguseid bioloogilisi rolle, nagu mobiilse DNA stabiliseerimine, osalemine faagitolerantsuses ja stressivastuses (Kamruzzaman *et al.*, 2021).

TA süsteemide osalemise kohta bakteri stressivastuses on andmed vastuolulised (Kamruzzaman *et al.*, 2021; Goormaghtigh *et al.*, 2018). Seevastu on DNAd stabiliseeriv funktsioon TA süsteemide puhul hästi kirjeldatud. Näiteks on näidatud bakteri *Vibrio vulnificus* *relBE1* ja *parDE1* süsteemide tähtsust suurte superintegronide stabiliseerimises ja ulatuslike deletsioonide piiramises (Szekers *et al.*, 2007), samal ajal osaleb *E. coli* TA süsteem CcdAB F plasmiiidi säilitamises (Ogura ja Hiragara, 1983). Ka faagikaitstes osalemine on mõne TA süsteemi puhul kinnitust leidnud. Näiteks kaitseb *E. coli* II tüüpi TA süsteem DarTG baktereid faagide vastu. DarT toksiin ADP-ribofosforüleerib faagi DNAd, mis inhibeerib faagi DNA ja RNA sünteesi, kusjuures nakatatud rakud ellu ei jää ja süsteem toimib abortiivse infektsiooni (Abi) elemendina, mis takistab faagi edasist levikut bakteripopulatsioonis (LeRoux *et al.*, 2022). Teine hästi iseloomustatud faagikaitset tagav TA süsteem on *E. coli*'s RnlAB, kus faagi infektsiooni korral aktiveerub RnIA, mis töötab RNAasina ja lagundab mRNA (Koga *et al.*, 2011). Kokkuvõtlikult peab mainima, et vaatamata toodud näidetele on praeguseks ajaks paljude II tüüpi TA süsteemide täpsed funktsioonid endiselt teadmata (Kamruzzaman *et al.*, 2021).

1.2.1. Tüüp II TA süsteemide toksiinide sihtmärgid

Toksiinid on valgud, mis blokeerivad bakterirakus bioloogiliselt olulisi protsesse (Lee ja Lee, 2016; Wen *et al.*, 2014). Kuna tavaliselt on toksiin antitoksiini poolt inhibeeritud, siis suudab toksiin bakterit mõjutada ainult siis, kui toksiini geen on üleekspresseeritud (Sonika *et al.*, 2023) või antitoksiini süntees on aeglasem kui lagundamine.

Tavaliselt on toksiinid ribonukleaasid, mis lagundavad mRNA-d (Vet *et al.*, 2019). Näitena võib tuua *E. coli* TA süsteemi MazEF. MazF on toksiin, mis toimib ribosoomist sõltumatu endoribonukleaasina ja näiteks *E. coli* MazF lõikab spetsiifiliselt mRNA-d ACA järjestusest ülesvoolu (Zhang *et al.*, 2005). See inhibeerib valgusünteesi, kuna katkiselt mRNA-lt ei saa transleerida aktiivset valku (Zhang *et al.*, 2005). Leidub ka ribosoomsõltuvaid toksiine (nt RelBE süsteemi RelE valk), mis pärsivad translatsiooni, lagundades ribosoomi A-saiti seondunud mRNA-sid (Griffin *et al.*, 2014; Pedersen *et al.*, 2003; Mäerand, 2018).

Toksiin võib translatsiooni peatada ka teistes etappides. RatAB süsteemi toksiin RatA blokeerib translatsiooni initsiatsiooni etappi (Zhang ja Inouye, 2011), sest toksiin seostub ribosoomi 50S subühikule ja takistab selle seondumist 30S subühikuga, mistõttu ei saa ribosoomi 70S moodustuda ja translatsiooni initsiatsioon on takistatud (Zhang ja Inouye, 2011).

Leidub ka toksiine, mille märklauaks on DNA replikatsioon või transkriptsioon (Harms *et al.*, 2018). Üks näide sellisest toksiinist on ParDE süsteemi toksiin ParE, mis inhibeerib DNA güraasi (Jiang *et al.*, 2002). Toksiin seondub güraasiga ja inhibeerib güraasi katalüütilise aktiivsuse sel hetkel, kui DNA on güraasi poolt lõigatud. Seega on toksiin-güraas kompleksis güraasi katalüütiline tsükkel takistatud ja lõigatud DNA vaheühendite kogunemine peatab replikatsiooni (Yuan *et al.*, 2010).

Lisaks sellele võivad toksiinid otseselt kahjustada ka muid raku elutähtsaid struktuure. Näiteks kahjustavad toksiinid Hok (Gerdes *et al.*, 1990) ja GhoT (Cheng *et al.*, 2014) rakumembraani. Mõlemad toksiinid sukelduvad membraani ja tekitavad poore, mis kahjustab membraani ja suurendab selle läbilaskvust (Gerdes *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 2018).

1.3. *Pseudomonas putida* TA süsteemid

Pseudomonas putida on gramnegatiivne pulkbakter, keda looduses võib leida mullas ja vees. Meie laboris uuritava *P. putida* PaW85 tüve isogeenne tüvi on *P. putida* KT2440, millel on ennustatud olevat kuni 15 kromosomaalset TA süsteemi, kusjuures kõik kuuluvad II tüüpi süsteemide hulka (Xie *et al.*, 2018). Deletsioonanalüüs, millega uuriti 13ne *P. putida* TA süsteemi funktsionaalsust, näitas, et vaid kaheksa neist TA lookustest kodeerib toksilist valku ja koguni viie süsteemi toksiin on rakule täiesti kahjutu ja ilmselt inaktiivne (Rosendahl *et al.*, 2020). Vaid nelja *P. putida* PaW85 TA lookust on põhjalikumalt uuritud: *graTA* (Ainelo *et al.*, 2019; Tamman *et al.*, 2014; Talavera *et al.*, 2019), *mqsRA* (Sun *et al.*, 2017), *mazEF* (Xie *et al.*, 2018) ja *xre-res* (Skjærning *et al.*, 2018).

1.3.1. *Pseudomonas putida* RES-Xre süsteem

P. putida lookus PP_2433-2434 kodeerib II tüüpi TA süsteemi RES-Xre (Skjærning *et al.*, 2018). Süsteemi ehitus vastab tavalisele tüüp II TA lookuse ehitusele, kus operonis asub antitoksiini geen (*xre*) toksiini geenist (*res*) eespool (Leplae *et al.*, 2011; Skjærning *et al.*, 2018).

Toksiini valgul on RES domeen. See on oma nime saanud valgu järjestuses konserveerunud kolme aminohappe järgi: arginiin (R), glutamaat (E) ja seriin (S), mis on eeldatavalt olulised valgu aktiivsuses (Makarova *et al.*, 2009; Skjærning *et al.*, 2018). Ka valgu 37. positsiooni türosiin (T37) on konserveerunud, kuid ei ole RES valgu toksilisuses oluline (Skjærning *et al.*,

2018). Xre-RES kompleksi valgustruktuuri analüüs tuvastas katalüütiliselt aktiivsete aminohapete konserveerumise järgi NADi seondumissaidi (Skjerning *et al.*, 2019).

Xre antitoksiini geen on samuti konserveerunud. Xre antitoksiini ja RES toksiini kompleksi struktuur näitas, et Xre valgul on DNAd siduv HTH (heelik-pööre-heeliks) domeen ja toksiiniga seonduv osa. Oletatakse, et toksiinis konserveerunud T37 võibki toksilisuse asemel olla oluline antitoksiiniga seondumisel (Skjerning *et al.*, 2018). Toksiiniga seondunud antitoksiin varjestab NAD⁺ seondumiskohta ja tõenäoliselt inhibeerib NAD⁺i seondumist toksiini C-terminaalse otsaga (Skjerning *et al.*, 2019). Selline toksiini aktiivsaiidi blokeerimine antitoksiini poolt on TA süsteemidel levinud (Lee ja Lee, 2016). Sarnaselt toimub toksiini neutraliseerimine ka VapBC (Lee ja Lee, 2016) ja REEB süsteemidel (Loris ja Garcia-Pino, 2014).

Samas on RES-Xre valkkompleksil ebatavaline stöhhiomeetria. Tavaliselt seonduvad toksiin ja antitoksiin suhtes 1:1 (Han *et al.*, 2011; Harms *et al.*, 2018), kuid RES-Xre kompleksis on valgud 1:2 stöhhiomeetrias, kus ühe RES toksiini dimeeriga seondub kaks antitoksiini dimeeri (Skjerning *et al.*, 2019).

Skjerning *et al.* (2018) näitasid, et RES toksiini ekspresseerimine põhjustab rakkudes NAD⁺ taseme languse, mis viitab, et RES lagundab NAD⁺i. Sellele viitab ka toksiini struktuur, mis sarnaneb ART perekonna ensüümidega (Skjerning *et al.*, 2018). ART ensüümidel leidub NAD⁺i lagundavatele toksiinidele sarnane NAD⁺i siduv tasku ning nad katalüüsivad ADP-riboosi ülekandmist NAD⁺lt sihtmärgile, milleks on tavaliselt erinevad valgud (Han ja Tainer, 2002). Erinevalt ART perekonnast, toimib aga NAD⁺i lagundavate toksiinide NAD⁺ hüdrolüüsimine ilma ADP-riboosi ülekandeta (Han *et al.*, 1996). Toksiini toimel vähenev rakusisene NAD⁺ tase viib makromolekulide biosünteesi ja rakkude kasvu aeglustumiseni, sest NAD⁺ on oluline koensüüm mitmetes rakulistes protsessides (näiteks DNA parandamisel ja glükolüüsis) (Covarrubias *et al.*, 2020).

P. putida RES toksiin on vaid mõõdukalt toksiline, sest kui genoomist eemaldada antitoksiini geen *xre*, siis suudab bakter endiselt kasvada, kuigi tema kasv muutub külmatundlikuks (Rosendahl *et al.*, 2020). Lisaks aeglasele kasvule madalatel temperatuuridel muudab RES toksiin bakterid tundlikuks ka mitmetele antibiootikumidele, nagu näiteks kanamütsiinile ja streptomütsiinile. Samas aga leiti, et kogu *xre-res* operoni eemaldamine bakterile mõju ei avalda (Rosendahl *et al.*, 2020). Lisaks kirjeldatud tulemustele on ühes bakalaureusetöös näidatud, et RES toksiin võib osaleda faagivastases kaitses (Blei, 2023).

1.4. Bakterite kaitsemehhanismid faagide vastu

Bakteriofaagid avastati 1915. aastal (Twort *et al.*, 1915) ja 1917. aastal kirjeldas F. d'Herelle nende võimet tappa bakterirakke (d'Hérelle, 1917). Bakteriofaagide elutsükkel võib olla kas lüütiline või lüsogeenne. Lüütilise tsükli korral suunab peremeesrakku sisenenud faag bakteri tootma enda genoomist koopiaid ja sünteesima viiruse valke, millest pärast moodustuvad uued faagipartiklid. Mõned faagid, nn mõõdukad faagid, kasutavad aga ka lüsogeenset tsükli, mis juhul faagi geneetiline materjal siseneb bakteriraku genoomi. Need faagid võivad aga ümber lülituda lüütilisse tsükklisse ja tavaliselt indutseerivad seda stressitingimused (Choi *et al.*, 2010).

Bakterid ja bakteriofaagid on omavahel pidevas võidurelvastumises. Bakterites on evolutsiooni käigus välja arenenud mitmesugused mehhanismid, mis neid faagide eest kaitsevad. Faagid omakorda muutuvad pidevalt, et neid kaitsemehhanisme ületada.

Enamik uuritud faagivastaseid süsteeme on seotud faagidega, kelle genoom on kaheahelaline DNA (Stern ja Sorek, 2012). Faagiresistentsuse mehhanism võib toimida faagi elutsükli erinevatel etappidel. Esimese võimalusena võivad raku kaitsemehhanismid takistada faagi seondumist retseptoriga ja seega genoomi raku sisestamist. Sellised mehhanismid on näiteks retseptorite peitmine eksopolüsahhariididega (Deveau *et al.*, 2002) või nende struktuuri muutmine (Wang *et al.*, 2019).

Järgmises etapis, kui faagi genoom on juba bakterirakku pääsenud, kasutatakse sisestatud DNA lagundamiseks näiteks restriksiooni-modifikatsiooni (RM) süsteeme (Wilson, 1991) või CRISPR-Cas süsteeme (Garneau *et al.*, 2010). Bakteri RM süsteemid lõikavad faagi genoomset DNAd (Wilson, 1991). Süsteem koosneb kahest põhilisest elemendist: restriksiooni- ja modifikatsiooniensüümist. Modifikatsiooniensüümid metüleerivad bakteriraku enda DNAd, tagades sellega kaitse endonukleaasi eest, kuna restriктаas tunneb ära metüleerimata saidi (Brocchi *et al.*, 2007). Restriksiooniensüümid suudavad ära tunda ja lõigata faagide DNAd, millel puudub bakterirakule omane metüleerimismuster (Brocchi *et al.*, 2007). Selle tulemusena lõigatakse sisenenud faagi genoom ja takistatakse faagi edasist replikatsiooni bakterirakkudes. Vastusena võib faagide genoom spetsiifiliselt muutuda nii, et faagid modifitseerivad enda DNAd. Samuti võivad faagid takistada restriksiooniensüümi toimimist (Tock ja Dryden, 2005).

Teine uuritud süsteem, mis toimib juba sisestatud faagigenoomi vastu, on CRISPR-Cas süsteem (klasterdatud, korrapäraste vahedega lühikesed palindroomsed kordusjärjestused ja nendega seotud *cas* geenid). CRISPR-Cas töötab omamoodi bakterite adaptiivse immuunsusena. CRISPR DNA koosneb lühikestest kordusjärjestustest, mille vahele salvestatakse võõra DNA fragmente esmasel kokkupuutel faagidega (Barrangou et al., 2007). Kui sama faag nakatab bakterit uuesti, siis transkribeeritakse CRISPR-lookusest faagispetsiifilist crRNAd, mis suunab Cas nukleaasi lõikama viiruse crRNAdega komplementaarset genoomi (Garneau et al., 2010).

On olemas ka teisi faagivastaseid süsteeme. Näiteks on Thoeris süsteem NAD⁺i lagundamisel põhinev faagivastane kaitsesüsteem (Ka et al., 2020). NAD⁺ on tähtis koensüüm, mis osaleb paljudes redoksreaktsioonides ja on vajalik raku metabolismiks (Covarrubias et al., 2020). Thoeris süsteem koosneb kahest geenist: *thsA* ja *thsB*. Mõlemate geenide kodeeritavad valgud on seotud NAD⁺i lagundamisega (Ka et al., 2020). ThsA sisaldab NAD⁺i või selle metaboliite siduvat domeeni ning ThsB omakorda TIR-domeeni, millel on osade valkude puhul näidatud NAD⁺ hüdrolaasi aktiivsust (Ka et al., 2020; Essuman et al., 2018).

1.4.1. Toksiin-antitoksiin süsteemide roll faagivastases kaitses

Kuigi paljude TA süsteemide tähtsus on siiani teadmata, näitavad viimaste uuringute andmed, et paljud neist võivad olla olulised faagivastases kaitses. Faagide inhibeerimist on näidatud nii I (Song ja Wood, 2020), II (Hazan et al., 2001), III (Fineran et al., 2009) kui ka IV (Dy et al., 2014) tüüpi TA süsteemide puhul.

On olemas TA süsteeme, mis on suunatud mitme erineva faagi vastu, kuid on ka selliseid, mis toimivad spetsiifiliselt konkreetse faagi vastu. *E. coli* tüüp II MazEF inhibeerib nakatumist P1-ga (Hazan et al., 2001) ja tüüp I Hok-Sok TA süsteem kaitseb bakterit T4 faagi vastu (Pecota ja Wood, 1996; Song ja Wood, 2020). Nimelt kahjustab *hok-sok* süsteemi Hok toksiin rakumembraani, mistõttu peatub raku metabolism ja seega ka faagi paljunemine (Pecota ja Wood, 1996). Spetsiifilisus T4 faagi vastu on tingitud sellest, et tõenäoliselt peatab faag mõneks ajaks peremeesorganismi transkriptsiooni, mis põhjustab toksiini ja antitoksiini tootmise blokeerimise (Pecota ja Wood, 1996). Kuna antitoksiin laguneb kiiremini, siis vabaneb toksiin antitoksiini kontrolli alt (Pecota ja Wood, 1996). Samal ajal suudab tüüp III ToxIN süsteem bakterit kaitsta mitme erineva faagi vastu (Fineran et al., 2009).

TA süsteem võib faagi paljunemist takistada erineva mehhanismiga. Toksiin võib kaitsta faagide vastu häirides virioni küpsemist või blokeerides faagi DNA replikatsiooni, seejuures

võib küll rakkude paljunemine peatuda, kuid rakud ei sure (Song ja Wood, 2018). Näiteks *E. coli* DarTG toksiin DarT ADP-ribosüülib faagi DNAd ja inhibeerib sellega faagi DNA sünteesi (LeRoux *et al.*, 2022). TenpIN süsteemi toksiin TenpN on endonukleas, mis lõikab mRNAd (Blower *et al.*, 2017). Sageli on toksiini bakteritsiidset toimet keeruline uurida, kuna on raske eristada, kas raku surm on tingitud toksiini toimest või faagist.

Erinevad faagivastased süsteemid võivad toimida ka sünergiliselt, omavahelises koostöös (Wu *et al.*, 2024). Nii on nähtud, et ka TA süsteemid võivad faagivastases kaitses olla olulised vaid koos RM süsteemiga. Fernández-García ja kolleegid (2024) näitasid *E. coli* MqsRAC toksiin/antitoksiin/šaperon süsteemi puhul, kuidas esmalt surub toksiin MqsR alla raku ainevahetuse, põhjustades uinavas olekus bakterite ehk persistorite teket. See omakorda annab aega RM süsteemi aktiveerumiseks ja faagi DNA lagundamiseks (Fernández-García *et al.*, 2024).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Meie laboris tehtud bakalaureusetöös (Sander Blei, 2023) ilmnas, et bakteritüvi, mille *xre-res* operonist on eemaldatud antitoksiini geen *xre* võib olla paremini kaitstud mõne meie faagiraamatukogus oleva faagi eest kui *P. putida* metsiktüvi, kuid tulemused olid väga kõikumavad. Kuna aga ka Hedvig Tammani ja Rita Hõraku katsed viitasid, et RES toksiin võib mõjutada *P. putida* faagiresistentsust, siis otsustati *xre-res* süsteemi rolli lähemalt uurida.

Sellest tulenevalt olid käesoleva uurimistöö eesmärgid:

1. Testida RES toksiini osalus *P. putida* PaW85 faagivastases kaitstes
2. Isoleerida RES toksiini aktiivsust neutraliseerivaid mutante
3. Sekveneerida saadud mutandid, et uurida supressiooni mehhanismi
4. Võrrelda *P. putida* algse tüve PaW85, Xre antitoksiini deletsioonmutandi ja valitud supressormutantide faagitolerantsust, et selgitada RES toksiini võimalikku mõju faagi nakatamisefektiivsusele

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Kasutatud söötmed ja bakteritüved

Töös kasutatud bakteritüved on toodud Tabelis 1. Baktereid kasvatati LB (*lysogeny broth*) söötmes (1% trüpton, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl) või M9 minimaalsöötmes [200 ml vesiagar, 20 ml 10X M9 (7% Na₂HPO₄, 3% KH₂PO₄, 0,5% NaCl, 1% NH₄Cl), 0,5 ml mikroelemente (1,075% MgO, 0,2% CaCO₃, 5,13 % HCl, 0,45 % FeSO₄ x 7H₂O, 0,144% ZnSO₄ x 7H₂O, 0,112% MnSO₄ x 4H₂O, 0,025% CuSO₄ x 5H₂O, 0,028% CoSO₄ x 7H₂O, 0,006% H₃BO₃], kuhu oli C-allikaks lisatud naatrimbensoaati (lõppkontsentratsioon 0,2%). Tardsööde sisaldas 1,5% agarit. Vedelsöötmes kasvatamisel aereeriti kultuure loksutil.

Faagikatseteks valati tsiprofloksatsiini (0,03 µg/ml) sisaldavale tardsöötmele bakterimuru, milleks kasutati 0,3% agarit sisaldavat pehmeagari LB söödet (säilitati temperatuuril 42 °C). Faagide lahjendamiseks kasutati SM puhvrit (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄, 0,01% želatiin).

Tabel 1. Kasutatud *P. putida* bakteritüved

Bakteritüvi	Iseloomustus	Viide allikale
PaW85	Metsiktüvi	Bayley <i>et al.</i> , 1977
$\Delta xre-res$	PaW85 deletsioonmutant, millest on eemaldatud <i>xre-res</i> operon	Rosendahl <i>et al.</i> , 2020
Δxre	PaW85 deletsioonmutant, milles <i>xre-res</i> operonist on eemaldatud antitoksiini geen <i>xre</i>	Rosendahl <i>et al.</i> , 2020
M1-M80	Esimesest ujumiskatses isoleeritud 80 Δxre supressormutanti	Käesolev töö
MU1-MU17	Teisest ujumiskatses isoleeritud 17 Δxre supressormutanti	Käesolev töö

2.2.2. Faagitolerantsuse testimine agarsöötmeil

RES toksiini mõju testimiseks *P. putida* faagitaluvusele võrreldi nakatamiskatses omavahel tüvesid PaW85, $\Delta xre-res$, Δxre , MU7 ja MU10. Kasutatud faagid on esitatud Tabelis 2.

Kõiki tüvesid kasvatati üleöö (~24 h) temperatuuril 30 °C 5 ml LB vedelsöötmes aereerides kultuure loksutil. Eksponentsiaalse kasvufaasi rakkude saamiseks lahjendati üleöö kultuure ~12,5 korda 5 ml värskesse LB vedelsöötmesse ning baktereid kasvatati loksutil ~2,5 tundi 30 °C optilise tiheduseni (580 nm, OD_{580}) $\approx 0,7-1$.

Bakterimuruga tasside valamiseks kasutati nii bakteritüvede eksponentsiaalselt kasvavaid kui ka statsionaarse kasvufaasi (üleöö kasvanud) kultuure. Selleks segati bakterid kokku ≈ 5 ml LB pehmeagariga (0,3%) ja valati LB tardagariga (1,5%) tassidele, mis sisaldasid tsiprofloksatsiini (0,03 $\mu\text{g/ml}$). Rakkude kogus arvutati OD_{580} mõõtmisest saadud tulemuste põhjal nii, et eksponentsiaalse kasvufaasi rakkude ja üleöö kultuuride lõplik rakkude hulk murus oleks ligikaudu sama, $OD \approx 1$ rakutihedusega kultuure lisati 200 μl .

Uuritavatest faagifiltraatidest tehti $10^0 - 10^{-5}$ lahjendusread SM puhvrisesse ning iga lahjendust pipeteeriti bakterimurule 2 μ l. Tasse inkubeeriti üleöö temperatuuril 20 °C.

Tabel 2. Kasutatud faagid

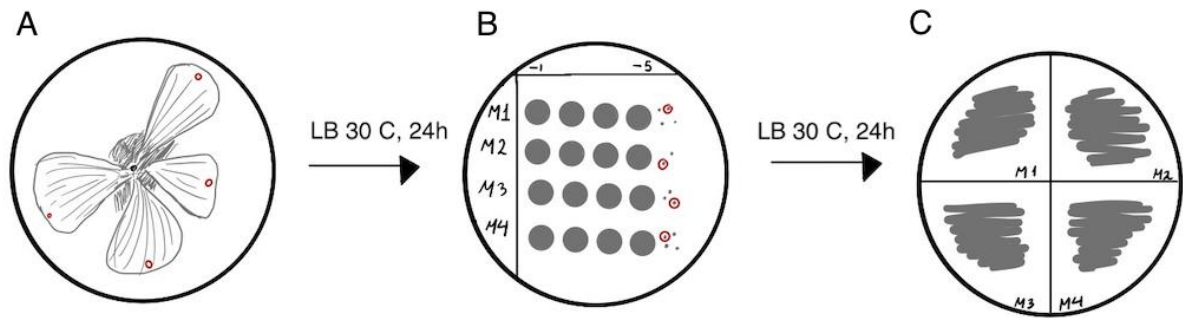
Faag	Perekond	Liik	Viide/eraldaja
Luke-3	G6	6A	Brauer <i>et al.</i> , 2024
IPa-2	G6	6A	Brauer <i>et al.</i> , 2024
TP_kompII-2	G6	6A	Rita Hõrak ja Hedvig Tamman
TP_kompII-3	G6		Rita Hõrak ja Hedvig Tamman
TP_kompIV-1	G6	6A	Rita Hõrak ja Hedvig Tamman
TP_kompIV-2	G6		Rita Hõrak ja Hedvig Tamman

2.2.3. Ujumiskatse Δ xre supressormutantide isoleerimiseks

P. putida Δ xre tüve kasvatati üleöö (~16 h) LB vedelsöötmes temperatuuril 30 °C. Δ xre mutantide isoleerimiseks kasutati 0,3% LB agariga tasse. Iga tassi keskele tehti torkekülv 2 μ l üleöö kultuuriga ning kasvatati temperatuuril 20 °C kuni 72 tundi. Kuna Δ xre tüvi kasvab temperatuuril 20 °C aeglasemalt kui *P. putida* metsiktüvi, siis on Δ xre supressormutandid kergesti nähtavad kiiremini ujuvate sektoritena (Joonis 2A).

Mutantide isoleerimiseks võeti 72 tundi pärast külvi ujumisfrondist väljaulatuvate sektorite välimisest servast proovid, mis suspendeeriti 100 μ l 1x M9 puhvrises. Saadud kultuuridest tehti 10-kordsete lahjenduste rida (kuni 10^{-5} lahjenduseni), lahjendustest tehti 5 μ l külvilid LB tassile ja baktereid kasvatati üleöö temperatuuril 30 °C (Joonis 2B). Tassidelt saadud üksikkolooniaid kasutati järgmistes katsetes (Joonis 2C).

Supressormutante säilitati \approx 30% glütserooliga LB söötmes temperatuuril -80 °C.



Joonis 2. Supressormutantide isoleerimine *P. putida* Δxre tüvest. Ujumistassil on supressormutandid näha kiiremini liikuvate harudena (A). Kõrvalharudest võeti tükk proovi (märgitud punase täpina, A), mis lahjendati 10^{-5} lahjenduseni ning kasvatati LB tassil 24 tundi (B). Kõige väiksemast lahjendusest võeti juhuslikult valitud 1 koloonia (märgitud punase ringiga, B), mida kasutati edasisteks testideks (C).

2.2.4. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

Supressormutantide huvipakkuvate lookuste sekveneerimiseks paljundati nende vastavad lookused PCRga (Polymerase Chain Reaction). Kasutatud praimerid on toodud tabelis 3.

PCRis kasutati matriitsina vastava supressormutandi rakke. Reaktsioonimahuks oli 20 μ l. Lisaks matriitsile sisaldas reaktsioonisegu: 1 x PCR puhvrit (7,5 mM Tris-HCl (pH 8,8)), 0,2 mM dNTP, 10 pmol mõlemat praimerit ja 0,5 ühikut DreamTaq polümeraasi.

PCRi reaktsioon koosnes 25 tsüklist ja sisaldas järgnevaid etappe:

1. 96°C 30 sekundit
2. 55°C, 30 sekundit
3. 72°C, toksiini lookuse sünteesiaeg oli 2 minutit ja šaperoni sünteesiaeg oli 2,1 minutit.

Kuna matriitsina kasutati bakterirakke, siis tsükli eelnes 2-minutiline eelkuumutus 96 °C, mis oli vajalik rakkude lõhkumiseks. Pärast 25. tsükli järgnes 2-minutiline lisa süntees temperatuuril 72 °C.

Tabel 3. Kasutatud praimerid

Nimetus	Nukleotiidne järjestus (5'-3')	Kus kasutati
2433Sac	GAGAGCTCGCACGTGATTGTGTTCT	<i>xre-res</i> lookuspetsiifiline PCR ja sekveneerimine

2434Xba	GGTCTAGATGTCTTTTTTCGGCGCACA	<i>xre-res</i> lookusspetsiifiline PCR ja sekveneerimine
2434Hind	TATAAGCTTGTGGTGACCACGCCCTAGA	<i>xre-res</i> lookusspetsiifiline sekveneerimine
groS_alg	CTATCTCGAGCCTTGTAAATC	<i>groSL</i> lookusspetsiifiline sekveneerimine
groL_end	AGCTGGTCAAGGAAGTTGCT	<i>groSL</i> lookusspetsiifiline sekveneerimine
groL_sees	CACTCGTTTCACAGCACAAG	<i>groSL</i> lookusspetsiifiline sekveneerimine

2.2.5. Geelelektroforees

PCRi produktide analüüsimiseks geelelektroforeesil kasutati 1% TAE agarosgeeli, mis sisaldas etiidiumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,33 µg/ml. Proovid voolutati 1 x TAE puhvril (50 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA; pH 8,2) pingel 130 V 15 minutit. DNA fragmentide suuruse hindamiseks kasutati firma Thermo Scientific DNA markerit ZipRuler Express DNA Ladder 2, ready-to-use. DNA visualiseeriti UV valguses.

2.2.6. DNA sekveneerimine

Sekveneerimiseks töödeldi PCRi produkte eksonukleas I (ExoI; lõppkontsentratsioon 2,5 U/µl) ja aluselise fosfataasiga (SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*); lõppkontsentratsioon 1 U/µl) 15 minutit temperatuuril 37 °C ja sellele järgnes ensüümide inaktiveerimine 15 minutit temperatuuril 80 °C. Seejärel valmistati proovid ette kitiga “*Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*” firmalt *Applied Biosystem*. Sekveneerimiseks kasutati lookuse spetsiifilisi praimereid (Tabel 3).

Sekveneerimise programm koosnes 30 tsüklist ja sisaldas järgnevaid etappe:

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

Sekveneerimisproduktide sadestamiseks lisati igasse tuubi 2,5 µl 125 mM EDTA (pH 8,0) ja 30 µl 96% etanooli (-20 °C). Segu hoiti 15 minutit toatemperatuuril ja tsentrifugiti toatemperatuuril kiirusel 16 000 g 12 minutit. Tuubid koputati kuivaks ja sadet pesti 30 µl 75% etanooliga (-20 °C). Fuugiti 16 000 g juures toatemperatuuril 10 minutit ja koputati kuivaks. DNA sade lahustati 10 µl formamiidis. Proovid saadeti sekveneerimiseks Eesti Biokeskuse tuumiklaborisse.

Sekveneerimistulemusi analüüsiti Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) ja BioEdit 7.2 abil. Sekveneeritud järjestusi võrreldi Blast andmebaasis oleva *P. putida* KT2440 tüvega, mis on isogeenne laboris kasutatava PaW85 tüvega.

2.2.7. Genoomse DNA eraldamine

Baktereid kasvatati ≈16 h LB vedelsöötmes temperatuuril 30 °C. Bakteri kromosomaalne DNA eraldati kasutades Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA eralduskitti ning jälgiti tootja protokolliga.

DNA-d analüüsiti agaros-geelelektroforeesil ja kontsentratsioon mõõdeti NanoDrop spektrofotomeetriga (Thermo Scientific). DNA saadeti sekveneerimiseks tuumiklaborisse. Sekveneerimistulemusi analüüsis Age Brauer.

2.2.8. Mutantide fenotüübiliste erinevuste kirjeldamine

2.2.8.1. Mutantide eluea määramine

Mutantide pikaajalise elumuse leidmiseks külvati mutandid iga 2 nädala möödudes algselt LB-tassilt uuele LB-tassile. Külvatud mutante kasvatati 24 tundi temperatuuril 30 °C.

2.2.8.2. Mutantide analüüsimine erinevates kasvutingimustes

Supressormutantide temperatuuritundlikkust võrreldi *P. putida* metsiktüvega PaW85 nii LB tardsöötme kui vedelkultuuris. Temperatuuritundlikkuse kontrollimiseks tardsöötmele külvati LB-agarile 5 µl iga bakteritüve 10^{-1} kuni 10^{-6} lahjendustest. Tasse inkubeeriti 24 tundi temperatuuril 20 °C ja 30 °C.

Kasvu erinevusi LB-vedelkultuuris testiti temperatuuril 20 °C. Selleks lahjendati bakteritüve üleöö kultuuri nii, et $OD_{580} = 0,1$. Mikrotiiterplaadi kannudesse külvati 100 µl lahjendatud

bakterikultuure, mikrotiiterplaati inkubeeriti üleöö (≈ 16 tundi) temperatuuril $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ja proovide optiline tihedus (OD_{580}) mõõdeti iga 10 minuti järel (BioTek SYNERGY H1 microplate reader).

2.3. Tulemused

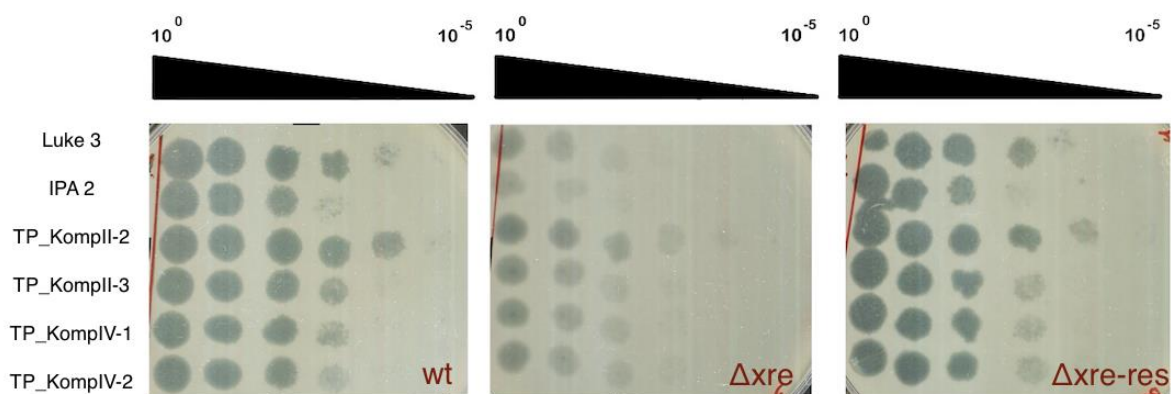
2.3.1. Xre antitoksiini puudumine suurendab *P. putida* faagiresistentsust

Sander Blei (2023) leidis, et *P. putida* Δxre tüve faagitundlikkus faagiraamatukogus olevate G1 perekonna Kassivere faagi ja G2 perekonna Rõõmu faagi suhtes on vähenenud 10 korda. G6 perekonna faagidega ilmsid kõikuvad tulemused, kus mõnikord oli näha faagitundlikkuse vähenemist ja mõnikord ei olnud. Ka Rita Hõraku ja Hedvig Tammani tehtud katsed G6 faagidega andsid kõikuvaid tulemusi.

Käesolevas töös soovisin selgitada Δxre tüve tundlikkust G6 perekonna faagidele. Selleks nakatasin *P. putida* metsiktüve PaW85, Δxre -res ja Δxre tüvesid meie laboris olevate G6 perekonna faagidega. Katset kordasin 5 korda nii eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudega kui ka üleöö kultuuridega.

Sõltumatud katsed näitasid, et G6 perekonna faagid nakatavad PaW85 metsiktüve ja Δxre -res TA-deletsioontüve sarnaselt (Joonis 3). Samas nakatasid IPA 2, TP_KompII-2, TP_KompII-3, TP_KompIV-1 ja TP_KompIV-2 faagid antitoksiinidefektset Δxre tüve keskmiselt 10 korda halvemini kui PaW85 ja Δxre -res tüvesid. Luke 3 faagi vastu on Δxre tüvi 100 korda paremini kaitstud kui *P. putida* PaW85 ja Δxre -res bakterid. Sama tulemus ilmsid nii eksponentsiaalse kui statsionaarse kasvufaasi rakkudega valatud tassidel.

Sellest võib järeldada, et *P. putida* RES toksiin võib antitoksiini puudumisel kaitsta *P. putida*'t G6 faagide vastu.

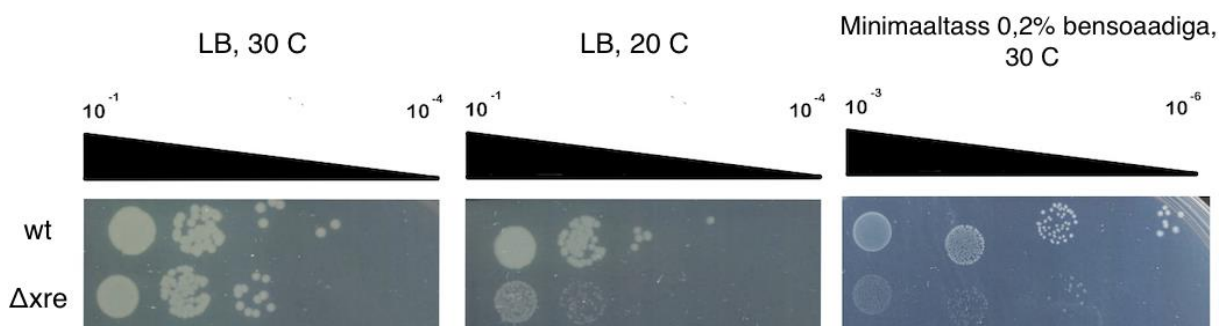


Joonis 3. Faagide lüüsilaigud *P. putida* metsiktüve PaW85 (wt), Δxre ja $\Delta xre-res$ tüvede bakterimurudel. Kuue G6 perekonna faagiga tehti kokku 5 sõltumatut katset. Esitatud on ühe katse tulemused. Katsed teostati LB agarsöötmel, mis sisaldas tsiprofloksatsiini (0,03 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Pilt on tehtud pärast ≈ 24 h kasvu temperatuuril 20 °C.

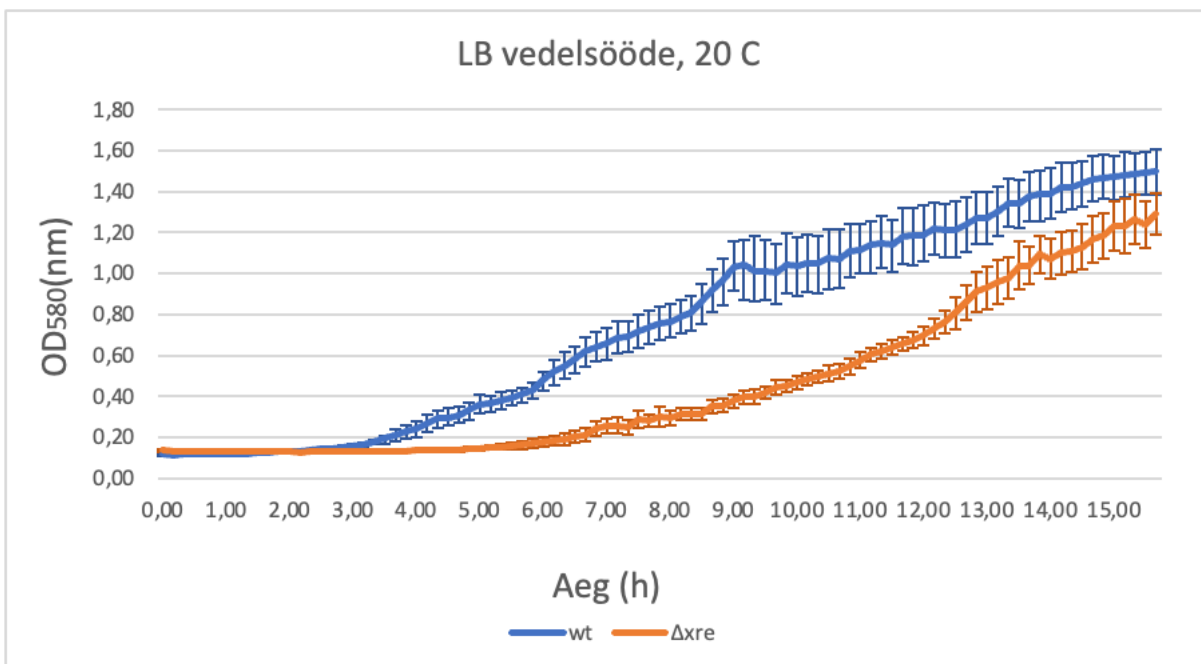
2.3.2. RES toksiin inhibeerib *P. putida* kasvu

Eelnevalt oli teada, et RES toksiin inhibeerib bakteri kasvukiirust optimumist (30 °C) madalamal (25 °C) temperatuuril (Rosendahl *et al.*, 2020). Toksiini mõju uurimiseks 20 °C kasvatati *P. putida* PaW85 ja Δxre tüve erinevatel temperatuuridel ja söötmetel.

Kui temperatuuril 30 °C LB tassil tüvede kasv ei erinenud, siis 20 °C kasvanud Δxre tüve kolooniad olid algse PaW85 tüve kolooniatest väiksemad ning aeglasemat kasvu on näha kõikides lahjendustes (Joonis 4). Minimaaltassil, kus süsinikuallikaks oli bensoaat, kasvas Δxre tüvi halvemini kui metsiktüvi ka temperatuuril 30 °C. Testiti ka bakteritüvede kasvukiirust vedelkultuuris temperatuuril 20 °C (Joonis 5). Selgus, et temperatuuril 20 °C kasvab Δxre tüvi märgatavalt aeglasemalt kui metsiktüvi.



Joonis 4. *P. putida* metsiktüve ja Δxre tüve kasv erinevates tingimustes. Esitatud on *P. putida* PaW85 metsiktüve (wt) ja Δxre tüve kasv LB söötmel ja 0,2% bensoadiga minimaaltassil. Katseid korrati rohkem kui 5 korda. Esitatud on ühe katse tulemused. Pildid on tehtud pärast ~ 24 h kasvatamist temperatuuril 30 °C või 20 °C.



Joonis 5. *P. putida* metsiktüve ja Δxre tüve kasvukõverad temperatuuril 20°C. *P. putida* metsiktüve (PaW85) ja Δxre tüve kasvatati mikrotiiterplaadis LB söötmes temperatuuril 20 °C ja graafikul esitatud optiline tihedus registreeriti iga 10 minuti järel. Tehti üks katse 24 tehnilise paralleeliga. Graafikul esitatud veapiirid väljendavad standardhälvet.

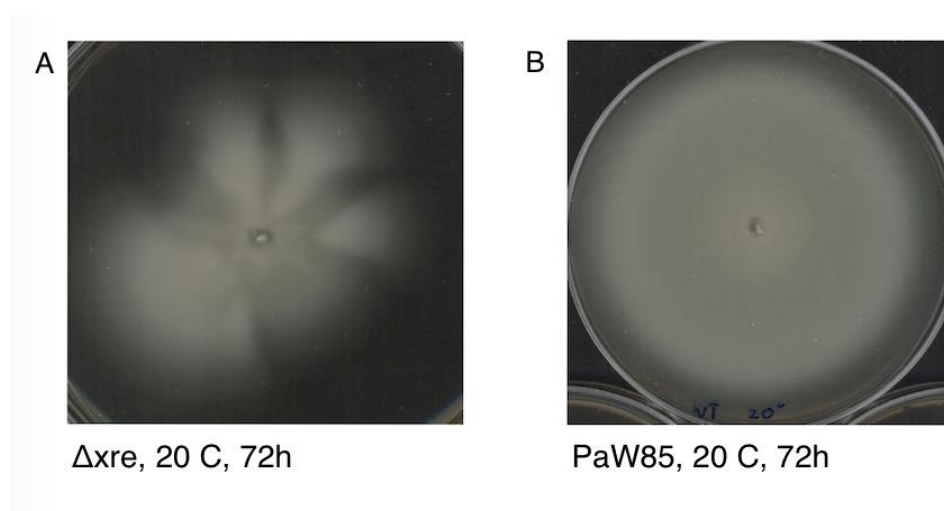
2.3.3. Esimesed RES toksiini supressormutandid: lisaks RES geeni muteerumisele supresseerivad Δxre tüve kasvudefektiga mutatsioonid mujal *P. putida* genoomis

Eelmised katsed kinnitasid Δxre tüve madalamat kasvukiirust võrreldes *P. putida* metsiktüvega. Kuna ka faagiga nakatamise katsed tehti 20 °C, siis võib olla Δxre suurenenud faagiresistentsus põhjustatud lihtsalt bakterite aeglasemast kasvust. Selle testimiseks otsustati isoleerida toksiini supressormutante. Oletati, et faagi nakatamise katsed osaliselt või täielikult taastatud kasvukiirusega supressormutantidega võimaldaksid selgitada ja eristada RES toksiini funktsionaalsuse ja kasvukiiruse rolli faagiresistentsuses.

Selleks, et leida toksiini supresseerivaid mutatsioone, kasvatati Δxre tüve temperatuuril 20 °C, kus tehti faagiga nakatamise katsed ja kus toksiini mõju kasvukiirusele on suur. Δxre tüve supressormutandid isoleeriti ujumistassidelt, kus RES toksiini tõttu kasvavad bakterid aeglasemalt kui metsiktüüpi tüvi (Joonis 6), kuid taastunud kasvuga mutandid tekitavad ujumisfrondist väljaulatuvaid sektoreid (Joonis 6A).

Katses isoleeriti 80 supressormutanti. Enne katset eeldati, et mutatsioonid toimuvad toksiini geenis, mida katsetulemustes ka nähti (Tabel 4). Väga mitmel mutandil oli toimunud ühe nukleotiidi deletsioonist tingitud raaminihe alates toksiini 17. aminohappest (37,5%) või 141. aminohappest (6,25%). Enamik deletsioone oli toimunud sõltumatult, sest mutandid olid eraldatud erinevatelt ujumistassidelt. 18,75% mutantidest oli toimunud ühenukleotiidne

asendusmutatsioon, mis tõi kaasa aminohappe muutuse toksiinis (Tabel 4). Ka mõned asendusmutatsioonid kordusid sõltumatutel kloonidel, nagu näiteks RES toksiini 108. positsioonis oleva valiini asenduminealaniiniga, mis ilmnes 4-lt erinevalt ujumistassilt isoleeritud kloonil. Üllatuslikult oli paljudel mutantidel (31,25%) toksiini geen täiesti terve, mis viitas, et supressormutatsioonid pidid olema toimunud mujal bakteri genoomis. Viiel kloonil jäi mutatsioon selgitamata, kuna toksiini geeni PCR ei tulnud välja (4) või sekveneerimistulemus oli lugematu (1).



Joonis 6. *P. putida* PaW85 ja Δxre tüvega ujumistassid. A: Δxre tüvega ujumistass ja B: *P. putida* metsiktüvega PaW85 ujumistass, pärast 72 tundi kasvu temperatuuril 20°C.

Tabel 4. Supressormutantide mutatsioonid toksiini piirkonna sekveneerimisel

Mutantide arv (N80)	Osakaal (%)	RES toksiini geenis või valgus muutunud järjestus
30	37,5%	ΔG , põhjustab raaminihke pärast 17. aminohapet
25	31,25%	Toksiin terve
15	18,75%	Aminohapet muutev asendusmutatsioon: V108A (6x), L106P (5x), A103T (1x), P114T (1x), R91L (1x), M60K (1x)
5	6,25%	ΔG , põhjustab raaminihke pärast 141. aminohapet
5	6,25%	Teadmata

Pärast sekveneerimistulemuste analüüsi taheti edasi uurida neid kloone, kellel toksiini geen oli terve. Ootamatult olid aga 1,5 kuud hiljem, kui kõik tulemused olid kätte saadud,

huvipakkuvad mutandid surnud (säilitati LB tassil temperatuuril 4 °C) ja ei suutnud pärast edasi külvamist üles kasvada, mille tõttu ei saanud edaspidiseid katseid läbi viia.

2.3.4. Supressormutandid teisest katsest: Δxre tüve mutantidel leitud mutatsioonid GroESL šaperonis

Teine katse viidi läbi samamoodi kui esimene, kuid saadud mutantidest valmistati kohe glütserooliga säilituskultuurid, mida hoiti -80 °C juures. Teises katseis isoleeriti 17 mutanti, kes saadi kuuelt erinevalt ujumistassilt (Tabel 5). Kloonide toksiini lookuse sekveneerimisest saadud tulemused sarnanesid esimese katse tulemustega (Tabel 4). Oli suur hulk kloone, kellel oli toimunud G nukleotiidi deletsioon, mis põhjustas alates 17-st aminohappest raaminihke. Neljal kloonil olid toimunud asendusmutatsioonid, mis erinesid eelmise katse omadest. 17-st kloonist saadi 4 mutanti, kellel toksiini piirkond oli terve ja ühel mutandil, MU10, oli toimunud ka sünonüümne asendusmutatsioon, milles nukleotiidi muutus ei muutnud aminohapet (Tabel 5). Terve *res* geeniga mutantide (MU7, MU9, MU10 ja MU12) ja MU11 genoomid sekveneeriti. Genoomi sekveneerimine tuvastas neljal mutandil mutatsiooni GroESL šaperoni kodeerivates geenides: *groL* geenis oli toimunud kolmenukleotiidne deletsioon ($\Delta L222$) kloonidel MU7 ja MU9 ning kloonidel MU10 ja MU12 oli GroES valgus 15. positsiooni seriin muutunud arginiiniks (S15R). Kuna sama mutatsiooniga kloonid pärinesid ühelt ujumistassilt, siis tõenäoliselt, ei ole need sõltumatud mutandid.

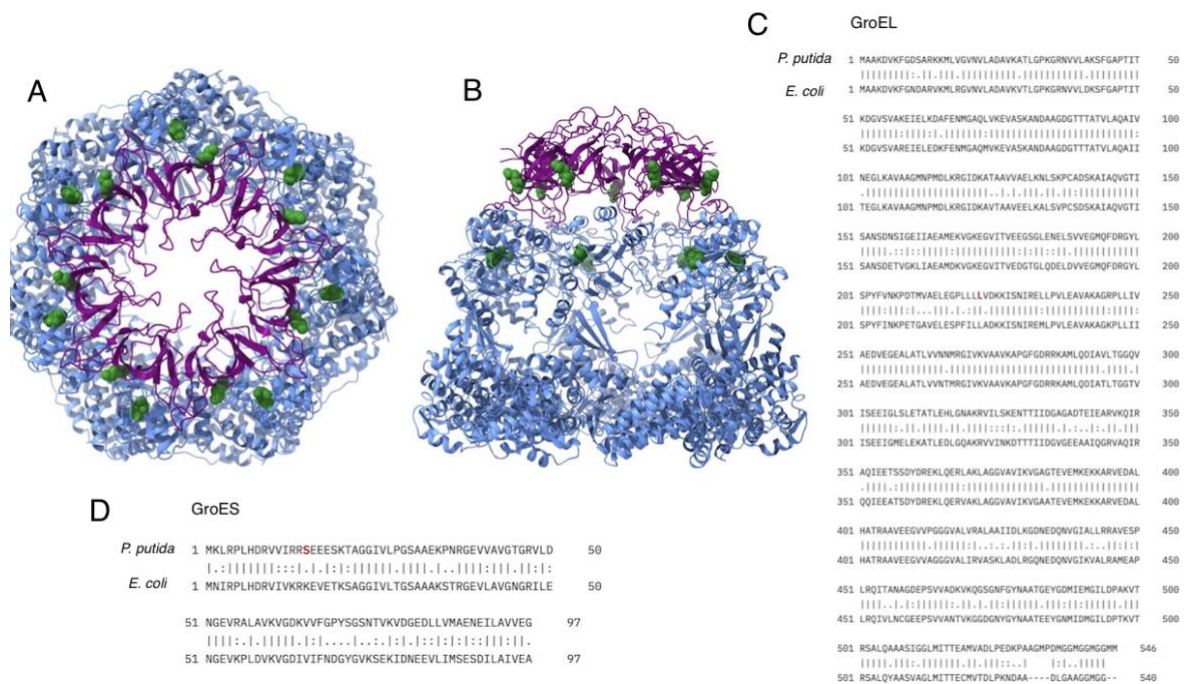
GroESL šaperoni struktuurile mutatsioone paigutades selgus üllatavalt, et kuigi mutatsioonid olid toimunud erinevates geenides, paiknesid muutused kahes valgus šaperoni struktuuris väga lähestikku, GroES ja GroEL subühikute kokkupuute koha lähedal (Joonis 7). MU11 klooni genoomi sekveneerimine tuvastas toksiini geenis osalise duplikatsiooni.

Tabel 5. Teisest ujumiskatsest saadud kloonidel tuvastatud supressormutatsioonid toksiinis ning genoomis

Mutant	RES toksiini mutatsioon	Mutatsioon genoomis
MU1	Asendusmutatsioon P140L	
MU2	Asendusmutatsioon Q26G	
MU3	ΔG , raaminihe pärast 17. aminohapet	
MU4	Asendusmutatsioon L145G	

MU5	ΔG, raaminihe pärast 17. aminohapet	
MU6	ΔG, raaminihe pärast 17. aminohapet	
MU7	Toksiin terve	3-nukleotiidne (CTG) deletsioon <i>groL</i> geenis, ΔL222 šaperoni GroESL GroEL subühikus
MU8	ΔG, raaminihe pärast 17. aminohapet	
MU9	Toksiin terve	3-nukleotiidne (CTG) deletsioon <i>groL</i> geenis, ΔL222 šaperoni GroESL GroEL subühikus
MU10	Nukleotiidi muutus, kuid aminohape jäi samaks: L12L	C→G asendusmutatsioon <i>groS</i> geenis, S15R asendus šaperoni GroESL GroES subühikus
MU11	RES geenis 32-nukleotiidne duplikatsioon	
MU12	Toksiin terve	C→G asendusmutatsioon <i>groS</i> geenis, S15R asendus šaperoni GroESL GroES subühikus
MU13	ΔG, raaminihe pärast 17. aminohapet	
MU14	ΔG, raaminihe pärast 17. aminohapet	
MU15	ΔG, raaminihe pärast 17. aminohapet	
MU16	ΔG, raaminihe pärast 17. aminohapet	
MU17	Asendusmutatsioon L63F	

Samalt ujumistassilt isoleeritud supressormutandid on märgitud sama värviga.



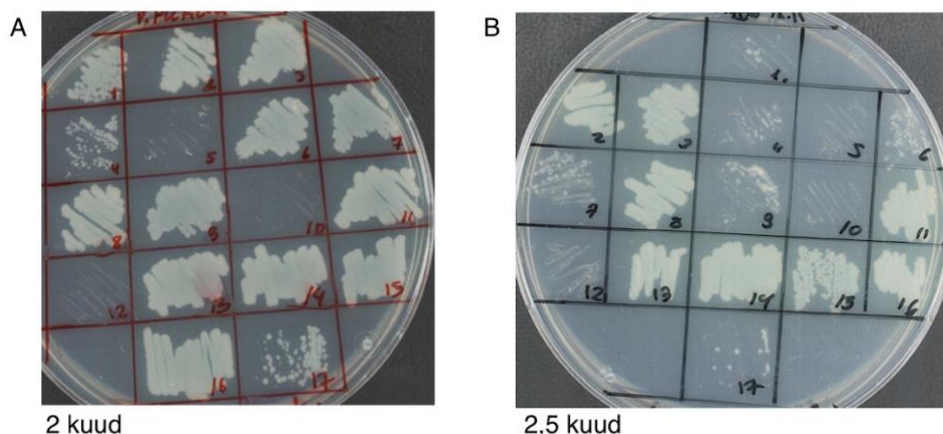
Joonis 7. GroESL šaperoni struktuur. A: *E. coli* tüve K12 GroESL šaperoni ühe poole struktuur pealtvaates. GroES on esitatud lilla värviga ja GroEL on sinine. Rohelisena on näidatud teisest ujumiskatses saadud kloonide mutatsioonide asukohad. B: Sama struktuur kõrvaltvaates. C: *P. putida* ja *E. coli* GroEL valkude aminohappeliste järjestuste võrdlus. Punasena on märgitud 222. positsioonis deleteerunud leutsiini asukoht. D: *P. putida* ja *E. coli* GroES valkude aminohappeliste järjestuste võrdlus. Punasena on märgitud mutatsiooni asukoht.

Kuna esimene supressormutantide isoleerimise katse näitas, et terve toksiiniga mutandid surevad LB tassil pikaajalisel säilitamisel (temperatuuril 4 °C), samas kui enamik muteerunud toksiiniga mutantidest jäid ellu, siis kontrolliti teise katse kloonide pikaajalist elumust (Joonis 8). RES_ΔG mutantidel, kellel oli toimunud raaminihe alates 17-st aminohapest, ei vähenenud pärast 10 nädalast LB tassil olekut rakkude elumus üldse või langes see vaid vähesel määral, samuti kasvasid need mutandid erinevates kasvutingimustes metsiktüvega sarnaselt (Tabel 6). Vaid MU5 mutandil olid kõik rakud surnud juba 6. nädalaks ja kasv sarnanes Δxre tüvele. Seega arvatavasti on MU5 pigem algne Δxre tüvi ning sekveneerimislugemites on esinenud viga ja 6-nukleotiidi pikkuses G-de järjestuses tegelikult tuvastatud deletsiooni ei ole toimunud. Asendusmutatsiooniga kloonide (MU1, MU2, MU4 ja MU17) pikaajaline elumus oli varieeruv (Joonis 8), kuid kasv teistes tingimustes oli sarnane *P. putida* metsiktüvega (Tabel 6).

GroESL mutandid käitusid erinevalt. Mutantse GroES valguga MU10 ja MU12 tüved surid 8. nädalaks, samal ajal kui mutantse GroEL valguga MU7 ja MU9 kloonidel hakkas rakkude hulk vähenema alles 10. nädalal. Samuti kasvasid GroESL mutandid LB tassil temperatuuril 20 °C veidi halvemini kui *P. putida* metsiktüvi PaW85 (Joonis 9).

Minimaaltassil 0,2% bensoaadiga kasvasid GroES mutandid (MU10 ja MU12) paremini kui Δxre tüvi, peaaegu võrdväärselt metsiktüvele. Seevastu GroEL mutantid (MU7 ja MU9), ei suutnud üldse kasvada (Joonis 9). LB söötmel temperatuuril 30 °C kasvasid kõik supressormutandid sarnaselt metsiktüvele.

Tulemustest võib järeldada, et GroEL ja GroES mutandidel on RES toksiini mõju tugevalt inhibeeritud.



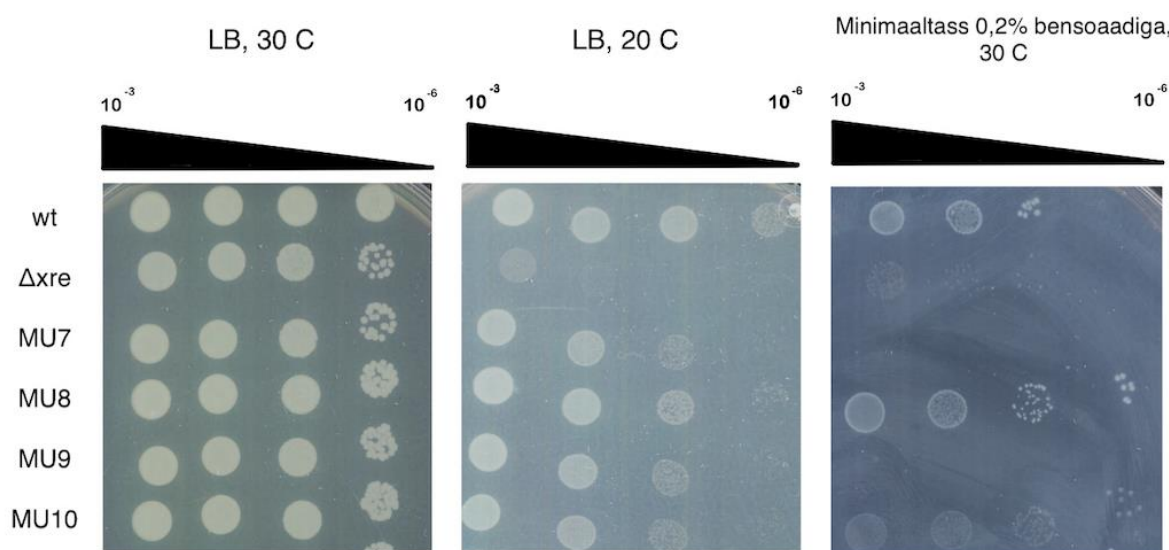
Joonis 8. Teise ujumiskatse supressormutantide elumus. A: teisest ujumiskatses isoleeritud supressormutantide elumus pärast 2 kuu pikkust inkubeerimist temperatuuril 4 °C. B: samade mutantide elumus 2,5 kuu pärast. Kloonid külvati ümber algsest LB tassilt uuele LB tassile iga 2 nädala järel ning kasvatati 30 °C ~24 h. Numbrid 1-17 tähistavad supressormutante MU1-MU17.

Tabel 6. Teise katse kloonide elumus ja kasv erinevates kasvutingimustes

Mutant	Aeg (nädalad)					LB tass		Minimaaltass bensoaadiga	0,2%
	2	4	6	8	10	20°C	30°C	20°C	
MU1 (RES_P140L)	Green	Green	Green	Yellow	Orange	=wt	=wt (=Δxre)	=wt	
MU2 (RES_Q26G)	Green	Green	Green	Green	Green	=wt	=wt (=Δxre)	=wt	
MU3 (RES_ΔG)	Green	Green	Green	Green	Green	=wt	=wt (=Δxre)	=wt	
MU4 (RES_L145G)	Green	Green	Yellow	Yellow	Orange	<wt	=wt (=Δxre)	=wt	
MU5 (RES_ΔG)	Green	Orange	Red	Red	Red	=xre	=wt (=Δxre)	=xre	
MU6 (RES_ΔG)	Green	Green	Green	Green	Yellow	=wt	=wt (=Δxre)	=wt	
MU7 (GroEL_ΔL222)	Green	Green	Green	Green	Orange	<wt	=wt (=Δxre)	<<xre	
MU8 (RES_ΔG)	Green	Green	Green	Green	Green	=wt	=wt (=Δxre)	=wt	

MU9 (GroEL_ΔL222)	■	■	■	■	■	<wt	=wt (=Δxre)	<<xre
MU10 (GroES_S15R)	■	■	■	■	■	<wt	=wt (=Δxre)	<wt
MU11 (RES_Duplikatsioon)	■	■	■	■	■	=wt	=wt (=Δxre)	=wt
MU12 (GroES_S15R)	■	■	■	■	■	<wt	=wt (=Δxre)	<wt
MU13 (RES_ΔG)	■	■	■	■	■	=wt	=wt (=Δxre)	=wt
MU14 (RES_ΔG)	■	■	■	■	■	=wt	=wt (=Δxre)	=wt
MU15 (RES_ΔG)	■	■	■	■	■	=wt	=wt (=Δxre)	=wt
MU16 (RES_ΔG)	■	■	■	■	■	=wt	=wt (=Δxre)	=wt
MU17 (RES_L63F)	■	■	■	■	■	=wt	=wt (=Δxre)	=wt

■ - Rakkude hulk ei ole vähenenud, ■ - Rakkude hulk on vähenenud 40-50% võrra, ■ - Rakkude hulk vähenenud 80-90% võrra, ■ - Kõik rakud on surnud
 =wt - kasv sarnanes *P. putida* metsiktüvega, <wt – kasvab mõnevõrra halvemini kui metsiktüvi, =Δxre – kasv sarnaneb Δxre tüve kasvuga, <<Δxre – kasvab halvemini kui Δxre.



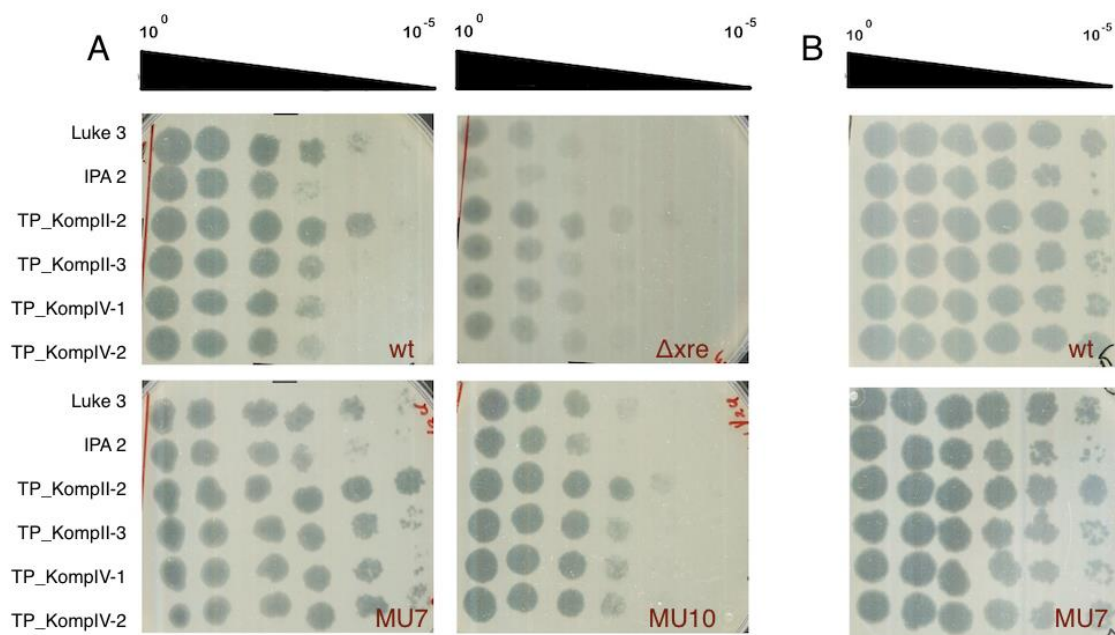
Joonis 9. Leu222 deletsioon GroESL šaperoni GroEL subühikus põhjustab kasvudefeki bensoadisöötmel. Esitatud on *P. putida* metsiktüve, Δxre tüve ja teise katse GroESL mutantide MU7 (GroEL_ΔL222), MU8 (RES_ΔG), MU9 (GroEL_ΔL222) ja MU10 (GroES_S15R) kasv LB tassil ja minimaaltassil 0,2% bensoadiga. Katset on tehtud üks kord. Pildid on tehtud pärast ~24 h kasvu temperatuuril 30 °C või 20 °C.

2.3.5. GroES ja GroEL mutandid kaitsevad faagide vastu erineval määral: mutantse *groL* geeniga tüvi on faaginakkusele tundlikum kui mutantse *groS* geeniga tüvi

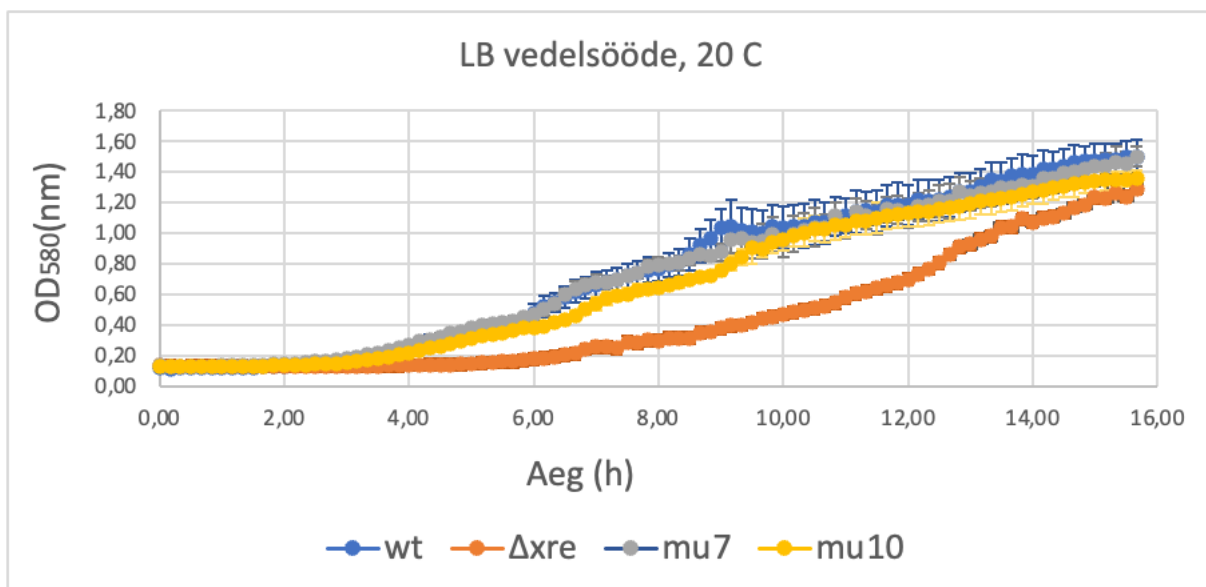
Erinevused GroES ja GroEL mutantidel erinevates kasvutingimustes viisid küsimuseni, kas nad erinevad ka faagitundlikkuses. Selle uurimiseks võrreldi MU7 (*groL*_{ΔL222}) ja MU10 (*groS*_{S15R}) ning *P. putida* metsiktüve PaW85 ja Δ*xre* tüvesid faaginakatamise katses. Tehti kolm katset eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudega ja kolm katset üleöö kultuuridega. Katsed näitasid, et kõikide faagide puhul on mutantse *groS* geeniga MU10 nakkusele vähemalt 10 korda tundetum kui *groL* mutant MU7 (Joonis 10A, esitatud ainult eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudega tehtud katse tulemused). Mõnes katses näis, et MU7 on G6 faagidele tundlikum kui metsiktüvi (Joonis 10A), kuid teises katses polnud kahe tüve vahel erinevusi (Joonis 10B). Nende kõikuvate tulemuste tõttu ei saa kindlalt järeldada, et MU7 oleks testitud faagide suhtes tundlikum kui metsiktüvi, kuid kindlasti pole tal faagide vastu tugevamat kaitset. MU10 on osade faagide (IPA 2, Luke 3 ja TP_KomplI-2) vastu 10 korda enam kaitstud kui metsiktüvi, kuid siiski on ta nakkusele tundlikum kui Δ*xre* tüvi.

Kuna eelnevalt arvati, et Δ*xre* tüve faagivastane kaitse võib olla seotud tema inhibeeritud kasvukiirusega, siis mõõdeti GroESL šaperoni mutantide kasvukiirust (Joonis 11). Tulemused näitasid, et mutantide kasvukiirus on kas metsiktüvega samasugune (GroEL mutant) või vaid väga vähesel määral madalam (GroES mutant).

Sellest võib järeldada, et Δ*xre* tüve faagiresistentsus ei ole tingitud vaid tema kasvukiiruse langusest ning RES toksiin suurendab bakteri faagivastast kaitset.



Joonis 10. Faagide lüüsilaiagud erinevate bakteritüvede murudel. A: Labori faagikollektsioonis olevate G6 perekonna faagidega nakatati *P. putida* PaW85 (wt), Δxre , mutantse *groL* geeniga MU7 ja mutantse *groS* geeniga MU10 tüvesid. Kokku viidi läbi 3 sõltumatut katset. Esitatud on ühe katse tulemused. B: G6 perekonna faagidega nakatati *P. putida* PaW85 (wt) ja mutantse *groL* geeniga MU7. Katsed teostati LB agarsöötmel, mis sisaldas tsiprofloksatsiini (0,03 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Bakterimuru valamiseks kasutati eksponentsiaalse kasvufaasi bakterikultuure ($\text{OD}_{580}=0,7-1$). Pildid on tehtud pärast ~ 24 h kasvatamist temperatuuril 20°C .



Joonis 11. Mutatsioonid GroES ja GroEL valkudes taastavad *P. putida* Δxre tüve kasvukiiruse. *P. putida* metsiktüve (PaW85), Δxre , MU7 ja MU10 tüvede kasvukõverad 20°C LB söötmes. Tehti üks katse 24 paralleeliga. Graafikul esitatud veapiirid tähistavad standardhälvet.

2.4. Arutelu

2.4.1. RES toksiin vähendab temperatuurist sõltuvalt *P. putida* kasvukiirust ja suurendab faagiresistentsust

Bakterites on laialt levinud kromosomaalsed TA süsteemid (Gerdes *et al.*, 2005), kuid nende tähtsust bakterile pole veel täielikult mõistetud ja avaldatud artiklites on palju vasturääkivusi. Kuigi antitoksiini deleteerimine või toksiini üleekspressioon võib mõjutada mitmeid bakteri fenotüüpe nagu stressitaluvus või antibiootikumiresistentsete persistorrakkude teke (Harms *et al.*, 2016), siis TA süsteemide operonide deleteerimine on näidanud, et TA süsteemid pole bakteritele vajalikud (Rosendahl *et al.*, 2020). Siiski on kirjeldatud mitmeid TA süsteeme, mis kaitsevad bakterit faagide vastu (LeRoux *et al.*, 2022; Song ja Wood, 2020; Hazan *et al.*, 2001) ja levimas on aramus, et lisaks mobiilse DNA stabiliseerimisele ongi faagikaitstes osalemine teine tähtis TA süsteemide funktsioon (LeRoux *et al.*, 2022; Kelly *et al.*, 2023).

Sander Blei uuris oma bakalaureusetöös (2023) *P. putida* kromosomaalsete TA süsteemide võimalikku rolli faagivastases kaitstes, kuid sai vastakaid tulemusi, kas RES toksiin suudab vähendada bakteri tundlikkust faagidele või mitte. Hedvig Tammani ja Rita Hõraku korduskatsed andsid samuti kõikuvaid tulemusi. Nendes katsetes kasvatati Δxre tüve faagikatseteks ette temperatuuril 20 °C. Minu tulemused näitavad, et kuna Δxre tüvi on külmatundlik, siis kipuvad temperatuuril 20 °C kiiresti tekkima supressormutatsioonid. Selles töös kasutati seda ära Δxre tüvest toksiini inhibeerivate mutantide saamiseks (Joonis 6), kuid kõikuvad tulemused eelnevates Δxre tüvega tehtud faagitolerantsuse katsetes võisid tuleneda sellest, et ettekasvatamise ajal temperatuuril 20 °C tekkisid Δxre tüvest RES toksiini inhibeerivad mutatsioonid. Selles bakalaureusetöös kasvatati faagikatseteks baktereid ette 30 °C kraadil ja saadi pidevalt reprodutseeruvaid tulemusi, mis näitasid, et Δxre tüvi on G6 faagide vastu 10-100 korda kaitstum kui *P. putida* metsiktüüp (Joonis 3).

Selleks, et uurida, kas Δxre tüve suurenenud faagiresistentsus on tingitud tema madalast kasvukiirusest või sellest, et RES toksiin osaleb kaitstes mõne teise mehhanismi kaudu, taheti leida selliseid Δxre kloone, kus toksiini põhjustatud kasvudefekt on taastunud. Mutantide leidmiseks tehtud ujumiskatsete abil tuvastati üsna palju erinevaid mutatsioone RES toksiinis (Tabel 4 ja 5). Oli oodatav, et punktmutatsioonid ja deletsioonid tekivad toksiini geenis. Kuid üllatuseks saadi ka kloone, kellel toksiini piirkond osutus terveks. Kuna nende kloonide eluiga

teistega võrreldes oli lühem (Tabel 6), siis võib see tähendada, et toksiini aktiivsus on osaliselt alles jäänud. Samas oli aga supressormutantide kasvukiirus nii LB tard- kui vedelsöötmes temperatuuril 20 °C suurel määral taastunud (Joonised 9 ja 11).

Sander Blei (2023) järeldas oma bakalaureusetöös, et tõenäoliselt RES-Xre TA süsteem ei ole faagiresistentsuses oluline. Minu katsed näitasid, et RES toksiin suudab suurendada kaitset spetsiifiliste faagide vastu. Mõnedes artiklites on näidatud, et faagirünnak võib aktiveerida toksiini ehk vabastada toksiini antitoksiini inhibeerivast mõjust (Leavitt *et al.*, 2022; Fernández-García *et al.*, 2024). Minu katsetest on selge, et testitud faagid ei suuda RES toksiini aktiveerida, kuna *P. putida* algse tüve PaW85 ja Δxre -res vahel faagikatsetes erinevusi ei olnud. Samas pole välistatud, et toksiini aktiveerimiseks on olemas väga spetsiifiline mehhanism (Smith ja Fineran, 2023), mida suudab käivitada mõni teine faag.

2.4.2 RES toksiini aktiivsus sõltub GroESL šaperonist

Täisgenoomi sekveneerimisega tuvastati, et terve RES toksiiniga mutantidel oli mutatsioon toimunud GroESL šaperonis. *groSL* operon kodeerib šaperoni valke GroES ja GroEL, mis vastutavad paljude valkude voltumise ja kokkupanemise vahendamise eest (Liu *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2016). Kokku saadi kaks erinevat GroESL šaperoni mutanti, mis viitab, et see šaperon on vajalik RES toksiini aktiivsuseks. Samalaadne tulemus saadi meie laboris ühe teise *P. putida* TA süsteemi toksiiniga, kus avastati, et GraT toksiini aktiivsuseks oli vajalik šaperon DnaK (Rosendahl *et al.*, 2021; Ainelo *et al.*, 2016). TA süsteemide sõltuvust šaperonidest on täheldatud ka varem TAC (toksiin/antitoksiin/šaperon) süsteemide puhul, kus SecB sarnased šaperonid abistavad antitoksiinide pakkimisel ja stabiliseerimisel (Bordes *et al.*, 2016). Seega võivad erinevad raku šaperonid osaleda TA süsteemide aktiivsuse reguleerimisel ja seda nii toksiinide kui antitoksiinide struktuuri mõjutamise kaudu.

Käesolevas töös tuvastati üks Δxre supressormutatsioon *groL* geenis ning teine *groS* geenis, kuid šaperoni struktuuri vaadates asuvad mutatsioonid lähestikku (Joonis 7), täpsemini GroEL šaperoni ja GroES ko-šaperoni kokkupuutekoha läheduses. Vaatamata sellele, et mutatsioonid asuvad struktuuril lähestikku, on nende efekt bakterile erinev. Kuigi LB vedelsöötmes oli 20 °C GroES ja GroEL mutantide kasvukiirus metsiktüvega võrdne ja 30 °C LB tassil kasvasid nad ka sarnaselt (Joonis 9), käitusid mutandid minimaaltassil erinevalt. Minimaalsöötmes 0,2% bensoaadiga ei suutnud GroEL mutant üldse kasvada, samas kui GroES mutandi kasv oli Δxre

tüvest parem, kuid metsiktüvest halvem. Selline tulemus viitab sellele, et mutatsioonid mõjutavad šaperoni tööd erinevalt. Võimalik, et mutatsioon GroEL šaperonis häirib mingi bensoaadi tassil kasvamiseks vajaliku valguga (ensüümi) voltumist. Seda arvamust toetab see, et GroEL mutant kasvas bensoaadil halvemini kui Δxre tüvi, seega peab olema mõni lisaefekt, mis takistab kasvu bensoaadil veel enam kui seda teeb RES toksiin.

Mõlemad mutatsioonid GroESL šaperonis taastasid Δxre tüve kasvukiiruse (Joonis 9 ja 11), kuid faagide nakatumise suhtes oli *groS* ja *groL* geenides toimunud mutatsioonide mõju erinev. Ko-šaperoni GroES mutant oli faagidele tundetum ja paremini kaitsud kui *P. putida* PaW85, samal ajal kui šaperoni GroEL mutandi tulemused olid sarnased *P. putida* metsiktüvega. Need tulemused näitavad, et GroES mutandil on RES toksiini aktiivsus mingil määral säilinud, samal ajal kui GroEL mutandil on toksiini aktiivsus täielikult inhibeeritud. GroES mutantset tüve võiks kasutada ka edaspidistes RES toksiiniga seotud faagikatsetes, kuna tüvi suudab kasvada 20 °C sama kiirusega kui metsiktüvi, mistõttu on võimalik eksponentsiaalse kasvufaasiga rakke ette kasvatada 20 °C, nagu uurimisgrupis tavaliselt tehakse.

Supressormutantide katse andis väga ootamatu ja huvitava tulemuse, sest viitab, et RES toksiin vajab aktiivsuseks GroESL šaperoni. Kuna šaperon vastutab mitmete valkude õige struktuuri moodustumise eest (Liu *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2016), siis tõenäoliselt vajab RES toksiini korrektne voltumine GroESL abi.

KOKKUVÕTE

Tänapäevani puudub ühine arusaam kromosomaalsete TA süsteemide funktsioonidest (Jurénas *et al.*, 2022). Üheks oletatavaks funktsiooniks on faagiresistentsuse suurendamine, mida analüüsis ka Sander Blei oma bakalaureusetöös (2023). RES-Xre TA süsteemi RES toksiin näis suurendavat faagiresistentsust mõnede faagi suhtes, kuid tulemused olid vastakad, eriti meie faagikollektsioonis G6 perekonna faagidega.

Käesoleva töö praktilise osa eesmärkideks oli testida *P. putida* RES-Xre TA süsteemi RES toksiini mõju faagide nakatamisefektiivsusele, isoleerida toksiini supressormutante ja kasutada saadud supressormutante faagide nakatumisefektiivsuse võrdlemiseks. Selleks võrreldi *P. putida* metsiktüve PaW85, Xre antitoksiini deletandi ja RES-Xre süsteemi deletandi nakatumisefektiivsust G6 perekonna faagidega. RES toksiini supressormutantide saamiseks kasutati ujumistasse, kus Δxre tüve supressormutandid olid kiirema kasvu tõttu kergesti tuvastatavad. Supressormutantide abil võrreldi nakatumisefektiivsust. Katsete tulemustest on võimalik järeldada järgmist:

- 1) *P. putida* RES-Xre TA süsteemi toksiin RES suurendab bakterite resistentsust uuritud G6 perekonna faagide suhtes ning aeglustab bakterite kasvu rikkal söötmel 20 °C ja bensoaat-minimaalsöötmel ka temperatuuril 30 °C.
- 2) RES toksiini põhjustatud kasvudefekti suruvad alla mitmed erinevad mutatsioonid RES toksiini kodeerivas geenis, aga ka GroESL šaperoni kodeerivates geenides.
- 3) *P. putida* GroESL šaperon tagab RES toksiini aktiivsuse, ilmselt osaleb šaperon toksiini valgu voltumises.

Tulemusi kokku võttes võib järeldada, et GroESL šaperon on vajalik RES toksiini toimeks. Kuna mutatsioonid nii *groL* ja *groS* geenis taastavad bakterite kasvukiiruse, kuid mõjutavad faagiresistentsust erinevalt, siis saab järeldada, et RES toksiini mõju faagiresistentsusele ei käi ainuüksi bakterite kasvu inhibeerimise kaudu.

SUMMARY

Suppressor mutations reduce the impact of RES toxin in *Pseudomonas putida*

Maria Grinkevičš

Despite the decades of studies and wide spread of chromosomal toxin-antitoxin (TA) systems (Gerdes *et al.*, 2005; Makarova *et al.*, 2009), to this day, there is no consensus on the functions of these chromosomal elements (Jurėnas *et al.*, 2022). One presumed function of TA loci is their involvement in phage resistance. As analysed by Sander Blei (2023) in his bachelor's thesis, the RES toxin of the RES-Xre TA system seemed to increase phage resistance against certain phages but the obtained results were not reproducible.

This study aimed to test whether the RES toxin could affect phage infection efficiency, investigate the mechanism of toxin suppression, and use suppressor mutants for comparing phage infection efficiencies. To achieve this, the phage resistance of *P. putida* wild-type PaW85, Xre antitoxin deletion mutant, and RES-Xre system deletion mutant were compared. Additionally, a swimming assay was employed to obtain RES toxin suppressor mutants at 20 °C, and the infection efficiencies were compared using these suppressor mutants. Based on the results of the experiments, one may conclude the following:

- 1) The RES toxin of the *P. putida* RES-Xre TA system enhances bacterial resistance against the phages from the genus G6, reduces the growth rate of bacteria in rich medium at 20 °C, and in benzoate minimal medium also at 30 °C .
- 2) The growth defect caused by the RES toxin is suppressed by several mutations in the *res* gene and also in *groS* and *groL* genes.
- 3) The GroESL chaperone of *P. putida* ensures the activity of the RES toxin, most probably by participating in the correct folding of the toxin protein.

Summarizing the results, it can be concluded that the *P. putida* GroESL chaperone is necessary for the activity of the RES toxin. As the mutations in *groEL* and *groES* genes restore the growth rate of bacteria, but impact the phage resistance provided by the toxin differently, we can conclude that the effect on phage protection by RES toxin does not rely solely on the growth rate reduction.

KASUTATUD KIRJANDUS

Aakre C.D., Phung T.N., Huang D., Laub M.T. A bacterial toxin inhibits DNA replication elongation through a direct interaction with the β sliding clamp. *Mol Cell*. 2013;52(5): 617–628.

Afif, H., Allali, N., Couturier, M., ja Van Melderen, L. (2001). The ratio between CcdA and CcdB modulates the transcriptional repression of the ccd poison–antidote system. *Molecular Microbiology*, 41(1): 73 – 82.

Ainelo, A., Porosk, R., Kilk, K., Rosendahl, S., Remme, J. ja Hõrak, R. (2019). *Pseudomonas putida* Responds to the Toxin GraT by Inducing Ribosome Biogenesis Factors and Repressing TCA Cycle Enzymes. *Toxins*, 11(2): 103–103.

Ainelo, A., Tamman, H., Leppik, M., Remme, J. ja Hõrak, R. (2016). The toxin GraT inhibits ribosome biogenesis. *Mol Microbiol*, 100(4): 719-34.

Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H., ja Glaser, G. (1996). An *Escherichia coli* chromosomal “addiction module” regulated by guanosine [corrected] 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(12): 6059–6063.

Aladjem, M. I. ja Fanning, E. (2004). The Replicon Revisited: An Old Model Learns New Tricks in Metazoan Chromosomes. *EMBO Reports*. 5 (7): 686–691.

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*, 315(5819): 1709–1712.

Bayley, S. A., Duggleby, C. J., Worsey, M. J., Williams, P. A., Hardy, K. G., ja Broda, P. (1977). Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2. *Molecular & General Genetics*, 154(2): 203-4.

Bordes, P., Sala, A. J., Ayala, S., Texier, P., Slama, N., Cirinesi, A.-M., Guillet, V., Mourey, L. Ja Genevoux, P. (2016). Chaperone addiction of toxin-antitoxin systems. *Nature Communications*, 7:13339.

- Boss, L., ja Kędzierska, B. (2023). Bacterial Toxin-Antitoxin Systems' Cross-Interactions—Implications for Practical Use in Medicine and Biotechnology. *Toxins (Basel)*, 15(6): 380.
- Blei, S., Rosendahl, S., Hõrak, R. (2023). Bakalaureusetöö „Kromosomaalsed toksiooni-antitoksiini süsteemid *Pseudomonas putida* faagitolerantsuses.“.
- Blower, T. R., Chai, R., Przybilski, R., ... Salmond, G. P. C. (2017). Evolution of Pectobacterium bacteriophage ΦM1 to escape two bifunctional type III toxin-antitoxin and abortive infection systems through mutations in a single viral gene. *Appl. Environ. Microbiol*, 83:8e03229–16
- Blower, T. R., Pei, X. Y., Short, F. L., Fineran, P. C., Humphreys, D. P., Luisi, B. F. ja Salmond G. P. C. (2011). A processed noncoding RNA regulates an altruistic bacterial antiviral system. *Nature Structural & Molecular Biology*. 18(2): 185–190.
- Brocchi, M., Tereza, A. ja Zaha, A. (2007). Restriction-modification systems in *Mycoplasma spp.* *Genetics and Molecular Biology*, 30(1): 236–244.
- Cheng, H. Y., Valerie, W.C. S., Islam, S., McAnulty, M. J., Benedik, M. J., ja Wood, T. K. (2014). Toxin GhoT of the GhoT/GhoS toxin/antitoxin system damages the cell membrane to reduce adenosine triphosphate and to reduce growth under stress. *Environmental Microbiology*, 16(6): 1741–1754.
- Choi, J. S., Kim, W., Suk, S., Park, H., Bak, G., Yoon, J. ja Lee, Y. (2018). The Small RNA, SdsR, Acts as a Novel Type of Toxin in *Escherichia Coli*. *RNA Biology*. 15 (10): 1319–1335.
- Choi, J., Kotay, S. M. ja Goel, R. (2010). Various physico-chemical stress factors cause prophage induction in *Nitrosospira multiformis* 25196- an ammonia oxidizing bacteria. *Water Research*, 44(15): 4550–4558.
- Covarrubias, A. J., Perrone, R., Grozio, A. ja Verdin, E. (2020). NAD⁺ metabolism and its roles in cellular processes during ageing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 22(2): 119–141.
- Deveau, H., Van Calsteren, M.-R., Moineau, S. (2002). Effect of exopolysaccharides on phage-host interactions in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 68(9): 4364-9.
- d'Hérelle F. (1917). Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentérique. *Acad Sci Paris*, 165: 373–5.

- Díaz-Orejas, R., Espinosa, M. ja Yeo, C. C. (2017). The Importance of the Expendable: Toxin–Antitoxin Genes in Plasmids and Chromosomes. *Front Microbiol*, 8: 1479.
- Durrant, M. G., Li, M. M., Siranosian, B. A., Montgomery, S. B., ja Bhatt, A. S. (2020). A Bioinformatic Analysis of Integrative Mobile Genetic Elements Highlights Their Role in Bacterial Adaptation. *Cell Host & Microbe*, 27(1): 140-153.
- Dy, R. L., Przybilski, R., Semeijn, K., Salmond, G. P. C ja Fineran, P. C. (2014). A widespread bacteriophage abortive infection system functions through a Type IV toxin–antitoxin mechanism. *Nucleic Acids Research*, 42(7): 4590–4605.
- Essuman, K., Summers, D. W., Sasaki, Y., Mao, X., Yuen, K., DiAntonio, A. ja Milbrandt, J. (2018). TIR Domain Proteins Are an Ancient Family of NAD⁺-Consuming Enzymes. *Current Biology*, 28(3): 421-430.e4.
- Fernández-García, L., Song, S., Kirigo, J., Battisti, M. E., Petersen, M. E., Tomás, M. ja Wood, T. K. (2024). Toxin/antitoxin systems induce persistence and work in concert with restriction/modification systems to inhibit phage. *Microbiology Spectrum*, 12(1):e0338823.
- Fiedoruk, K., Daniluk, T., Swiecicka, I., Sciepek, M. ja Leszczynska, K. (2015). Type II toxin–antitoxin systems are unevenly distributed among *Escherichia coli* phylogroups. *Microbiology*, 161: 158–167.
- Fineran, P. C., Blower, T. R., Foulds, I. J., Humphreys, D. P., Lilley, K. S. ja 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.
- Fozo, E., Makarova, K. S., Shabalina, S. A., Yutin, N., Koonin, E. V. ja Storz, G. (2010). Abundance of Type I Toxin–Antitoxin Systems in Bacteria: Searches for New Candidates and Discovery of Novel Families. *Nucleic Acids Research*, 38 (11): 3743–3759.
- Garcia-Pino, A., Balasubramanian, S., Wyns, L., Gazit, E., De Greve, H., Magnuson, R. D., Charlier, D., van Nuland, N. A., Loris, R. (2010) Allosteric and intrinsic disorder mediate transcription regulation by conditional cooperativity. *Cell*, 142(1):101-11.

- Garneau, J. E., Dupuis, M.-E., Villion, M., ... Moineau, S. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468: 67-71.
- Gerdes, K., Bech, F. W., Jorgensen, S. T., ... Meyenburg, K. (1986). Mechanism of postsegregational killing by the hok gene product of the parB system of plasmid RI and its homology with the relF gene product of the *E. coli* relB operon. *EMBO J*, 5(8): 2023–2029.
- Gerdes, K., Poulsen, L. K., Thisted, T., Nielsen, A. K., Martinussen, J., Andreasen, P. H. (1990). The hok killer gene family in gram-negative bacteria. *The New Biologist*, 2(11): 946-56.
- Goeders, N. ja Van Melderren, L. (2014). Toxin-Antitoxin Systems as Multilevel Interaction Systems. *Toxins*. 6 (1): 304–324.
- Goormaghtigh, F., Fraikin, N., Putrinš, M., ... Van Melderren, 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.
- Griffin, M. A., Davis, J. H., ja Strobel, S. A. (2013). Bacterial Toxin RelE: A Highly Efficient Ribonuclease with Exquisite Substrate Specificity Using Atypical Catalytic Residues. *Biochemistry*, 52(48): 8633–8642.
- Guan, J., Chen, Y., Goh, Y.-X., Wang, M., Tai, C., Deng, Z., Song, J., Ou, H.-Y. (2023). TADB 3.0: an updated database of bacterial toxin–antitoxin loci and associated mobile genetic elements. *Nucleic Acids Research*, 52(D1): D784–D790.
- Guglielmini, J., ja Van Melderren, L. (2011). Bacterial toxin-antitoxin systems: Translation inhibitors everywhere. *Mobile Genetic Elements*, 1(4): 283–306.
- Harms, A., Brodersen, D. E., Mitarai, N. ja Gerdes, K. (2018). Toxins, Targets, and Triggers: An Overview of Toxin-Antitoxin Biology. *Mol Cell*. 70(5): 768-784.
- Harms, A., Maisonneuve, E. ja Gerdes, K. (2016). Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science*, 354: 6318.
- Hallez, R., Geeraerts, D., Sterckx Y., Mine, N., Loris, R. ja Van Melderren, L. (2010). New toxins homologous to ParE belonging to three-component toxin-antitoxin systems in *Escherichia coli* O157:H7. *Molecular Microbiology*, 76(3): 719–732.

- Hampton, H. G., Watson, B. N. J., ja Fineran, P. C. (2020). The arms race between bacteria and their phage foes. *Nature*, 577(7790): 327–336.
- Han, K.-D., Matsuura, A., Ahn, H.-C., ... Lee, B.-J. (2011). Functional Identification of Toxin-Antitoxin Molecules from *Helicobacter pylori* 26695 and Structural Elucidation of the Molecular Interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 286(6): 4842–4853.
- Han, M.-K., Lee, J.-Y., Cho, Y.-S., Song, Y. M., An, N.-H., Kim, H.-R., ja Kim, U.-H. (1996). Regulation of NAD⁺ glycohydrolase activity by NAD⁺-dependent auto-ADP-ribosylation. *Biochemical Journal*, 318(3): 903–908.
- Han, S. ja Tainer, J. A. (2002). The ARTT motif and a unified structural understanding of substrate recognition in ADP-ribosylating bacterial toxins and eukaryotic ADP-ribosyltransferases. *International Journal of Medical Microbiology*, 291(6-7): 523–529.
- Hazan, R., Sat, B., Reches, M. ja Engelberg-Kulka, H. (2001). Postsegregational Killing Mediated by the P1 Phage “Addiction Module” phd-doc Requires the *Escherichia coli* Programmed Cell Death System mazEF. *Journal of Bacteriology*, 183(6): 2046–2050.
- Hayes, F., ja Kędzierska, B. (2014). Regulating Toxin-Antitoxin Expression: Controlled Detonation of Intracellular Molecular Timebombs. *Toxins*, 6(1): 337–358.
- Jahn, N. ja Brantl, S. (2013). One antitoxin—two functions: SR4 controls toxin mRNA decay and translation. *Nucleic Acids Res.* 41(21): 9870–9880.
- Jiang, Y., Pogliano, J., Helinski, D. R., & Konieczny, I. (2002, June). ParE toxin encoded by the broad-host-range plasmid RK2 is an inhibitor of *Escherichia coli* gyrase. *Molecular Microbiology*, 44(4): 971-9.
- Jurėnas, D., Fraikin, N., Goormaghtigh, F. ja Van Melderen, L. (2022). Biology and evolution of bacterial toxin–antitoxin systems. *Nature Reviews. Microbiology*, 20(6): 335–350.
- Ka, D., Oh, H., Park, E., Kim, J.-H. ja Bae, E. (2020). Structural and functional evidence of bacterial antiphage protection by Thoeris defense system via NAD⁺ degradation. *Nature Communications*, 11(1): 2816.
- Kamruzzaman, M., Wu, A. Y. ja Iredell, J. R. (2021). Biological Functions of Type II Toxin-Antitoxin Systems in Bacteria. *Microorganisms*. 9(6): 1276.

- Kawano, M. (2012). Divergently overlapping cis-encoded antisense RNA regulating toxin-antitoxin systems from *E. coli*: hok/sok, ldr/rdl, symE/symR. *RNA Biol.* 9(12): 1520-7.
- Kelly, A., Arrowsmith, T. L., Went, S. C. ja Blower T. R. (2023). Toxin-antitoxin systems as mediators of phage defence and the implications for abortive infection. *Curr Opin Microbiol*, 73:102293.
- Kim, J. S., Schantz, A. B., Song, S., Kumar, M., ja Wood, T. K. (2018). GhoT of the GhoT/GhoS toxin/antitoxin system damages lipid membranes by forming transient pores. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 497(2): 467–472.
- Koga, M., Otsuka, Y., Lemire, S., ja Tetsuro Yonesaki. (2011). *Escherichia coli* rnlA and rnlB Compose a Novel Toxin–Antitoxin System. *Genetics*, 187(1): 123–130.
- Leavitt, A., Yirmiya, E., Amitai, G., ... Sorek, R. (2022). Viruses inhibit TIR gcADPR signalling to overcome bacterial defence. *Nature*, 611(7935): 326-331.
- Lee, K.-Y. ja Lee, B.-J. (2016). Structure, Biology, and Therapeutic Application of Toxin–Antitoxin Systems in Pathogenic Bacteria. *Toxins*: 8(10): 305.
- Leplae, R., Geeraerts, D., Hallez, R., Guglielmini, J., Drèze, P.-A., ja Van Melderen, L. (2011). Diversity of bacterial type II toxin–antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. *Nucleic Acids Research*, 39(13): 5513–5525.
- LeRoux, M., ja Laub, M. T. (2022). Toxin-Antitoxin Systems as Phage Defense Elements. *Annual Review of Microbiology*, 76(1): 21–43.
- LeRoux, M., Srikant, S., Littlehale, M. H., ... Laub M. T. (2022). The DarTG toxin-antitoxin system provides phage defense by ADP-ribosylating viral DNA. *Nat Microbiol*, 7(7): 1028-1040.
- Li, M., Gong, L., Cheng, F., ... Xiang, H. (2021). Toxin-antitoxin RNA pairs safeguard CRISPR-Cas systems. *Science*, 372(6541):eabe5601.
- Liu, K., Li, J., Liu, M. Ja Hou, J (2022). Molecular chaperone GroEL-GroES enhances the soluble expression of biologically active ovine growth hormone in the prokaryotic system. *Protein Expression and Purification*, 195-196: 106097.

- Loris, R. ja Garcia-Pino, A. (2014). Disorder- and Dynamics-Based Regulatory Mechanisms in Toxin–Antitoxin Modules. *Chem Rev*, 114(13): 6933-47.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., ja Koonin, E. V. (2009). Comprehensive comparative-genomic analysis of Type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes. *Biology Direct*, 4(1).
- Markovski, M. ja Wickner, S. (2013). Preventing Bacterial Suicide: A Novel Toxin-Antitoxin Strategy. *Molecular Cell*. 52(5): 611–612.
- Masuda, H., Tan, Q., Awano, N., Wu, K. ja Inouye, M. (2012). YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 84(5): 979–989.
- Mäerand, A., Mets, T., Kaldalu, N. (2018). Bakalaureusetöö „Toksiin-antitoksiin süsteem relBE mõju E. coli rakkudele aminohappe nälja tingimustes“
- Ogura, T., ja 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.
- Olson, M. E., Ceri, H., Morck, D. W., Buret ,A. G. ja Read R. R. (2002). Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Microbiol*. 48(1):86-92.
- Page, R., ja Peti, W. (2016). Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nat Chem Biol.*, 12(4):208-14.
- Pandey, D. R. ja Gerdes, K. (2005). Toxin-Antitoxin Loci Are Highly Abundant in Free-Living but Lost from Host-Associated Prokaryotes. *Nucleic Acids Research*. 33 (3): 966–976.
- Pecota, D. C. ja Wood, T. K. (1996). Exclusion of T4 phage by the hok/sok killer locus from plasmid R1. *Journal of Bacteriology*, 178(7): 2044–2050.
- Pedersen, K., Zavialov, A. V., Pavlov Y. M., Elf, J., Gerdes, K., & Ehrenberg, M. (2003). The Bacterial Toxin RelE Displays Codon-Specific Cleavage of mRNAs in the Ribosomal A Site. *Cell*, 112(1), 131–140.

Ramisetty, B. C. M. ja Santhosh R. S. (2016). Horizontal gene transfer of chromosomal Type II toxin-antitoxin systems of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett. 363(3):fzv238.

Rosendahl, S., Ainelo, A. ja Hõrak, R. (2021). The Disordered C-Terminus of the Chaperone DnaK Increases the Competitive Fitness of *Pseudomonas putida* and Facilitates the Toxicity of GraT. Microorganisms, 9(2): 375.

Rosendahl, S., Tamman, H., Brauer, A., Remm, M. ja Hõrak R. (2020). Chromosomal toxin-antitoxin systems in *Pseudomonas putida* are rather selfish than beneficial. Scientific Reports. 9230.

Schuster, C. F. ja Bertram, R. (2013). Toxin-antitoxin systems are ubiquitous and versatile modulators of prokaryotic cell fate. FEMS Microbiology Letters. 340(2):73-85.

Sharma, B., Brown, A. V., Matluck, N. E., Hu, L. T. ja Lewis, K. (2015). *Borrelia burgdorferi*, the Causative Agent of Lyme Disease, Forms Drug-Tolerant Persister Cells. Antimicrob Agents Chemother. 59(8): 4616-4624.

Singh, G., Yadav, M., Ghosh, C. ja Jitendra, S. R. (2021). Bacterial toxin-antitoxin modules: classification, functions, and association with persistence. Current Research in Microbial Sciences. 2: 100047.

Skjærning, R. B., Senissar, M., Winther, K. S., Gerdes, K., ja Brodersen, D. E. (2018). The RES domain toxins of RES-Xre toxin-antitoxin modules induce cell stasis by degrading NAD⁺. Molecular Microbiology, 111(1): 221–236.

Smith, L. M. ja Fineran, P. C. (2023). Phage capsid recognition triggers activation of a bacterial toxin-antitoxin defense system. Mol Cell. 83(2):165-166.

Song, S. ja Wood, T. K. (2018). Post-segregational Killing and Phage Inhibition Are Not Mediated by Cell Death Through Toxin/Antitoxin Systems. Frontiers in Microbiology, 9: 814.

Song, S. ja Wood, T. K. (2020). A Primary Physiological Role of Toxin/Antitoxin Systems Is Phage Inhibition. Frontiers in Microbiology, 11: 1895.

Sonika, S., Singh, S., Mishra, S., ja Verma, S. (2023). Toxin-antitoxin systems in bacterial pathogenesis. Heliyon, 9(4), e14220.

- Stern, A. ja Sorek, R. (2011). The phage-host arms race: shaping the evolution of microbes. *Bioessays*, 33(1): 43-51.
- Sun, C., Guo, Y., Tang, K., Wen, Z., Li, B. ja Zeng, Z. (2017). MqsR/MqsA Toxin/Antitoxin System Regulates Persistence and Biofilm Formation in *Pseudomonas putida* KT2440. *Frontiers in Microbiology*, 8.
- Szekers, S., Dauti, M., Wilde, C., Mazel, D. ja 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.
- Zhang, J., Gorzelnik, K. V., Schmid, M. F. ja Chiu, W. (2016). Single-Particle CryoEM of Macromolecular Complexes. *Encyclopedia of Cell Biology*, 2: 5-13.
- Zhang, Y., ja Inouye, M. (2011). RatA (YfjG), an *Escherichia coli* toxin, inhibits 70S ribosome association to block translation initiation. *Molecular Microbiology*, 79(6), 1418–1429.
- Zhang, Y., Zhang, J., Hara, H., Kato, I., ja Inouye, M. (2005). Insights into the mRNA Cleavage Mechanism by MazF, an mRNA Interferase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(5): 3142-3150.
- Talavera, A., Tamman, H., Ainelo, A., Konijnenberg, A., Hadži, S., Sobott, F., Sobott, F., Garcia-Pino, A., Hůrak, R. ja Loris, R. (2019). A dual role in regulation and toxicity for the disordered N-terminus of the toxin GraT. *Nature Communications* (10): 972.
- Tamman, H., Ainelo, A., Ainsaar, K. ja Hůrak, R. (2013). A Moderate Toxin, GraT, Modulates Growth Rate and Stress Tolerance of *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, 196(1): 157–169.
- Tock, M. R. ja Dryden, D. T. F. (2005). The biology of restriction and anti-restriction. *Current Opinion in Microbiology*, 8(4): 466–472.
- Twort F. W. (1915). AN INVESTIGATION ON THE NATURE OF ULTRA-MICROSCOPIC VIRUSES. *Lancet*, 186(4814): 1241–1243.
- Unterholzner, S. J., Poppenberger, B., ja Rozhon, W. (2013). Toxin–antitoxin systems. *Mobile Genetic Elements*, 3(5): e26219.

- Van Melderen, L., ja Saavedra, M. (2009). Bacterial Toxin–Antitoxin Systems: More Than Selfish Entities?. *PLOS Genetics*, 5(3): 1000437.
- Vet, S., Vandervelde, A., ja Gelens, L. (2019). Excitable dynamics through toxin-induced mRNA cleavage in bacteria. *PloS One*, 14(2), e0212288.
- Wang, C., Nie, T., Lin, F., Connerton, I. F., Lu, Z., Zhou, S. ja Hang, H. (2019). Resistance mechanisms adopted by a *Salmonella Typhimurium* mutant against bacteriophage. *Virus Research*, 273: 197759.
- Wang P., Lord D. M., Cheng H., ... Wood, T. K. (2012). A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. *Nature Chemical Biology*, 8(10): 855–861.
- Wang, P., Yao, J., Sun, Y. ja Wood, T. K. (2020). Type VII Toxin/Antitoxin Classification System for Antitoxins that Enzymatically Neutralize Toxins. *Trends in Microbiology*. 29(5): 388–393.
- Wang, X., Lord, D. M., Hsin, Y. C., ... Wood, T. K. (2012). A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. *Nature Chemical Biology*, 8(10), 855–861.
- Wang X. ja Wood T. K. (2011). Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response. *Appl Environ Microbiol.* 77:5577–5583.
- Wen, Y., Behiels, E., ja Devreese, B. (2014). Toxin-Antitoxin systems: Their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity. *Pathog Dis.*, 70(3): 240–249.
- Wilson, G. G. (1991). Organization of restriction-modification systems. *Nucleic Acids Research*, 19(10): 2539–2566.
- Wu, Y., Garyshyants, S. K., van den Hurk, A., ... Nobrega, F. L. (2024). Bacterial defense systems exhibit synergistic anti-phage activity. *Cell Host & Microbe*, 32(4): 557-572.
- 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 1): D749–D753.

Yuan, J., Sterckx, Y., Mitchenall, L. A., Maxwell, A., Loris, R., ja Waldor, M. K. (2010). Vibrio cholerae ParE2 Poisons DNA Gyrase via a Mechanism Distinct from Other Gyrase Inhibitors. Journal of Biological Chemistry, 285(51): 40397–40408.

Kasutatud veebiaadressid

TADB kodulehekül (2023). Vaadatud 31.10.2023. <https://bioinfo-mml.sjtu.edu.cn/TADB3/>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Maria Grinkevitš,

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

***Pseudomonas putida* RES toksiini mõju vähendavad supressormutatsioonid**

mille juhendajad on Hedvig Tamman ja 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'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, 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.

Maria Grinkevitš

24.05.2024