

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
GENEETIKA ÕPPETOOL

**Poomisvastuse mõju *Pseudomonas putida* stressitaluvusele**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Roger Rikberg

Juhendaja PhD Hedvig Tamman

TARTU 2023

# INFOLEHT

## Poomisvastuse mõju *Pseudomonas putida* stressitaluvusele

Poomisvastus on viis, kuidas bakterid tulevad toime mitmesuguste stressitingimustega. Kuigi poomisvastuse mõju on varasemalt põhjalikult kirjeldatud biokile moodustumises, on tagaplaanile jäänud *Pseudomonas putida* faagikaitse ning antibiootikumi- ja kemikaalitolerantsuse uuringud. Seega puudub selge ülevaade poomisvastuse mõjust *P. putida* füsioloogiale. Sellest lähtuvalt oli käesoleva töö eesmärgiks välja selgitada, kuidas poomisvastus mõjutab *P. putida*'t, käsitledes ka selle võimalikku rolli faagivastases kaitstes. Tulemused näitasid, et poomisvastus-defektsed tüved on prototroofid ning et poomisvastus mõjutab vähesel määral antibiootikumi- ja kemikaalitolerantsust ning kaitseb nõrgalt bakteriofaagide eest, kuid kaitse tugevus sõltub suuresti konkreetsest bakteriofaagist. Lisaks leiti, et poomisvastus-defektsed tüved on statsionaarses kasvufaasis suuremad kui metsiktüve rakud, moodustavad ahelaid ning neil esinevad tugevad membraanidefektid.

Märksõnad: *Pseudomonas putida*, poomisvastus, stressitaluvus

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

## The effect of stringent response on stress tolerance of *Pseudomonas putida*

The stringent response is a common way for bacteria to survive various stressful conditions. While its impact on biofilm formation has been extensively studied, there is limited data available on its importance in phage defence and antibiotic and chemical tolerance in *Pseudomonas putida*. Thus, there is no clear overview of the effect of the stringent response on *P. putida*'s physiology. Therefore, this study aimed to determine the effects of stringent response on the physiology of *P. putida*, with a specific focus on its potential involvement in phage defence. The results revealed that the stringent response mutant strains are prototrophic; and the stringent response has a minor effect on antibiotic and chemical tolerance and provides generally weak protection against bacteriophages, but the level of protection is highly dependent on the specific phage. Additionally, the mutant strains form filaments, have enlarged cells and severe membrane defects in the stationary phase.

Keywords: *Pseudomonas putida*, stringent response, stress tolerance

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

# SISUKORD

INFOLEHT.....	2
KASUTATUD LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS .....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Poomisvastus .....	7
1.1.1 Poomisvastuseta bakterite kasvukiirus ja kasv minimaalsöötmel .....	10
1.1.2 Biokile moodustumine .....	10
1.1.3 Antibiootikumi- ja kemikaalitolerantsus.....	11
1.1.4 Faagivastane kaitse .....	12
1.2. Poomisvastus <i>Pseudomonas putida</i> 's .....	13
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	15
2.1. Töö eesmärgid .....	15
2.2. Materjal ja meetodika .....	16
2.2.1. Kasutatud söötmed ja bakteritüved.....	16
2.2.2. Bakterite kasv erinevatel tardsöötmetel .....	17
2.2.3. Fluorestsentsmikroskoopia.....	17
2.2.4. Rakkude loendamine loenduskambri abil .....	18
2.2.5. Lävivoolutsütomeetria .....	18
2.2.6. Antibiootikumi- ja kemikaalitolerantsus agarsöötmel.....	19
2.2.7. Faagikaitse testimine agarsöötmel.....	20
2.3. Tulemused .....	21
2.3.1. <i>P. putida</i> $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT kolooniate moodustumine on hilises statsionaarses faasis vähenenud.....	21
2.3.3. <i>P. putida</i> statsionaarse kasvufaasi $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT rakuarvukus erineb metsiktüvest .....	22
2.3.3. <i>P. putida</i> $\Delta$ RelA ja $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT on läbilaskvama membraaniga võrreldes metikstüvega.....	24
2.3.4. <i>P. putida</i> $\Delta$ RelA ja $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT tüved suudavad kasvada minimaalsöötmel .....	25
2.3.5 Poomisvastus aitab kaasa antibiootikumi- ja kemikaalitolerantsusele.....	26
2.3.6 Poomisvastus suurendab <i>P. putida</i> faagitolerantsust agarsöötmel .....	27
2.4. Arutelu .....	30
KOKKUVÕTE .....	34
SUMMARY .....	35
TÄNUSÕNAD .....	37
KIRJANDUSE LOETELU .....	38

LISAD .....	47
Lisa 1: Kasv minimaalsöötmetel .....	47
Lisa 2: Bakteriofaagide nakatamisefektiivsus tardsöötmetel .....	47

## KASUTATUD LÜHENDID

**(p)ppGpp** – guanosiintetrafosfaat ja guanosiinpentafosfaat

**Bp** – bensüülpenitsilliin (ingl *benzylpenicillin*)

**CAA** – kaseiini hüdrolüsaat (ingl *casamino acids*)

**cipro** – tsiprofloksatsiin (ingl *ciprofloxacin*)

**Cm** – klooramfenikool (ingl *chloramphenicol*)

**EDTA** – etüleendiamiintetraädikhape (*ethylene diamine tetra acetic acid*)

**Gm** – gentamütsiin (ingl *gentamicin*)

**LB** – lüsogeenne sööde (ingl *lysogeny broth*), rikas sööde

**NQ** – nitrokinoliin (ingl *nitroquinoline*)

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

**PI** – propiidiumjodiid (ingl *propidium iodide*)

**PolyB** – polümüksiin B (ingl *polymyxin B*)

**RSH** – RelA-SpoT-homoloog

**SAH** – väike alarmooni hüdrolaas (ingl *small alarmone hydrolase*)

**SAS** – väike alarmooni süntetaas (ingl *small alarmone synthetase*)

**TAS** – toksiin-antitoksiin süsteem

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

## SISSEJUHATUS

Bakterite kasvukeskkond võib väga kiiresti muutuda, mistõttu puutuvad nad oma elutsükli jooksul kokku mitmesuguste stressoritega. Vaenulikes tingimustes ellujäämiseks on bakteritel väljakujunenud erinevad mehhanismid. Üheks selliseks konserveerunud stressimehhanismiks, mis mitmete stressorite mõjul aktiveerub, on poomisvastus. Seda reguleerivad RelA ja SpoT ensüümid, sünteesides ja/või hüdroliüüsidest alarmooni molekule guanosiintetrafosfaat ja guanosiinpentaosfaat, ühiselt tuntud kui (p)ppGpp. Selle alarmooni akumulereerumine põhjustab globaalse geeniekspressiooni ümberprogrammeerimist, võimaldades bakteritel toime tulla nii toitainete puuduse kui ka teiste keskkonnatingimuste muutustega.

Poomisvastus suunab bakterid kasvult stressitaluvusele, aeglustades raku elutegevust kuni soikeseisundini. See võimaldab bakteritel ekstreemsetes stressitingimustes, sh antibiootikumi töötlus, elus püsida, kusjuures sellistes tingimustes on suurem surve resistentsust tagavate mutatsioonide tekkeks ja püsijäämiseks. Kui mutanttüved on tekkinud, võivad mutatsioonid horisontaalse geeniülekanega levida edasi tundlikesse bakteritesse, mille tulemuseks on lõpuks vaid antibiootikumiresistentsete bakterite ellujäämine. Seega aitab poomisvastus kaasa antibiootikumiresistentsuse levikule, mis on tänapäeva meditsiinis märkimisväärne probleem ning antibiootikumiresistentsusega võitlemiseks on oluline mõista poomisvastuse toimimist ja selle olulisust bakterifüsioloogias.

Seni on poomisvastuse mõju kirjeldatud biokile regulatsioonis, patogeensete bakterite virulentsuses, antibiootikumi- ja kemikaalitaluvuses ning mõningaid viiteid on avaldatud ka selle stressivastuse olulisuse kohta bakteriofaagide, baktereid nakatavate viiruste, vastases kaitses. Samuti on kirjeldatud (p)ppGpp-defektsete tüvede erinevat nõudlikkust kasvusõotmetele. Poomisvastuse olulisus faagivastases kaitses on aga veel küllaltki ebaselge ning suuresti kirjeldamata, seda eriti keskkonnabakterite mudelorganismi *Pseudomonas putida* puhul, mida nakatavaid faage oli veel hiljuti isoleeritud vaid mõned üksikud. Lisaks on *P. putida* puhul vähekirjeldatud ka poomisvastuse tähtsus antibiootikumi- ja kemikaalitaluvuses. Seega, kuigi biokile moodustumist on sel bakteril põhjalikult uuritud, puudub selge ülevaade poomisvastuse mõjust bakteri üldisele kohasusele.

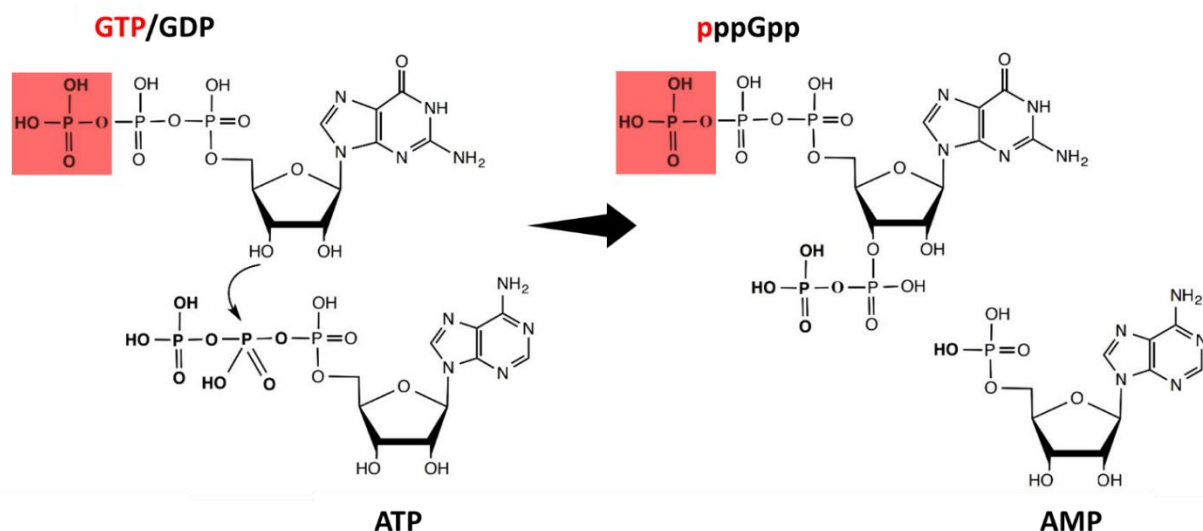
Eelnevast informatsioonist lähtuvalt on käesoleva töö eesmärk välja selgitada, kuidas poomisvastus mõjutab *P. putida*'t, käsitledes ka selle stressivastuse võimalikku rolli faagivastases kaitses.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Poomisvastus

Bakterid peavad enda elutsükli jooksul pidevalt toime tulema muutuvate keskkonnatingimustega, mis võivad ohustada nende ellujäämist (K. R. Gupta *et al.*, 2021). Muutustele reageerimine ja nendega kohanemine vajab kiirelt toimivaid signaaliradasid ja tõhusaid stressivastuseid (Irving *et al.*, 2020).

Poomisvastus on bakterites levinud stressimehhanism, mida reguleerivad alarmoonid guanosiintetrafosfaat (ppGpp) ja guanosiinpentafosfaat (pppGpp), vastavalt guanosiin-5'-difosfaat,3'-difosfaat ning guanosiin-5'-trifosfaat,3'-difosfaat (Hara ja Sy, 1983; Irving *et al.*, 2020). Nende ühisnimetusena kasutatakse lühendit (p)ppGpp (Yan *et al.*, 2009). Alarmooni pppGpp/ppGpp sünteesitakse vastavalt GTP-st või GDP-st, kasutades pürofosfaadi doonorina ATP-d (vaata ka Joonis 1) (Srivatsan ja Wang, 2008; Yan *et al.*, 2009). Lisaks on bakterid võimelised hüdrolüüsima pppGpp ka guanosiinpentafosfaatfosfohüdrolaasi toimel ppGpp-ks (Xiao *et al.*, 1991). Antud töös käsitletakse alarmoone ppGpp ja pppGpp samaväärsena, sest varasemad *in vitro* katsed ei ole näidanud nende vahel märkimisväärsed funktsionaalseid erinevusi (Potrykus ja Cashel, 2008).



Joonis 1. (p)ppGpp süntees ATP-st ja GTP/GDP-st.

Selle stressialarmooni sünteesi ja hüdrolüüsi reaktsioone rakus viivad läbi RSH (RelA-SpoT-homoloog) perekonna valgud (Atkinson *et al.*, 2011). RSH-d on võimalik jaotada kolme

rühma: pikad RSH-d (RelA, SpoT ja Rel), väikesed alarmooni süntetaasid (SAS - *small alarmone synthetase*) ja hüdrolaasid (SAH - *small alarmone hydrolase*) (Atkinson *et al.*, 2011).

Geenid *relA* ja *spoT* on tekkinud nende eelkäija *rel* geeniduplikatsiooni ja spetsialiseerumise käigus. Rel valk viib efektiivselt läbi nii (p)ppGpp sünteesi- kui ka hüdrolüüsireaktsiooni (Atkinson *et al.*, 2011; Mittenhuber, 2001). SpoT valdavalt hüdrolüüsib (p)ppGpp-d aga omab ka sünteesimise aktiivust (Sy, 1977; Xiao *et al.*, 1991), samas kui RelA on võimeline ainult sünteesima (Boutte ja Crosson, 2013). Seejuures on oluline, et RelA aktiveerub juba üksikute aminohapete puuduse korral, ning SpoT mitme aminohappe puudusel (Braeken *et al.*, 2006; Jimmy *et al.*, 2020), rauavaegusel, fosfaadinäljas ja lipiidide vaegusel (Boutte ja Crosson, 2013). Mitmed SpoT aktiveerumist põhjustavad mehhanismid on praeguseks veel teadmata (Braeken *et al.*, 2006; Murray ja Bremer, 1996).

Erinevalt pikkadest multidomeensetest RelA ja SpoT valkudest on SAS ja SAH ehituselt väiksemad ühe domeeniga ning ühe kindla funktsiooniga valgud (Atkinson *et al.*, 2011). SAH valgud on olemuselt sarnased SpoTga, viies läbi (p)ppGpp hüdrolüüsireaktsiooni, samas kui SAS valgud on olemuselt sarnasemad RelA-ga, katalüüsides sünteesireaktsiooni (Gaca *et al.*, 2015; Hobbs ja Boraston, 2019). Tõenäoliselt on tegu evolutsiooni käigus omandatud lisageenidega, mis võimaldavad bakterile täpsemaid stressivastuseid ja seega edukamat kohanemist (Atkinson *et al.*, 2011).

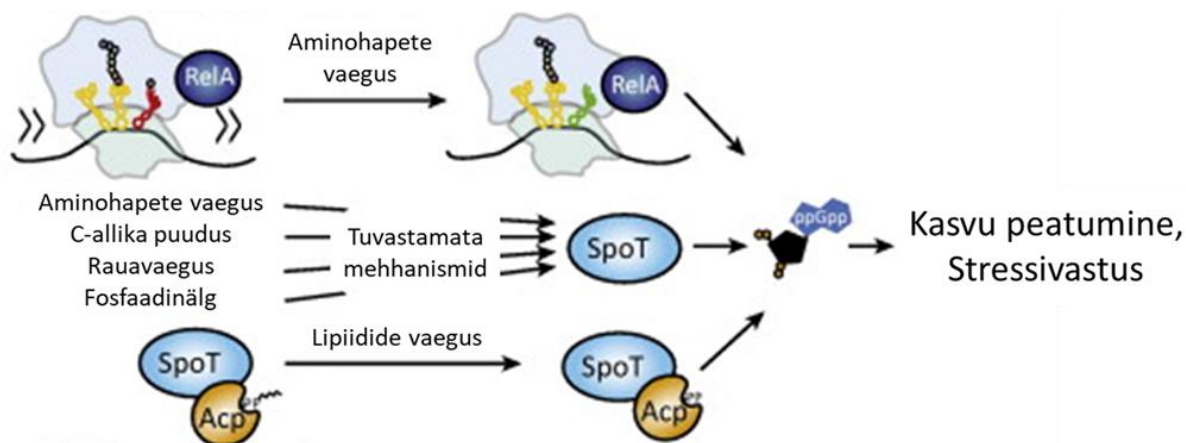
Alarmoon (p)ppGpp on bakterites geeniekspressiooni globaalne regulaator, mille toimel lülitatakse transkriptsioon ümber kasvu ja raku jagunemise geenide avaldumiselt näljaga toimetuleku ning virulentsuse geenide ekspressioonile (Magnusson *et al.*, 2005). Lisaks transkriptsioonile (Vrentas *et al.*, 2008) reguleerib (p)ppGpp ka translatsiooni (Milon *et al.*, 2006; Mitkevich *et al.*, 2010), replikatsiooni (Maciag *et al.*, 2010) ja sageli nende kaudu ka kasvukiirust (Potrykus *et al.*, 2011) ning suunab rakud eksponentsiaalsest kasvufaasist statsionaarsesse faasi (Lazzarini *et al.*, 1971). Muuhulgas mõjutab poomisvastus ka biokile moodustumist, antibiootikumitaluvust ning virulentsust (Römling ja Balsalobre, 2012; Srivatsan ja Wang, 2008).

Poomisvastus on bakteri reaktsioon mitmete toitainete puudusele ja teistele keskkonnamõjudele: aminohapete nälg (Haseltine ja Block, 1973), süsinikuallikate puudus (Flardh *et al.*, 1994), fosfaadinälg (Spira *et al.*, 1995), rasvhappevaegus (Battesti ja Bouveret, 2006), rauavaegus (Vinella *et al.*, 2005), temperatuurimuutus (English *et al.*, 2011; Gallant *et al.*, 1977), happestress (Kanjee *et al.*, 2011; Mouery *et al.*, 2006; Nanamiya *et al.*, 2008; Wells ja Gaynor, 2006) ning aeroobne šokk (Mouery *et al.*, 2006). Selliste muutuste tulemusel

aktiveerub alarmooni (p)ppGpp tootmine ja raku elutegevus suunatakse ümber vastavalt eelkirjeldatule (vaata ka Joonis 2).

(p)ppGpp poolt vahendatud stressivastus, on väga konserveerunud paljudes bakterites (Braeken *et al.*, 2006).  $\beta$ - ja  $\gamma$ -proteobakterites, sh *P. putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, sünteesitakse (p)ppGpp-d RelA ja SpoT valkude vahendusel (Germain *et al.*, 2019). Ülejäänud bakterid kodeerivad vaid ühte suurt RSH valku, milleks on kahe ensümaatilise aktiivsusega Rel (Potrykus ja Cashel, 2008). Lisaks on RSH valke leitud ka taimedest, kus nad on samuti tähtsad stressivastuse regulatsioonis (Braeken *et al.*, 2006; Givens *et al.*, 2004; Van Der Biezen *et al.*, 2000).

Olgugi, et alarmooni (p)ppGpp kirjeldati esmakordselt juba 1960-ndatel aastatel (Cashel ja Gallant, 1969) ja üsna palju on teada selle mikrobioloogilisest olulisusest (Potrykus ja Cashel, 2008) (vaata ka järgnevaid peatükke), on poomisvastuse molekulaarses regulatsioonis veel palju aspekte, mis vajavad uurimist (Irving *et al.*, 2020). Alles viimastel aastatel on selginenud täpsed RSH ensüümide molekulaarse regulatsiooni mehhanismid (Roghianian *et al.*, 2021; Tamman *et al.*, 2020, 2022), mis aitavad täpsemalt mõista, mis mehhanismide kaudu (p)ppGpp süntees ja/või hüdrolyüs aktiveeruvad, selgitades seega poomisvastuse vallandumise tagamaid. Siiski on poomisvastuse täpne funktsioon paljudes stressitingimustes veel mõistmata (Irving *et al.*, 2020).



**Joonis 2. Poomisvastuse alarmooni (p)ppGpp tootmise aktiveerimine.** (p)ppGpp sünteesi indutseerib aminohappeta tRNA sisenemine ribosoomi A-saiti (aminohapete nälg), mis aktiveerib RelA valgu. Mitme aminohappe nälg, süsinikuallikate puudus, rauavaegus ja fosfaadinälg aktiveerivad seni teadmata mehhanismide kaudu SpoT valgu, mis samuti toodab (p)ppGpp-d. Lipiidide vaeguse korral aktiveeritakse SpoT (p)ppGpp sünteesiaktiivsus holoatsüül-kandjavalgu (Acp) kaudu. Alarmooni (p)ppGpp tootmise tulemuseks on bakterite kasvu peatumine ning stressivastus. (Boutte ja Crosson, 2013, muudetud)

### 1.1.1 Poomisvastuseta bakterite kasvukiirus ja kasv minimaalsöötmel

Poomisvastus suunab rakud aeglasemale kasvule, eksponentsiaalsest kasvufaasist statsionaarsesse kasvufaasi (Hauryliuk *et al.*, 2015; Lazzarini *et al.*, 1971). Alarmooni (p)ppGpp kontsentratsioon *E. coli* rakus arvatakse olevat peamine kasvukiirust kontrolliv tegur, sest (p)ppGpp<sup>0</sup> tüvedes on kasv aeglasem ja kasvukiiruse regulatsioon on häiritud (Potrykus *et al.*, 2011). Kaudselt on näidanud (p)ppGpp mõju bakterifüsioloogia kasvult vastupidavusele suunamisel ka *E. coli* geeni *hipA* uuringud. HipA avastati kui persister-rakkude teket indutseeriv valk (Moyed ja Bertrand, 1983). Persister-rakud taluvad väga efektiivselt antibiootikumitöötlust, sest on sisenenud soikeseisundisse, kus nende kasv on minimaalne (Balaban *et al.*, 2019). HipA inhibeerib Glu-tRNA süntetaasi, mis katalüüsib glutamaatide lisamist tRNA-le. Seega põhjustab aktiivne HipA tRNA kuhjumise ribosoomi A-saiti, mis omakorda aktiveerib RelA ning (p)ppGpp sünteesi (Bokinsky *et al.*, 2013; Germain *et al.*, 2013; Kaspary *et al.*, 2013). See näitab, et (p)ppGpp vahendatud regulatsioon suunab bakterirakud soikeseisundisse.

Prototroofid on bakteritüved, mis on võimelised kasvama minimaalsöötmel, millel puuduvad lisatud kasvufaktorid, sh aminohapped (Sze *et al.*, 2002). Kasvufaktorid on orgaanilised ained, mida bakter vajab väikestes kogustes. Auksotroofid vajavad minimaalsöötmel kasvamiseks keskkonnast või teistelt bakteritelt aminohappeid, mida nad ise ei ole võimelised sünteesima (Figueiredo ja Kümmerli, 2020). On näidatud, et *E. coli* ja *B. subtilis* (p)ppGpp<sup>0</sup> tüve (deleteeritud *relA* ja *spoT* või *rel*) rakud ei suuda minimaalsöötmel kasvada ilma aminohapeteta ehk tegu on auksotroofsete tüvedega (Kriel *et al.*, 2012; Potrykus *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 1991). On pakutud, et *E. coli* (p)ppGpp<sup>0</sup> tüve auksotroofsust põhjustab aminohapete biosünteesi geenide ebapiisav transkriptsioon (Barker *et al.*, 2001). Auksotroofne teatud aminohapete suhtes on ka *Enterococcus faecalis* ppGpp<sup>0</sup> tüvi (Gaca *et al.*, 2013).

### 1.1.2 Biokile moodustumine

Biokile (ka biofilm) on struktureeritud bakterikooslused polümeerses maatriksis, mis on kinnitunud biootilisele või abiootilisele pinnale, kaitstes baktereid erinevate keskkonnamõjude, antibiootikumide ja peremeesorganismi immuunsüsteemi eest (Arora *et al.*, 2017; Costerton *et al.*, 1999; K. R. Gupta *et al.*, 2021).

*E. coli* puhul on näidatud, et *relA-spoT* deletsiooni mutant moodustab mikrotiiterplaadi minimaalsöötmes väiksemat biokilet, kuid vedelas LB täissöötmes biokile moodustumine suureneb. Sellest järeldati, et poomisvastuse *relA* ja *spoT* geenid on olulised toitainevaeguses

moodustavas biokiles (Balzer ja McLean, 2002). Võrreldes metsiktüvega on vähenenud biokile moodustumist tuvastatud ka järgmistes (p)ppGpp<sup>0</sup> bakterites: *Enterococcus faecalis* (Chávez de Paz *et al.*, 2012), *Vibrio cholerae* (He *et al.*, 2012), *Bordetella pertussis* (Sugisaki *et al.*, 2013). Vastupidist ehk biokile suurenemist on täheldatud (p)ppGpp<sup>0</sup> bakterites *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Li *et al.*, 2015) ja *Francisella novicida* (Dean *et al.*, 2015). Seega ei ole poomisvastusel ühest mõju biokile moodustumisele, vaid efekt oleneb konkreetsest bakteriliigist või -tüvest.

### 1.1.3 Antibiootikumi- ja kemikaalitolerantsus

Antibiootikumidega ravitakse bakteriaalseid infektsioone, kuid nende väärkasutamine on põhjustanud mitmete ravimiresistentsete bakterite teket ja levikut (K. R. Gupta *et al.*, 2021). Suuresti on selle põhjuseks bakterite aktiivne poomisvastus. Mitmete bakterite, näiteks *E. coli*, poomisvastus on seotud antibiootikumiresistentsuse tekkega, sest *relA* ja *spoT* geenid põhjustavad biokiles integraasi suurenenud ekspressiooni (Strugeon *et al.*, 2016). Seetõttu on bakter vastuvõtavam sissetulevatele resistentsuskassetidele (Strugeon *et al.*, 2016).

Lisaks resistentsuse levikule kaasaaitamisele võib poomisvastus mõjutada ka antibiootikumide taluvust. On näidatud, et *relA* ja *spoT* geenide inaktiveerimine *E. coli*'s vähendab antibiootikumide suhtes tolerantsete bakterite arvu enam kui 65 korda (Nguyen *et al.*, 2011). Sarnast olukorda on näidatud ka teatud kemikaalide suhtes, näiteks *E. coli*  $\Delta relA \Delta spoT$  tüve nitrokinoliini taluvus oli üle 100 korra madalam võrreldes metsiktüvega (Kamarthapu *et al.*, 2016). Poomisvastuse inaktiveerimine muutis ka *P. aeruginosa* tundlikumaks mitmetele antibiootikumidele, suurendades antibiootikumide efektiivsust (Nguyen *et al.*, 2011). Sarnast tulemust presenteerisid ka P. Stewart kolleegidega (Stewart *et al.*, 2015), kes kasvasid *P. aeruginosa* ilma *rpoS*, *relA* ja *spoT* geenideta mutanti biokiles, kuhu lisati antibiootikumi tsiprofloksatsiin. Katse tulemusel vähenes mutanttüve elujõuliste rakkude arv biokiles ligi kolm korda rohkem võrreldes metsiktüvega (Stewart *et al.*, 2015). Lisaks on antibiootikumitaluvuse vähenemist ja rakkude kõrgemat suremust näidatud toitainevaeguses biokiles kasvaval *P. aeruginosa*  $\Delta relA \Delta spoT$  bakteritüvel, näiteks gentamüsiini töötlusel (Hobbs ja Boraston, 2019; Nguyen *et al.*, 2011). Kusjuures autorid jõudsid järeldusele, et toitainetega piiratud *P. aeruginosa* ja tema biokile antibiootikumitaluvust vahendavad just poomisvastuse nälgstressi reaktsioonid (Nguyen *et al.*, 2011).

Samas on *Mycobacterium smegmatis*'es kirjeldatud poomisvastuse peamise valgu Rel puudumisel antibiootikumi tolerantsuse suurenemist. Nimelt selle bakteri  $\Delta rel$  tüvi oli

rifampitsiinile vastupidavam (Bhaskar *et al.*, 2018; K. R. Gupta *et al.*, 2015). Autorid pakkusid muuhulgas põhjuseks *Rel* rakuseina lipiidse koostise muutuse, mis takistas rakul antibiootikumi vastuvõtmist (K. R. Gupta *et al.*, 2015). Samas peab kindlasti ka meeles pidama, et Rel valk ei ole selle bakteri ainus (p)ppGpp tootja ehk tegu ei olnud (p)ppGpp<sup>0</sup> tüvega. Nimelt kodeerib *M. smegmatis* ka SAS valku RelZ, mis võib samuti (p)ppGpp-d sünteesida (K. R. Gupta *et al.*, 2021; Krishnan *et al.*, 2016; Murdeshwar ja Chatterji, 2012).

#### 1.1.4 Faagivastane kaitse

Bakteriofaagid ehk faagid on viirused, mis nakatavad baktereid. Neid arvatakse biosfääris olevat 10<sup>31</sup> partiklit, mida on 10 korda rohkem kui baktereid (Fortier ja Sekulovic, 2013). See hoiab baktereid keskkonnas pideva stressi all.

On selgeid viiteid poomisvastuse olulisuse kohta faagi nakatumise korral *E. coli* näitel, kus faagiinfektsioon põhjustab rakus (p)ppGpp taseme tõusu (Nowicki *et al.*, 2013; Tabib-Salazar *et al.*, 2018). Bakteriofaagi T7 nakatamise korral hakkab *E. coli* vastuseks faagile tootma suures hulgas (p)ppGpp-d, mis rakus akumulereerub, takistamaks T7 spetsiifiliste valkude tootmist, mis inhibeeriksid bakteri RNA polümeraasi koduhoidja gene (Tabib-Salazar *et al.*, 2018). D. Nowicki kolleegidega (2013) näitasid, et *E. coli* ppGpp<sup>0</sup> tüvi (puuduvad nii *relA* kui *spoT* geenid) toodab faaginakkuse korral rohkem virione võrreldes metsiktüvega ning faaginakkus tekitas bakterimuruga tassil märgatavalt suuremaid faagilaike (Nowicki *et al.*, 2013). Autorid järeldasid, et poomisvastus mõjutab negatiivselt faagide lüütilist arengut ning faagide DNA replikatsiooni efektiivsust (Nowicki *et al.*, 2013).

Sarnaseid viiteid (Fernández *et al.*, 2017) faagiinfektsiooni tõttu suurenenud (p)ppGpp sünteesigeenide ekspressioonist on näidatud ka *Staphylococcus aureus*'e kohta. Lisaks põhjustab madala bakteriofaagide kontsentratsiooni mõjul indutseeritud poomisvastus sellel bakteril paksema ja suurema DNA sisaldusega biokile teket võrreldes kontrollkatsega (Fernández *et al.*, 2017). Vaatamata sellele on faagid ka olulised biokilede eemaldajad erinevate mehhanismide (Chan ja Abedon, 2015; Gutiérrez *et al.*, 2012; Parasion *et al.*, 2014) kaudu, aidates võidelda antibiootikumiresistentsete tüvedega (K. Gupta *et al.*, 2013), kuid faagiinfektsiooni kahetise mõju tõttu on äärmiselt oluline faagitiiter, mida kasutatakse biokilede töötlemiseks.

Bakteriofaagid liigitatakse vastavalt elutsüklile lüütilisteks või mõõdukateks ehk lüsogeenseteks faagideks (Bondy-Denomy *et al.*, 2016). Lüütilise elutsükliga faagid replitseeruvad ja väljuvad peremeesrakust lüüsimise teel, samas kui lüsogeensed faagid

jagunevad koos peremeesrakuga, kas integreerudes nende genoomi (profaagid) või plasmiidina (Young, 2013; Zhang *et al.*, 2022). Samas võivad mõõdukad faagid minna üle lüütilisele tsüklile, seda näiteks keskkonnast põhjustatud stressi tõttu (Salmond ja Fineran, 2015). Peremeesraku lüüsimine tähendab üldjuhul bakteriraku surma (Roach ja Donovan, 2015; Young, 2013), kuid teatud filamentsed faagid väljuvad ka välismembraani sekretsiooni kaudu, mis ei lüüsi rakku, kuid aeglustab peremeesraku kasvu (Rakonjac *et al.*, 2011). On näidatud, et (p)ppGpp tase mõjutab *E. coli*'t nakatava mõõduka faagi  $\lambda$  valikut lüütilise ja lüsogeense tsükli vahel (Benler ja Koonin, 2020; Slomińska *et al.*, 1999). Kõrge või puuduv (p)ppGpp kontsentratsioon rakus soodustab *E. coli* bakteriofaagi lüütilist elutsükli, samas kui madal (p)ppGpp kontsentratsioon soodustab faagi integratsiooni bakteri kromosoomi (Slomińska *et al.*, 1999).

Väikeseid RSH ensüüme ehk SASe ja SAHe on tuvastatud ka bakteriofaagide genoomidest, kus nad esinevad operonidena, mis meenutavad toksiin-antitoksiin süsteeme (TAS). TASid on bakterites kodeeritavad enamasti kahest komponendist koosnevad süsteemid, millest üks on bakterile kahjulik toksiin ja teine toksilisuse neutraliseerija (Jimmy *et al.*, 2020). SASide ja SAHide osalus sellistes süsteemides vihjab, et (p)ppGpp kontsentratsioon võib käituda toksiinina, mis on bakterile kahjulik või juhib bakterid soikeseisundisse (Ahmad *et al.*, 2019; Harms *et al.*, 2018). Sellist SAS valkude toksilisuse potentsiaali toetab ka tähelepanek, et (p)ppGpp üleproduktioonil kui SpoT hüdrolyüs ei tasakaalusta RelA sünteesi, muutub alarmoon kahjulikuks ja pärsib bakteri kasvu (Jimmy *et al.*, 2020; Xiao *et al.*, 1991).

## 1.2. Poomisvastus *Pseudomonas putida*'s

*P. putida* on gramnegatiivne keskkonnabakter, keda leidub nii mullas kui vees. Mullas on need bakterid taimede risosfääri bakterikoosluste fundamentaalne osa (Girard *et al.*, 2021; Molina *et al.*, 2000). Lisaks kodeerivad perekond *Pseudomonas* esindajad väga mitmekesiseid metabolismi radu. Nende omaduste tõttu kasutatakse *P. putida*'t aktiivselt bioremediatsioonil ja biostimulatsioonil (Girard *et al.*, 2021).

Varasemalt on kirjeldatud, et *P. putida* KT2440 (p)ppGpp<sup>0</sup> tüvi on prototroofne ja ei vaja minimaalsöötmet kasvamiseks juurde ühtegi aminohapet (Bernardo *et al.*, 2009; Sze *et al.*, 2002). Tüvede prototroofsus vähendab survet kompensatoorsete mutatsioonide tekkeks ja võimaldab läbi viia katseid erinevates kasvutingimustes.

Lisaks ppGpp<sup>0</sup> tüve prototroofsuse kirjeldamisele, on väga põhjalikult uuritud poomisvastuse mõju *P. putida* biokilele. Carlos Díaz-Salazar ja tema kolleegide (Díaz-Salazar *et al.*, 2017) uurimistulemustest saab järeldada, et poomisvastus stimuleerib *P. putida* biokile lagunemist ehk biokilest irdumist toitainete puuduse korral, soodustades biokile maatriksi struktuurvalgu LapA proteolüüsi ning takistades selle sünteesi ja sekretsiooni. Arvatakse, et biokilest irdumine on reguleeritud levimisstrateegiaga, mis võimaldab uute piirkondade koloniseerimist enne toitainete puudust (Díaz-Salazar *et al.*, 2017; Petrova ja Sauer, 2016). Sama tulemust kinnitavad ka H. Liu ja kolleegide (Liu *et al.*, 2017) katsed, kus *P. putida* KT2440 tüve (p)ppGpp sünteesigeenide deleteerimine suurendab mikrotiiterplaatidel biokile moodustumist. Deletsioontüvedes esines ka muutusi biokile struktuuri mõjutavate transkriptsiooniregulaatorite ekspressioonis, mis vihjab, et (p)ppGpp võib kaudselt vahendada biokile maatriksi sünteesi (Liu *et al.*, 2017).

Vaatamata sellele, et on näidatud, et *P. putida* poomisvastus mõjutab biokile moodustumist ja irdumist, puudub selge ülevaade poomisvastuse mõjust selle bakteri üldisele füsioloogiale. Et *P. putida* on põhiline osa taimejuuri koloniseerivatest bakterikooslustest ja on kasutusel kui keskkonnabakterite mudelorganism, on oluline mõista poomisvastuse rolli *P. putida* füsioloogias ja faagivastases kaitses. Viimane neist on jäänud varasemates uuringutes eriti tagaplaanile, kuna *P. putida* 't nakatavaid bakteriofaage oli veel hiljuti isoleeritud vaid üksikuid. Seega vajab *P. putida* poomisvastus ja faagitaluvus põhjalikumaid uuringuid.

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1. Töö eesmärgid

Poomisvastus on bakteritel oluline stressimehhanism, mis aitab muutlike keskkonnatingimustega toime tulla. Selline kohanemine ümbritseva keskkonnaga mõjutab selgelt ka bakteri füsioloogiat, kuid nagu sai eelnevas töös osas kirjeldatud, head ülevaadet poomisvastuse mõjust *P. putida* füsioloogiale ei ole. Varasemalt on vaid näidatud, et poomisvastus mõjutab *P. putida* biokile moodustumist ning *P. putida* (p)ppGpp<sup>0</sup> tüvi on prototroofne. Lisaks on isoleeritud äärmiselt vähe keskkonnabakterit *P. putida* nakatavaid bakteriofaage, mistõttu ei ole seni uuritud ka selle bakteri faagitaluvuse sõltuvust poomisvastusest. Meie uurimisrühm on aga asunud viimastel aastatel looma *P. putida*'t nakatavate bakteriofaagide kollektsiooni. Antud töö viidi läbi, et katta seni täitmata lünki poomisvastuse mõjust *P. putida* füsioloogiale ning faagitolerantsusele. Eesmärgi saavutamiseks:

- testisin *P. putida* poomisvastuse  $\Delta$ RelA ja  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT tüvede kasvu minimaalsöötmetel;
- võrdlesin metsiktüve ja poomisvastuse mutantide rakkude suurust ja membraaniläbilaskvust üksikraku tasandil
- testisin *P. putida*  $\Delta$ RelA ja  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT tüvede antibiootikumi- ning kemikaalitolerantsust;
- testisin *P. putida* poomisvastuse  $\Delta$ RelA ja  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT tüvede faagikaitset.

## 2.2. Materjal ja meetodika

### 2.2.1. Kasutatud söötmed ja bakteritüved

Bakterite kasvatamiseks kasutati kas vedelat LB (ingl *lysogeny broth*) täissöödet (1% trüpton, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl), LB tardsöödet (1,5% agar), pehmet LB tardsöödet (0,3% agar) või minimaalsöötmeid (prototroofsuse määramisel). Minimaalsöötmed sisaldasid vesiagarit (1,5% agar), M9 puhvrit (42 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 19 mM NH<sub>4</sub>Cl, 9 mM NaCl), mikroelementide lahust (lõppkontsentratsioonidega 667 µM MgO, 50 µM CaCO<sub>3</sub>, 40 µM FeSO<sub>4</sub>, 12,5 µM ZnSO<sub>4</sub>, 12,5 µM MnSO<sub>4</sub>, 2,5 µM CuSO<sub>4</sub>, 2,5 µM, CoSO<sub>4</sub>, 1,9 µM H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>) ja süsinikuallikana 0,2% suksinaati (SUC), 0,2% glükonaati (GLN), 0,2% glükoosi (GLC), 0,2% Na-bensoaati (BENS), 0,2% fruktoosi (FRU) või 0,2% glütserooli (GLY).

Kasutatud bakteritüved ja bakteriofaagid on toodud alljärgnevas tabelis (Tabel 1). Meie laboris on bakteriofaagide genoomid sekveneeritud ja määratud vastavatesse faagiperekondadesse (70% genoomide identsus, numbriline määratlus) ja faagiliikidesse (95% identsus, täheline määratlus). Selle alusel kuulub näiteks G1A sekveneerimisgruppi Amme 3 faag (perekond G1, liik A) (Tabel 1).

Baktereid kasvatati temperatuuril 30 °C või 20 °C (faagiga nakatamise katsed). Vedelsöötmes kasvatades aereeriti kultuure loksutil. Faagilahjendused tehti SM puhvis (100 mM NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,01% želatiin), mis stabiliseerib faagipartikleid ja tagab seeläbi parema faagipreparaatide säilimise.

**Tabel 1.** Töös kasutatud bakteritüved ja bakteriofaagid.

Tüvi	Iseloomustus	Allikas
<b><i>Pseudomonas putida</i> bakteritüved</b>		
PaW85	Metsiktüvi	(Rosendahl <i>et al.</i> , 2020)
ΔRelA (ΔR)	PaW85, millest on eemaldatud geen <i>relA</i>	Hedvig Tamman
ΔRelAΔSpoT (ΔRS)	PaW85, millest on eemaldatud geenid <i>relA</i> ja <i>spoT</i>	Hedvig Tamman
<b>Bakteriofaagid</b>		
Amme 3	Keskonnaproovist eraldatud bakteriofaag. Sekveneerimisgrupp G1A.	Rita Hõrak, Age Brauer
Nõo 2	Keskonnaproovist eraldatud bakteriofaag. Sekveneerimisgrupp G1C.	Rita Hõrak, Age Brauer
Laguja oja 3	Keskonnaproovist eraldatud bakteriofaag. Sekveneerimisgrupp G5B.	Rita Hõrak, Age Brauer

Tüvi	Iseloomustus	Allikas
<b>Bakteriofaagid</b>		
Suure Kambja 3	Keskkonnaproovist eraldatud bakteriofaag. Sekveneerimisgrupp G5B.	Hedvig Tamman, Age Brauer
Hammaste oja 2	Keskkonnaproovist eraldatud bakteriofaag. Sekveneerimisgrupp G5B.	Sirli Rosendahl, Age Brauer
Luke 3	Keskkonnaproovist eraldatud bakteriofaag. Sekveneerimisgrupp G6A.	Rita Hõrak, Age Brauer

### 2.2.2. Bakterite kasv erinevatel tardsöötmetel

*P. putida* PaW85,  $\Delta$ RelA ja  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT tüvesid kasvatati üleöö (~16 h) LB vedelsöötmes. Seejärel tehti kultuurist 50-kordne lahjendus värskesse LB vedelsöötmesse ning rakke kasvatati ette vastavalt 3 h ( $OD_{580} \sim 1-2$ ), 8 h või 24 h. Kolooniaarvukuse võrdlemiseks tehti bakterikultuuridest  $10^1-10^6$ -kordsed lahjendused 1 x M9 puhvris, mis pipeteeriti 5  $\mu$ l tilkküvina LB tardsöötmele. Lisaks mõõdeti rakutihedus (OD) lainepikkusel 580 nm. Tasse inkubeeriti 24 h temperatuuril 30 °C. Katset korrati neli korda.

Aukso- ja prototroofsuse määramiseks testiti poomisvastuse suhtes defektsete tüvede kasvu minimaalsöötmetel. Auksotroofid vajavad minimaalsöötmel kasvamiseks lisaks aminohappeid, samas kui prototroofid ei vaja.

Minimaalsöötmetes kasutati järgmisi süsinikuallikaid (lõppkontsentratsiooniga 0,2%): suktsinaat (SUC), glükonaat (GLN), glükoos (GLC), Na-bensoaat (BENS), fruktoos (FRU) või glütserool (GLY). Kontrollkatseks kasutati LB tardsöödet. Ettekasvatatud bakterikultuurid lahjendati kümnekordsete lahjenduste reana ( $10^1-10^6$ -kordsed lahjendused) 1 x M9 puhvris, millest tehti minimaaltassidele 5  $\mu$ l tilkküvid. Tasse inkubeeriti 24 h või 44 h (FRU, GLY) temperatuuril 30 °C. Iga süsinikuallikaga korrati katset kaks korda.

### 2.2.3. Fluorestsentsmikroskoopia

Topeltmutandi rakusuuruse ja rakumembraani läbilaskvuse võrdlemiseks metsiktüvega vaadeldi rakke fluorestsentsmikroskoobis. Selleks kasvatati PaW85 ja  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT tüvesid üleöö (~16 h) LB vedelsöötmes. Üleöö kultuurist tehti 50-kordne lahjendus värskesse söötmesse ning rakke kasvatati vastavalt 3 h, 8 h või 24 h.

Seejärel värviti 5  $\mu$ l vedelsöötmes kasvanud rakke LIVE/DEAD *Baclight* komplekti fluorestseeruvate värvidega propiidiumjodiid (PI) ja SYTO9 (Thermo Scientific), lisades võrdses ruumalas (5  $\mu$ l) PI/SYTO9 värvisegu (0,03% värvisegu 1 x M9 puhvris). Need

fluorestseeruvad värvid seonduvad bakteri DNAGA, kusjuures SYTO9 pääseb kõikidesse rakkudesse ja fluorestseerub roheliselt, kuid PI pääseb ainult läbilaskva membraaniga rakkudesse ning fluorestseerub punaselt. Kui SYTO9 ja PI on korraga rakus, siis need fluorokroomid konkureerivad omavahel DNAGA seondumisel ning propiidiumjodiid varjestab SYTO9.

Värvitud rakukultuuri pipeteeriti alusklaasil olevale ligikaudu 1 cm<sup>2</sup> suurusele agarsöötme tükile, millele lisati katteklaas ning rakke vaadeldi 1000-kordse suurendusega fluorestsentsmikroskoobis öliimmersioonis, kasutatud filter võimaldas vaadelda nii rohelist kui punast fluorestsentsi. Katset korrati kaks korda kolme tehnilise paralleeliga.

#### 2.2.4. Rakkude loendamine loenduskambri abil

Metsiktüve ja  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT tüve arvukuse määramiseks ja võrdlemiseks erinevatel ajapunktidel (3 h, 8 h, 24 h) kasutati loenduskambri meetodit. Vedelsöötmes aereerides temperatuuril 30 °C ette kasvatatud rakud fikseeriti keemiliselt 1% formaldehüüdiga ning seejärel tehti rakkudest lahjendused: 3 h kasvanud rakukultuurist 10-kordne lahjendus, 8 h kasvanud rakukultuurist 50-kordne lahjendus ja 24 h kasvanud rakukultuurist 100-kordne lahjendus 1 x M9 puhvris. 10  $\mu$ l proovi pipeteeriti Gorjajevi loenduskambrisse (ruumalaga 0,00025 mm<sup>3</sup>) ning rakke mikroskoobiti kuivsüsteemis 400-kordse suurendusega. Katset korrati viis korda. Algproovis olevate rakkude arv milliliitris arvutati valemiga:

$$\frac{\text{rakku}}{\text{ml}} = \frac{\text{rakkude arv} \times \text{lahjendusfaktor}}{\text{kambri ruumala}}$$

#### 2.2.5. Lävivoolutsütomeetria

Bakteritüvede membraanide läbilaskvuse ja populatsioonide täpsemaks uurimiseks kasutati lävivoolutsütomeetria. Selleks kasvatati kõiki tüvesid (PaW85,  $\Delta$ RelA,  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT) loksutil üleöö (~16 h) LB vedelsöötmes. Üleöö kultuurist tehti 50-kordne lahjendus värskesse LB vedelsöötmesesse ning rakke kasvatati ette vastavalt 3 h, 8 h või 24 h temperatuuril 30 °C. Igal ajapunktil tsentrifuugiti 1 mL rakukultuuridest lauatsentrifuugis täispööretel (45 sekundit, 12 100 x g) söötme eemaldamiseks, võeti üles 1 mL filtreeritud 1 x M9 puhvris ja määrati rakusegu optiline tihedus lainepikkusel 580 nm. Seejärel lahjendati rakukultuuri nii, et optiline tihedus (OD<sub>580</sub>) oleks 0,03 ning 75  $\mu$ l'ile rakulahjendusele lisati 3,75  $\mu$ l 0,03% PI/SYTO9 värvisegu M9 puhvris ja lasti temperatuuril 30° C pimedas 30 minutit värvuda. Lävivoolutsütomeetria viidi läbi masinaga Becton Dickinson FacsAria I. Lisaks fluorestsentsvärvidele eristatakse

läbivoolutsütomeetrias rakke otsehajuvuse (rakkude suhteline suurus) ja külghajuvusega (rakkude suhteline granulaarsus, rakusisaldiste hulk). Surnud rakkude subpopulatsioon on väiksema külghajuvusega ja tihti suurema väljalekinud tsütoplasmaatilise sisaldisega ning vähenenud DNA hulgaga (nõrgem fluorestsents). Erinevalt tervetest rakkudest, mis SYTO9 toimel fluorestseeruvad roheliselt, pääseb läbilaskva membraaniga rakkudesse ka punaselt fluorestseeruv propiidiumjodiid (PI). Seega fluorestseeruvad erineva membraaniläbilaskvusega rakud erineva lainepikkusega valgust. Tulemuste analüüsimiseks kasutati Flowing Software 2.5.1 programmi. Katset korrati kaks korda kolme tehnilise paralleeliga.

### 2.2.6. Antibiootikumi- ja kemikaalitolerantsus agarsöötmed

Selleks, et hinnata poomisvastuse olulisust bakterite stressitaluvuses kasvatati bakterirakke erinevaid antibiootikume ja kemikaale sisaldavatel LB tardsöötmetel. Selleks kasvati baktereid üleöö (~16 h) LB vedelsöötmes. Üleöö rakukultuurist tehti 50-kordne lahjendus värskesse LB vedelsöötmesesse ning kasvatati veel 8 h. Seejärel tehti rakukultuurist 10-kordsete lahjenduste rida ( $10^{-10}$  lahjendused, 1 x M9 puhvris), mis külvati 5 µl tilkadena kemikaale või antibiootikume sisaldavatele LB agarsöötme tassidele. Testitud antibiootikumid ja kemikaalid ning kasutatud kontsentratsioonid on toodud tabelis (Tabel 2). Kontrolltassile antibiootikume ega kemikaale ei lisatud. Tasse inkubeeriti 24 h või 44 h temperatuuril 30 °C. Katset korrati sõltuvalt antibiootikumist ja kemikaalist 3-9 korda.

**Tabel 2.** Töös kasutatud antibiootikumid ja kemikaalid.

	Lühend	Testitud kontsentratsiooni- vahemikud	Mõju bakterile
<b>Antibiootikumid</b>			
Polümüksiin B	PolyB	0,3-0,45 µg/mL	Lõhub bakterite rakumembraane
Gentamütsiin	Gm	1,5-2 µg/mL	Inhibeerivad translatsiooni
Klooramfenikool	Cm	30-120 µg/mL	
Bensüülpenitsilliin	Bp	300-400 µg/mL	Inhibeerib peptidoglükaani sünteesi
Tsiprofloksatsiin	Cipro	0,02-0,05 µg/mL	Põhjustab DNA katkete teket

	Lühend	Testitud kontsentratsiooni-vahemikud	Mõju bakterile
<b>Kemikaalid</b>			
Etüleendiamiintetraäädikhape	EDTA	1-1,5 mM	Suurendab välis-membraanide läbilaskvust
Naatriumkloriid	NaCl	200-500 mM	Põhjustab osmootset šokki
Nitrokinoliin	NQ	100-300 mM	Põhjustab oksüdatiivset stressi

### 2.2.7. Faagikaitse testimine agarsöötmel

Poomisvastuse võimalikku tähtsust faagivastases kaitstes uuriti LB agarsöötmel. Selleks kasvatati kõiki tüvesid aereerides LB vedelsöötmes temperatuuril 20 °C üleöö (~16 h). Üleöö kultuurist tehti 15-kordne lahjendus värskesse LB vedelsöötmesesse. Eksponentsiaalse ja statsionaarse kasvufaasi rakkude saamiseks kasvatati rakke ette vastavalt ~4 h (OD<sub>580</sub> ~ 1) või 48 h temperatuuril 20 °C.

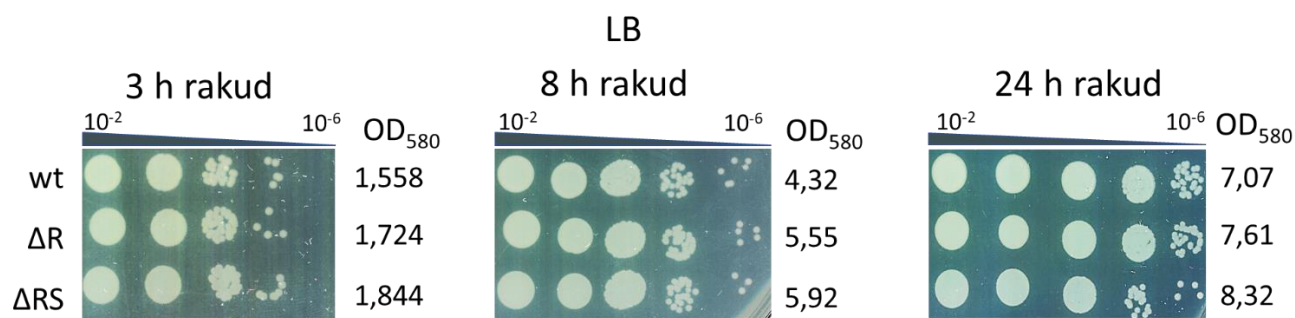
Valati topeltagariga tassid, mille alumine kiht oli LB tardsööde (1,5% agar) ja pealmine (bakterimuruga kiht) LB pehme-agar (0,3% agar). Bakterimuruga kihi valamiseks segati kokku ~5 mL LB pehme-agarit ning 200 µl eksponentsiaalse kasvufaasi (4 h) või 50 µl statsionaarse kasvufaasi (48 h) rakke. LB tardsööde sisaldas faagide lüütilise tsükli indutseerimiseks tsiprofloksatsiini (0,03 µg/mL) ja pehme-agarile lisati faagide infektsiooniefektiivsuse suurendamiseks CaCl<sub>2</sub> (10 mM).

Faagifiltraadid viidi SM puhvrts tiitrini 10<sup>8</sup> PFU/mL (*plaque forming unit* – faagilaiku tekitav ühik) ning lahjendati SM puhvrts 10-kordsete lahjenduste reana kuni 10<sup>6</sup>-kordse lahjenduseni. Bakterimurule pipeteeriti iga lahjendust 1,5 µl tilkkülvina ja tase inkubeeriti üleöö (16 h) temperatuuril 20 °C. Katset korrati 3 korda.

## 2.3. Tulemused

### 2.3.1. *P. putida* $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT kolooniate moodustumine on hilises statsionaarses faasis vähenenud

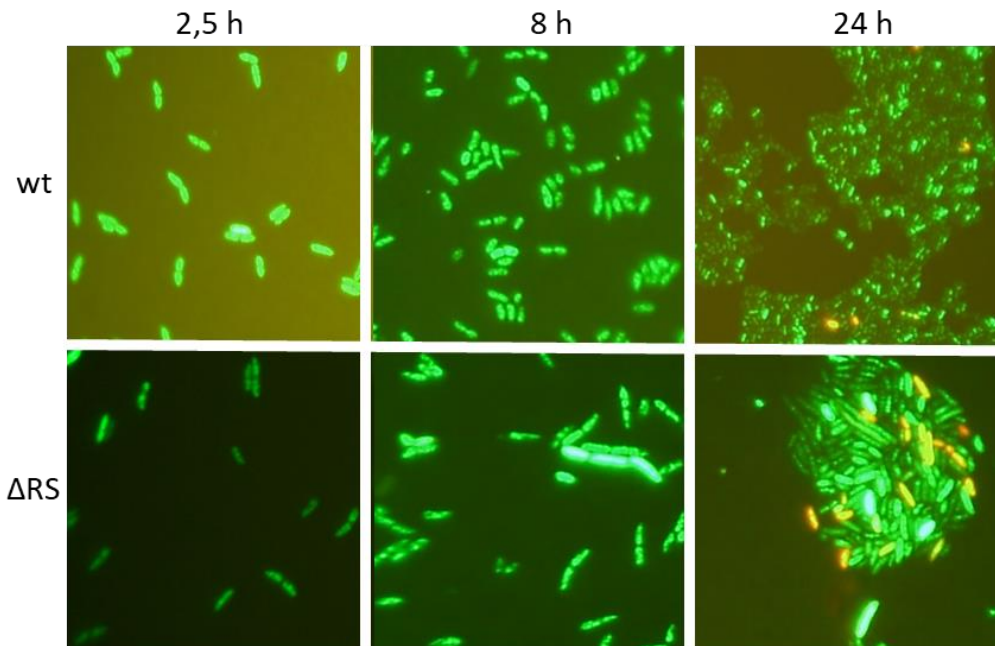
Enne planeeritud põhikatsete läbiviimist võrreldi erinevate bakteritüvede kasvu LB tardsöötmel. Katsetulemused näitavad, et kõigi kolme võrreldud tüve (wt,  $\Delta$ RelA,  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT) rakuarvukus on sarnane 3 h (eksponentsiaalne faas) ja 8 h kultuuride puhul (varajane statsionaarne faas), samas kui 24 h bakteritüvede rakuarvukus on üksteisest märgatavalt erinev (Joonis 3). Muuhulgas selgub tulemustest, et 24 h ette kasvatatud  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT tüvi moodustab LB tardsöötmel küll vähem kolooniaid, kuid rakukultuuri tihedus ( $OD_{580}$ ) on suurem kui sama ajapunkti teistel tüvedel (Joonis 3). See pani aluse uuele hüpoteesile, et  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT rakud on teiste testitud tüvede rakkudest suuremad.



**Joonis 3. *P. putida* 3 h ja 8 h ette kasvatatud bakteritüvedel on sarnane kolooniaarvukus.** *P. putida* PaW85 (wt),  $\Delta$ RelA ( $\Delta$ R) ja  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT ( $\Delta$ RS) tüvede rakuarvukus erinevatel ajapunktidel (3 h, 8 h, 24 h) LB tahkel söötmel. Rakutihedus ( $OD_{580}$ ) on märgitud iga tüve kohta iga pildi kõrval. Lahjenduskordused, millest tilkkülvid tehti ( $10^2$ - $10^6$ ) on joonisel näidatud pildi kohal. Tasse inkubeeriti 24 h temperatuuril 30 °C. Katset on korratud neli korda.

### 2.3.2 *P. putida* $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT statsionaarse kasvufaasi rakud on metsiktüvega võrreldes suuremad

Topeltmutandi rakusuuruse ja rakumembraani läbilaskvuse võrdlemiseks metsiktüvega vaadeldi rakke fluorestsentsmikroskoobis („Materjal ja meetodika“, peatükk 2.2.3). Antud katse eesmärgiks oli leida vastus eelkatse käigus püstitatud hüpoteesile, et topeltmutandi rakud on suuremad kui metsiktüve rakud, sest  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT rakukultuur oli alati kõrgema optilise tihedusega ( $OD_{580}$ ) ning statsionaarse kasvufaasi rakud moodustasid söötmel vähem kolooniaid. Rakud on värvitud SYTO 9 ja PI värviseguga. Eksponentsiaalse (2,5 h) ja varajase statsionaarse kasvufaasi (8 h) rakusuuruses märgatavaid erinevusi ei esine (Joonis 4). 24 h  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT rakud on aga metsiktüve rakkudest suuremad.

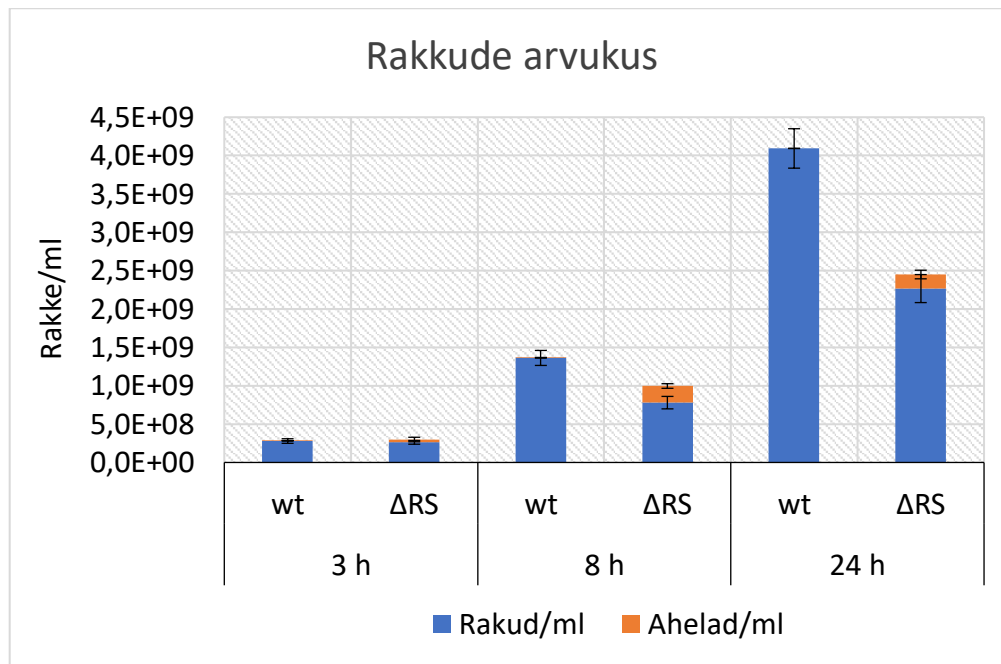


**Joonis 4. Statsionaarse kasvufaasi topeltnutandi ( $\Delta$ RS) rakud on võrreldes metsiktüvega (wt) suuremad.** Metsiktüve (wt) ja  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT tüve ( $\Delta$ RS) eksponentsiaalse (2,5 h), varajase statsionaarse (8 h) ning statsionaarse (24 h) kasvufaasi rakud on värvitud SYTO 9 ja PI värviseguga. Rakke kasvatati eelnevalt ette vedelas LB täissöötmes temperatuuril 30 °C. Vaadeldud epifluorestsents mikroskoobiga. Rakke vaadeldi 1000-kordse suurendusega.

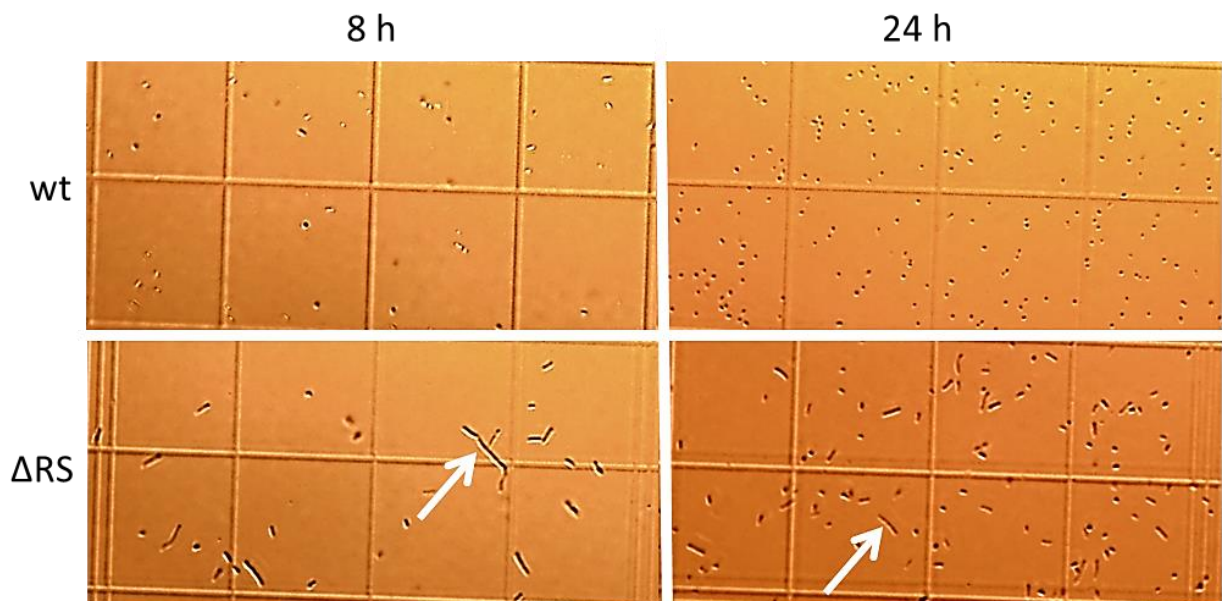
### 2.3.3. *P. putida* statsionaarse kasvufaasi $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT rakuarvukus erineb metsiktüvest

Bakterirakkude suuruse erinevus selgitas küll kõrgemat optilist tihedust ( $OD_{580}$ ), kuid selgitamaks, kas tüvedel on erinev kolooniate moodustamise võimekus, millest tuleneb näiline rakuarvukuse langus, või on ka vedelkultuuris tüvede rakuarvukus erinev, määrati bakteritüvedel ka rakkude arvukus vedelkultuuris erinevatel ajapunktidel. Selleks kasutati loenduskaambi meetodit („Materjal ja meetodika“, peatükk 2.2.4).

Rakuarvukuse määramisest selgub, et wt ja  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT bakteritüvede rakuarvukus on võrdväärne 3 h ajapunktil, samas kui 8 h ja 24 h kasvanud kultuurides on rakkude arvukus erinev (Joonis 5). Lisaks on jooniselt 6 näha, et 8 h ja 24 h ettekasvatatud  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT rakud moodustasid märkimisväärselt rohkem ahelaid võrreldes metsiktüvega. Ahelad koosnesid vähemalt kahest otsapidi ühendatud rakust, mis on loendamisel arvestatud ühe rakuna. Kui arvestada, et ühes ahelas võis olla mitu koloonia moodustamise võimega rakku, võib rakuarvukuse erinevus PaW85 ja  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT vahel näida reaalsest veidi suurem.



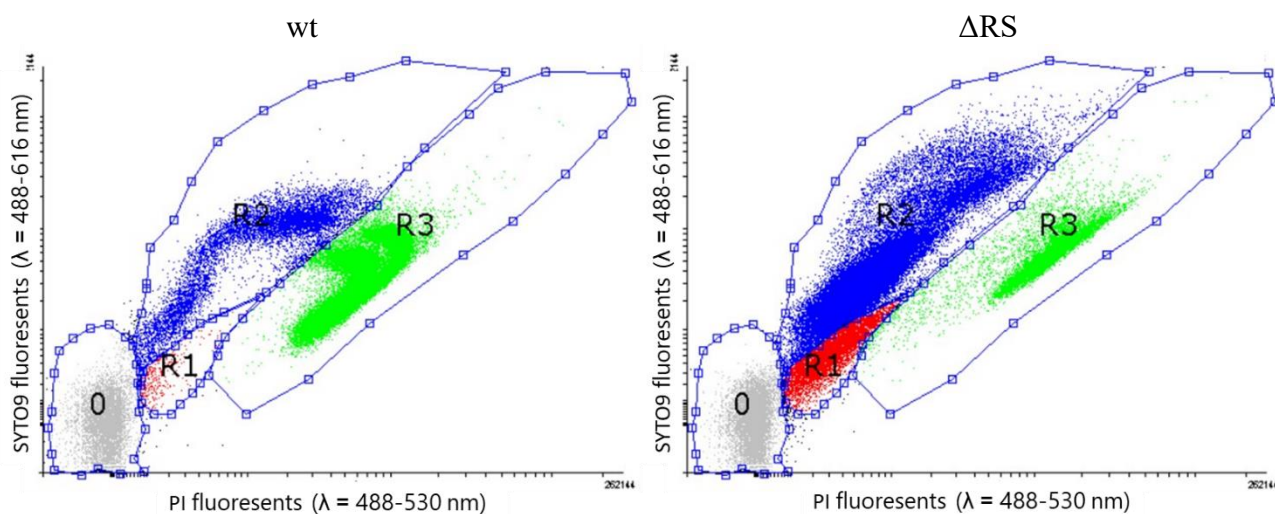
**Joonis 5. Statsionaarse kasvufaasi topelmutantide ( $\Delta$ RS) rakuarvukus erineb metsiktüvest (wt). *P. putida* PaW85 (wt) ja  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT ( $\Delta$ RS) tüvede rakuarvukus milliliitris erinevatel ajapunktidel (3 h, 8 h, 24 h). Ahelad on loendamisel arvestatud ühe rakuna. Tulemused on esitatud 95%-usaldusintervallidega viiest bioloogiliselt sõltumatus katsest.**



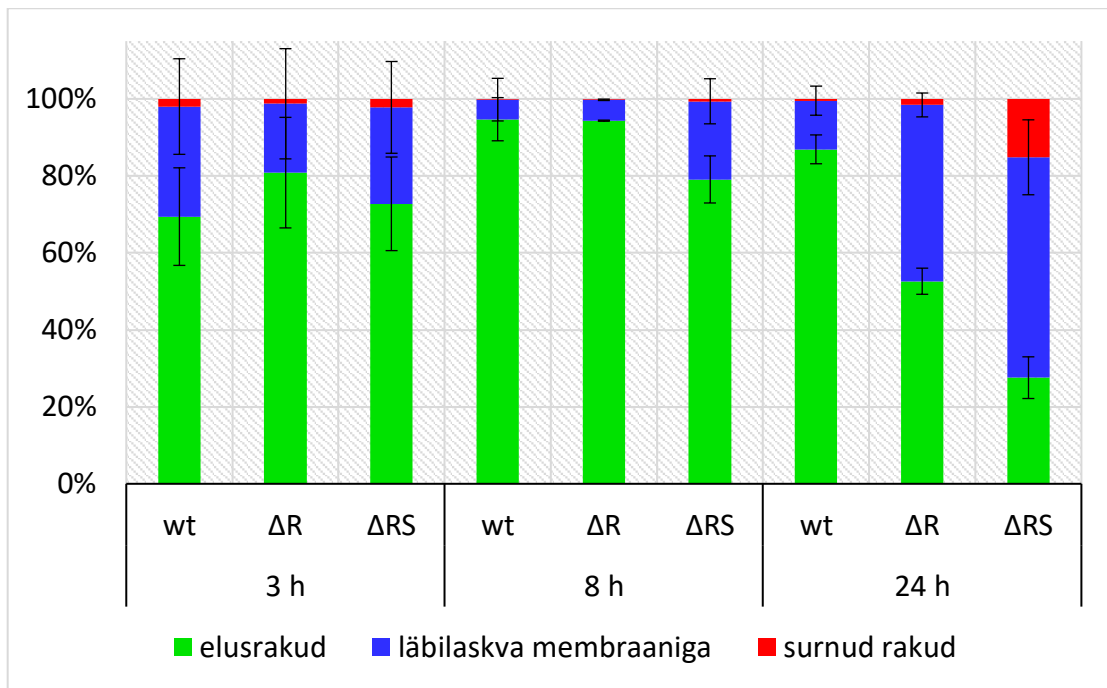
**Joonis 6. 8 h ja 24 h ette kasvatatud  $\Delta$ RS rakud moodustavad rohkem ahelaid võrreldes metsiktüvega. *P. putida* 8 h ja 24 h ette kasvatatud PaW85 (wt) ja  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT ( $\Delta$ RS) tüved loenduskambris, vaadelduna valgusmikroskoobis 400-kordse suurendusega. Bakterikultuuridest tehti enne loenduskambrit 50-kordne (24 h rakud) või 100-kordne (8 h rakud) lahjendus. Valge noolega on näidatud ahelad.**

### 2.3.3. *P. putida* $\Delta$ RelA ja $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT on läbilaskvama membraaniga võrreldes metikstüvega

*P. Putida* metsiktüve (PaW85) ja poomisvastuse mutantide ( $\Delta$ RelA,  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT) membraanide läbilaskvuse ning elus ja surnud rakupopulatsioonide täpsemaks kirjeldamiseks kasutati PI/SYTO9 värvilahusega värvitud rakke koos läbivoolutsütomeetriaga (kirjeldatud „Materjal ja meetodika“, peatükk 2.2.5). Läbivoolutsütomeetria tulemuste järgi määratud rakupopulatsioonid on näidatud joonisel 7. Läbivoolutsütomeetria katsest ilmneb, et 24 h ette kasvatatud poomisvastuse topeltmutandil on võrreldes algse tüvega tunduvalt läbilaskvam membraan ja esineb rohkem surnud rakke (Joonis 7). Eriti märkimisväärsed membraani läbilaskvuse erinevused esinevad 24 h wt ja  $\Delta$ RelA/ $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT tüvede vahel, kus läbilaskva membraaniga rakke esines  $\Delta$ RelA ja  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT mutantide seas vastavalt ca 33% ja 45% võrra rohkem kui metsiktüvel (Joonis 8). Lisaks on neil tüvedel suurenenud ka surnud rakkude osakaal. Tulemustest selgub ka, et varajase statsionaarse (8 h) kasvufaasi topeltmutandil esineb ülejäänud ajapunkti tüvedest läbilaskvam membraan. Sealjuures puuduvad märgatavad populatsioonide osakaalu erinevused eksponentsiaalse kasvufaasi (3 h) mutantide ja metsiktüve vahel (Joonis 8).



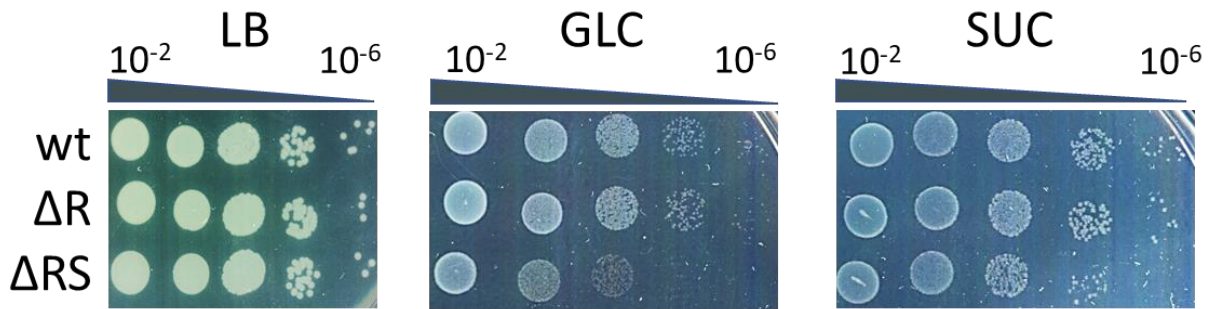
**Joonis 7. Läbivoolutsütomeetria defineeritud rakupopulatsioonid.** *P. putida* PaW85 (wt) ja  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT ( $\Delta$ RS) 24 h tüvede läbivoolutsütomeetria tulemused dot plot graafikul. Rakud on värvitud PI/SYTO9 värvilahusega. Joonistel on y-teljele märgitud SYTO9 fluorestsents ja x-teljele PI fluorestsents. 0 tähistab prahti ehk muid kõrvalisi aineid, R1 tähistab surnud rakupopulatsiooni, R2 tähistab läbilaskva membraaniga rakupopulatsiooni ja R3 terve rakumembraaniga rakupopulatsiooni ehk elus rakke. Katset korraldati kaks korda kolme tehnilise paralleeliga.



**Joonis 8. Poomisvastuse mutantidel on läbilaskvam membraan.** *P. putida* PaW85 (wt),  $\Delta$ RelA ( $\Delta$ R),  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT ( $\Delta$ RS) tüvede läbivoolutsütomeetria rakupopulatsioonid ja nende osakaalud erinevatel ajapunktidel (3 h, 8 h, 24 h). Rakud on värvitud PI/SYTO9 värviseguga ja toodud on elusrakkude, kahjustatud membraaniga rakkude ning surnud rakkude osakaal populatsioonis. Katset korrati kaks korda kolme tehnilise paralleeliga.

### 2.3.4. *P. putida* $\Delta$ RelA ja $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT tüved suudavad kasvada minimaalsöötmetel

Tüvede proto- või auksotroofsuse hindamiseks testisin nende kasvu minimaalsöötmetel (kirjeldatud „Materjal ja meetodika“, peatükk 2.2.2). Lähtudes eelnevatest tulemustest, valisin testimiseks varase statsionaarse faasi rakud kahel põhjusel. Esiteks, sel ajapunktil on tassil moodustuvate kolooniate arv kõige paremini võrreldav (Joonis 3). Teine põhjus, on poomisvastuse olulisus bakterifüsioloogiale just statsionaarses faasis (vaata käesolev töö „Kirjanduse ülevaade“, peatükk 1.1.1; „Tulemused“, peatükk 2.3.6). Joonisel 9 esitatud tulemustest selgub, et  $\Delta$ RelA ja  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT tüved suudavad kasvada minimaalsöötmetel ilma aminohappeid lisamata. Metsiktüve ja  $\Delta$ RelA kasv on kõigil minimaalsöötmetel sarnane. Võrreldes wt ja  $\Delta$ RelA tüvega on  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT tüvi siiski minimaalsöötmetel aeglasema kasvuga, kuid suksinaadil kasvades kasvukiiruse vahe peaaegu puudub (Joonis 9, Lisa 1). Lisaks joonisel 9 toodud glükoosi ja suksinaadi tulemustele testisin ppGpp-defektsete tüvede kasvu ka glükonaati (GLN), Na-bensoaati (BENS), fruktoosi (FRU) ja glütserooli (GLY) sisaldavatel tassidel (Lisa 1). Kuna  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT tüvi suutis kasvada kõigil testitud minimaalsöötmetel, saab järeldada, et see tüvi on prototroofne ja ei vaja kasvuks aminohapete lisamist söötmesse.



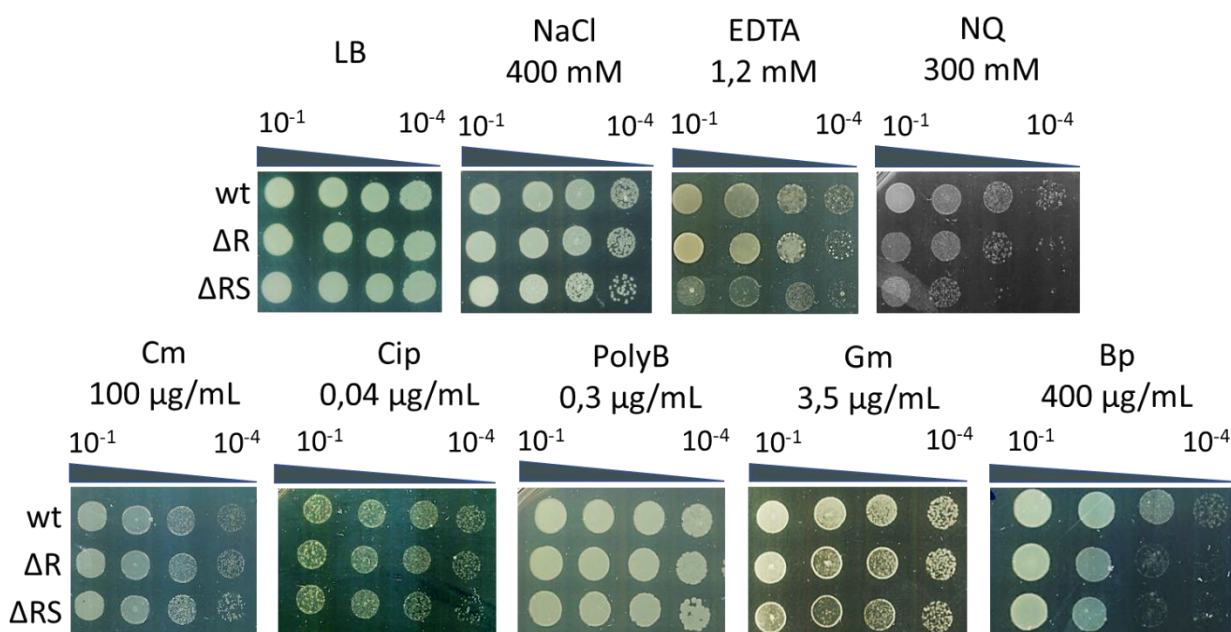
**Joonis 9.** *P. putida* ΔRelA ja ΔRelAΔSpoT tüved suudavad kasvada minimaalsöötmel. 8 h ette kasvatatud *P. putida* PaW85 (wt), ΔRelA (ΔR) ja ΔRelAΔSpoT (ΔRS) tüvede kasv erinevatel süsinikuallikatel (lõppkontsentratsiooniga 0,2%): glükoos (GLC), suktsinaat (SUC). Lisaks kontrolliti tüvede kasvu ka rikkal söötmel (LB). Joonise kohal on näidatud lahjenduskordused (10<sup>2</sup>-10<sup>6</sup>), millest tehti agarsöötmetele 5 μl tilkküvid. Tasse inkubeeriti 24 h temperatuuril 30 °C. Katset on korratud kaks korda.

### 2.3.5 Poomisvastus aitab kaasa antibiootikumi- ja kemikaalitolerantsusele

Poomisvastuse stressitaluvuse hindamiseks kasvasin baktereid erinevaid antibiootikume ja kemikaale sisaldavatel söötmetel (kirjeldatud „Materjal ja meetodika“, peatükk 2.2.6). Katses kasutasin 8 h ette kasvatatud rakukultuure eelmises peatükis kirjeldatud põhjustel. Bakteritüvedest tehti 10-10<sup>6</sup> lahjendused, mis külvati 5 μl tilkadena kemikaale või antibiootikume sisaldavatele LB agarsöötme tassidele. Kontrolltassile (LB) antibiootikume ega kemikaale ei lisatud. Kõikide katses testitud antibiootikumide ja kemikaalide kontsentratsioonivahemikud on toodud tabelis 2 („Materjal ja meetodika“, Tabel 2).

Tulemustest selgub, et poomisvastus kaitseb vähesel määral antibiootikumide eest, mis inhibeerivad peptidoglükaani sünteesi (Bp) (Joonis 10). Peptidoglükaan kuulub peaaegu kõigi bakterite rakukesta koosseisu, kaitstes rakku osmootsest rõhust põhjustatud lüüsumise eest. Lisaks kaitseb poomisvastus bakterit osmootset šokki põhjustava NaCl eest, sest metsiktüvi on võimeline NaCl sisaldaval söötmel moodustama rohkem kolooniaid võrreldes topeltmutandiga. Translatsiooni inhibeerivad (Cm, Gm) ja bakterite rakumembraane lõhkuvad (PolyB) antibiootikumid avaldavad väga tagasihoidlikku efekti ppGpp-defektsetele tüvedele võrreldes metsiktüvega (Joonis 10). Nõrk kaitseefekt esines ka tsiprofloksatsiin puhul. Märkimisväärselt tugevat efekti omab nitrokinoliin ΔRelAΔSpoT tüve suhtes, mõjudes ΔRelAΔSpoT kasvule 10-100 korda pärssivamalt võrreldes metsiktüvega. Välismembraani läbilaskvust suurendava kemikaali EDTA puhul näitasid tulemused, et ΔRelA bakteritüvel esineb parem kasvuvõime võrreldes ΔRelAΔSpoT ja metsiktüvega (Joonis 10). Samas omavahelises võrdluses talub metsiktüvi EDTAd paremini kui ΔRelAΔSpoT. Testitud antibiootikumide ja kemikaalidega saadud tulemustest järeldub, et kuigi mingil määral on poomisvastuse mutantide

antibiootikumi- ja kemikaalitaluvus muutunud, mõjutab poomisvastus seda vaid vähesel määral.



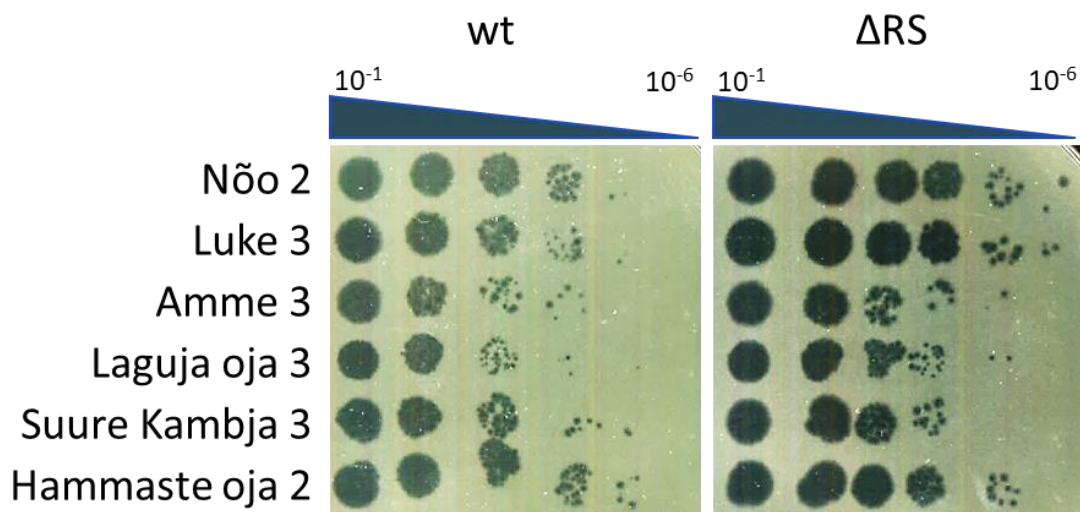
**Joonis 10. Poomisvastus mõjutab vähesel määral antibiootikumitolerantsust.** 8 h ette kasvatatud *P. putida* PaW85 (wt),  $\Delta$ RelA ( $\Delta$ R),  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT ( $\Delta$ RS) kasv LB agarsöötmel, kuhu on lisatud erinevaid antibiootikume ja kemikaale. Paneelide kohal on märgitud järgmiste ainete lõppkontsentratsioonid söötmes: EDTA, NaCl, polümüksiin B (PolyB), nitrokinoliin (NQ), klooramfenikool (Cm), tsiprofloksatsiin (cipro), bensüülpenitsilliin (Bp), gentamütsiin (Gm). LB kontrolltasile antibiootikume ega kemikaale ei lisatud. Pildid on tehtud pärast 24 h või 44 h (EDTA) kasvatamist temperatuuril 30 °C. Katset korrati sõltuvalt ainest 3-9 korda.

### 2.3.6 Poomisvastus suurendab *P. putida* faagitolerantsust agarsöötmel

Bakterite faagitolerantsuse testimiseks võrdlesin *P. putida* metsiktüve ja  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT topeltmutandi faagidega nakatumist bakterimuruga agarsöötme tassidel (kirjeldatud „Materjal ja meetodika“, peatükk 2.2.7). Katset viisin läbi 4 h ja 48 h vedelsöötmes ette kasvanud bakteritüvedega, kuna faagid nakatavad eelistatult eksponentsiaalse kasvufaasi rakke, kuid hilises statsionaarses faasis tuleb esile just poomisvastuse mõju. Lisaks võimaldas see näha eksponentsiaalse faasi ja statsionaarse faasi rakkude faagitaluvuse erinevust.

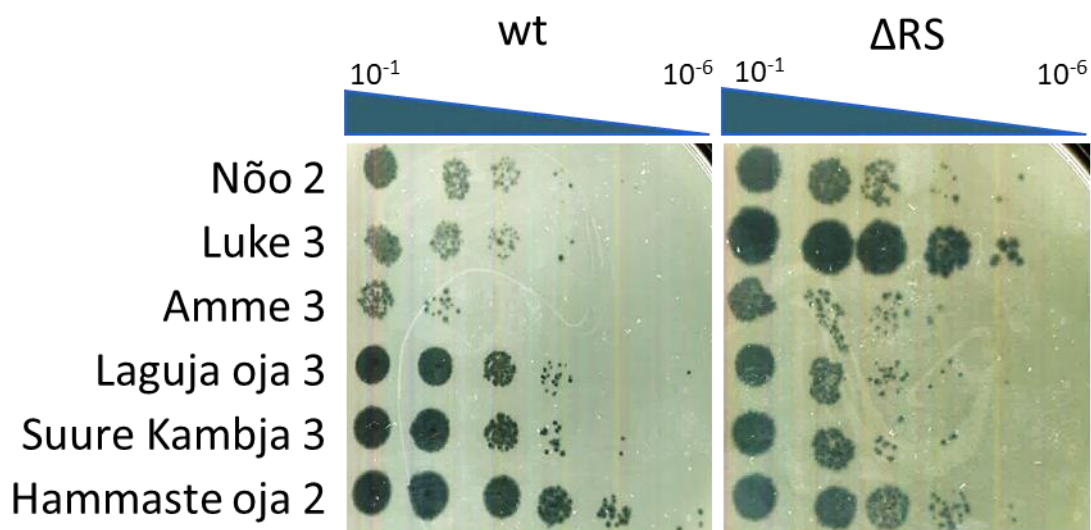
Kolme sõltumatu katse tulemused näitasid, et 4 h ette kasvatatud rakukultuuride puhul nakatasid faagid Nõo 2, Luke 3 ja Amme 3  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT tüve keskmiselt 10 korda paremini võrreldes metsiktüvega (Joonis 11, Tabel 3). Lisaks moodustas faag Luke 3  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT bakterimurul selgelt suuremaid faagilaike. Ka faag Laguja oja 3 nakatas mutanttüve 10 korda paremini (Joonis 11), kuid kõikide katsetulemuste peale kokku kõikusid nakatamisefektiivsuse

tulemused vahemikus 0-10 (Tabel 3, Lisa 2A). Faagide Suure-Kambja 3 ja Hammaste oja 2 nakatamisefektiivsust poomisvastuse puudumine ei mõjutanud (Joonis 11).



**Joonis 11. Bakteriofaagide lüüsilaiatud eksponentsiaalse faasi rakkudest valatud bakterimurudel.** Joonisel on esitatud Nõo 2, Luke 3, Amme 3, Laguja oja 3, Suure Kambja 3 ning Hammaste oja 2 faagide lüüsilaiatud erinevate lahjendustena *P. putida* PaW85 (wt) ja  $\Delta\text{RelA}\Delta\text{SpoT}$  ( $\Delta\text{RS}$ ) tüvede bakterimurudel, mis valati 4 h temperatuuril 20 °C kasvatatud bakteritest. Pilt on tehtud pärast ~24 h kasvatamist temperatuuril 20 °C. Katseid korrati 3 korda bioloogiliselt sõltumatute katsetena, esitatud on ühe iseloomustava katse tulemused.

Kolme sõltumatu katse tulemused näitasid, et sügava statsionaarse kasvufaasini (48 h) kasvatatud rakukultuuride puhul ilmnes (p)ppGpp olulisus kõige enam Luke 3 ja Amme 3 faagidega nakatamisel, mille puhul  $\Delta\text{RelA}\Delta\text{SpoT}$  tüvi oli vastavalt 10- ja 100-korda tundlikum kui metsiktüvi (Joonis 12). Kusjuures Luke 3 faagilaigud olid  $\Delta\text{RelA}\Delta\text{SpoT}$  bakterimurul taas suuremad kui metsiktüvel. Samas kõigi kolme katsetulemuse peale kokku ei mõjutanud poomisvastuse puudumine faagi Laguja oja 3 lüüsilaiikude arvu ja suurust (Tabel 3, Lisa 2B). Lüüsilaiikude arv ei erinenud ka Nõo 2 faagi puhul, kuid lüüsilaiigud olid siiski selgelt suuremad 48 h rakkudest valatud bakterimurudel (Joonis 12). Sellest järeldub, et *P. putida* poomisvastus ei kaitse bakterit kõigi faagide vastu samaväärselt. Katsest ilmnes ka, et Suure-Kambja 3 ja Hammaste oja 2 faagid nakatasid hilises statsionaarses faasis poomisvastuse  $\Delta\text{RelA}\Delta\text{SpoT}$  deletsioontüve 10 korda halvemini võrreldes algse tüvega (Joonis 12), kuid kõik katsetulemused varieerusid vahemikus -10 – 0 (Tabel 3, Lisa 2B).



**Joonis 12. Bakteriofaagide lüüsilaiugud hilis-statsionaarse faasi rakkudest valatud bakterimurudel.** Joonisel on esitatud Nõo 2, Luke 3, Amme 3, Laguja oja 3, Suure Kambja 3 ning Hammaste oja 2 faagide lüüsilaiugud erinevate lahjendustena *P. putida* PaW85 (wt) ja  $\Delta\text{RelA}\Delta\text{SpoT}$  ( $\Delta\text{RS}$ ) tüvede bakterimurudel, mis valati 48 h temperatuuril 20 °C kasvatatud bakteritest. Pilt on tehtud pärast ~24 h kasvatamist temperatuuril 20°C. Katseid korrati 3 korda bioloogiliselt sõltumatute katsetena, esitatud on ühe katse tulemused.

Enamasti kaitseb poomisvastus sama liigi faagide vastu samaväärselt, pigem erinesid omavahel faagiperekonnad. Testitud G5B liigi faagid käitusid kõik omavahel sarnaselt, omamata tugevat poomisvastuse puudumisest tulenevat efekti (Tabel 3). See eristab G5B rühma faage ka kõigist ülejäänud gruppidest, kus poomisvastus kaitseb vähemalt ühel juhul (eksponentsiaalne faas, ja/või hilis-statsionaarne faas) bakterit faaginakkuse eest 10 korda.

**Tabel 3. Faagidel on erinev ppGpp-tundlikkus ning faagide nakatamisefektiivsus oleneb raku kasvufaasist.** Kaitse tugevus on leitud võrreldes  $\Delta\text{RelA}\Delta\text{SpoT}$  nakatumisefektiivsust metsiktüvega.

Bakteriofaag	Faagi fülogeneetiline kuuluvus	Tahke sööde 4h		Tahke sööde 48h	
		ppGpp kaitse tugevus <sup>a</sup>	faagilaigu suurus <sup>b</sup>	ppGpp kaitse tugevus	faagilaigu suurus
<b>Nõo 2</b>	G1C	10 x	=	0 – 10 x	≥
<b>Luke 3</b>	G6A	10 x	≥	10 – 100 x	>
<b>Amme 3</b>	G1A	10 x	=	10 – 100 x	>
<b>Laguja oja 3</b>	G5B	0 – 10 x	=	0	=
<b>Suure-Kambja 3</b>	G5B	0 – 10 x	≤	-10 – 0 x	=
<b>Hammaste oja 2</b>	G5B	0	≤	-10 – 0 x	=

<sup>a</sup>- poomisvastuse kaitstva efekti tugevus, võrreldi  $\Delta\text{RelA}\Delta\text{SpoT}$  tüve metsiktüve suhtes.

<sup>b</sup>- faagilaigu suurus on toodud  $\Delta\text{RelA}\Delta\text{SpoT}$  tüve võrdluses metsiktüvega: =, võrdne laigusuurus; >, suuremad laigud  $\Delta\text{RelA}\Delta\text{SpoT}$  tüvel; <, väiksemad laigud  $\Delta\text{RelA}\Delta\text{SpoT}$  tüvel.

## 2.4. Arutelu

Käesolevas töös leiti, et *P. putida*  $\Delta$ RelA ja  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT tüved on prototroofid ehk suudavad kasvada minimaalsöötmel ilma lisatud aminohapeteta (Joonis 3, Lisa 1), mis kinnitab varasemalt C. Sze (Sze *et al.*, 2002) ning L. Bernardo uurimisrühmade (Bernardo *et al.*, 2009) saadud tulemusi, kus samuti näidati, et *P. putida* laboritüve KT2440 (p)ppGpp<sup>0</sup> tüvi on prototroofne. See eristab *P. putida*'t paljudest teistest bakteritest, nagu *E. coli* (samuti  $\gamma$ -proteobakter), *B. subtilis* ja *E. faecalis*, mille (p)ppGpp-defektsed tüved on auksotroofid ja ei suuda minimaalsöötmel kasvada (Gaca *et al.*, 2013; Kriel *et al.*, 2012; Potrykus *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 1991). See võimaldab *P. putida* mutanttüvede kasvu kontrollida erinevates kasvutingimustes. Kuigi  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT tüves puuduvad kõik ppGpp-d sünteesivad ensüümid ja tegemist on ppGpp<sup>0</sup> tüvega, on siiski oluline märkida, et antud töös kasutati *P. putida* ppGpp<sup>0</sup> tüvena  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT tüve, millest on deleteeritud *relA* ja *spoT* geenid, kuid mitte kõik ppGpp taset reguleerivad ensüümid. Nimelt on ennustatud, et *P. putida* genoom kodeerib ka ühte SAH valku (PP\_2450) (Atkinson *et al.*, 2011).

*P. putida*  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT mutanttüve aeglasem kasv minimaalsöötmel võrreldes metsiktüvega (Joonis 9, Lisa 1) võib olla seletatav sellega, et antud tüvel on suurenenud tundlikkus keskkonnastressorite suhtes, kuna (p)ppGpp on seotud stressi reguleerimisega bakterites. Seega võib poomisvastuse puudumine muuta  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT tüve keskkonnastressidele vastuvõtlikumaks, põhjustades aeglustunud kasvu või vähenenud ellujäämist, arvestades, et  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT tüvel esinevad tugevad membraanidefektid (Joonis 8). Samas oli erinevatel süsinikallikatel ka erinev kasvupeetus, mis viitab, et lülitumine konkreetse süsinikuallika kasutuselevõtuks võib olla häiritud, mistõttu kasvavad mutanttüved minimaalsöötmetel aeglasemalt.

Katsetulemustest järeldus, et *P. putida* 8 h ja 24 h ettekasvatatud statsionaarse faasi  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT rakud on võrreldes metsiktüvega visuaalselt suuremad (Joonis 4), mis põhjustab mõõtmisel kõrgemat optilist tihedust (Joonis 3). Lisaks selgus, et selle kasvufaasi  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT rakud moodustasid ka märkimisväärselt rohkem ahelaid võrreldes metsiktüvega (Joonis 5, Joonis 6). Ahelad koosnesid vähemalt kahest otsapidi ühinenud rakust, mis olid jagunevatest rakkudest pikemad/filamentsemad. Sarnaseid tulemusi on varasemalt näidatud *E. coli* ppGpp<sup>0</sup> tüve puhul. Nimelt olid mõned isoleutsiiniljas kasvatatud *E. coli* ppGpp<sup>0</sup> rakud eksponentsiaalses faasis veidi pikemad kui metsiktüve rakud ning statsionaarses faasis 4-10 korda pikemad kui metsiktüve rakud ja rakukultuur saavutas tavapärasest suurema tiheduse (Traxler *et al.*, 2008). Samas uuringus nähti ka üksikuid filamenteerunud rakke juba eksponentsiaalses kasvufaasis (Traxler *et al.*, 2008), samas kui *P. putida*  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT tüve

puhul esinesid need alles statsionaarses kasvufaasi alguses (8 h). Lisaks on *E. coli* ppGpp<sup>0</sup> tüve omadust eksponentsiaalses faasis moodustada filamente varem kirjeldatud ka nii LB vedelsöötmes kasvatatud rakkudega (Magnusson *et al.*, 2007) kui glükoos CAA (kaseiini hüdroliisaat) söötmetel kasvatatud ja hiljem vees resuspendeeritud rakkudega (Xiao *et al.*, 1991). Seega on *P. putida* ppGpp<sup>0</sup> tüvi fenotüübiliselt sarnane *E. coli* mutanttüvega – moodustuvad filamendid ja rakud on suuremad võrreldes metsiktüvega. Kuid erinevusena moodustab *P. putida* ppGpp<sup>0</sup> tüvi filamente alles statsionaarses faasis.

Rakuarvukuse katses on ahelad loendamisel arvestatud ühe rakuna. Võttes arvesse, et tegelikult võisid vähemalt kaks rakku olla veel otsapidi ühendatud, kuid tegelikult eraldi rakud pooldumistsükli lõpus, võib väita, et 8 h ja 24 h  $\Delta RelA\Delta SpoT$  rakuarvukus on tegelikkuses mõnevõrra kõrgem kui rakuarvukuse loendamisel tundub (Joonis 5). See on tõenäoline, sest 8 h ette kasvatatud bakteritüvede moodustatud kolooniate arvukus on metsiktüvel ja poomisvastuse mutandil sarnane. Seda enam, et 3 h metsiktüve ja  $\Delta RelA\Delta SpoT$  raku- ning kolooniaarvukus on omavahel sarnased. Arvestades, et 24 h  $\Delta RelA\Delta SpoT$  rakuarvukus on metsiktüvest märgatavalt erinev, selgitab see ka madalamat kolooniaarvukust võrreldes metsiktüvega. ppGpp<sup>0</sup> tüve kümme korda madalamat plaatimise efektiivsust täheldatud varem isoleutsiini näljas *E. coli* puhul nii eksponentsiaalses kui statsionaarses kasvufaasis (Traxler *et al.*, 2008). Lisaks on *E. coli* eksponentsiaalse faasi  $\Delta spoT$  rakkude kasvul LB agaröötmel täheldatud mitmekordset madalamat kolooniaarvukust võrreldes metsiktüvega (Xiao *et al.*, 1991). Seega eristub *E. coli*'st *P. putida* 8 h kultiveeritud  $\Delta RelA\Delta SpoT$  tüvi, kuna suudab moodustada kolooniaid metsiktüvega võrdselt.

Läbivoolutsütomeetria tulemustest ilmnes (Joonis 8), et 3 h rakukultuuris esines võrreldes 8 h rakkudega rohkem nii läbilaskva membraaniga rakke kui ka surnud rakke. Suuremat surnud rakkude osakaalu võiks seletada asjaoluga, et 3 h kasvanud kultuuris on veel suurem osakaal esialgsel üleöö kasvanud bakterikultuuril, millest võib pärineda ka surnud, vähenenud DNA sisaldusega, bakterirakke. Varajase (8 h) ja hilise (24 h) statsionaarse kasvufaasi  $\Delta RelA\Delta SpoT$  tunduvalt suurem membraani läbilaskvus viitab tüve süvenevatele membraanikahjustustele statsionaarses kasvufaasis.

Katsetulemused näitasid *P. putida* puhul, et poomisvastuse *relA* ja *spoT* geenide inaktiveerimine vähendab bakterite tolerantsust antibiootikumide suhtes (Joonis 10), mis ühtib varasemalt tehtud katsetega *E. coli* ja *P. aeruginosa*'ga (Nguyen *et al.*, 2011; Stewart *et al.*, 2015). Eelnevalt on näidatud biokiles kasvava *P. aeruginosa*  $\Delta relA\Delta spoT$  bakteritüvede antibiootikumi tolerantsuse vähenemist ja rakkude kõrgemat suremust rakkude töötlemisel gentamütsiini ja tsiprofloksatsiiniiga (Hobbs ja Boraston, 2019; Nguyen *et al.*, 2011; Stewart *et*

*al.*, 2015). Samasuunaliselt, kuid pigem nõrgalt, mõjutab poomisvastus ka *P. putida* antibiootikumi- ja kemikaalitaluvust, kuid seda LB agarsöötmele kasvades (Joonis 10). Kas sarnaselt *P. aeruginosa*'le suurendab poomisvastus antibiootikumide taluvust ka biokiles kasvaval *P. putida*'l, vajab veel edasisi katseid.

Poomisvastus pakub nõrka kaitset antibiootikumide eest, mis inhibeerivad peptidoglükaani sünteesi (Bp) (Joonis 10). Nimetatud toimefunktsiooniga antibiootikumid mõjuvad efektiivsemalt kahjustunud/läbilaskva membraaniga rakkudele. Arvestades läbivoolutsütomeetria tulemusi, et 8 h ette kasvatatud  $\Delta\text{RelA}\Delta\text{SpoT}$  membraan on läbilaskvam võrreldes  $\Delta\text{RelA}$  ja algse tüvega (Joonis 8), on selgitatav ka poomisvastuse kaitse nende antibiootikumide suhtes. Sama kehtib ka membraanide läbilaskvust suurendava kemikaali EDTA puhul, kus läbilaskvama membraaniga  $\Delta\text{RelA}\Delta\text{SpoT}$  kasv on rohkem inhibeeritud kui tervel metsiktüvel, kuid seda eristab bakteritüve  $\Delta\text{RelA}$  parem kasvuvõime EDTA söötmele võrreldes  $\Delta\text{RelA}\Delta\text{SpoT}$  ja metsiktüvega. Kuigi EDTA taluvus on  $\Delta\text{RelA}$  tüvel metsiktüvega võrdväärne, kasvab  $\Delta\text{RelA}$  EDTA'd sisaldaval tassil mõnevõrra kiiremini (Joonis 10). Antud olukorras ei saa olla tähtis membraani läbilaskvus, sest 8 h  $\Delta\text{RelA}$  ja metsiktüve membraani läbilaskvuses märgatavaid erinevusi ei esinenud (Joonis 8), pigem on võimalik, et RelA puudumisel esineb madalam rakusisene ppGpp kontsentratsioon, mis lubab rakkudel kiiremini kasvada.

Faaginakkuse katsetes olid Luke 3 faagilaigud 48 h ette kasvatatud  $\Delta\text{RelA}\Delta\text{SpoT}$  bakterimurul märkimisväärselt suuremad kui metsiktüvel (Joonis 12), mis viitab faagi aktiivsemale lüütilisele faasile, sest faagilaigud iseloomustavad, kui palju faagipartikleid ühest bakterist vabaneb (Parada *et al.*, 2006). Varem on näidatud, et *E. coli* ppGpp<sup>0</sup> tüvi toodab faaginakkuse korral võrreldes metsiktüvega rohkem virione, mis tekitab bakterimuruga tassil ka märgatavalt suuremaid faagilaike (Nowicki *et al.*, 2013). Üks võimalik põhjus on (p)ppGpp võime inhibeerida valgusünteesi (Milon *et al.*, 2006; Mitkevich *et al.*, 2010). Metsiktüüpi bakterites toodetakse faagiinfektsiooni vastuseks (p)ppGpp-d, mis inhibeerib valgusünteesi ja piirab viiruse käsutuses olevaid rakulisi ressursse (nt ribosoomid, ATP, RNA/DNA polümeraas, aminohapped) (Tabib-Salazar *et al.*, 2018). Seevastu võib  $\Delta\text{RelA}\Delta\text{SpoT}$  mutandis (p)ppGpp puudumine tagada aktiivsema valgusünteesi ja rohkem ressursse viiruse jaoks, võimaldades aktiivsemat struktuurivalgude tootmist ja seega suuremat faagipartiklite arvu. Lisaks nakatasid faagid tõenäoliselt  $\Delta\text{RelA}\Delta\text{SpoT}$  tüve üldjuhul paremini ka põhjusel, et mutanttüvel on võrreldes metsiktüvega tunduvalt läbilaskvam membraan, lihtsustades faagide sisenemist raku. Samas võivad bakteri membraanikahjustused muuta raku faagiinfektsioonile ka vähem vastuvõtlikuks. Seda seetõttu, et muutused membraanis võivad olla bakteri mehhanism faagi

nakatumisest hoidumiseks, kuna faagid ei pruugi vajaliku retseptorita oma peremeesorganismile seonduda (Ongena *et al.*, 2021). Esines ka tulemusi, milles teatud faagid nakatasid hilise statsionaarse (48 h) kasvufaasi metsiktüve rakke  $\Delta\text{RelA}\Delta\text{SpoT}$  tüvest paremini. Nendeks faagideks olid Suure-Kambja 3 ja Hammaste oja 2 (Tabel 3, Lisa 2B). Antud tulemused viitavad, et teatud faagid võivad vajada efektiivseks nakatamiseks alarmooni (p)ppGpp olemasolu. Võttes teadmiseks, et oksüdatiivse stressivastuse valgud on vajalikud efektiivseimaks faaginakkuseks (Sacher *et al.*, 2018), võib järeldada, et teatud faagid kasutavad bakteri stressivastuseid ära efektiivseks nakatamiseks. Samuti võib siinkohal tähtsust omada ka bakterite erinev membraani läbilaskvus, arvestades, et 4 h rakukultuuride ( $\text{OD}_{580} \sim 1$ ) membraanid on tõenäoliselt tunduvalt tervemad võrreldes 48 h kultuuri bakteritega. Katsetulemustest võib oletada (Tabel 3, Lisa 2B), et uuritud faagide seas oli neid, kelle nakatamise efektiivsust membraanidefekt soodustas kui pärssis.

Jooniste 11 ja 12 võrdluses on näha, et teatud faagid tõesti nakatavad paremini eksponentsiaalse kasvufaasi rakke, nagu on ka varem näidatud (Cerca *et al.*, 2007; Sillankorva *et al.*, 2004). Eksponentsiaalse kasvufaasi metsiktüve rakke nakatavad paremini faagid Nõo 2, Luke 3 ja Amme 3, samas kui  $\Delta\text{RelA}\Delta\text{SpoT}$  rakke nakatavad paremini faagid Nõo 2, Laguja oja 3, Suure-Kambja 3 ja Hammaste oja 2. Eksponentsiaalse faasi rakkude edukama nakatamise põhjus on tõenäoliselt see, et eksponentsiaalses kasvufaasis jagunevad bakterirakud aktiivselt ja sünteesivad uusi erinevaid rakulisi komponente, sealhulgas retseptoritena käituvaid lipopolüsahhariide (Shu ja Mi, 2022) ja vibureid (Sim *et al.*, 2017), mida teatud faagid vajavad peremeesrakkude külge kinnitumiseks ja nakatamiseks (Dy *et al.*, 2014). Selle tulemusena on faagidel rohkem potentsiaalseid seondumiskohti, mis võib viia faagide parema nakatumiseni. Lisaks on kõik bakteri sünteesiprotsessid kiiremad, mis tõenäoliselt tagab ka kiirema infektsioonitsükli ja seega suurema viiruspartiklite hulga. Seevastu statsionaarses faasis faagireseptorite sünteesi kiirus väheneb, muutes rakud faagiinfektsioonile vähem vastuvõtlikuks. Arvestades kokkuvõetud faagitulemuste (Tabel 3) nakatamisefektiivsuse vahemikku, siis G5B liigi faagid nakatavad hilis-statsionaarse kasvufaasi  $\Delta\text{RelA}\Delta\text{SpoT}$  rakke keskmiselt kehvemini kui eksponentsiaalse faasi rakke. Seega on faagide sõltuvus kasvufaasist erinev.

Arvestades, et poomisvastuse mõju faagikaitstes uuriti vaid 6 bakteriofaagi põhjal (4 sekveneerimisgruppi), siis kindlate järelduste tegemiseks, kas ja kuidas (p)ppGpp *P. putida* faagitaluvust mõjutab, tuleks järgmistes uuringutes suurendada faagide valimit. Käesoleva töö tulemuste põhjal võib väita, et poomisvastus kaitseb enamjaolt *P. putida*'t faaginakkuse eest, kuid kaitse tugevus on faagist.

## KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja selgitada poomisvastuse mõju *P. putida* füsioloogiale ning faagitolerantsusele. Antud eesmärgi saavutamiseks testiti *P. putida* ppGpp-defektsete tüvede ( $\Delta\text{RelA}$  ja  $\Delta\text{RelA}\Delta\text{SpoT}$ ) kasvu minimaalsöötmetel, vaadeldi rakke mikroskoobis, uuriti bakteri membraanide läbilaskvust läbivoolutsütomeetriaga ning testiti antibiootikumi- ja kemikaalitolerantsust ning faagikaitset. Tehtud katsete tulemusena saab järeldada, et:

- 1) *P. putida*  $\Delta\text{RelA}$  ja  $\Delta\text{RelA}\Delta\text{SpoT}$  tüved on prototroofid;
- 2) poomisvastuse topeltnmutant moodustab statsionaarses kasvufaasis ahelaid, on läbilaskvama membraaniga ning suuremate rakkudega kui metsiktüvi;
- 3) poomisvastus mõjutab vähesel määral antibiootikumi- ja kemikaalitolerantsust;
- 4) poomisvastuse osalus *P. putida* faagivastases kaitses sõltub faagist, kuid üldiselt tagab (p)ppGpp bakterile faagide vastu nõrga kaitse.

Poomisvastus-defektsete rakud on suuremad, moodustavad ahelaid ning esinevad tugevad membraanikahjustused. Samuti on poomisvastus-defektsete rakkude antibiootikumi- ja kemikaalitaluvus veidi vähenenud ning üldiselt nakatavad faagid neid bakteritüvesid paremini. Seega, antud uuringu tulemused viitavad, et poomisvastusel on *P. putida* stressitaluvusele pigem tagasihoidlik mõju, kuid poomisvastus on väga oluline korrektse bakterimorfoloogia kujunemisel ja elumusel statsionaarses kasvufaasis.

## **SUMMARY**

The stringent response is a common stress mechanism in bacteria governed by the alarmons pppGpp and ppGpp, jointly known as (p)ppGpp. The cellular (p)ppGpp levels are regulated by RSH (RelA/SpoT homologues) enzymes, such as RelA and SpoT. SpoT mainly hydrolyzes (p)ppGpp but also has synthesizing activity, while RelA only synthesizes. During stress, the cell's metabolism is reprogrammed to shift from rapid to slow growth.

For *Pseudomonas putida*, the effect of the stringent response deficiency has been previously described mainly in terms of prototrophy and biofilm formation, much less so in phage tolerance and antibiotic and chemical tolerance. In fact, the role of the stringent response in phage defence has in general remained rather unclear, but even more so for *P. putida* due to the scarcity of isolated phages from this strain, resulting in a significant gap in phage studies. Therefore, a clear overview of the impact of the stringent response on *P. putida*'s physiology and its role in phage defence is still lacking.

The aim of this study was to determine the effect of stringent response on *P. putida*'s physiology and phage tolerance. To achieve this goal, the growth of *P. putida* ppGpp-deficient strains ( $\Delta$ RelA and  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT) was tested on minimal media, cells were observed under a microscope, and bacterial membrane permeability was assessed by microscopy and flow cytometry. Additionally, we conducted tests to evaluate antibiotic and chemical tolerance as well as phage defence. Based on the results, the following conclusions can be drawn:

- 1) *P. putida*  $\Delta$ RelA and  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT strains are prototrophs;
- 2)  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT strain forms chains in the stationary growth phase, has a more permeable membrane, and larger cells compared to the wild type;
- 3) the stringent response has a minor effect on antibiotic and chemical tolerance;
- 4) the involvement of stringent response in phage defence of *P. putida* depends on the phage, but in general, cellular (p)ppGpp provides weak protection against phages.

Although both *P. putida* and *E. coli* ppGpp<sup>0</sup> mutants form filaments and have enlarged cells in the stationary phase, *P. putida*  $\Delta$ RelA $\Delta$ SpoT strain has less severe defects that are revealed only in the stationary phase. Moreover, the strong membrane permeability increase of ppGpp<sup>0</sup>

strain does not seem to result in a drastic loss in antibiotic tolerance, showing how bacteria are different, and research conducted on one cannot be directly applied to another bacterium.

In conclusion, the results of this study suggest that the stringent response has a rather modest effect on the stress tolerance of *P. putida*, but it is important in shaping bacterial morphology and for survival in stationary phase.

## TÄNUSÕNAD

Eelkõige soovin väljendada oma suurt tänu Hedvigile, kes andis märkimisväärse panuse käesoleva töö valmimisse ning innustas pidevalt oma põhjalikkuse ja töökusega. Tänan Hedvigit ja Ritat, kes õpetasid mulle aastate jooksul lugematul hulgal väärtuslikke laborioskuseid. Suur tänu ka Dimitrile, kes aitas mõista läbivoolutsütomeetria hingeelu ja oli alati lahkelt valmis oma teadmisi jagama. Soovin tänusõnad edasi anda ka Merikesele ja Signele, kes õpetasid mind mikroskoopia maailmas navigeerima ning ilma Signeta otsiksin tõenäoliselt siiani õiget fookustasandit.

## KIRJANDUSE LOETELU

- Ahmad, S., Wang, B., Walker, M. D., Tran, H. K. R., Stogios, P. J., Savchenko, A., Grant, R. A., McArthur, A. G., Laub, M. T., and Whitney, J. C. (2019). An interbacterial toxin inhibits target cell growth by synthesizing (p)ppApp. *Nature*, 575(7784), 674–678. <https://doi.org/10.1038/S41586-019-1735-9>
- Arora, G., Sajid, A., Virmani, R., ... Singh, Y. (2017). Ser/Thr protein kinase PrkC-mediated regulation of GroEL is critical for biofilm formation in *Bacillus anthracis*. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/S41522-017-0015-4>
- Atkinson, G. C., Tenson, T., and Haurlyuk, V. (2011). The RelA/SpoT Homolog (RSH) Superfamily: Distribution and Functional Evolution of ppGpp Synthetases and Hydrolases across the Tree of Life. *PLOS ONE*, 6(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0023479>
- Balaban, N. Q., Helaine, S., Lewis, K., ... Zinkernagel, A. (2019). Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nature Reviews Microbiology* 2019 17:7, 17(7), 441–448. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0196-3>
- Balzer, G. J., and McLean, R. J. C. (2002). The stringent response genes *relA* and *spoT* are important for *Escherichia coli* biofilms under slow-growth conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(7), 675–680. <https://doi.org/10.1139/W02-060>
- Barker, M. M., Gaal, T., Josaitis, C. A., and Gourse, R. L. (2001). Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation in vivo and in vitro. *Journal of Molecular Biology*, 305(4), 673–688. <https://doi.org/10.1006/JMBI.2000.4327>
- Battesti, A., and Bouveret, E. (2006). Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Molecular Microbiology*, 62(4), 1048–1063. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2006.05442.X>
- Benler, S., and Koonin, E. V. (2020). Phage lysis-lysogeny switches and programmed cell death: Danse macabre. *BioEssays*, 42(12), 2000114. <https://doi.org/10.1002/BIES.202000114>
- Bernardo, L. M. D., Johansson, L. U. M., Skärfstad, E., and Shingler, V. (2009).  $\sigma$ 54-Promoter Discrimination and Regulation by ppGpp and DksA. *Journal of Biological Chemistry*, 284(2), 828–838. <https://doi.org/10.1074/JBC.M807707200>
- Bhaskar, A., De Piano, C., Gelman, E., McKinney, J. D., and Dhar, N. (2018). Elucidating the role of (p)ppGpp in mycobacterial persistence against antibiotics. *IUBMB Life*, 70(9), 836–844. <https://doi.org/10.1002/IUB.1888>
- Bokinsky, G., Baidoo, E. E. K., Akella, S., Burd, H., Weaver, D., Alonso-Gutierrez, J., García-Martín, H., Lee, T. S., and Keasling, J. D. (2013). HipA-triggered growth arrest and  $\beta$ -lactam tolerance in *Escherichia coli* are mediated by RelA-dependent ppGpp synthesis. *Journal of Bacteriology*, 195(14), 3173–3182. <https://doi.org/10.1128/JB.02210-12>

- Bondy-Denomy, J., Qian, J., Westra, E. R., Buckling, A., Guttman, D. S., Davidson, A. R., and Maxwell, K. L. (2016). Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms. *The ISME Journal*, *10*(12), 2854. <https://doi.org/10.1038/ISMEJ.2016.79>
- Boutte, C. C., and Crosson, S. (2013). Bacterial lifestyle shapes the regulation of stringent response activation. *Trends in Microbiology*, *21*(4), 174. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2013.01.002>
- Braeken, K., Moris, M., Daniels, R., Vanderleyden, J., and Michiels, J. (2006). New horizons for (p)ppGpp in bacterial and plant physiology. *Trends in Microbiology*, *14*(1), 45–54. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2005.11.006>
- Cashel, M., and Gallant, J. (1969). Two Compounds implicated in the Function of the RC Gene of Escherichia coli. *Nature* *1969 221:5183*, *221*(5183), 838–841. <https://doi.org/10.1038/221838a0>
- Cerca, N., Oliveira, R., and Azeredo, J. (2007). Susceptibility of Staphylococcus epidermidis planktonic cells and biofilms to the lytic action of staphylococcus bacteriophage K. *Letters in Applied Microbiology*, *45*(3), 313–317. <https://doi.org/10.1111/J.1472-765X.2007.02190.X>
- Chan, B., and Abedon, S. (2015). Bacteriophages and their enzymes in biofilm control. *Current Pharmaceutical Design*, *21*(1), 85–99. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140905112311>
- Chávez de Paz, L. E., Lemos, J. A., Wickström, C., and Sedgley, C. M. (2012). Role of (p)ppGpp in biofilm formation by Enterococcus faecalis. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(5), 1627–1630. <https://doi.org/10.1128/AEM.07036-11>
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., and Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science (New York, N.Y.)*, *284*(5418), 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.284.5418.1318>
- Dean, S. N., Chung, M. C., and van Hoek, M. L. (2015). Burkholderia diffusible signal factor signals to Francisella novicida to disperse biofilm and increase siderophore production. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(20), 7057–7066. <https://doi.org/10.1128/AEM.02165-15>
- Díaz-Salazar, C., Calero, P., Espinosa-Portero, R., Jiménez-Fernández, A., Wirebrand, L., Velasco-Domínguez, M. G., López-Sánchez, A., Shingler, V., and Govantes, F. (2017). The stringent response promotes biofilm dispersal in Pseudomonas putida. *Scientific Reports*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-18518-0>
- Dy, R. L., Richter, C., Salmond, G. P. C., and Fineran, P. C. (2014). Remarkable Mechanisms in Microbes to Resist Phage Infections. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Virology-031413-085500>, *1*(1), 307–331. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-VIROLOGY-031413-085500>
- English, B. P., Hauryliuk, V., Sanamrad, A., Tankov, S., Dekker, N. H., and Elf, J. (2011). Single-molecule investigations of the stringent response machinery in living bacterial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(31), E365. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1102255108>

- Fernández, L., González, S., Campelo, A. B., Martínez, B., Rodríguez, A., and García, P. (2017). Low-level predation by lytic phage phiIPLA-RODI promotes biofilm formation and triggers the stringent response in *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/SREP40965>
- Figueiredo, A. R. T., and Kümmerli, R. (2020). Microbial Mutualism: Will You Still Need Me, Will You Still Feed Me? *Current Biology*, 30(18), R1041–R1043. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2020.07.002>
- Flardh, K., Axberg, T., Albertson, N. H., and Kjelleberg, S. (1994). Stringent control during carbon starvation of marine *Vibrio* sp. strain S14: molecular cloning, nucleotide sequence, and deletion of the *relA* gene. *Journal of Bacteriology*, 176(19), 5949. <https://doi.org/10.1128/JB.176.19.5949-5957.1994>
- Fortier, L. C., and Sekulovic, O. (2013). Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence*, 4(5), 354. <https://doi.org/10.4161/VIRU.24498>
- Gaca, A. O., Colomer-Winter, C., and Lemos, J. A. (2015). Many means to a common end: The intricacies of (p)ppGpp metabolism and its control of bacterial homeostasis. *Journal of Bacteriology*, 197(7), 1146–1156. <https://doi.org/10.1128/JB.02577-14>
- Gaca, A. O., Kajfasz, J. K., Miller, J. H., Liu, K., Wang, J. D., Abranches, J., and Lemos, J. A. (2013). Basal levels of (p)ppGpp in *Enterococcus faecalis*: The magic beyond the stringent response. *MBio*, 4(5). <https://doi.org/10.1128/MBIO.00646-13>
- Gallant, J., Palmer, L., and Pao, C. C. (1977). Anomalous synthesis of ppGpp in growing cells. *Cell*, 11(1), 181–185. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90329-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90329-4)
- Germain, E., Castro-Roa, D., Zenkin, N., and Gerdes, K. (2013). Molecular Mechanism of Bacterial Persistence by HipA. *Molecular Cell*, 52(2), 248–254. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2013.08.045>
- Germain, E., Guiraud, P., Byrne, D., Douzi, B., Djendli, M., and Maisonneuve, E. (2019). YtfK activates the stringent response by triggering the alarmone synthetase SpoT in *Escherichia coli*. *Nature Communications* 2019 10:1, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/S41467-019-13764-4>
- Girard, L., Lood, C., Höfte, M., Vandamme, P., Rokni-Zadeh, H., van Noort, V., Lavigne, R., and De Mot, R. (2021). The ever-expanding pseudomonas genus: Description of 43 new species and partition of the pseudomonas putida group. *Microorganisms*, 9(8), 1766. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9081766/S1>
- Givens, R. M., Lin, M. H., Taylor, D. J., Mechold, U., Berry, J. O., and Hernandez, V. J. (2004). Inducible Expression, Enzymatic Activity, and Origin of Higher Plant Homologues of Bacterial RelA/SpoT Stress Proteins in *Nicotiana tabacum*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(9), 7495–7504. <https://doi.org/10.1074/JBC.M311573200>
- Gupta, K., Marques, C. N. H., Petrova, O. E., and Sauer, K. (2013). Antimicrobial tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is activated during an early developmental stage and requires the two-component hybrid SagS. *Journal of Bacteriology*, 195(21), 4975–4987. <https://doi.org/10.1128/JB.00732-13>

- Gupta, K. R., Arora, G., Mattoo, A., and Sajid, A. (2021). Stringent Response in Mycobacteria: From Biology to Therapeutic Potential. *Pathogens*, *10*(11). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10111417>
- Gupta, K. R., Kasetty, S., and Chatterji, D. (2015). Novel Functions of (p)ppGpp and Cyclic di-GMP in Mycobacterial Physiology Revealed by Phenotype Microarray Analysis of Wild-Type and Isogenic Strains of Mycobacterium smegmatis. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(7), 2571. <https://doi.org/10.1128/AEM.03999-14>
- Gutiérrez, D., Martínez, B., Rodríguez, A., and García, P. (2012). Genomic characterization of two Staphylococcus epidermidis bacteriophages with anti-biofilm potential. *BMC Genomics*, *13*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-228>
- Hara, A., and Sy, J. (1983). Guanosine 5'-triphosphate, 3'-diphosphate 5'-phosphohydrolase. Purification and substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry*, *258*(3), 1678–1683. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)33039-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)33039-4)
- Harms, A., Brodersen, D. E., Mitarai, N., and 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>
- Haseltine, W. A., and Block, R. (1973). Synthesis of Guanosine Tetra- and Pentaphosphate Requires the Presence of a Codon-Specific, Uncharged Transfer Ribonucleic Acid in the Acceptor Site of Ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *70*(5), 1564. <https://doi.org/10.1073/PNAS.70.5.1564>
- Haurlyuk, V., Atkinson, G. C., Murakami, K. S., Tenson, T., and Gerdes, K. (2015). Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nature Reviews Microbiology* *2015* *13*:5, *13*(5), 298–309. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO3448>
- He, H., Cooper, J. N., Mishra, A., and Raskin, D. M. (2012). Stringent response regulation of biofilm formation in vibrio cholerae. *Journal of Bacteriology*, *194*(11), 2962–2972. <https://doi.org/10.1128/JB.00014-12>
- Hobbs, J. K., and Boraston, A. B. (2019). (p)ppGpp and the Stringent Response: An Emerging Threat to Antibiotic Therapy. *ACS Infectious Diseases*, *5*(9), 1505–1517. <https://doi.org/10.1021/ACSINFECDIS.9B00204>
- Irving, S. E., Choudhury, N. R., and Corrigan, R. M. (2020). The stringent response and physiological roles of (pp)pGpp in bacteria. *Nature Reviews Microbiology* *2020* *19*:4, *19*(4), 256–271. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00470-y>
- Jimmy, S., Saha, C. K., Kurata, T., ... Atkinson, G. C. (2020). A widespread toxin-antitoxin system exploiting growth control via alarmone signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(19), 10500–10510. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1916617117>
- Kamarthapu, V., Epshtein, V., Benjamin, B., Proshkin, S., Mironov, A., Cashel, M., and Nudler, E. (2016). ppGpp Couples Transcription to DNA Repair in E. coli. *Science (New York, N.Y.)*, *352*(6288), 993. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAD6945>
- Kanjee, U., Gutsche, I., Alexopoulos, E., ... Houry, W. A. (2011). Linkage between the bacterial acid stress and stringent responses: the structure of the inducible lysine

- decarboxylase. *The EMBO Journal*, 30(5), 931–944.  
<https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2011.5>
- Kaspy, I., Rotem, E., Weiss, N., Ronin, I., Balaban, N. Q., and Glaser, G. (2013). HipA-mediated antibiotic persistence via phosphorylation of the glutamyl-tRNA-synthetase. *Nature Communications* 2013 4:1, 4(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS4001>
- Kriel, A., Bittner, A. N., Kim, S. H., Liu, K., Tehranchi, A. K., Zou, W. Y., Rendon, S., Chen, R., Tu, B. P., and Wang, J. D. (2012). Direct Regulation of GTP Homeostasis by (p)ppGpp: A Critical Component of Viability and Stress Resistance. *Molecular Cell*, 48(2), 231–241. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2012.08.009>
- Krishnan, S., Petchiappan, A., Singh, A., Bhatt, A., and Chatterji, D. (2016). R-loop induced stress response by second (p)ppGpp synthetase in Mycobacterium smegmatis: functional and domain interdependence. *Molecular Microbiology*, 102(1), 168–182.  
<https://doi.org/10.1111/MMI.13453>
- Lazzarini, R. A., Cashel, M., and Gallant, J. (1971). On the Regulation of Guanosine Tetraphosphate Levels in Stringent and Relaxed Strains of Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry*, 246(14), 4381–4385. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)62023-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)62023-X)
- Li, G., Xie, F., Zhang, Y., Bossé, J. T., Langford, P. R., and Wang, C. (2015). Role of (p)ppGpp in Viability and Biofilm Formation of Actinobacillus pleuropneumoniae S8. *PLOS ONE*, 10(10), e0141501. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0141501>
- Liu, H., Xiao, Y., Nie, H., Huang, Q., and Chen, W. (2017). Influence of (p)ppGpp on biofilm regulation in Pseudomonas putida KT2440. *Microbiological Research*, 204, 1–8.  
<https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2017.07.003>
- Maciag, M., Kochanowska, M., Łyżeń, R., Wegrzyn, G., and Szalewska-Pałasz, A. (2010). ppGpp inhibits the activity of Escherichia coli DnaG primase. *Plasmid*, 63(1), 61–67.  
<https://doi.org/10.1016/J.PLASMID.2009.11.002>
- Magnusson, L. U., Farewell, A., and Nyström, T. (2005). ppGpp: a global regulator in Escherichia coli. *Trends in Microbiology*, 13(5), 236–242.  
<https://doi.org/10.1016/J.TIM.2005.03.008>
- Magnusson, L. U., Gummesson, B., Joksimović, P., Farewell, A., and Nyström, T. (2007). Identical, Independent, and Opposing Roles of ppGpp and DksA in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 189(14), 5193. <https://doi.org/10.1128/JB.00330-07>
- Milon, P., Tischenko, E., Tomšić, J., Caserta, E., Folkers, G., La Teana, A., Rodnina, M. V., Pon, C. L., Boelens, R., and Gualera, C. O. (2006). The nucleotide-binding site of bacterial translation initiation factor 2 (IF2) as a metabolic sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(38), 13962.  
<https://doi.org/10.1073/PNAS.0606384103>
- Mitkevich, V. A., Ermakov, A., Kulikova, A. A., Tankov, S., Shyp, V., Soosaar, A., Tenson, T., Makarov, A. A., Ehrenberg, M., and Hauryliuk, V. (2010). Thermodynamic characterization of ppGpp binding to EF-G or IF2 and of initiator tRNA binding to free IF2 in the presence of GDP, GTP, or ppGpp. *Journal of Molecular Biology*, 402(5), 838–846. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2010.08.016>

- Mittenhuber, G. (2001). Comparative Genomics and Evolution of Genes Encoding Bacterial (p)ppGpp Synthetases/Hydrolases (the Rel, RelA and SpoT Proteins). *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 3(4), 585–600. [www.caister.com/bacteria-plant](http://www.caister.com/bacteria-plant)
- Molina, L. Á., Ramos, C., Duque, E., Ronchel, M. C., García, J. M., Wyke, L., and Ramos, J. L. (2000). Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(3), 315–321. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00156-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00156-X)
- Mouery, K., Rader, B. A., Gaynor, E. C., and Guillemin, K. (2006). The stringent response is required for *Helicobacter pylori* survival of stationary phase, exposure to acid, and aerobic shock. *Journal of Bacteriology*, 188(15), 5494–5500. <https://doi.org/10.1128/JB.00366-06>
- Moyed, H. S., and Bertrand, K. P. (1983). *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *Journal of Bacteriology*, 155(2), 768–775. <https://doi.org/10.1128/JB.155.2.768-775.1983>
- Murdeswar, M. S., and Chatterji, D. (2012). MS\_RHII-RSD, a Dual-Function RNase HIII-(p)ppGpp Synthetase from *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology*, 194(15), 4003. <https://doi.org/10.1128/JB.00258-12>
- Murray, K. D., and Bremer, H. (1996). Control of *spoT*-dependent ppGpp synthesis and degradation in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 259(1), 41–57. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0300>
- Nanamiya, H., Kasai, K., Nozawa, A., Yun, C. S., Narisawa, T., Murakami, K., Natori, Y., Kawamura, F., and Tozawa, Y. (2008). Identification and functional analysis of novel (p)ppGpp synthetase genes in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 67(2), 291–304. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2007.06018.X>
- Nguyen, D., Joshi-Datar, A., Lepine, F., ... Singh, P. K. (2011). Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science*, 334(6058), 982–986. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1211037>
- Nowicki, D., Kobiela, W., Wegrzyn, A., Wegrzyn, G., and Szalewska-Palasz, A. (2013). ppGpp-Dependent Negative Control of DNA Replication of Shiga Toxin-Converting Bacteriophages in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 195(22), 5007. <https://doi.org/10.1128/JB.00592-13>
- Ongena, V., Briegel, A., and Claessen, D. (2021). Cell wall deficiency as an escape mechanism from phage infection. *Open Biology*, 11(9). <https://doi.org/10.1098/RSOB.210199>
- Parada, V., Herndl, G. J., and Weinbauer, M. G. (2006). Viral burst size of heterotrophic prokaryotes in aquatic systems. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 86(3), 613–621. <https://doi.org/10.1017/S002531540601352X>
- Parasion, S., Kwiatek, M., Gryko, R., Mizak, L., and Malm, A. (2014). Bacteriophages as an alternative strategy for fighting biofilm development. *Polish Journal of Microbiology*, 63(2), 137–145. <https://doi.org/10.33073/PJM-2014-019>

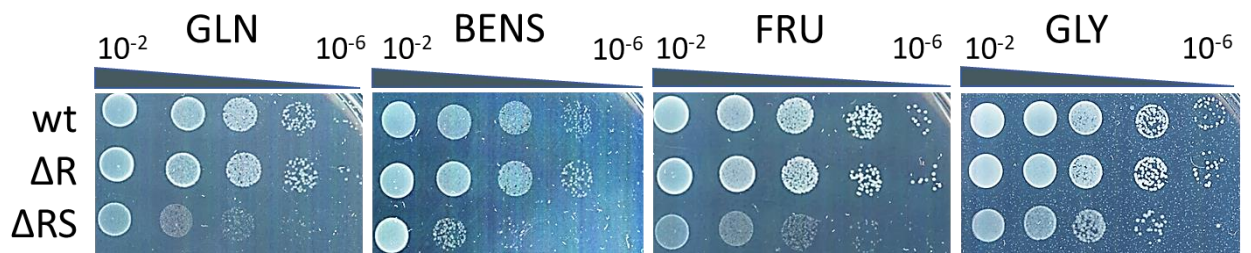
- Petrova, O. E., and Sauer, K. (2016). Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. *Current Opinion in Microbiology*, 30, 67–78.  
<https://doi.org/10.1016/J.MIB.2016.01.004>
- Potrykus, K., and Cashel, M. (2008). (p)ppGpp: Still Magical?\*. <https://doi.org/10.1146/Annurev.Micro.62.081307.162903>, 62, 35–51.  
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MICRO.62.081307.162903>
- Potrykus, K., Murphy, H., Philippe, N., and Cashel, M. (2011). ppGpp is the major source of growth rate control in *E. coli*. *Environmental Microbiology*, 13(3), 563.  
<https://doi.org/10.1111/J.1462-2920.2010.02357.X>
- Rakonjac, J., Bennett, N. J., Spagnuolo, J., Gagic, D., and Russel, M. (2011). Filamentous Bacteriophage: Biology, Phage Display and Nanotechnology Applications. *Current Issues in Molecular Biology 2011, Vol. 13, Pages 51-76*, 13(2), 51–76.  
<https://doi.org/10.21775/CIMB.013.051>
- Roach, D. R., and Donovan, D. M. (2015). Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications. *Bacteriophage*, 5(3), e1062590.  
<https://doi.org/10.1080/21597081.2015.1062590>
- Roghianian, M., Van Nerom, K., Takada, H., ... Hauryliuk, V. (2021). (p)ppGpp controls stringent factors by exploiting antagonistic allosteric coupling between catalytic domains. *Molecular Cell*, 81(16), 3310–3322.e6.  
<https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2021.07.026>
- Römling, U., and Balsalobre, C. (2012). Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of Internal Medicine*, 272(6), 541–561.  
<https://doi.org/10.1111/JOIM.12004>
- Rosendahl, S., Tamman, H., Brauer, A., Remm, M., and Hörak, R. (2020). Chromosomal toxin-antitoxin systems in *Pseudomonas putida* are rather selfish than beneficial. *Scientific Reports 2020 10:1*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65504-0>
- Sacher, J. C., Flint, A., Butcher, J., Blasdel, B., Reynolds, H. M., Lavigne, R., Stintzi, A., and Szymanski, C. M. (2018). Transcriptomic Analysis of the *Campylobacter jejuni* Response to T4-Like Phage NCTC 12673 Infection. *Viruses*, 10(6).  
<https://doi.org/10.3390/V10060332>
- Salmond, G. P. C., and Fineran, P. C. (2015). A century of the phage: past, present and future. *Nature Reviews Microbiology 2015 13:12*, 13(12), 777–786.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro3564>
- Shu, S., and Mi, W. (2022). Regulatory mechanisms of lipopolysaccharide synthesis in *Escherichia coli*. *Nature Communications 2022 13:1*, 13(1), 1–11.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-32277-1>
- Sillankorva, S., Oliveira, R., Vieira, M. J., Sutherland, I. W., and Azeredo, J. (2004). Bacteriophage Phi S1 infection of *Pseudomonas fluorescens* planktonic cells versus biofilms. *Biofouling*, 20(3), 133–138. <https://doi.org/10.1080/08927010410001723834>
- Sim, M., Koirala, S., Picton, D., Strahl, H., Hoskisson, P. A., Rao, C. V., Gillespie, C. S., and Aldridge, P. D. (2017). Growth rate control of flagellar assembly in *Escherichia coli* strain RP437. *Scientific Reports 2017 7:1*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep41189>

- Slomińska, M., Neubauer, P., and Wegrzyn, G. (1999). Regulation of bacteriophage lambda development by guanosine 5'-diphosphate-3'-diphosphate. *Virology*, 262(2), 431–441. <https://doi.org/10.1006/VIRO.1999.9907>
- Spira, B., Silberstein, N., and Yagil, E. (1995). Guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp) synthesis in cells of *Escherichia coli* starved for Pi. *Journal of Bacteriology*, 177(14), 4053. <https://doi.org/10.1128/JB.177.14.4053-4058.1995>
- Srivatsan, A., and Wang, J. D. (2008). Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Current Opinion in Microbiology*, 11(2), 100–105. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2008.02.001>
- Stewart, P. S., Franklin, M. J., Williamson, K. S., Folsom, J. P., Boegli, L., and James, G. A. (2015). Contribution of Stress Responses to Antibiotic Tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(7), 3838. <https://doi.org/10.1128/AAC.00433-15>
- Strugeon, E., Tilloy, V., Ploy, M. C., and Da Re, S. (2016). The stringent response promotes antibiotic resistance dissemination by regulating integron integrase expression in biofilms. *MBio*, 7(4). <https://doi.org/10.1128/MBIO.00868-16>
- Sugisaki, K., Hanawa, T., Yonezawa, H., Osaki, T., Fukutomi, T., Kawakami, H., Yamamoto, T., and Kamiya, S. (2013). Role of (p)ppGpp in biofilm formation and expression of filamentous structures in *Bordetella pertussis*. *Microbiology (United Kingdom)*, 159(PART7), 1379–1389. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.066597-0>
- Sy, J. (1977). In vitro degradation of guanosine 5'-diphosphate, 3'-diphosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5529. <https://doi.org/10.1073/PNAS.74.12.5529>
- Sze, C. C., Bernardo, L. M. D., and Shingler, V. (2002). Integration of Global Regulation of Two Aromatic-Responsive  $\zeta$ 54-Dependent Systems: a Common Phenotype by Different Mechanisms. *Journal of Bacteriology*, 184(3), 760. <https://doi.org/10.1128/JB.184.3.760-770.2002>
- Tabib-Salazar, A., Liu, B., Barker, D., Burchell, L., Qimron, U., Matthews, S. J., and Wigneshweraraj, S. (2018). T7 phage factor required for managing RpoS in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(23), E5353–E5362. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1800429115>
- Tamman, H., Ernits, K., Roghanian, M., ... Garcia-Pino, A. (2022). Structure of SpoT reveals evolutionary tuning of catalysis via conformational constraint. *Nature Chemical Biology* 2022 19:3, 19(3), 334–345. <https://doi.org/10.1038/s41589-022-01198-x>
- Tamman, H., Van Nerom, K., Takada, H., ... Garcia-Pino, A. (2020). A nucleotide-switch mechanism mediates opposing catalytic activities of Rel enzymes. *Nature Chemical Biology* 2020 16:8, 16(8), 834–840. <https://doi.org/10.1038/S41589-020-0520-2>
- Traxler, M. F., Summers, S. M., Nguyen, H. T., Zacharia, V. M., Hightower, G. A., Smith, J. T., and Conway, T. (2008). The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 68(5), 1128–1148. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2008.06229.X>

- Van Der Biezen, E. A., Sun, J., Coleman, M. J., Bibb, M. J., and Jones, J. D. G. (2000). Arabidopsis RelA/SpoT homologs implicate (p)ppGpp in plant signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7), 3747–3752. <https://doi.org/10.1073/PNAS.97.7.3747>
- Vinella, D., Albrecht, C., Cashel, M., and D'Ari, R. (2005). Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in Escherichia coli. *Molecular Microbiology*, 56(4), 958–970. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2005.04601.X>
- Vrentas, C. E., Gaal, T., Berkmen, M. B., Rutherford, S. T., Haugen, S. P., Vassilyev, D. G., Ross, W., and Gourse, R. L. (2008). Still looking for the magic spot: the crystallographically-defined binding site for ppGpp on RNA polymerase is unlikely to be responsible for rRNA transcription regulation. *Journal of Molecular Biology*, 377(2), 551. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2008.01.042>
- Wells, D. H., and Gaynor, E. C. (2006). Helicobacter pylori initiates the stringent response upon nutrient and pH downshift. *Journal of Bacteriology*, 188(10), 3726–3729. <https://doi.org/10.1128/JB.188.10.3726-3729.2006>
- Xiao, H., Kalman, M., Ikehara, K., Zemel, S., Glaser, G., and Cashel, M. (1991). Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of relA null mutants can be eliminated by spoT null mutations. *Journal of Biological Chemistry*, 266(9), 5980–5990. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)67694-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)67694-5)
- Yan, X., Zhao, C., Budin-Verneuil, A., Hartke, A. M., Rincé, A., Gilmore, M. S., Auffray, Y., and Pichereau, V. (2009). The (p)ppGpp synthetase RelA contributes to stress adaptation and virulence in Enterococcus faecalis V583. *Microbiology*, 155(Pt 10), 3226–3237. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.026146-0>
- Young, R. (2013). Phage lysis: Do we have the hole story yet? *Current Opinion in Microbiology*, 16(6), 790–797. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2013.08.008>
- Zhang, M., Zhang, T., Yu, M., Chen, Y. L., and Jin, M. (2022). The Life Cycle Transitions of Temperate Phages: Regulating Factors and Potential Ecological Implications. *Viruses*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/V14091904>

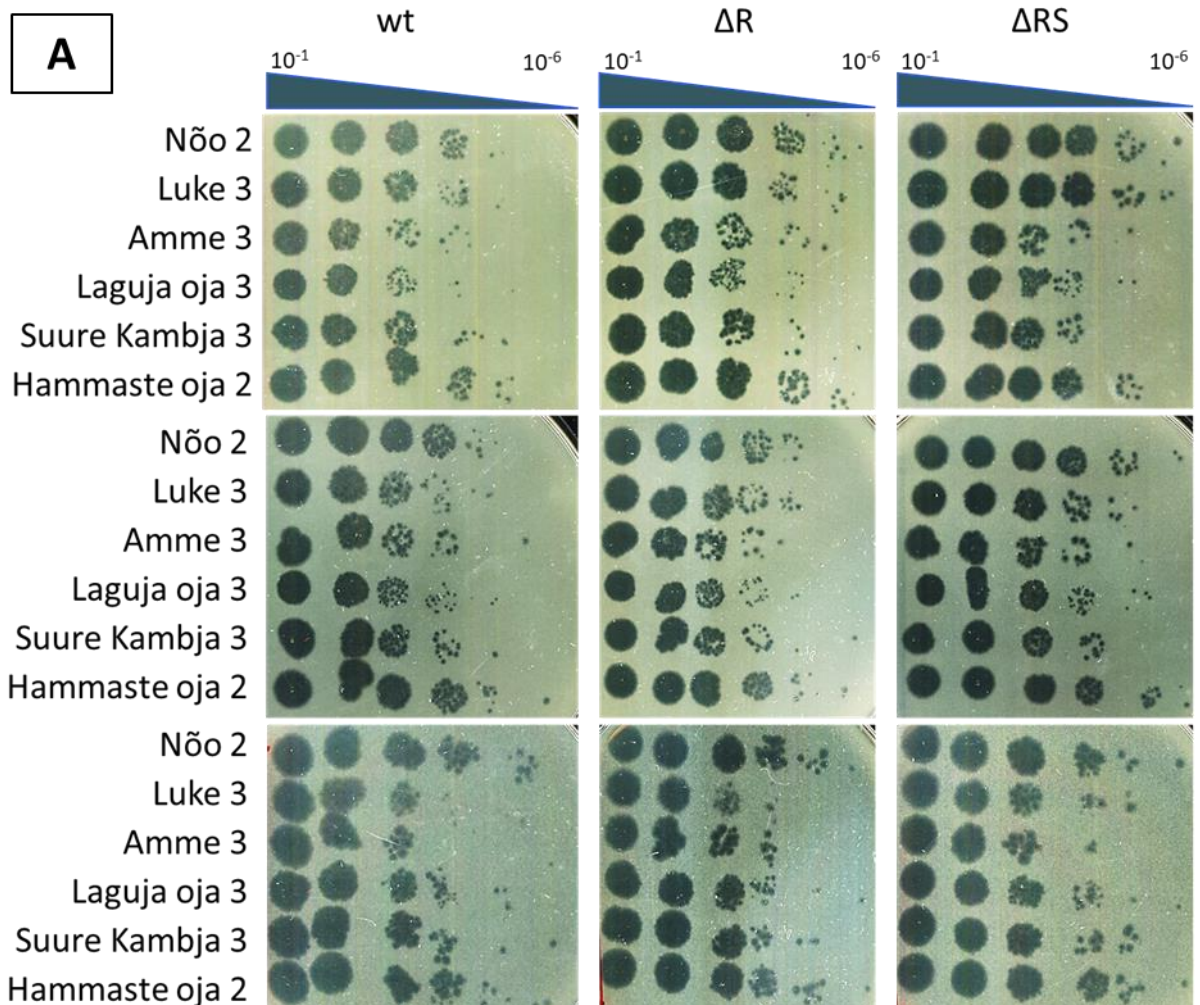
# LISAD

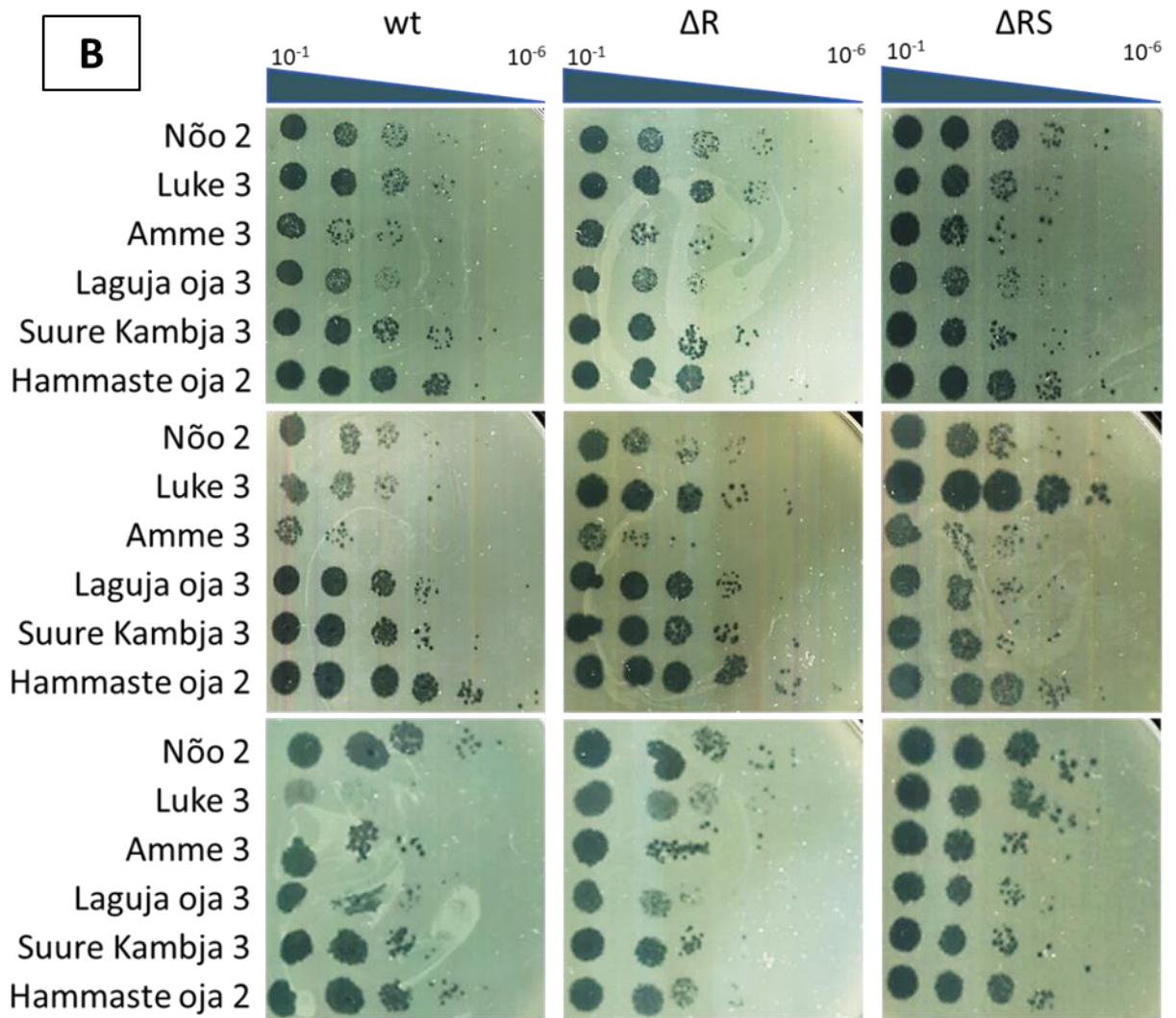
## Lisa 1: Kasv minimaalsöötmetel



**Lisa 1.** *P. putida*  $\Delta RelA$  ja  $\Delta RelA\Delta SpoT$  tüved suudavad kasvada minimaalsöötmetel. 8 h ette kasvatatud *P. putida* PaW85 (wt),  $\Delta RelA$  ( $\Delta R$ ) ja  $\Delta RelA\Delta SpoT$  ( $\Delta RS$ ) tüvede kasv erinevatel süsinikuallikatel (lõppkontsentratsiooniga 0,2%): glükonaat (GLN), Na-bensoaat (BENS), fruktoos (FRU), glütserool (GLY). Ettekasvatatud bakterikultuuridest tehti  $10^1$ - $10^6$ -kordsed lahjendused, millest tehti minimaaltassidele 5  $\mu$ l tilkkülvid. Tasse inkubeeriti 24 h või 44 h (FRU, GLY) temperatuuril 30 °C. Katset on korratud kaks korda.

## Lisa 2: Bakteriofaagide nakatamisefektiivsus tardsöötmetel





**Lisa 2. Bakteriofaagide lüüsilaiitud eksponentsiaalse (A) või hilis-statsionaarse (B) faasi rakkudest valatud bakterimurudel.** Joonisel on esitatud Nõo 2, Luke 3, Amme 3, Laguja oja 3, Suure Kambja 3 ning Hammaste oja 2 faagide lüüsilaiitud erinevate lahjendustena *P. putida* PaW85 (wt),  $\Delta RelA$  ( $\Delta R$ ) ja  $\Delta RelA\Delta SpoT$  ( $\Delta RS$ ) tüvede bakterimurudel, mis valati 4 h või 48 h temperatuuril 20 °C kasvatatud bakteritest. LB agarsöötmele oli lisatud tsiprofloksatsiin (0,03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ja  $\text{CaCl}_2$  (10 mM). Pilt on tehtud pärast ~24 h kasvatamist temperatuuril 20°C. Katsete omavahelise varieeruvuse iseloomustamiseks on esitatud kõigi 3 katse tulemused.

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

Mina, Roger Rikberg,

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

**„Poomisvastuse mõju *Pseudomonas putida* stressitaluvusele“**,

mille juhendaja on Hedvig Tamman PhD,

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.

*Roger Rikberg*

**29.05.2023**