

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

***Pseudomonas putida* profaag P2 faagivastases kaitses**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Gülgäz Gasymova

Juhendaja PhD Sirli Rosendahl

TARTU 2024

INFOLEHT

***Pseudomonas putida* profaag P2 faagivastases kaitses**

Pseudomonas putida on keskkonnabakter, kelle faagitolerantsust on vähe uuritud. *P. putida* genoomis on neli profaagi ning meie uurimisgrupis on näidatud, et need võivad tõsta *P. putida* faagitolerantsust. Meie laboris nähti, et profaag P2 kaitseb *P. putida*'t viienda ja kuuenda perekonna faagide eest. Sellest lähtuvalt oli käesoleva bakalaureusetöö eesmärk uurida, kui suur on profaag P2 kaitseefekt ning tuvastada geen(id), mis selle eest vastutab(vad) kasutades profaag P2 deletsioonanalüüsi. Tulemused näitasid, et agarsöötmele on profaagi P2 kaitse G5 perekonna faagide eest 10-kordne ja vedelsöötmes 10- kuni 100-kordne. G6 perekonna faagide vastu kaitseb P2 agarsöötmele 10-1000-kordselt ja vedelkultuuris vähemalt 100-kordselt. Lisaks selgus, et G6 perekonna faagide virulentsust inhibeerib vedelsöötmesse lisatud CaCl_2 . Faagitolerantsuse eest vastutab profaagi geen PP_3026.

Märksõnad: *Pseudomonas putida*, profaag, faagiresistentsus

CERCS kood: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

***Pseudomonas putida* prophage P2 in anti-phage defence**

Pseudomonas putida is an environmental bacterium and little is known about its phage tolerance. There are four prophages in the genome of *P. putida*, and the results of our group have shown that prophages can increase *P. putida* phage tolerance. It has also been shown that prophage P2 protects *P. putida* from genus G5 and G6 phages. Thus, this study aimed to determine the protective effect of prophage P2 and to identify which gene(s) is(are) responsible for this using deletion analysis. The data showed that prophage P2 provides *P. putida* on solid medium 10-fold protection and in liquid medium 10- to 100-fold protection against G5 phages. The P2 protection against G6 phages on solid medium is 10- to 1000-fold, and in liquid medium at least 100-fold. The infection efficiency of 6A phages is inhibited when CaCl_2 is added to the liquid medium. In addition to this, the results indicate that prophage P2 gene PP_3026 is responsible for the anti-phage effect.

Keywords: *Pseudomonas putida*, prophage, phage resistance

CERCS code: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

INFOLEHT	3
KASUTATUD LÜHENDID	6
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1. Bakteriofaagid ja nende kasutusala.....	8
1.1.1 Bakteriofaagide klassifikatsioon	8
1.1.2. Bakteriofaagide paljunemistsükkel	9
1.2. Bakterite kaitsemehhanismid faagide vastu.....	10
1.2.1 Raku retseptori muundamine	11
1.2.2 Restriksiooni-modifikatsiooni süsteemid.....	11
1.2.3. CRISPR-Cas süsteem.....	11
1.2.4 Abi süsteem	12
1.3. Faagide möödahiilimine bakteri kaitsemehhanismidest	12
1.4. Profaagid.....	13
1.4.1. <i>Pseudomonas putida</i> ja tema profaagid	14
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	16
2.1. Töö eesmärgid.....	16
2.2. Materjal ja meetodika	17
2.2.1 Kasutatud söötmed, <i>P. putida</i> tüved, plasmiidid ja faagid	17
2.2.2. Bakterite elektroporeerimine.....	19
2.2.3. Polümeraasi ahelreaktsioon.....	19
2.2.4. Geelelektroforees	20
2.2.5. P2_ΔL4 ja P2_ΔL5 deletsioonmutantide konstrueerimine	20
2.2.6. Faagitolerantsuse testimine agarsöötmes.....	20
2.2.7. Faagitolerantsuse testimine vedelsöötmes mikrotiiterplaadil	21
2.3. Tulemused.....	22
2.3.1. Profaag P2 kaitseb <i>P. putida</i> ’t viienda ja kuuenda perekonna faagide eest	22

2.3.2. CaCl ₂ soodustab G5 ja vähendab G6 faagide nakatamisvõimet	23
2.3.3. Profaag P2 geen PP_3026 kaitseb <i>P. putida</i> 't G5 ja G6 perekonna faagide vastu..	26
2.4. Arutelu	29
2.4.1. <i>P. putida</i> profaag P2 kaitseb G5 ja G6 perekonna faagide eest.....	29
2.4.2. CaCl ₂ pärsib 6A liigi faagide nakatamisvõimet vedelsöötmes.....	30
2.4.3. G5 ja G6 perekonna faagide vastane kaitsegeen PP_3026 on rekombinaas	30
KOKKUVÕTE	32
SUMMARY	33
TÄNUSÕNAD	35
KIRJANDUSE LOETELU.....	36
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	41
LIHTLITSENTS.....	42

KASUTATUD LÜHENDID

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

AMR – antimikroobne resistentsus (ingl. k. *antimicrobial resistance*)

ap – aluspaar (ingl. k. *base pair*)

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

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

CEPEST – *Pseudomonas putida* faagide kollektsioon Eesti keskkonna proovidest (ingl. k. *Collection of Environmental Pseudomonas putida Phages from Estonia*)

Cipro – tsiprofloksatsiin (ingl. k. *ciprofloxacin*)

CRISPR – klasterdatud regulaarsete vahedega lühikesed palindroomsed kordused (ingl. k. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)

crRNA – CRISPR-RNA

dsDNA – kaksikahelaline DNA (ingl. k. *double-stranded DNA*)

Km – kanamütsiin (ingl. k. *kanamycin*)

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

Map – megaaluspaar (ingl. l. *megabase pair*)

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

MT – metüültransferaas (ingl. k. *methyltransferase*)

RE – restriктаas (ingl. k. *restriction endonuclease*)

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

SISSEJUHATUS

Bakteriofaagid on viirused, kes nakatavad baktereid. Looduses eksisteerivad faagid seal, kus leidub baktereid, kuna nad suudavad paljuneda ainult bakteri sees. Faagi paljunemine on peremehele kurnav ja võib lõppeda bakteri surmaga. Seetõttu on bakteritel tekkinud erinevad faagivastased kaitsemehhanismid, näiteks restriksiooni-modifikatsiooni, CRISPR ja Abi süsteemid (Dy jt., 2014). Faagid on samuti „kavalad“ ning neil on ka tekkinud erinevaid viise, kuidas bakteri kaitsemehhanismidest jagu saada (Samson jt., 2013).

Faagi nimetatakse profaagiks kui tema genoom on integreerunud bakteri kromosoomi. Tavaliselt on profaagide geenid repressseeritud, et takistada ümber lülitumist lüütilisse tsükklisse. On täheldatud, et profaagid võivad kaitsta peremeest teiste faagide vastu (Bondy-Denomy jt., 2016; Cumby jt., 2012; Patel ja Maxwell, 2023).

Pseudomonas putida on keskkonnabakter ning oma mitmekesise metaboolse võimekuse ja suure stressitaluvuse tõttu on tal suur potentsiaal biotehnoloogias. Kuigi tegemist on laialdaselt kasutatava bakteriga, on tema interaktsioone faagidega vähe uuritud. *P. putida* tüve PaW85 genoomis on 4 profaagi, mis mõjutavad tema stressitaluvust (Martínez-García jt., 2015). Meie labori varasematest uuringutest selgus, et *P. putida* PaW85 profaagid suurendavad bakteri faagitolerantsust (Brauer jt., 2024; Kärgerberg, 2021; Lipu, 2023; Piirmets, 2022). Sirli Rosendahli ja Rita Hõraku avaldamata andmed näitasid, et profaag P2 kaitseb bakterit CEPEST kollektsiooni G5 ja G6 perekonna faagide vastu.

Selle bakalaureusetöö eesmärk oli uurida kui suure kaitse annab *P. putida* PaW85 profaag P2 viienda ja kuuenda perekonna faagide vastu ja leida geen(id), mis selle eest vastutab(vad) kasutades deletsioonanalüüsi.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Bakteriofaagid ja nende kasutusala

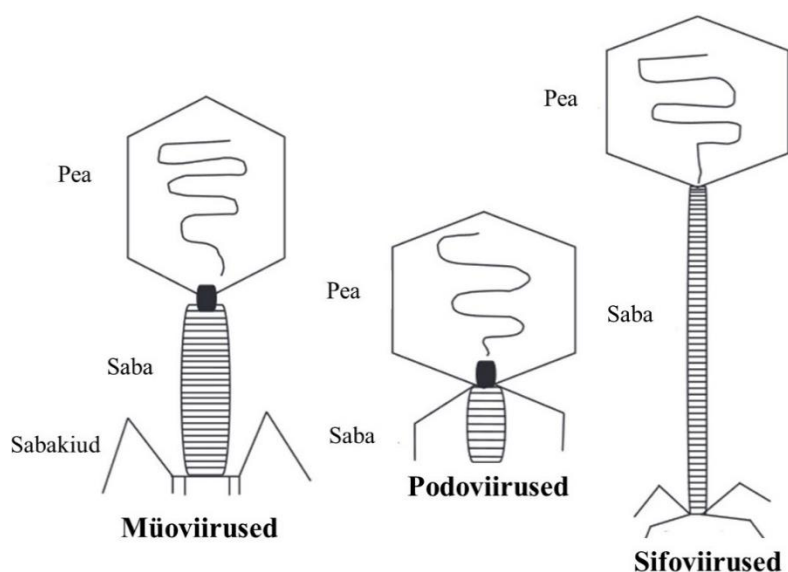
Bakteriofaagid ehk faagid on viirused, kes on võimelised nakatama ainult baktereid, põhjustades rakkude lüüsumist. Arvatakse, et biosfääris on 10^{31} faagipartiklit, mis on umbes 10 korda rohkem kui arvatakse olevat baktereid (Brüssow ja Hendrix, 2002; Fortier ja Sekulovic, 2013). Bakterid ja viirused ümbritsevad meid kõikjal ja nende olemasolu mängib olulist rolli mitmetel elualadel, näiteks meditsiinis, kuid ka toidu- ja biotehnoloogias. Bakteriofaagide uurimine on võimaldanud nendes peituvat potentsiaali rakendada mitmel moel. Juba 20. sajandi I poolel hakati kasutama bakteriofaage, et ravida bakteriaalseid infektsioone (Strathdee jt., 2023). Sellist ravimisviisi tuntakse faagiteraapiana. Kuigi sellel oli palju potentsiaali, jäeti faagiteraapia kõrvale enamikes riikides pärast antibiootikumide avastamist. Tänapäeval tekitab meditsiinivaldkonnas probleeme antimikroobne resistentsus (AMR, ingl. k. *antimicrobial resistance*), mis tähendab, et mikroobid ei allu enam seni toiminud antibiootikumidele (Pendleton jt., 2013; Strathdee jt., 2023). Arvatakse, et kui ei rakendata uusi meetmeid, siis sureb AMR-i tõttu iga aasta 10 miljonit inimest (O'Neill, 2014). Tänu AMR-i levikule on faagiteraapia uuesti populaarsust kogumas, sest sellega proovitakse lahendada mikroobide resistentsust ravimitele.

Faage on võimalik kasutada ka toidutööstuses biotõrjevahendina vähendades patogeeni arvu ja tõstes sellega toiduohutust (Hassan jt., 2021). Meetodi plussiks on faagi võime nakatada spetsiifiliselt patogeeni, mistõttu toidus leiduvad kasulikud bakterid jäävad ellu (Moye jt., 2018). Ühes uuringus näidati, kuidas *Listeria monocytogenes* hulk juustus vähenes umbes 100 korda peale faagi P100 lisamist (Silva jt., 2014). Aga selle meetodi kasutamisega võib kaasneda probleeme (Moye jt., 2018). Nimelt on oht faagiresistentsete patogeeni tekkimiseks. Selle tõenäosust vähendaks faagikokteilide ehk rohkem kui ühest faagist koosnevate faagisegude kasutamine patogeeni kasvu inhibeerimiseks.

1.1.1 Bakteriofaagide klassifikatsioon

Bakteriofaage võib jaotada genoomi või struktuuri alusel (Ackermann, 1998). Looduses leidub nii DNA kui ka RNA genoomiga viiruseid. Enamus seni kirjeldatud bakteriofaage on kaksikahelalise DNA-ga (dsDNA) ja sabaga viirused, mis kuuluvad *Caudovirales* seltsi (Ackermann, 1998). Nimetatud selts jaotub kolmeks sugukonnaks: sifoviirused, müoviirused ja podoviirused (Joonis 1) (Ackermann, 1998). *Caudovirales* viirustel on kapsiid, mille külge on kinnitunud saba. Sifo- ja müoviiruseid iseloomustab pikk saba, kuid podoviiruseid palju

lühem saba. Müoviirused erinevad teistest sabaga viirustest selle poolest, et nende sabal on võime kokku tõmbuda. Bakalaureusetöö eksperimentaalses osas kasutatud faagid on dsDNA viirused, mis kuuluvad podoviiruste sugukonda (Brauer jt., 2024).



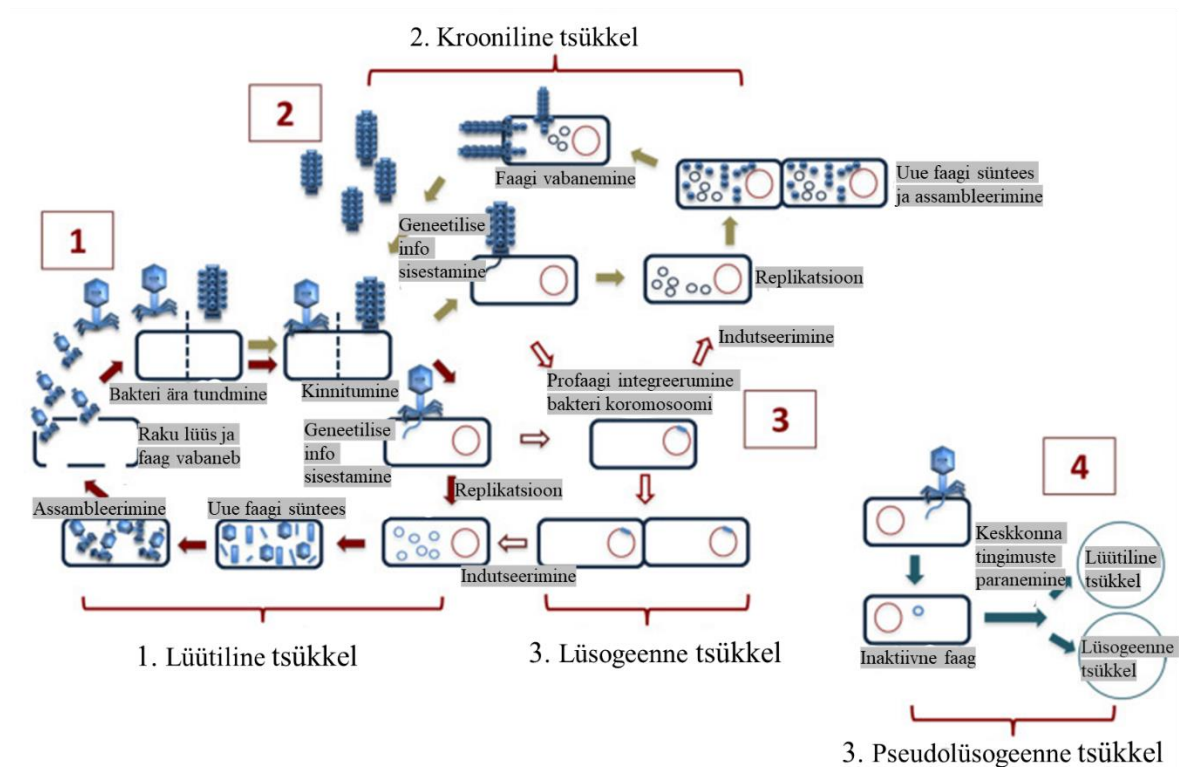
Joonis 1. *Caudovirales* seltsi kuuluvate faagide struktuur. Sabaga faagid jaotuvad vastavalt oma saba tüübile kolmeks: müoviirused, podoviirused ja sifoviirused. Müoviirustel on pikk ja kokkutõmbav saba. Podoviirustel on väga lühike saba. Sifoviirustel on pikk ja tavaliselt painduv saba. Nii podo- kui ka sifoviirustel puudub võime oma saba kokku tõmmata. Joonis on kohandatud (Elbreki jt., 2014).

1.1.2. Bakteriofaagide paljunemistsükkel

Bakteriofaagidel on neli paljunemistsükli: lüütiline, krooniline, lüsogeenne ja pseudolüsogeenne (Sieiro jt., 2020). Lüütilise ehk reproduktiivse tsükli puhul kinnitub faag oma retseptoreid siduva valguga bakterile ja süstib oma genoomi tema tsütoplasmasse (Feiner jt., 2015). Seejärel toimub kiire faagipartiklite tootmine ja pakkimine. Kui bakterid ei suuda oma kaitsesüsteemidega faagist jagu saada, lõppeb infektsioonitsükkel bakteri lüüsumisega. Keskkonda väljuvad uued viirused, kes on võimelised uusi baktereid nakatama (Joonis 2.1). Faage, kellele on omane lüütiline tsükkel nimetatakse virulentseteks faagideks. Krooniline tsükkel sarnaneb lüütilise tsükliga ehk faag kinnitub bakteri pinnale, sisestab oma genoomi bakterisse, toimub faagipartiklite sünteesimine ja assambleerimine, kuid erinevused on viimases etapis. Nimelt lahkuvad äsja sünteesitud faagid peremeesorganismist nii, et ei põhjusta bakteri surma, küll aga on see bakterile kurnav (Joonis 2.2) (Sieiro jt., 2020).

Lüsogeense tsükli puhul sisestab bakteriofaag oma geneetilise info peremeesrakku ning faagi geneetiline info integreerub bakteri genoomi (Joonis 2.3). Bakteri kromosoomi integreerunud faagi genoomi nimetatakse profaagiks. Iga kord kui bakter paljuneb, kandub bakterigenoomi

koosseisus olev profaag edasi tütarakkudesse. Kuigi lüsogeenne tsükkel ei põhjusta peremeesraku hukkumist, võib profaag stressi olukordades üle minna lüütilisse tsükklisse ja bakteriraku lüüsida. Faage, kellel on lüsogeenne tsükkel nimetatakse mõõdukateks faagideks. Faagidel võib esineda ka neljas paljunemistsükkel – pseudolüsogeenne (Feiner jt., 2015) (Joonis 2.4). Enamasti võib seda näha toidainetevaestes keskkondades, kus faagid jäävad bakteri sees integreerumata preprofaagina püsima. Kui keskkonnatingimused paranevad, siis lülitub faag ümber lüütilisse või lüsogeensesse tsükklisse (Sieiro jt., 2020).



Joonis 2. Bakteriofaagide paljunemistsükkel. 1. Lüütiline tsükkel. 2. Krooniline tsükkel. 3. Lüsogeenne tsükkel. 4. Pseudolüsogeenne tsükkel. Joonis on kohandatud (Sieiro jt., 2020).

1.2. Bakterite kaitsemehhanismid faagide vastu

Bakterid on pidevalt ohustatud neid nakatavate faagide poolt ja selline antagonistlik suhe põhjustab bakterite ja viiruste vahelist võidurelvastumist ja koevolutiooni. Bakteritel on populatsiooni säilitamiseks tekkinud erinevad faagivastased kaitsesüsteemid ning järgnevates alapeatükkides tuleb juttu põhilistest ja rohkem uuritud mehhanismidest. Tegelikult on faagivastaseid kaitsesüsteeme veel ja aina leitakse juurde, mis viitab sellele, et palju on veel avastamata. Sellepärast on oluline uurida bakterite ja faagide omavahelisi

interaktsioone, mis aitaks tulevikus rakendada uusi mehhanisme meditsiinis, biotehnoloogias ja muudes valdkondades.

1.2.1 Raku retseptori muundamine

Bakteri nakatamiseks on vaja kõigepealt täita kaht tingimust. Esiteks peab bakteril olema retseptor, millega faag on võimeline seonduma. Teiseks, faag peab olema võimeline bakteris paljunema ehk bakter peab olema permissiivne. Infektsiooni esmases etapis peab faag kinnituma bakteri retseptorile. Selles etapis faaginakkuse blokeerimine on bakterile kõige soodsam, sest siis ei pääse võõr-DNA peremeesorganismi.

Ühes uuringus näidati, kuidas piilide modifitseerimine glükosüültransferaasiga kaitseb bakterit faagide eest, kes kasutavad peremehe piilisid kinnitumiseks (Harvey jt., 2018). *Pseudomonas aeruginosa* glükosüülitud tüüp IV piilide kaitseefekt faagide JBD26 ja JBD68 vastu oli vähemalt 10^5 -kordne võrreldes tüvega, mille piilid olid glükosüülimata (Harvey jt., 2018).

1.2.2 Restriktiooni-modifikatsiooni süsteemid

Restriktiooni-modifikatsiooni (RM) süsteemid on bakterites laialt levinud kaitsemehhanismid, mis viivad võõr-DNA lagundamiseni rakkudes (Roberts jt., 2003; Tock ja Dryden, 2005). RM süsteeme on nelja erinevat tüüpi ning kõik RM-süsteemid vajavad kofaktorina Mg^{2+} . Tüüp I ja III vajavad lisaks ka ATPaasi (Roberts jt., 2003).

RM süsteemid koosnevad enamasti restriктаasist (RE) ja metüültransferaasist (MT). RE on endonukleasne ensüüm, mis lõikab DNA-d spetsiifilises äratundmiskohas ja MT on ensüüm, mis metüleerib DNA-d (Tock ja Dryden, 2005). Faagi metüleerimata genoom on RE substraadiks ja RE lõikab seda. Bakterid kodeerivad MT, mille tõttu on nende kromosoom metüleeritud ja seega RE eest kaitstud. Selline RM-süsteem on omane tüüpidele I, II ja III. Erandiks on tüüp IV, millel puudub MT ning restriктаas lõikab ainult modifitseeritud (näiteks metüleeritud, hüdroksümetüleeritud) faagi genoomi (Roberts jt., 2003).

1.2.3. CRISPR-Cas süsteem

CRISPR-Cas on laialdaselt uuritud prokarüootide faagivastane kaitsesüsteem, mille abil bakter omandab resistentsuse nende faagide vastu, millega ta on varem kokku puutunud (Barrangou jt., 2007). CRISPR lookus sisaldab lühikesi peaaegu identseid kordusjärjestusi (21-48 ap) ja nende vahele jäävaid vahealasid ehk speissereid (26-72 ap) (Labrie jt., 2010). Speisserid on DNA fragmendid, mis pärinevad faagidest või muudest mobiilsetest

geneetilistest elementidest. Lisaks kuuluvad CRISPR-Cas süsteemi Cas (ingl. k. *CRISPR associated*) valgud, mille ülesanne on võõr-nukleiinhappe lõikamine (Richter jt., 2012).

Speisserjärjestust sisaldavalt CRISPR lookuselt transkribeeritakse crRNA (ingl. k. *CRISPR RNA*), mis seondudes Cas valkudega moodustab crRNA-Cas kompleksi (McGinn ja Marraffini, 2019). Kui kompleks leiab faagirünnaku korral speisseriga komplementaarse ahela, siis Cas valgud lõikavad faagi genoomi ning bakteri nakatamine on häiritud (Horvath ja Barrangou, 2010).

1.2.4 Abi süsteem

Abortiivse infektsiooni (Abi) süsteem erineb eelnevalt mainitud bakteri kaitsemehhanismidest, kuna Abi põhjustab kas peremehe surma või metabolismi maha surumist enne kui faag jõuab oma paljunemise lõpule viia. Bakter kasutab Abi süsteemi viimase variandina peale seda kui muud kaitsemehhanismid (näiteks RM-süsteem, CRISPR-Cas süsteem) ei ole saanud faagist jagu (Lopatina jt., 2020). Kõigepealt peab Abi süsteem ära tundma bakterisse sisenenud faagi ja peale seda aktiveeritakse protsessid, mis viivad raku surmani või metabolismi inhibeerimiseni. Abi süsteemi suureks eeliseks on faagide paljunemise takistamine. Kuigi see võib põhjustada peremehe surma, on vähemalt teised bakterid populatsioonis faagirünnaku eest kaitstud (Lopatina jt., 2020).

Näiteks *Staphylococcus epidermidis*'e seriin/treoniini kinaas Stk2 takistab faagide paljunemist (Depardieu jt., 2016). Kinaas Stk2 aktiveerub faagi PacK valgu juuresolekul, mis on seotud sissetungija genoomi pakkimisega (Depardieu jt., 2016). Uuringus selgitati välja, et faagi poolt aktiveeritud kinaas fosforüülib bakterile eluliselt vajalikke valke, mis on seotud transkriptsiooni, translatiooni ja stressivastusega. Fosforüülimine inhibeerib valkude funktsiooni ja põhjustab raku surma (Depardieu jt., 2016).

1.3. Faagide möödahiilimine bakteri kaitsemehhanismidest

Bakterite ja viiruste pidev võitlus põhjustab nende üksteisest sõltuvat evolutsiooni ehk koevolutsiooni. Viirustel on bakterite kaitsesüsteemidest möödahiilimiseks aja jooksul välja kujunenud erinevad mehhanismid (Samson jt., 2013). Selles peatükis kirjeldatakse erinevaid faagide strateegiaid bakteri kaitsemehhanismidest mööda hiilimiseks.

Bakter võib kaitsta end faagi eest muutes või varjestades faagi retseptorit või represseerides faagi retseptoriks olnud valgu ekspressiooni, mistõttu ei saa faag enam bakterile kinnituda. Selleks, et faag saaks uuesti bakterit nakatada peab muteeruma faagi retseptorit siduv valk,

mille tulemusena võib faag hakata kasutama mõnda teist bakteri pinnavalku retseptorina. Näiteks kasutab *Escherichia coli* faag λ oma sabas olevat valku J, et kinnituda bakteri poriinile LamB (Berkane jt., 2006). Poriini ekspressiooni inhibeerimine muutis bakteri faagi λ suhtes resistentseks (Meyer jt., 2012). Mutatsioonid λ faagi J valgus võimaldasid tal *E. coli*'t jälle nakatada, kuid nüüd kasutas ta retseptorina poriin OmpF, mitte LamB (Meyer jt., 2012).

Faagid on võimelised ka bakteri RM-süsteemist mööda hiilima. RE lõikab faagi genoomi spetsiifilistest järjetustest ning faag võib neid alasid oma valkudega RE eest ära peita, mille tõttu on faag RM süsteemi eest kaitstud. Seda täheldati bakteriofaagil P1, keda ei mõjuta tüüp I RM-süsteem, kuna faagi kaitsevad valgud DarA ja DarB (Iida jt., 1987). DarA ja DarB on faagi struktuurvalgud, mis pakitakse faagi kapsiidi ja infektsiooni korral sisestab faag nad koos oma genoomiga bakterisse. RE äratundmissait on DarA ja DarB poolt peidetud ning faag saab bakterit edukalt nakatada. Hiljutisem uuring näitas, et tegelikult aitavad DarA ja DarB valkudele kaasa ka DdrA, DdrB, Hdf ja Ulx valgud (Piya jt., 2017).

Ka CRISPR-Cas kaitsesüsteem ei suuda alati faage kahjutuks muuta. Näiteks on täheldatud, et mõned profaagid võivad kaitsta nakatavaid faage bakteri CRISPR-Cas süsteemi eest. Uuringus vaadeldi lüsogeensete bakterite nakatumist CRISPR-tundlike faagidega (Bondy-Denomy jt., 2013). Faag JBD18, mis on CRISPR-tundlik, ei nakata üldse algset tüve *Pseudomonas aeruginosa* PA14. Samas nakatas faag JBD18 lüsogeenset tüve PA14(JBD30) sama efektiivselt nagu CRISPR-Cas deletsioontüve (Bondy-Denomy jt., 2013). Seega profaag JBD30 kaitseb faagi JBD18 *P. aeruginosa* CRISPR-Cas süsteemi eest. Edasised katsed näitasid, et kaitse eest vastutas profaagi JBD30 geen 35, mis autorite arvates täidab oma funktsiooni peale seda, kui crRNA-Cas kompleks on moodustunud (Bondy-Denomy jt., 2013).

Selles peatükis mainitud viisid näitavad, miks bakterid pole oma looduslikest vaenlastest lõplikult jagu saanud ning kindlasti pole ülalmainitud strateegiad ainukesed, mis faagidel on tekkinud.

1.4. Profaagid

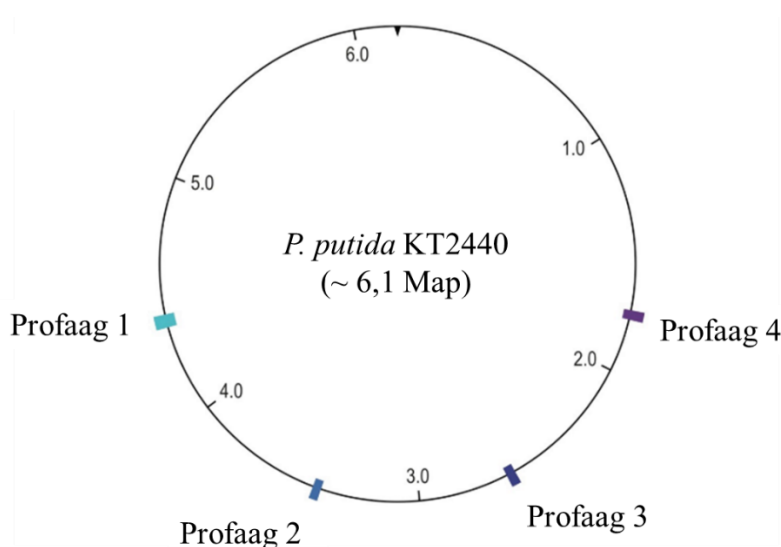
Profaag on mõõdukas faag, mis on integreerunud peremeesraku kromosoomi lüsogeense paljunemistsükli käigus. Profaagide arvukus bakteri genoomis oleneb erinevatest teguritest: profaage on rohkem suurema genoomiga ja kiiremalt kasvavates bakterites (Touchon jt., 2016). Tavaliselt on profaagide geenid represseeritud, kuid mõnesid geene siiski ekspresseeritakse (Brüssow jt., 2004). Ekspresseeritud geene hakati nimetama moron

geenideks, mis võivad suurendada bakteri kohasust või kaitsta teiste faagirünnakute eest (Bondy-Denomy jt., 2016; Brüssow jt., 2004; Cumby jt., 2012; Juhala jt., 2000).

On teada, et profaagid võivad bakterit kaitsta superinfektsioonide eest. Superinfektsioon on selline olukord, kus lüsogeenset bakterit nakatab profaagiga sama või sarnane faag. Näiteks on leitud, et *E. coli* profaag HK97 kodeerib moron geenilt valku gp15, mis kaitseb bakterit faagide HK97 ja HK75 superinfektsiooni eest (Cumby jt., 2012; Juhala jt., 2000). Leiti, et ennustuse kohaselt transmembraanne valk gp15 takistab faagide DNA sisenemist bakteri tsütoplasmasse ja gp15 sihtmärgiks arvatakse olevat nakatava faagi saba (Cumby jt., 2012).

1.4.1. *Pseudomonas putida* ja tema profaagid

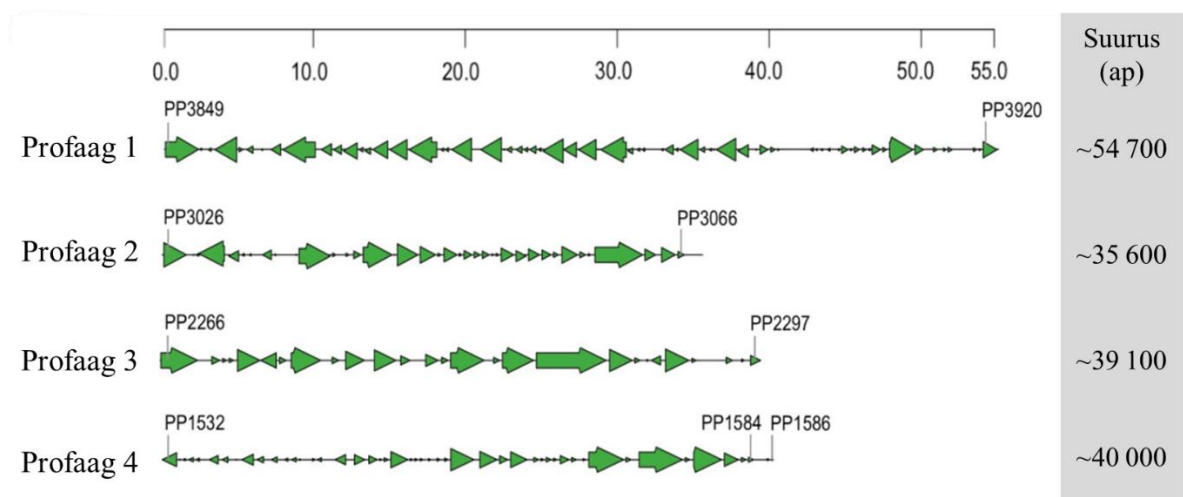
Pseudomonas putida PaW85 (isogeenne tüvega KT2440) on gramnegatiivne keskkonnabakter ja tema genoom on umbes 6 megaaluspaari (Map) pikk (Joonis 3). *P. putida* on mudelorganism, kellel on mitmekesised metaboolsed rajad ning ta on laialdaselt kasutatav organism biotehnoloogias. Tema genoomis on neli profaagi: P1, P2, P3 ja P4 (Joonis 3).



Joonis 3. *Pseudomonas putida* KT2440 genoomi skemaatiline ehitus. Esitatud on *P. putida* KT2440 genoomi suurus (6,1 Map) ja profaagide asukoht genoomis. Joonis on kohandatud (Martínez-García jt., 2015).

Profaagide P1, P2, P3, P4 genoomid ja pikkused on toodud Joonisel 4. Kõik koos moodustavad 2,6% *P. putida* täisgenoomist (Martínez-García jt., 2015). Uuringud on näidanud, et kui eemaldada kõik neli profaagi *P. putida* genoomist, siis suureneb bakteri UV-kiirguse taluvus (Martínez-García jt., 2015). Veel leiti, et nimetatud profaagid pole võimelised ümber lülituma lüütilisesse tsükliksse ja moodustama faagipartikleid (Martínez-García jt., 2015). Seega võib neid pidada inaktiivseteks ehk krüptilisteks profaagideks.

Meie laboris eelmisel aastal valminud bakalaureusetöös uuriti profaag P1 ja P3 mõju *P. putida* faagitolerantsusele (Lipu, 2023). *P. putida*-spetsiifiliste faagide CEPEST kollektsiooni sõelumisega selgitati välja, et profaag P1 kaitseb Kompost 2 (7B) ja Konnatiik (5B) faagide eest ning profaag P3 G3 perekonna faagide eest (Lipu, 2023). Töös tuvastati piirkonnad, kus potentsiaalsed faagivastased kaitsegeenid paiknevad. Tänapäevaks on selgunud, et P1 kaitsegeenid on PP_5643 ja PP_5644 (Rita Hõrak, Anu Kängsep, Anita Lipu, avaldamata andmed) ning profaag P3 kaitsegeenid PP_5516 ja PP_5517 (Rita Hõrak, Anita Lipu, avaldamata andmed).



Joonis 4. *Pseudomonas putida* KT2440 profaagide geenide organisatsioon ja pikkused. Profaagide pikkused (aluspaarides) on toodud paremal pool oleva riba. Joonis on kohandatud (Martínez-García jt., 2015).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Pseudomonas putida on gramnegatiivne bakter, kes elab peamiselt mullas. Teda on kasutatud laialdaselt biotehnoloogias, kuid tema faagiresistentsuse kohta on vähe infot. *P. putida* tüve PaW85 genoomis on 4 profaagi, mis mõjutavad tema stressitaluvust (Martínez-García jt., 2015). Meie laboris täheldati, et profaag P2 kaitseb *P. putida* PaW85 tüve CEPEST kollektiooni G5 ja G6 perekonna faagide eest (Sirli Rosendahl ja Rita Hõrak, avaldamata andmed). Tegemist on *Caudovirales* seltsi ja podoviiruste sugukonda kuuluvate sabaga dsDNA-ga bakteriofaagidega, mille genoomide suurus on umbes 40 000 ap (Brauer jt., 2024). Selles bakalaureusetöös kasutati viienda ja kuuenda perekonna faagide esindajaid, et

- 1) uurida kui suurt kaitseefekti avaldab *Pseudomonas putida* PaW85 profaag P2 viienda ja kuuenda perekonna faagide vastu;
- 2) deletsioonanalüüsi kasutades tuvastada profaag P2 geen(id), mis tõstab(vad) *P. putida* PaW85 faagitolerantsust nende faagide suhtes.

2.2. Materjal ja metoodika

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

Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid on toodud Tabelis 1 ning bakteriofaagid Tabelis 2. Faagitolerantsuse testimiseks kasutasin lüsogeenset söödet (LB) (1% trüptoon, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl). LB tardsööde sisaldas 1,5% agarit ja lisaks tsiprofloksatsiini (Cipro; 0,03 µg/ml). Bakterimuru jaoks kasutasin LB pehmeagari söödet, mis sisaldas 0.3% agarit ja CaCl₂ (10 mM). LB vedelsöötmes kasvatamisel aereeriti kultuure loksutil. Bakteritüvede konstrueerimisel kasvatati bakterikultuure 30 °C juures ja faagitolerantuse testimisel 20 °C juures.

Selekteerimiseks kasutati antibiootikume kanamütsiin (Km; 50 µg/ml) ja bensüülpenitsilliin (Bp; 1500 µg/ml). Plasmidi pSW(I-SceI) indutseerimiseks kasutati meta-toluaati (3 mM).

Tabel 1. Töös kasutatud *P. putida* tüved.

Bakter	Iseloomustus	Viide allikale
Bakteritüved		
<i>Pseudomonas putida</i>		
PaW85	Metsiktüvi	(Bayley jt., 1977)
ΔP2	PaW85, millest on eemaldatud profaag P2	(Kärgerberg, 2022)
Δ4φ	PaW85, millest on eemaldatud kõik neli profaagi (P1,P2,P3,P4)	(Brauer jt., 2024)
ΔP2_left	PaW85, millest on eemaldatud profaag P2 vasema poole geenid PP_3026 kuni PP_3039	Sirli Rosendahl
ΔP2_right	PaW85, millest on eemaldatud profaag P2 parema poole geenid PP_3040 kuni PP_5557	Sirli Rosendahl
P2_ΔL2	PaW85, millest on eemaldatud profaag P2 geenid PP_3026 kuni PP_5553	Sirli Rosendahl
P2_ΔL4	PaW85, millest on eemaldatud profaag P2 geenid PP_3026 kuni PP_3031	Gülgaz Gasymova
P2_ΔL5	PaW85, millest on eemaldatud profaag P2 geenid PP_3032, PP_5552, P_5553	Gülgaz Gasymova
P2_ΔL6	PaW85, millest on eemaldatud profaag P2	Sirli Rosendahl

	geenid PP_3027, PP_3028 ja pool PP_3029 geenist	
P2_ΔL7	PaW85, millest on eemaldatud profaag P2 geenid PP_3030 ja PP_3031 ning pool PP_3029 geenist	Sirli Rosendahl
P2_Δ3026	PaW85, millest on eemaldatud profaag P2 geen PP_3026	Sirli Rosendahl
Plasmiidid		
pSNW2-P2ΔL4	P2 geenide PP_3026 kuni PP_3031 deleteerimiseks	Sirli Rosendahl
pSNW2-P2ΔL5	P2 geenide PP_3032, PP_5552 ja PP_5553 deleteerimiseks	Sirli Rosendahl
pSW(I-SceI)	Kointegraatide lahutamiseks genoomis	(Wong ja Mekalanos, 2000)

Tabel 2. Töös kasutatud bakteriofaagid^a

Nimi	Perekond	Liik	Faagide eraldaja
Luutsna 3	G5	5B	Roger Rikberg
Kompost 1	G5	5B	Hedvig Tamman
VoKo	G5 (PCR)		Hedvig Tamman
Mõra 3	G5	5B	Anita Lipu
PuKo 3	G6	6A	Rita Hõrak Hedvig Tamman
PuKo 4	G6	6A	Rita Hõrak Hedvig Tamman
Luke 3	G6	6A	Rita Hõrak Sirli Rosendahl
IPA 2	G6	6A	Rita Hõrak
Eiki 2	G6	6A	Juhan Mattias Laipaik

^a Faagi perekonnaspetsiifiliste praimeritega teostatud PCR-i või sekveneerimise tulemuste põhjal jaotati faagid samasse perekonda, kui genoomide identsus oli vähemalt 70% ja samasse liiki kui genoomide identsus oli vähemalt 95%. Seda teostasid Rita Hõrak, Hedvig Tamman, Age Brauer ja Juhan Mattias Laipaik.

2.2.2. Bakterite elektroporeerimine

P. putida DNA-kompetentsete rakkude saamiseks kasvatati rakke üleöö LB vedelsöötmes temperatuuril 30 °C. Üleöö kultuure tsentrifuugiti lauatsentrifuugiga (1 minut, 13400 x g). Seejärel pesti baktereid kolm korda 1 ml 300 mM sahharoosiga ning suspendeeriti umbes 100 µl 300 mM sahharoosis.

Bakteritele lisati ~1 µg vees lahustatud plasmiidset DNA-d (Tabel 1). Elektroporatsioon viidi läbi BioRad-i elektroporaatoriga pingel 2500 V. Rakkudele lisati 1 ml LB vedelsöödet ning kasvatati 1-3,5 tundi temperatuuril 30 °C. Rakud tsentrifuugiti (1 minut, 13400 x g) söötimest välja ning seejärel plaaditi selektiivsöötmele.

2.2.3. Polümeraasi ahelreaktsioon

Polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) mahuks oli 20 µl. Matriitsina kasutati bakterirakke. Reaktsioonisegu sisaldas matriitsi, 1 x *DreamTaq GreenBuffer* puhvrit, 0,2 mM dNTP segu, 0,75 U/µl *DreamTaq* DNA polümeraasi ja 10 pmol mõlemat praimerit. Kasutatud praimerid on toodud Tabelis 3. PCR-i reaktsioon koosnes 25 tsüklist, mis sisaldas järgnevaid etappe:

- 1) 96 °C, 30 sekundit;
- 2) 55 °C, 30 sekundit;
- 3) 72 °C, sünteesiaeg sõltus amplifitseeritava ala pikkusest arvestusega, et Taq DNA polümeraas sünteesib 1000 nukleotiidi minutis.

Tsüklitele eelnes 3-minutiline kuumutamine temperatuuril 96 °C. Peale 25 tsükli järgnes 2-minutiline lisasüntees temperatuuril 72 °C.

Tabel 3. Töös kasutatud praimerid.

Praimerid	Nukleotiidne järjestus	Selgitus
P2_del_leftBam	AAGGATCCTTTGCTGTCCATAGCTTG	P2ΔL4 deletsiooni kontrollimiseks
P2_del_L4Bam	AAGGATCCCCTGGCTAGCAGA	P2ΔL4 deletsiooni kontrollimiseks
P2_del_L5Eco	TTGAATTCTGGGTGCCGAGACTGCT	P2ΔL5 deletsiooni kontrollimiseks
P2_delL2Eco_uus	AAGAATTCTAATCTCCTGGGTTCAAG	P2ΔL5 deletsiooni kontrollimiseks

2.2.4. Geelelektroforees

PCR produktide visualiseerimiseks kasutati 1 x TAE puhvriga (50 mM Tris-atsetaat; 1 mM EDTA pH 8,2) valmistatud 1%-list agarosgeeli, mis sisaldas etiidiumbromiidi (0,33 µl/ml). Geeli voolutati 1 x TAE puhvris pingel 130 V. DNA fragmendi pikkuse kindlaks tegemiseks kasutati DNA suurusmarkerit *ZipRuler Express DNA Ladder* firmalt *Thermo Scientific*.

2.2.5. P2_ΔL4 ja P2_ΔL5 deletsioonmutantide konstrueerimine

Deletsioonmutantide konstrueerimisel kasutati väikeste erinevustega Victor de Lorenzo laboris välja töötatud meetodikat (Martínez-García ja de Lorenzo, 2011). Deletsiooni konstrueerimiseks viidi *P. putida* PaW85 tüve rakkudesse elektroporatsiooni abil deletsioonfragmendiga suitsiidplasmiid (Tabel 1). Tänu deletsioonfragmendi ja kromosoomi vahelisele homoloogilisele rekombinatsioonile siseneb plasmiid bakteri kromosoomi, mille tulemusena moodustuvad kanamütsiini suhtes resistentsed kointegraadid, mis sisaldavad nii metsiktüüpi kui ka deletsiooniga lookust. Peale seda viidi elektroporatsiooniga kointegraatidesse plasmiid pSW(I-SceI), mis kodeerib nukleaasi I-SceI. Nukleaas lõikab kromosoomi integreerunud plasmidi kahelt poolt deletsioonifragmenti I-SceI saitidest. I-SceI indutseerimiseks kasvatati rakke 3 mM meta-toluaati sisaldavas LB vedelsöötmes üleöö, plaaditi LB agarsöötmele ja selekteeriti Km-i suhtes tundlikke kolooniaid. Deletsiooni olemasolu kontrolliti PCR-iga. pSW(I-SceI) plasmidi eemaldamiseks kasvatati deletsioontüvesid paar päeva mitteselektiivsetes tingimustes ja selekteeriti välja bensüülpenitsilliini (1500 µg/ml) suhtes tundlikud kolooniad. Seejärel kontrolliti uuesti deletsiooni olemasolu PCR-iga.

2.2.6. Faagitolerantsuse testimine agarsöötmel

Faagitolerantsuse testimiseks agarsöötmel kasutasin Tabelis 1 toodud bakteritüvesid. Baktereid kasvasin LB vedelsöötmes üleöö 20 °C juures. Eksponentsiaalse kasvufaasi rakkude saamiseks tegin üleöö kasvanud bakterikultuuridest 12,5-kordse lahjenduse värskesse LB vedelsöötmesse ja kasvasin baktereid umbes 4 tundi temperatuuril 20 °C kuni rakkude OD₅₈₀ ~ 1.

Tsiprofloksatsiini (0,03 µg/ml) sisaldavale LB tardsöötme tassile valasin bakterimuru, mis koosnes 200 µl eksponentsiaalses kasvufaasis bakterirakkudest ja umbes 5 ml 0,3% LB pehmeagarist (42 °C), millele lisasin ka CaCl₂ (10 mM).

Uuritavatest faagifiltraatidest (Tabel 2) tegin 10^{-1} – 10^{-6} lahjendusread SM puhvriss (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 8 mM MgSO₄; 0,01% želatiini) ning pipeteerisin igat lahjendust 1,5 µl bakterimurule. Tasse inkubeerisin üleöö temperatuuril 20 °C.

2.2.7. Faagitolerantsuse testimine vedelsöötmes mikrotiiterplaadil

Faagitolerantsuse testimiseks vedelsöötmes kasutasin mõnda Tabelis 1 välja toodud *P. putida* PaW85 tüve. Baktereid kasvasin LB vedelsöötmes üleöö 20 °C juures. Eksponentsiaalse kasvufaasi rakkude saamiseks tegin üleöö kasvanud bakterikultuuridest 16,6-kordse lahjenduse värskesse LB vedelsöötmesse ja kasvasin umbes neli tundi temperatuuril 20 °C, kuni rakkude OD₅₈₀ ~ 1.

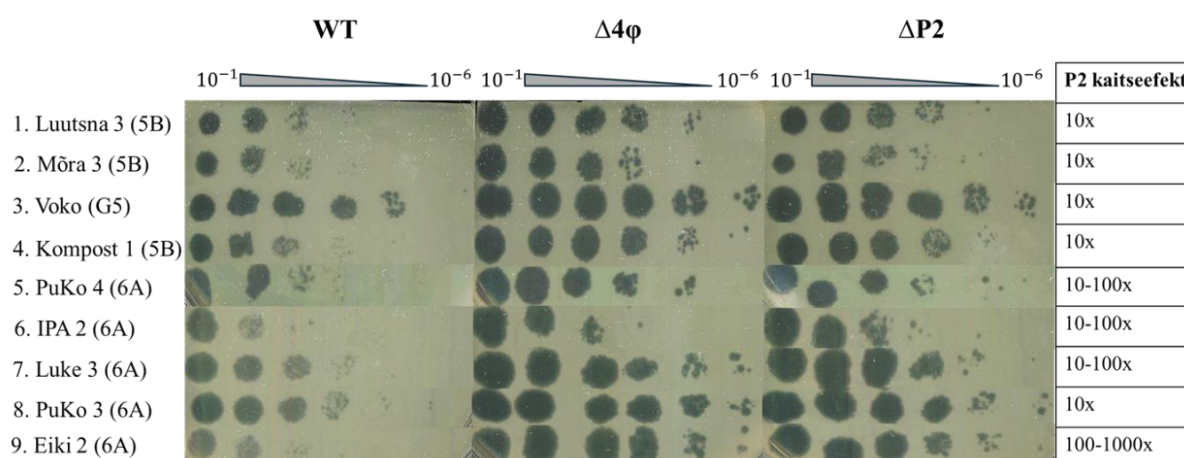
Katse läbiviimiseks kasutasin mikrotiiterplaati, mille igasse kannu lisasin 80 µl LB vedelsöödet, mis sisaldas tsiprofloksatsiini (0,03 µg/ml). Mõnes katses lisasin ka CaCl₂ (10 mM). Seejärel lisasin mikrotiiterplaadi kannudesse ka 10 µl eksponentsiaalse kasvufaasi rakke ja 10 µl faagilahjendust arvestusega, et nakatamiskordaja (MOI) oleks 10^{-2} . Mikrotiiterplaadile tegin kontrollrea, kuhu lisasin faagide asemel 10 µl SM puhvrit. Seejärel inkubeerisin mikrotiiterplaati üleöö temperatuuril 20 °C Tecan Infinite m200 Pro või BioTek Synergy H1 masinas. Mikrotiiterplaadi lugeja mõõtis kannus oleva proovi optilist tihedust (OD₅₈₀) iga 10 minuti järel.

2.3. Tulemused

2.3.1. Profaag P2 kaitseb *P. putida*'t viienda ja kuuenda perekonna faagide eest

Pseudomonas putida PaW85 (isogeenne tüvega KT2440) genoomis on neli profaagi (Martínez-García jt., 2015) ja meie labori uuringud näitasid, et kõigi nelja profaagi puudumine (tüvi $\Delta 4\phi$) vähendab bakteri faagitolerantsust mitmete meie laboris isoleeritud CEPEST kollektsooni faagide suhtes (Brauer jt., 2024; Kärgerberg, 2021; Lipu, 2023; Piirmets, 2022). Profaagide üksikdeletantide esmane analüüs näitas, et profaag P2 kaitseb *P. putida* PaW85 tüve G5 ja G6 perekonna faagide eest (Sirli Rosendahl ja Rita Hõrak, avaldamata andmed). Minu ülesanne oli selgitada kui suure kaitseefekti profaag P2 annab bakterile faagide eest. Esmalt võrdlesin *P. putida* PaW85 metsiktüve, $\Delta 4\phi$ ja $\Delta P2$ tüvede lüüsumist faaginakkuse korral agarsöötme tassidel (Joonis 5).

Joonisel 5 on näha, et uuritud faagid nakatavad metsiktüve (WT) halvemini kui $\Delta 4\phi$ ja $\Delta P2$ tüvesid. Faagide Luutsna 3 (5B), Mõra 3 (5B), VoKo (G5), Kompost 1 (5B) ja PuKo 3 (6A) nakatasid $\Delta P2$ ja kontrollina kasutatud $\Delta 4\phi$ tüve kümme korda paremini kui algset tüve (Joonis 5). 6A liigi faagid PuKo 4, Luke 3 ja IPA 2 nakatasid nii $\Delta P2$ kui ka $\Delta 4\phi$ tüve 10-100 korda efektiivsemalt kui metsiktüve. Üks 6A liigi faag, Eiki 2, eristus aga oluliselt teistest sama liigi faagidest, kuna nakatas $\Delta 4\phi$ ja $\Delta P2$ tüve 100-1000 korda paremini kui algset tüve. Katsetest järeldasin, et profaag P2 annab *P. putida*'le G5 perekonna faagide eest agarsöötmele 10-kordse ja G6 perekonna faagide eest 10- kuni 1000-kordse kaitse.

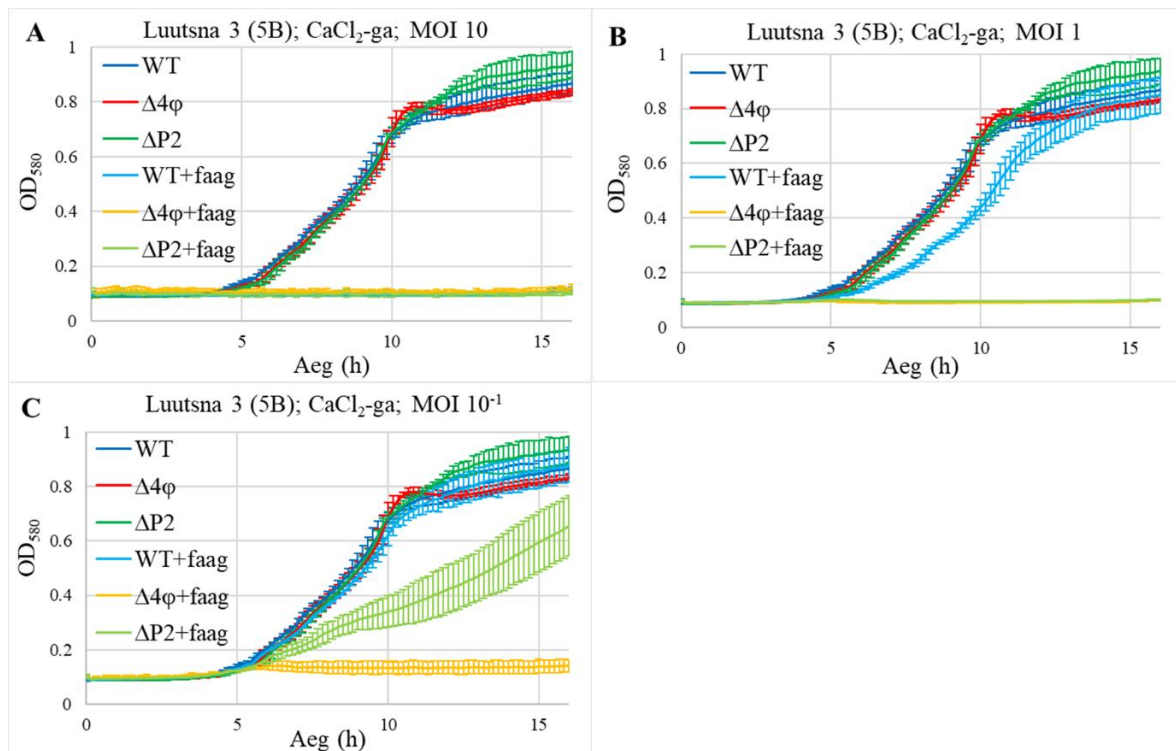


Joonis 5. Profaag P2 kaitseb *P. putida*'t G5 ja G6 grupi faagide eest. Joonisel on faagilaigud *P. putida* metsiktüüpi (WT), $\Delta 4\phi$ ja $\Delta P2$ tüvede bakterimurudel. Faagide liik või perekond on toodud sulgudes. LB agarsööde sisaldas tsiprofloksatsiini (0,03 $\mu\text{g/ml}$). 0,3% pehmeagarile lisati CaCl_2 -i (10 mM). Pilt tehti peale tasside inkubeerimist (~24 h) temperatuuril 20 °C. Kõikide faagidega olen teinud katset vähemalt viis korda, välja arvatud faagiga Kompost 1 (5B), mida kasutasin üks kord.

2.3.2. CaCl₂ soodustab G5 ja vähendab G6 faagide nakatamisvõimet

Eelnevad katsed näitasid, et faagid on võimelised bakterit nakatama agarsöötmel. Järgmisena tahtsin välja selgitada kaitseefekti suurust vedelsöötmes. Selleks võrdlesin erinevate bakteritüvede kasvudünaamikat faaginakkuse korral vedelsöötmes. Faagideks valisin viienda perekonna esindaja Luutsna 3 ja kuuenda perekonna esindajad Luke 3 ja PuKo 3. Bakteritüvedele lisasin faage erinevas koguses nii, et nakatumiskordaja MOI väärtuseks oleks $10 - 10^{-2}$. LB vedelsöötmele lisasin tsiprofloksatsiini (0,03 µg/ml) ja CaCl₂-i (10 mM).

P. putida algse tüve, ΔP2 ja Δ4φ tüvede nakatamine Luutsna 3 (5B) faagiga näitas, et kui faagi on kümme korda rohkem kui baktereid (MOI 10), siis on kõikide tüvede kasv inhibeeritud (Joonis 6A). Kui faagi kogust vähendada kümme korda (MOI 1), siis on algse tüve kasv faaginakkusest veidi häiritud, kuid Δ4φ ja ΔP2 tüved ei suuda endiselt üldse kasvada (Joonis 6B). Seega on näha siin profaag P2 kaitseefekti. Veel madalama MOI juures (MOI 10^{-1}) käituvad kõik tüved erinevalt. MOI 10^{-1} korral ei mõjuta Luutsna 3 algse tüve kasvu, samas kui ΔP2 tüve kasv on märgatavalt häiritud ning Δ4φ tüvi ei suuda üldse kasvada. Katsest järeldasin, et profaag P2 kaitseb *P. putida*'t Luutsna 3 (5B) faaginakkuse eest vedelsöötmes ning kaitseefekt on 10- kuni 100-kordne.

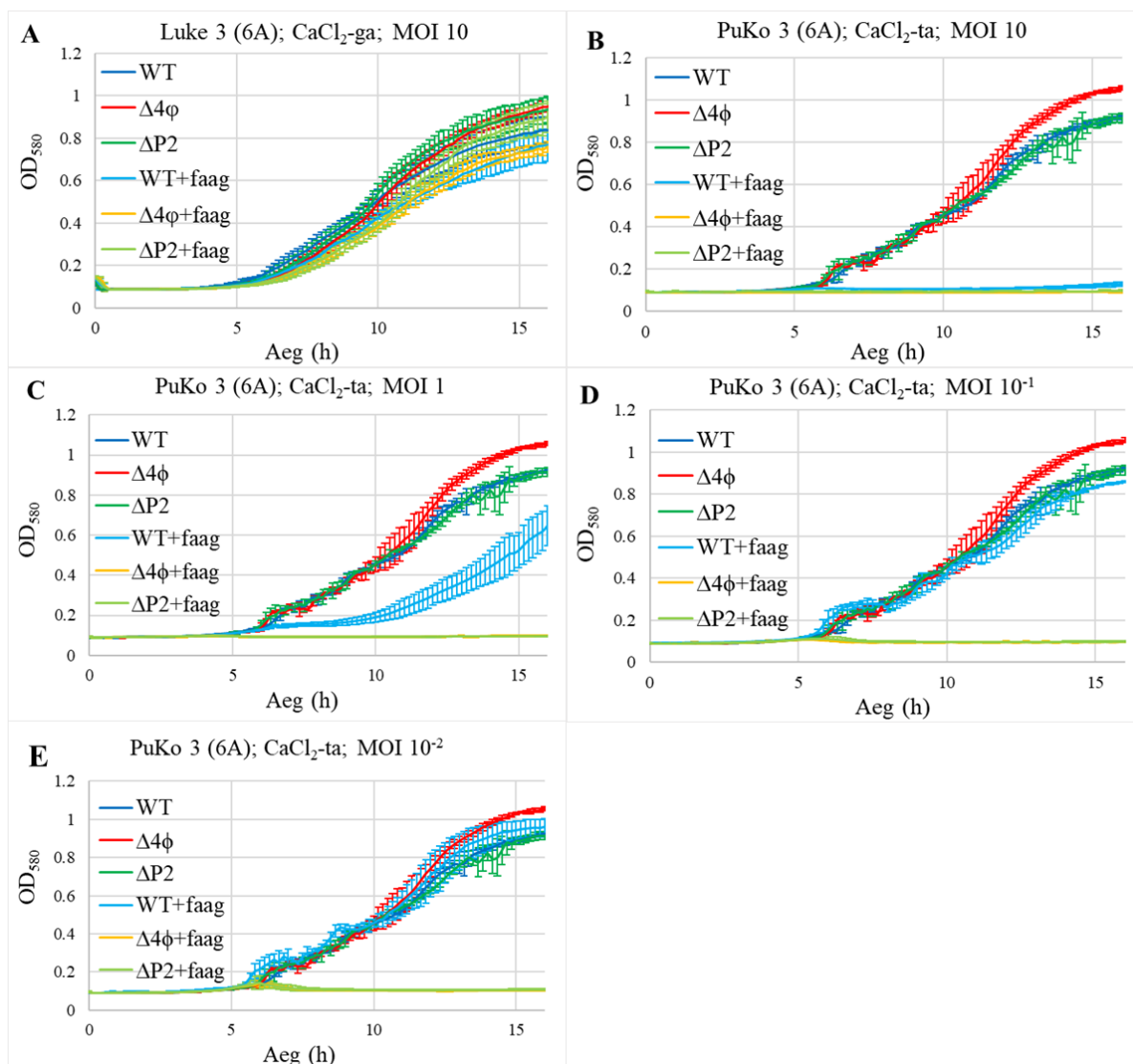


Joonis 6. Profaag P2 suurendab *P. putida* resistentsust Luutsna 3 faagi vastu ka vedelsöötmes. *P. putida* algse tüve PaW85 (WT), $\Delta 4\phi$ ja $\Delta P2$ tüvede kasvukõverad vedelsöötmes faagiga Luutsna 3 (5B) ja ilma faagita. Paneelidel A-C on esitatud erinevate nakatumiskordajate (MOI 10 – 10^{-1}) korral saadud kasvukõverad. LB vedelsööde sisaldas tsiprofloksatsiini (0,03 $\mu\text{g/ml}$) ja CaCl_2 -i (10 mM). Katset tehti neli korda ja esitatud on ühe katse nelja tehnilise korduse keskmised tulemused ja standardhälbed.

Järgnevalt tahtsin võrrelda algse tüve, $\Delta P2$ ja $\Delta 4\phi$ tüvede kasvudünaamikat Luke 3 (6A) faagi nakkuse korral. Jooniselt 7A on näha, et faagi juuresolekul kasvavad kõik tüved sarnaselt kontrollkultuuridega, kuhu ei ole faagi lisatud ja seda olukorras, kus faag on kümnekordses ülehulgas (MOI 10). Seega järeldasin, et kasutatud kasvutingimustes on Luke 3 faagi nakatamisvõime häiritud.

Kuigi enamasti CaCl_2 lisamine söötmesse soosib faaginakkust (Bonhivers ja Letellier, 1995; Delbrück, 1948), siis juhendaja soovitusel proovisin teha sama katset ilma CaCl_2 -ta. Joonisel 7B-E on näha, kuidas CaCl_2 puudumisel suudab faag PuKo 3, mis kuulub samuti 6A liiki nagu Luke 3, edukalt baktereid nakatada, millest järeldasin, et kuuenda perekonna faagidele ei tohi CaCl_2 -i vedelsöötmesse lisada. MOI 10 korral on kõikide bakteritüvede kasv faagi poolt inhibeeritud (Joonis 7B). MOI 1 korral on algse tüve kasv faaginakkusest häiritud, kuid samal ajal ei suuda $\Delta 4\phi$ ja $\Delta P2$ tüved üldse kasvada (Joonis 7C). MOI 10^{-1} ja 10^{-2} korral kasvab algne tüvi sarnaselt ilma faagita kontrollkultuuriga, samas kui $\Delta 4\phi$ ja $\Delta P2$ tüved ei ole endiselt võimelised faagi juuresolekul üldse kasvama (Joonis 7D-E). Katsest järeldasin, et CaCl_2 -i lisamine LB vedelsöötmesse takistab 6A liigi faagide võimekust *P. putida*-t nakatada.

Samuti näitasid katsed, et profaag P2 kaitseefekt *P. putida*'le PuKo (6A) faagi vastu on rohkem kui 100 korda.



Joonis 7. CaCl₂ takistab kuuenda perekonna faagide nakatamist vedelsöötmes. *P. putida* algse tüve (WT), $\Delta 4\phi$ ja $\Delta P2$ tüvede kasvukõverad vedelsöötmes faagiga Luke 3 (6A) või PuKo 3 (6A) ja ilma faagita. Paneelidel A-E on esitatud erinevate nakatumiskordajate (MOI 10 – 10⁻²) korral saadud kasvukõverad. A. LB vedelsööde sisaldas tsiprofloksatsiini (0,03 $\mu\text{g/ml}$) ja CaCl₂-i (10 mM). Katset tehti kaks korda ja esitatud on ühe katse nelja tehnilise korduse keskmised tulemused ja standardhälbed. B-E. LB vedelsööde sisaldas tsiprofloksatsiini (0,03 $\mu\text{g/ml}$). Katset tehti üks korda ja esitatud on kolme tehnilise korduse keskmised tulemused ja standardhälbed.

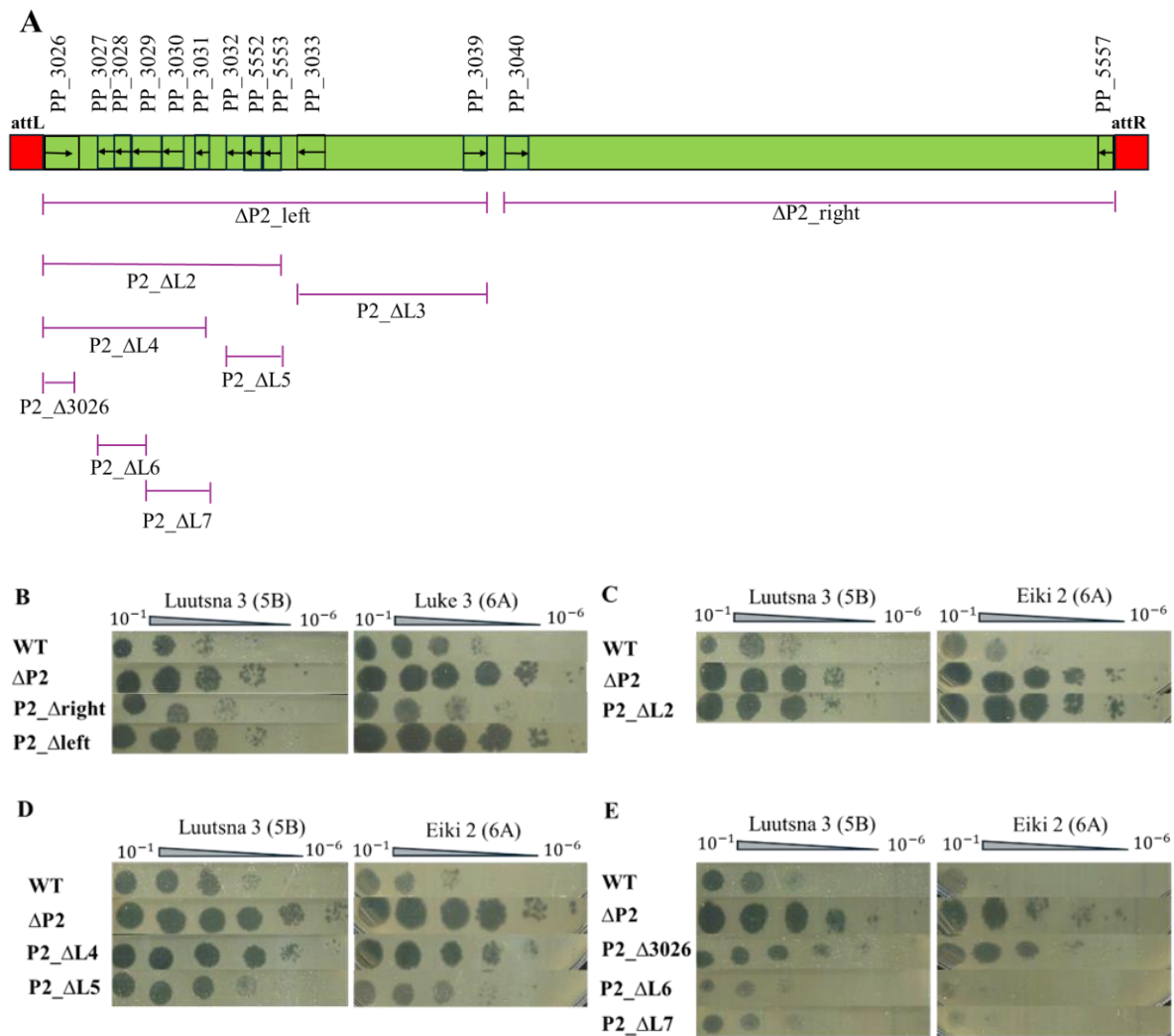
Kuna CaCl₂ lisamine vedelsöötmesse takistas G6 perekonna faagide nakatamist, otsustasin testida CaCl₂ mõju G5 ja G6 perekonna faagide nakatamisvõimele ka agarsöötmetel. Selleks võrdlesin *P. putida* $\Delta P2$ tüve nakatumist G5 ja G6 perekonna faagidega agarsöötmetassidel, mis kas sisaldasid või ei sisaldanud CaCl₂-i (Joonis 8). Selgus, et viienda perekonna faagid nakatavad $\Delta P2$ tüve CaCl₂ juuresolekul 1000 kuni 10 000 korda paremini kui ilma CaCl₂-ta.

2 3 3 Profsaag P2 teen PD 3026 kaitseb *P. nutida*'t G5 ia G6 perekonna faagide vastu

Minu järgmine eesmärk oli välja selgitada, milline P2 lookus vastutab kaitseefekti eest. Selle

Kuna kaitse eest vastutav lookus asus PP_3026 – PP_5553 alas, siis vastavalt sellele konstrueerisin kaks uut tüve: P2_ΔL4 ja P2_ΔL5 (Joonis 10A). Seejärel võrdlesin uute tüvede nakatumist algse ja ΔP2 tüvega (Joonis 10D). Faagid lüüsisid P2_ΔL5 ja algset tüve sarnaselt ehk P2_ΔL5 tüvest deleteeritud geenid ei osale faagivastases kaitstes. Samas nakatub P2_ΔL4 tüvi faagidega sama efektiivselt kui ΔP2 tüvi. Sellest tulenevalt järeldasin, et kaitsegeen(id) paikneb(vad) profaagi P2 PP_3026 - PP_3031 alas.

Järgnevalt konstrueeriti kolm uut tüve: P2_Δ3026, P2_ΔL6 ja P2_ΔL7 (Joonis 10A). Võrdlesin uute tüvede nakatumisefektiivsust algse tüve ja ΔP2 tüvega (Joonis 10E). Jooniselt 10E on näha, et faagid nakatavad P2_ΔL6 ja P2_ΔL7 tüvesid algse tüvega sarnaselt, seega välistasin nendes deleteeritud geenid potentsiaalse kaitseefekti andjana. Samas oli P2_Δ3026 tüvi faaginakkusele sama tundlik kui ΔP2 tüvi (Joonis 10E), millest järeldasin, et *P. putida* PaW85 profaag P2 geen PP_3026 on see, mis vastutab faagitolerantsuse eest G5 ja G6 perekonna faagide vastu.



Joonis 10. Profaag P2 geen PP_3026 kaitseb *P. putida*'t viienda ja kuuenda perekonna faagide eest. A. Profaag P2 ja tema deletsioonmutantide $\Delta P2_left$, $\Delta P2_right$, $P2_L2$, $P2_L4$ ja $P2_L5$, $P2_L3026$, $P2_L6$ ja $P2_L7$ skemaatiline kirjeldus. Punased alad on profaagi vasak- ja parempoolsed insertioonisaaidid attL ja attR. Roheline on profaag P2 genoom. Lillad jooned näitavad deletsioonmutantidest puuduvaid profaagi geene. Musta värvi ruudud tähistavad osasid profaag P2 geene ning nooled nende suunda. B-E. Faagide lüüsilaiugud erinevate bakteritüvede tassidel. Faagide perekond ja liik on välja toodud sulgudes. LB agarsööde sisaldas tsiprofloksatsiini (0,03 $\mu\text{g/ml}$) ja 0,3% pehmeagar CaCl_2 (10 mM). Pilt tehti peale tasside inkubeerimist ~24 h temperatuuril 20 °C. B ja D katset korrati üks kord ning C ja E katset kaks korda.

2.4. Arutelu

P. putida faagitolerantsust on uuritud meie laboris mitme bakalaureusetöö raames ja ilmunud on ka esimene selleteemaline artikkel (Brauer jt., 2024). Nendes töödes uuriti faagitolerantsust $\Delta 4\phi$ mitmikdeletsioonmutandiga, millest on kõik neli kromosomaalset profaagi deleteeritud. Liis Kärgerbergi (2021) lõputöös selgus, et *P. putida* PaW85 profaagid kaitsevad bakterit faagide Pp_F1 (ümber nimetatud AnF1) ja Pp_F2 eest. Ta leidis, et kaitseefekt avaldub agar- ja vedelsöötmes. Kendra Piirmetsa (2022) tulemused kuue faagiga näitasid, et profaagid võivad faagitolerantsust suurenda, kuid kaitse ei pruugi olla iga faagi vastu. Nüüdseks on meie labori faagiraamatukogu oluliselt täienenud ja 67 CEPEST kollektiooni faagi testimine $\Delta 4\phi$ tüvega näitas, et rohkem kui poolte faagide suhtes andsid profaagid mingil määral kaitse (Brauer jt., 2024). Profaagi P1 ja P3 mõju faagitolerantsusele uuris Anita Lipu (2023). Tema tulemustest selgus, et profaag P1 kaitseb *P. putida*'t faagide Kompost 2 (7B) ja Konnatiik (5B) eest ning profaag P3 kolmanda perekonna faagide eest.

2.4.1. *P. putida* profaag P2 kaitseb G5 ja G6 perekonna faagide eest

Kuna Rita Hõraku ja Sirli Rosendahli avaldamata andmed näitasid, et profaag P2 kaitseb G5 ja G6 perekonna faagide eest, siis hindasin oma töös kui suure kaitseefekti P2 nende faagide vastu annab.

Agarsöötmele oli profaag P2 kaitseefekt viienda perekonna faagide vastu umbes 10-kordne (Joonis 5). Vedelkultuuri katsetes oli P2 efekt G5 perekonna faagide vastu 10- kuni 100-kordne ehk umbes kümme korda suurem kui agarsöötmele (Joonis 6). Huvitava asjaoluna selgus, et $\Delta 4\phi$ tüvi on Luutsna 3 faaginakkusele tundlikum kui $\Delta P2$ tüvi (Joonis 6C). See viitab, et mingi teine *P. putida* profaag kaitseb bakterit Luutsna 3 nakkuse eest. Kuna Anita Lipu (2023) näitas oma lõputöös, et profaag P1 kaitses vähesel määral ka viienda perekonna faagi Konnatiik (5B) vastu, siis ma oletan, et Luutsna 3 (5B) eest võib kaitsta mitte ainult profaag P2, vaid ka P1. Et teha kindlaks kahe profaagi koostööd peaks konstrueerima tüve, kus mõlema profaagi ala on deleteeritud ja võrdlema saadud tüve nakatumisefektiivsust algse tüvega ja P1 ning P2 üksikdeletsioontüvedega.

G6 perekonna faagide vastu oli P2 kaitseefekt agarsöötmele 10- kuni 1000-kordne ja vedelsöötmes vähemalt 100-kordne. Siin oleks hea teha katseid veel väiksema MOI juures, et teha kindlaks P2 pakutava kaitse maksimaalne suurus algsele tüvele. Praegu aga võin järeldada, et P2 kaitseb *P. putida*'t vedelsöötmes rohkem kui kümme korda paremini kui agarsöötmele.

2.4.2. CaCl₂ pärsib 6A liigi faagide nakatamisvõimet vedelsöötmes

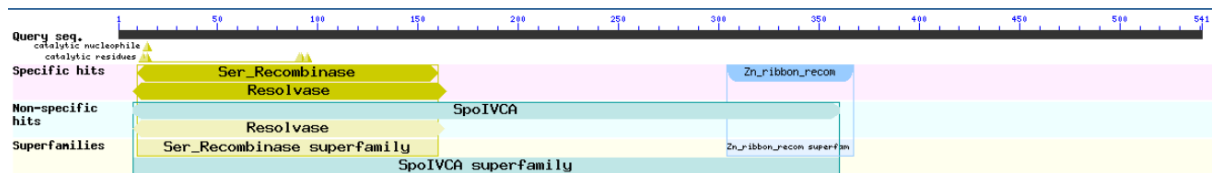
Tavaliselt nakatavad faagid bakterit paremini siis, kui sööde sisaldab piisavalt CaCl₂-i, mistõttu ka meie laboris lisatakse seda faagikatsetes LB agar- ja vedelsöötmele. Minu katsetest aga selgus, et G6 perekonna faagid ei nakata CaCl₂ juuresolekul *P. putida* tüvesid vedelsöötmes üldse, kuigi agarsöötmes CaCl₂-il olulist mõju nakkusele polnud (Joonis 7A ja 8). Sellist inhibeerivat mõju faagidele vedelsöötmes pole varem meie laboris täheldatud. CaCl₂ võib muuta bakterimembraani läbilaskvust mõjutades faagide adsorptsiooni (Delbrück, 1948) või DNA sisestamist (Cvirkaitė-Krupovič jt., 2010). Kuna see on seotud bakteri membraani olekuga, siis oletan, et *P. putida* membraan on tard- ja vedelsöötmes erinev. See seletaks, miks nägin CaCl₂-st tingitud erinevusi 6A faagide korral.

2.4.3. G5 ja G6 perekonna faagide vastane kaitsegeen PP_3026 on rekombinaas

Profaagid kaitsevad bakterit sageli superinfektsiooni eest, takistades nakatumist homoloogsete faagidega. *P. putida* profaagide puhul ilmselt sellise kaitsemehhanismiga tegu ei ole, sest Brauer jt. (2024) analüüs näitas, et ükski CEPEST kollektsiooni faag ei ole homoloogne ühegi nelja *P. putida* genoomis leiduva profaagiga.

P. putida profaag P2 piirkonna deletsioonanalüüs tuvastas, et faagivastase kaitseefekti eest vastutab profaagi geen PP_3026. Selle geeni kodeeritud valgu järjestuse analüüs BLAST programmiga (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) näitas, et tegu on rekombinaasiga. PP_3026 N-terminaalne ots sisaldab seriini rekombinaasi domääni, kuid samas C-terminaalsele otsale mingit vastet ei leitud (Joonis 11).

Tulemus on üllatav, sest rekombinaasid osalevad mitmesuguste sait-spetsiifiliste genoomsete ümberkorralduste (deletsioonid, inversioonid, transpositsioonid) tegemises. Praeguse seisuga pole kirjeldatud, kuidas profaagi rekombinaas võib osaleda faagivastases kaitses. Üheks faagikaitse mehhanismiks on retseptorite faasivariatsioon, milles võiks hüpoteetiliselt P2 rekombinaas osaleda. Faasivariatsioon on juhuslik ja pöörduv protsess (van der Woude ja Bäuml, 2004). Lülitades geeniekspressiooni „sisse“ või „välja“ suudavad bakterid adapteruda kiiresti muutuva keskkonnaga (Phillips jt., 2019). Rekombinaasid võivad faasivariatsioonis läbi viia genoomseid ümberkorraldusi, näiteks DNA rekombinatsiooni kaudu pöörates ümber promootori, mille tõttu lülitatakse välja geeni ekspressioon (Gor jt., 2021). Kui PP_3026 suudaks rekombinatsiooniliselt faagi retseptori ekspressiooni osades rakkudes välja lülitada, siis see võiks suurendada faagiresistentsust küll. Meie uurimisgrupi edasine plaan on välja selgitada P2 rekombinaasi kaitsemehhanism faaginakkuses.



Joonis 11. PP_3026 valk sisaldab seriini rekombinaasi domääni. PP_3026 valgu järjestust analüüsiti programmiga BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

KOKKUVÕTE

Pseudomonas putida on keskkonnabakter ning tema faagiresistentsust on veel üsna vähe uuritud. *P. putida* PaW85 genoomis on 4 profaagi (Martínez-García jt., 2015) ning on teada, et profaagid võivad oma genoomis kanda erinevaid kaitsemehhanisme, mis kaitsevad bakterit teiste faagide rünnakute eest (Patel ja Maxwell, 2023).

Varasemad uuringud meie laboris näitasid, et profaag P2 suurendab *P. putida* faagitolerantsust G5 ja G6 perekonna faagide suhtes. Seetõttu oli käesoleva uurimistöö eesmärk määrata kui suure kaitseefektiga tegemist on ning leida geen(id), mis tolerantsuse eest vastutab(vad). Katsete tulemustest selgus:

- 1) Profaag P2 kaitseefekt *P. putida*'le G5 perekonna faagide vastu agarsöötmes on 10-kordne ja vedelsöötmes 10- kuni 100-kordne;
- 2) Luutsna 3 (5B) faagi eest kaitseb lisaks profaagile P2 ka mõni teine profaag, tõenäoliselt profaag P1;
- 3) Profaag P2 kaitseefekt *P. putida*'le G6 perekonna faagide vastu agarsöötmes on 10-kuni 1000-kordne ja vedelsöötmes vähemalt 100-kordne;
- 4) CaCl_2 suurendab G5 faagide nakatamisefektiivsust agarsöötmel. CaCl_2 pärsib 6A faagide nakatamisvõimet vedelsöötmes, kuid ei mõjuta oluliselt 6A faagide nakatamisvõimet agarsöötmel;
- 5) Profaag P2 geen PP_3026, mis kodeerib seriini rekombinaasi, tõstab *P. putida* faagitolerantsust.

Hetkel ei ole näidatud, et profaagi seriini rekombinaas võiks osaleda faagivastases kaitstes. Võimalik, et kaitse faagide vastu toimib faasivariatsiooni kaudu. Sel juhul peaks PP_3026 kodeeritav rekombinaas osalema kas faagi retseptori või mingi muu faagivastase kaitsesüsteemi rekombinatsioonilises sisse-välja lülitamises. Meie uurimisgrupi edasine eesmärk on kirjeldada mehhanismi, kuidas profaag P2 seriini rekombinaas suurendab *P. putida* faagiresistentsust.

***Pseudomonas putida* prophage P2 in anti-phage defence**

Gülgöz Gasymova

SUMMARY

Bacteriophages are natural enemies of phages. It is no surprise that bacteria have evolved to carry mechanisms to protect themselves from phages. The most known anti-phage mechanisms are restriction-modification, CRISPR-Cas and Abi systems (Dy jt., 2014). At the same time, phages have developed various strategies to evade anti-phage systems in bacteria (Bondy-Denomy jt., 2013; Iida jt., 1987; Meyer jt., 2012). Temperate phages that have integrated into the host chromosome are called prophages. Prophages are known to carry mechanisms that may help the host bacterium to survive attacks by other phages (Patel ja Maxwell, 2023).

Pseudomonas putida is an environmental bacterium and little is known about its phage tolerance. There are four prophages in the genome of *P. putida* (Martínez-García jt., 2015). The results of previous bachelor's theses in our laboratory (Kärgerberg, 2021; Lipu, 2023; Piirmets, 2022) have shown that prophages can increase *P. putida* phage tolerance.

It was also seen in our laboratory that prophage P2 protects *P. putida* from genus G5 and G6 phages. The aim of this study was to determine the protective effect of prophage P2 and to identify which gene(s) was(were) responsible for this using deletion analysis. The results of my experiments are:

- 1) Prophage P2 increases *P. putida* phage resistance to genus G5 phages 10-fold on solid medium and 10- to 100-fold in liquid medium;
- 2) In addition to prophage P2, another prophage, most likely prophage P1, can provide protection against phage Luutsna 3 (5B);
- 3) Prophage P2 increases *P. putida* phage resistance to genus G6 phages 10- to 1000-fold on solid medium and at least 100-fold in liquid medium;
- 4) CaCl₂ promotes the infection efficiency of G5 phages on agar plates. CaCl₂ inhibits the infection efficiency of 6A phages in liquid medium, but has no significant effect on the 6A phages on agar plates;
- 5) Prophage P2 gene PP_3026 that encodes serine recombinase increases *P. putida* phage tolerance.

As of now, serine recombinases of prophages have not been described to be involved in anti-phage defence. One may hypothesize that the protection against phages works through PP_3026-mediated phase variation, for instance, by on-off switching the phage receptor or some unknown antiphage system. Our research group's future goal is to characterize the mechanism of how prophage P2 encoded serine recombinase increases the phage resistance of *P. putida*.

TÄNUSÕNAD

Sooviksin tänada oma juhendajat Sirlit tema suurepärase juhendamise, kannatlikkuse ja abivalmiduse eest. Tänu tema käe all juhendamisele sain lõputöö kirjutatud.

Samuti suured tänud Ritale, kes aitas kui Sirlit polnud laboris ning andis nõuandeid lõputöö kirjutamiseks.

Minu aeg laboris oli äärmiselt huvitav ja kasulik ning kõik, mida seal õppisin võtan endaga kaasa. Hedvig, Andres, Anita, Anu, Johanna, Heili ja Lea – tänan teid abi eest kui laboris tekkisid küsimused.

Tänamata ei jää ka mu pere, kes toetasid ja motiveerisid mind kolm aastat. Ei olnud kerge, kuid teie olite üks põhjus, miks ma ei andnud alla.

KIRJANDUSE LOETELU

- Ackermann, H.-W. (1998). Tailed Bacteriophages: The Order *Caudovirales*. *Advances in Virus Research*. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60785-X](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60785-X)
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., & Horvath, P. (2007). CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*, 315(5819), 1709–1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- Bayley, S. A., Duggleby, C. J., Worsey, M. J., Williams, P. A., Hardy, K. G., & Broda, P. (1977). Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2. *Molecular & General Genetics: MGG*, 154(2), 203–204. <https://doi.org/10.1007/BF00330838>
- Berkane, E., Orlik, F., Stegmeier, J. F., Charbit, A., Winterhalter, M., & Benz, R. (2006). Interaction of Bacteriophage Lambda with Its Cell Surface Receptor: An in Vitro Study of Binding of the Viral Tail Protein gpJ to LamB (Maltoporin). *Biochemistry*, 45(8), 2708–2720. <https://doi.org/10.1021/bi051800v>
- Bondy-Denomy, J., Pawluk, A., Maxwell, K. L., & Davidson, A. R. (2013). Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature*, 493(7432), 429–432. <https://doi.org/10.1038/nature11723>
- Bondy-Denomy, J., Qian, J., Westra, E. R., Buckling, A., Guttman, D. S., Davidson, A. R., & Maxwell, K. L. (2016). Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms. *The ISME Journal*, 10(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.79>
- Bonhivers, M., & Letellier, L. (1995). Calcium controls phage T5 infection at the level of the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *FEBS Letters*, 374(2), 169–173. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01101-J](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01101-J)
- Brauer, A., Rosendahl, S., Kängsep, A., Lewańczyk, A. C., Rikberg, R., Hõrak, R., & Tamman, H. (2024). *Isolation and characterization of a phage collection against Pseudomonas putida* (lk 2024.03.26.586772). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2024.03.26.586772>
- Brüssow, H., Canchaya, C., & Hardt, W.-D. (2004). Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: From Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), 560–602. <https://doi.org/10.1128/mmbr.68.3.560-602.2004>
- Brüssow, H., & Hendrix, R. W. (2002). Phage genomics: Small is beautiful. *Cell*, 108(1), 13–16. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00637-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00637-7)

- Cumby, N., Edwards, A. M., Davidson, A. R., & Maxwell, K. L. (2012). The Bacteriophage HK97 gp15 Moron Element Encodes a Novel Superinfection Exclusion Protein. *Journal of Bacteriology*, 194(18), 5012–5019. <https://doi.org/10.1128/jb.00843-12>
- Cvirkaitė-Krupovič, V., Krupovič, M., Daugelavičius, R., & Bamford, D. H. (2010). Calcium ion-dependent entry of the membrane-containing bacteriophage PM2 into its *Pseudoalteromonas* host. *Virology*, 405(1), 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.05.021>
- Delbrück, M. (1948). Biochemical Mutants of Bacterial Viruses 1. *Journal of Bacteriology*, 56(1), 1–16.
- Depardieu, F., Didier, J.-P., Bernheim, A., Sherlock, A., Molina, H., Duclos, B., & Bikard, D. (2016). A Eukaryotic-like Serine/Threonine Kinase Protects Staphylococci against Phages. *Cell Host & Microbe*, 20(4), 471–481. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.08.010>
- Dy, R. L., Richter, C., Salmond, G. P. C., & Fineran, P. C. (2014). Remarkable Mechanisms in Microbes to Resist Phage Infections. *Annual Review of Virology*, 1(1), 307–331. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085500>
- Elbreki, M., Ross, R. P., Hill, C., O'Mahony, J., McAuliffe, O., & Coffey, A. (2014). Bacteriophages and Their Derivatives as Biotherapeutic Agents in Disease Prevention and Treatment. *Journal of Viruses*, 2014, e382539. <https://doi.org/10.1155/2014/382539>
- Feiner, R., Argov, T., Rabinovich, L., Sigal, N., Borovok, I., & Herskovits, A. A. (2015). A new perspective on lysogeny: Prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 13(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3527>
- Fortier, L.-C., & Sekulovic, O. (2013). Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence*, 4(5), 354–365. <https://doi.org/10.4161/viru.24498>
- Gor, V., Ohniwa, R. L., & Morikawa, K. (2021). No Change, No Life? What We Know about Phase Variation in *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms*, 9(2), 244. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020244>
- Harvey, H., Bondy-Denomy, J., Marquis, H., Sztanko, K. M., Davidson, A. R., & Burrows, L. L. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* defends against phages through type IV pilus glycosylation. *Nature Microbiology*, 3(1), 47–52. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0061-y>

- Hassan, A. Y., Lin, J. T., Ricker, N., & Anany, H. (2021). The Age of Phage: Friend or Foe in the New Dawn of Therapeutic and Biocontrol Applications? *Pharmaceuticals*, 14(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/ph14030199>
- Horvath, P., & Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. *Science*, 327(5962), 167–170. <https://doi.org/10.1126/science.1179555>
- Iida, S., Streiff, M. B., Bickle, T. A., & Arber, W. (1987). Two DNA antirestriction systems of bacteriophage P1, darA, and darB: Characterization of darA- phages. *Virology*, 157(1), 156–166. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(87\)90324-2](https://doi.org/10.1016/0042-6822(87)90324-2)
- Juhala, R. J., Ford, M. E., Duda, R. L., Youlton, A., Hatfull, G. F., & Hendrix, R. W. (2000). Genomic sequences of bacteriophages HK97 and HK022: Pervasive genetic mosaicism in the lambdoid bacteriophages1. *Journal of Molecular Biology*, 299(1), 27–51. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3729>
- Kärgerberg, L. (2021). Kromosoomsete profaagide ja toksiini-antitoksiini süsteemide roll *Pseudomonas putida* faagiresistentsuses. *Bakalaureusetöö*.
- Labrie, S. J., Samson, J. E., & Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), 317–327. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2315>
- Lipu, A. (2023). Profaagide mõju *Pseudomonas putida* faagiresistentsusele. *Bakalaureusetöö*.
- Lopatina, A., Tal, N., & Sorek, R. (2020). Abortive Infection: Bacterial Suicide as an Antiviral Immune Strategy. *Annual Review of Virology*, 7(1), 371–384. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-011620-040628>
- Martínez-García, E., & de Lorenzo, V. (2011). Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: Analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, 13(10), 2702–2716. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02538.x>
- Martínez-García, E., Jatsenko, T., Kivisaar, M., & de Lorenzo, V. (2015). Freeing *Pseudomonas putida* KT2440 of its proviral load strengthens endurance to environmental stresses. *Environmental microbiology*, 17(1), 76–90. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12492>
- McGinn, J., & Marraffini, L. A. (2019). Molecular mechanisms of CRISPR–Cas spacer acquisition. *Nature Reviews Microbiology*, 17(1), 7–12. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0071-7>
- Meyer, J. R., Dobias, D. T., Weitz, J. S., Barrick, J. E., Quick, R. T., & Lenski, R. E. (2012). Repeatability and Contingency in the Evolution of a Key Innovation in Phage Lambda. *Science*, 335(6067), 428–432. <https://doi.org/10.1126/science.1214449>

- Moye, Z. D., Woolston, J., & Sulakvelidze, A. (2018). Bacteriophage Applications for Food Production and Processing. *Viruses*, 10(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/v10040205>
- Patel, P. H., & Maxwell, K. L. (2023). Prophages provide a rich source of antiphage defense systems. *Current Opinion in Microbiology*, 73, 102321. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102321>
- Pendleton, J. N., Gorman, S. P., & Gilmore, B. F. (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 11(3), 297–308. <https://doi.org/10.1586/eri.13.12>
- Phillips, Z. N., Tram, G., Seib, K. L., & Attack, J. M. (2019). Phase-variable bacterial loci: How bacteria gamble to maximise fitness in changing environments. *Biochemical Society Transactions*, 47(4), 1131–1141. <https://doi.org/10.1042/BST20180633>
- Piirmets, K. (2022). Kromosomaalsete toksiin-antitoksiin süsteemide ja profaagide mõju *Pseudomonas putida* faagiresistentsusele. *Bakalaureusetöö*.
- Piya, D., Vara, L., Russell, W. K., Young, R., & Gill, J. J. (2017). The multicomponent antirestriction system of phage P1 is linked to capsid morphogenesis. *Molecular Microbiology*, 105(3), 399–412. <https://doi.org/10.1111/mmi.13705>
- Richter, C., Chang, J. T., & Fineran, P. C. (2012). Function and Regulation of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) / CRISPR Associated (Cas) Systems. *Viruses*, 4(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/v4102291>
- Roberts, R. J., Belfort, M., Bestor, T., ... Xu, S. (2003). A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Research*, 31(7), 1805–1812. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg274>
- Samson, J. E., Magadán, A. H., Sabri, M., & Moineau, S. (2013). Revenge of the phages: Defeating bacterial defences. *Nature Reviews Microbiology*, 11(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3096>
- Sieiro, C., Areal-Hermida, L., Pichardo-Gallardo, Á., Almuiña-González, R., de Miguel, T., Sánchez, S., Sánchez-Pérez, Á., & Villa, T. G. (2020). A Hundred Years of Bacteriophages: Can Phages Replace Antibiotics in Agriculture and Aquaculture? *Antibiotics*, 9(8), 493. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9080493>
- Silva, E. N. G., Figueiredo, A. C. L., Miranda, F. A., & Almeida, R. C. de C. (2014). Control of *Listeria monocytogenes* growth in soft cheeses by bacteriophage P100. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45, 11–16. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000100003>

- Strathdee, S. A., Hatfull, G. F., Mutalik, V. K., & Schooley, R. T. (2023). Phage therapy: From biological mechanisms to future directions. *Cell*, 186(1), 17–31. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.017>
- Tock, M. R., & Dryden, D. T. (2005). The biology of restriction and anti-restriction. *Current Opinion in Microbiology*, 8(4), 466–472. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.06.003>
- Touchon, M., Bernheim, A., & Rocha, E. P. (2016). Genetic and life-history traits associated with the distribution of prophages in bacteria. *The ISME Journal*, 10(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.47>
- van der Woude, M. W., & Bäumler, A. J. (2004). Phase and Antigenic Variation in Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(3), 581–611. <https://doi.org/10.1128/cmr.17.3.581-611.2004>
- Wong, S. M., & Mekalanos, J. J. (2000). Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(18), 10191. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.18.10191>

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Jim O'Neill (2014). Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the future health and wealth of nations. Review on Antimicrobial Resistance. Aruanne.

<https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations%201.pdf> (17.05.24)

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (24.05.24)

LIHTLITSENTS

Mina, Gülgäz Gasymova,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „*Pseudomonas putida* profaag P2 faagivastases kaitses“, mille juhendaja on Sirli Rosendahl, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates 04.06.26 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.

Gülgäz Gasymova

21.05.24