

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

GENEETIKA ÕPPETOOL

***Pseudomonas putida* ennustatavate faagikaitstesüsteemide testimine**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Joosep Jagomägi

Juhendaja PhD Andres Ainelu

TARTU 2024

INFOLEHT

***Pseudomonas putida* ennustatavate faagikaitstesüsteemide testimine**

Pseudomonas putida-s on ennustatud mitmed faagikaitstesüsteeme aga nende tegelik roll faagiresistentsuses pole teada. Sellest lähtuvalt on käesoleva töö eesmärk välja selgitada, kas RloC, Gabija ja Wadjet kaitstesüsteemil on mõju *Pseudomonas putida* faagiresistentsusele. Tulemused näitasid, et RloC muudab tüve tundlikumaks faagide (eriti 5. perekond) suhtes aga Gabijal ja Wadjetil puudus kaitsev efekt testitud faagide ja plasmiidide vastu.

Märksõnad: *Pseudomonas putida*, Gabija, Wadjet, RloC, faagikaitse

CERCS kood: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Testing of predicted phage defense systems in *Pseudomonas putida*

Several phage defense systems have been predicted in *Pseudomonas putida*, but their actual role in phage resistance is unknown. Therefore, the aim of this work is to determine whether the RloC, Gabija, and Wadjet defense systems have an effect on the phage resistance of *Pseudomonas putida*. The results showed that RloC makes the strain more sensitive to phages (especially the 5th family), but Gabija and Wadjet had no defensive effect against the phages and plasmids tested.

Keywords: *Pseudomonas putida*, Gabija, Wadjet, RloC, phage defense

CERCS code: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

INFOLEHT	2
SISUKORD.....	3
KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Sissejuhatus faagikaitstesüsteemidesse.....	7
1.1.1. Faagid ja nende roll mikrobioloogias.....	7
1.1.2. Faagikaitstesüsteemide ülevaade.....	7
1.1.3. Faagikaitstesüsteemide leidmine.....	10
1.2. <i>Pseudomonas putida</i> faagikaitstesüsteemid.....	11
1.2.1. <i>Pseudomonas putida</i>	11
1.2.2. <i>Pseudomonas putida</i> faagikaitstesüsteemid	12
1.2.3. Wadjet	12
1.2.4. Gabija.....	13
1.2.5. RloC.....	13
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	14
2.1 Töö eesmärgid.....	14
2.2 Materjal ja meetodika	15
2.2.1. Bakteritüved, söötmed ja kasvutingimused	15
2.2.3. Faagide nakkuvuse mõõtmine.....	18
2.2.4. Kasvukõvera mõõtmine	19
2.2.5. Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon	19
2.2.6. RloC komplementatsioon	20
2.2.7. Plasmidi transformatsioon.....	20
2.2.8. Plasmidi kadumise mõõtmine	20
2.3 Tulemused.....	22

2.3.1. RloC deletanttüve faagiresistentsus üldiselt suurenes võrreldes PaW85 tüvega...	22
2.3.2. Wadjeti ega Gabija deletsioon ei mõjutanud oluliselt plasmiidide stabiilsust.....	27
2.4 Arutelu	29
2.4.1. RloC langetab faagiresistentsust.....	29
2.4.2. Wadjet ja Gabija ei oma olulist efekti faagikaitstes ega plasmiidistabiilsuses.....	30
KOKKUVÕTE	31
SUMMARY.....	32
KASUTATUD KIRJANDUS.....	34
LIHTLITSENTS	37

KASUTATUD LÜHENDID

Abi mehhanism – abortatiivne infektsiooni mehhanism

Bp – Bensüülpenitsiliin

Cip – Tsiprofloksatsiin

Gm – Gentamütsiin

Km – Kanamütsiin

TAS – toksiin-antitoksiin süsteem

rpm – *revolutions per minute* (pööret minutis)

SISSEJUHATUS

Faagid on bakterite viirused ja põhilised looduslikud vaenlased, avaldades seeläbi suurt evolutsioonilist survet bakterite faagikaitstesüsteemide arenemisele (Güemes et al., 2016). Faagikaitstesüsteemid on väga laialt levinud ja arenenud väga mitmekesiseks (Georjon ja Bernheim, 2023). Tänu uutele meetoditele ja andmebaasidele on ennustatud väga palju uusi faagikaitstesüsteeme, mille homolooge saab otsida igast sekveneeritud bakteritüvest (Georjon ja Bernheim, 2023; Tesson et al., 2022).

Pseudomonas putida on keskkonnabakter, millel on oma mitmekesise metabolismi ja hea stressitaluvuse tõttu suur potentsiaal bioremediatsioonis ja biosünteesis (Kivisaar, 2020). Selleks, et veelgi suurendada *P. putida* potentsiaali on hakatud ta genoomi optimeerima, lõigates seal välja vähem vajalikke alasid (Aparicio, de Lorenzo, ja Martínez-García, 2019; Zong et al., 2022; Liu et al., 2022). Sellel viisil optimeerimisega kaasneb oht, et lõigatakse välja mõni faagikaitstesüsteem. See nõrgestab tüve ja võib põhjustada suuri rahalisi ja ajalisi kaotusi, kui bakter puutub kokku faagidega.

Erinevates andmebaasides on ennustatud PaW85 tüves 7 kuni 12 faagikaitstesüsteemi, aga ühtegi neist pole testitud. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk on kontrollida kolme *Pseudomonas putida* PaW85 tüve ennustatava kaitstesüsteemi aktiivsust faagikaitstes.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Sissejuhatus faagikaitsesüsteemidesse

1.1.1. Faagid ja nende roll mikrobioloogias

Bakteriofaagid ehk faagid on baktereid nakatavad viirused. Hinnanguliselt on biosfääris faage kokku $4,80 \times 10^{31}$, mis on üle kümne korra rohkem kui prokarüootseid rakke (Güemes et al., 2016). Faagid saab jagada infektsioonitsükli alusel lüütilisteks ja lüsogeenseteks faagideks. Lüütiliste faagide puhul siseneb faagi nukleiinhape peremeesraku. Seejärel võtab faag üle bakteri metabolismi, mis võimaldab tal võimalikult palju viiruse partikleid toota. Infektsioonitsükli lõpus lüüsitakse peremeesrakk, vabastades seeläbi viirusepartiklid, mis on rakus kuhjunud. Lüsogeenses tsükli siseneb faagi DNA peremeesraku genoomi ja paljuneb selle replitseerumisel. Juhul kui keskkonnatingimused halvenevad, võib faagi DNA genoomist väljuda ja siseneda lüütilisse tsükli, mille tulemusel peremeesrakk lüüsub. Faagide arvukuse ja efektiivsuse tõttu lüüsub iga päev hinnanguliselt 15% heterotroofsetest meres elavatest bakteritest (Suttle, 1994).

1.1.2. Faagikaitsesüsteemide ülevaade

Faagid on bakteritele tõsiseks ohuks ja põhjustavad seega suurt evolutsioonilist survet.

Bakteritel on vastukaaluks välja arenenud palju erinevaid süsteeme viirustega võitlemiseks.

Neid kutsutakse faagikaitsesüsteemideks. Faagikaitsesüsteeme saab aktivaatori alusel jagada neljaks:

1. nukleiinhapete käivitavad süsteemid;
2. faagi valkude käivitavad süsteemid;
3. peremeesraku seisundit jälgivad süsteemid;
4. teadmata käivitajaga süsteemid.

Nukleiinhapete käivitavad süsteemid on laialt levinud kaitsesüsteemid, mis reageerivad faagile esmastes nakkusstaadiumites, kui faagi nukleiinhapped on alles sisenenud bakterisse (Georjon ja Bernheim, 2023). Võõra DNA ära tundmiseks on kolm moodust. Esiteks on võimalik märgistada enda DNA kindlate märgistega ja hävitada DNA millel antud märgised puuduvad. Niimoodi toimivad restriksiooni-modifikatsioonisüsteemid, mis koosnevad üldiselt kahest poolest: restriктаasist ja metüültransferaasist. Restriктаasid tunnevad ära võõra DNA nukleiinhappe modifikatsioonide olemasolu või puudumise ja lõikavad võõra DNA katki. Metüültransferaas märgistab bakteri enda DNAd, seda metüleerides (Tock ja Dryden,

2005). Teine võimalus on tunda ära topoloogilisi iseärasusi DNAs. Näiteks Wadjet kaitsesüsteem tunneb ära plasmiidide tsirkulaarse struktuuri ning lõikab need seejärel katki (Deep et al., 2022). Kolmas võimalus on kasutada viiruse DNAGA komplementaarseid RNAsid. CRISPR-Cas süsteem salvestab lõike vöör-DNAst ning sünteesib nendega komplementaarseid RNAsid. Nende RNAde abil leiavad Cas valgud vöör-DNA üles ja lõikavad selle katki (Xu ja Li, 2020).

Faagi valkude poolt käivitavad süsteemid reageerivad infektsioonile hilisemates nakkusstaadiumites, kui faagi nukleiinhappe pealt on hakatud valke sünteesima. Kõik teadaolevad faagi valkude poolt käivitavad süsteemid kasutavad Abi (abortivne infektsioon) mehhanisme, mis vabastavad toksiinid faagi valgu avastamisel rakus, mis omakorda viib nii viiruse kui ka bakteri elutsükli peatumiseni ja surmani. Sellised süsteemid on oma iseloomult altruistlikud, kuna tugevdavad populatsiooni tervikuna üksikorganismi arvelt. Ära tuntava valgu tüübi järgi saab jagada faagi valkude poolt käivitavad süsteemid kaheks: replikatsiooniks vajalikke valke ära tundvad süsteemid ja struktuuri valke ära tundvad valgud (Georjon ja Bernheim, 2023). Replikatsiooniks vajalikke valke tunnevad ära näiteks Avs süsteemid, mis tuvastavad konserveerunud motiive *Caudoviralese* klassi faagide portaali ja suure terminaasi subühiku valkudel. Faagi valkude tuvastamisel Avs süsteemi valgud tetrameriseeruvad ja aktiveerivad seeläbi N-terminaalses otsas paiknevad suure varieeruvusega efektorid (Gao et al., 2022). Struktuurivalke tunneb ära näiteks CapRel süsteem. Tegu on mitteklassikalise ühest liitvalgust koosneva toksiin – antitoksiin süsteemiga, mille C-terminaalne antitoksiin-domeen inhibeerib N-terminaalset toksiin-domeeni kuniks seondub suure kapsiidi valguga. Inhibitsioonist vabanenud N-terminaalne domeen hakkab pürofosforüleerima tRNAsid, seistes seeläbi faagi ja raku translatsiooni (Zhang et al., 2022).

Faagid kaaperdavad tavaliselt bakteri transkriptsiooni, translatsiooni ja replikatsiooni mehhanismid, et suunata kogu ressursid faagi paljundamisesse või suruvad alla bakteri immuunvastust. Peremeesraku metabolismitasakaalu jälgivad süsteemid tuvastavad selliseid kõrvalekaldeid normaalsusest ja initsieerivad immuunreaktsiooni. Metabolismi muutust tuvastavate süsteemide alla kuuluvad paljud toksiin – antitoksiin süsteemid (TAS), mis koosnevad stabiilsest toksiinist ja ebastabiilsest antitoksiinist, mida bakter peab kogu aeg juurde tootma, et elus püsida. Kui faag peatab uute antitoksiinide tootmise, vabaneb toksiin ja bakter sureb (Georjon ja Bernheim, 2023). Selline süsteem on näiteks *tox/N* süsteem, kus ebastabiilne RNAst antitoksiin *toxI* inhibeerib RNAas ToxN'i. Peremehe transkriptsiooni

peatamine viib ebastabiilse *toxI* kadumise ja ToxN'i vabanemiseni, mis hakkab RNAsid lõikama (Guegler ja Laub, 2021). Bakteri immuunvastuse allasurumist tuvastab näiteks PrrC süsteem. Kui faag T4 poolt toodetud valk Stp inhibeerib *EcoprrI* restriktaasi, siis vabastab ta tRNA^{Lys} spetsiifilise tRNAasi PrrC ja translatsioon peatub (Penner et al., 1995).

Viimasesse kategooriasse kuuluvad süsteemid, millel aktivatsioonimehhanism pole veel kindlaks tehtud, aga omavad faagivastast toimet. Näiteks DarTG TAS aktiveerub viie minutiga, mis on *toxI/N* laadse süsteemi jaoks liiga kiire. Antud süsteemi puhul spekulatsioonitakse, et initsiaatoriks võib olla faagi valk või faktor, aga tõestusmaterjal puudub (LeRoux et al., 2022).

Faagikaitse teine pool on infektsioonitsükli katkestamine, milleks on kolm põhilist strateegiat:

- 1) nukleiinhappeid ründavad;
- 2) nukleotiide ründavad;
- 3) rakumembraani ründavad süsteemid (Georjon ja Bernheim, 2023).

Nukleiinhappeid ründavad süsteemid on teadaolevatest süsteemidest bakterite genoomides kõige laialt levinumad kaitsesüsteemid (Tesson et al., 2022). Nende süsteemide puhul toimub infektsioonitsükli katkestamine spetsiifiliselt faagi nukleiinhappeid rünnates või ebaspetsiifiliselt nukleiinhappeid rünnates, kui on tuvastatud infektsioon. Esimesel juhul jääb peremees tavaliselt ellu, teisel juhul mitte (Georjon ja Bernheim, 2023). Tavaliselt nukleiinhappeid ründavad süsteemid lõikavad nukleiinhappeid, aga osad hoopis modifitseerivad neid. Näiteks DarTG süsteem inaktiveerib viiruse DNA ADP-ribosüleerimise teel (LeRoux et al., 2022).

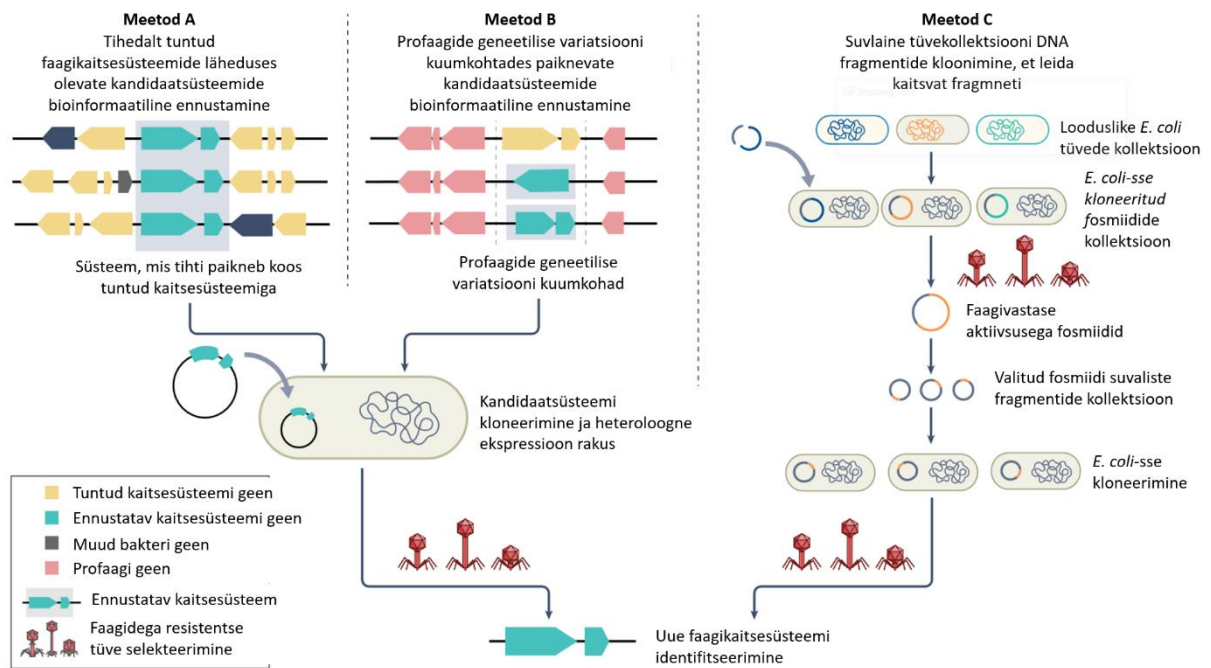
Teine variant infektsioonitsükli peatada on nukleotiide rünnata, piiritledes seeläbi replikatsioonitsükli läbiviimiseks vajalikke ressursse. Seda tehakse degradeerides või modifitseerides nukleotiide nagu näiteks ATPd, NADi, CTPd või GTPd nii, et neid ei saa enam replikatsiooniks kasutada (Duncan-Lowey et al., 2023; Ofir et al., 2021; Tal et al., 2022)

Kolmas variant on lõhkuda ära rakumembraan ja seeläbi katkestada kõik rakusisesed protsessid, kaasaarvatud faagi infektsioonitsükliga seotud protsessid. Membraani lõhkumiseks on mitmeid viise. Üks võimalus membraani lõhkumiseks on tekitada piisavalt suured poorid, et membraan enam ei toimiks keskkonnast eraldava barjäärina. Teine võimalus on sünteesida valke, mis degradeerivad raku membraanis leiduvad fosfolipiidid. Kolmas võimalus on sisestada membraani transmembraanseid valke, mis kahjustavad

membraani ilma sinna poore tekitamata, ega fosfolipiide degradeerimata (Georjon ja Bernheim, 2023).

1.1.3. Faagikaitstesüsteemide leidmine

Uute faagikaitstesüsteemide avastamiseks on välja töötatud kolm suure läbilaskvusega meetodit. Esimene neist põhineb nähtusel, kus tihti paiknevad kaitstesüsteemid bakteri genoomis teineteise lähedal, moodustades nii kaitseosa (Makarova et al., 2011). Seega saab oletada, et tundmatud geenid, mis paiknevad tihti kaitstesüsteemide geenide läheduses võivad ka olla faagikaitsegeenid (Joonis 1 A) (Doron et al., 2018). Teise meetodiga saab leida faagikaitstesüsteeme, mis asuvad profaagidel geneetilise variatsiooni kuumkohtades, kus on eelnevalt tuvastatud faagikaitstesüsteeme (Joonis 1 B) (Rousset et al., 2022). Nende kahe meetodiga tuvastatakse kandidaatgeenid, mida saab siis funktsionaalselt testida. Miinuseks on see, et nendega ei saa väljaspool kaitseosa või kuumkohti asuvaid süsteeme leida. Kolmas meetod võimaldab otseselt leida töötavaid kaitstesüsteeme väljaspool kaitseosa ja profaage. Selleks lõhutakse eri tüvede DNA fragmentideks, mis transformeeritakse ükshaaval bakterisse, et tuvastada faagikaitse muutused. Kui leitakse fragment, mis suurendab faagikaitset, siis sellest tehakse veel väiksemaid fragmente, mida kontrollitakse samamoodi. Lõpuks saab niimoodi tuvastada faagikaitse eest vastutavad geenid (Joonis 1 C) (Vassallo et al., 2022). See meetod võimaldab kaitstesüsteemide leidmist terve genoomi ulatuses aga on väga töömahukas.



Joonis 1. Erinevad meetodid faagikaitstesüsteemide avastamiseks (Georjon ja Bernheim, 2023). Meetod A tugineb sellel, et kaitsesüsteemid paiknevad tihti genoomis koos (Makarova et al., 2011). Meetod B tugineb sellel, et profaagide geneetilise variatsiooni kuumkohtades leidub tihti kaitsesüsteeme. Seega on võimalik leida nendes olevaid tundmatuid gene uurides uusi kaitsesüsteeme (Rousset et al., 2022) Meetod C on katse-eksitus meetod, kus lihtsalt testitakse suvalisi fragmente suvalistest bakteritüvedest faagide vastu, kuni leitakse fragment, mis tõstab resistentsust. Seejärel antud fragmenti tükeldatakse seni, kuni on kindlaks tehtud täpne piirkond, mis otsidud efekti annab (Vassallo et al., 2022).

Tänu nendele kolmele meetodile on viimastel aastatel ennustatavate ja teadaolevate faagikaitstesüsteemide arvukus palju kasvanud. Selleks, et tuvastada teadaolevaid kaitsesüsteeme uue bakteri genoomis on välja töötatud tööriistad nagu DefenseFinder ja Padloc. Mõlemad töötavad homoloogia alusel, võrreldes teadaolevate kaitsesüsteemide valke ette antud genoomi pealt sünteesitavate valkudega ja tagastades vastavused (Tesson et al., 2022; Payne et al., 2022).

1.2. *Pseudomonas putida* faagikaitstesüsteemid

1.2.1. *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida on gramnegatiivne keskkonnabakter, kes elab vees, mullas ja risosfääris. *P. putida* olulisus seisneb tema mitmekesisel metabolismil, tänu millele on ta ahvatlev uurimisalus bioremedatsiooni, põllumajanduse ja biokatalüüsi seisukohast (Kivisaar, 2020). Bioremedatsiooni seisukohast on oluline *P. putida* plasmiidide võime lagundada aromaatsaid ühendeid nagu fenool ja toluen (Herrmann et al., 1988; Williams ja Murray, 1974). Põllumajanduse seisukohast on *P. putida* väga kasulik mullamikroob, kuna parandab nii

idanemist, juurte kasvu kui ka taimede kasvu (Roca et al., 2013). *Pseudomonas putida* on biokatalüüsi seisukohast atraktiivne bakter, kuna on kohanenud elama rasketes keskkonnatingimustes ja talub hästi erinevaid tööstuslikke protsesse (Kim ja Park, 2014; Nikel ja de Lorenzo, 2018). Ta metabolism on loomulikult suunatud redokspotentsiaali genereerimisele, mis teeb sellest bakterist sobiliku peremehe redoks-intensiivsetele reaktsioonidele (Akkaya et al., 2018; Nikel ja de Lorenzo, 2018). Lisaks on *P. putida* võimeline peremeheks olema mitte ainult teiste mikroorganismide heteroloogsetele radadele, vaid ka täiesti kunstlikele radadele uute, sünteetiliste molekulide tootmiseks (Nikel ja de Lorenzo, 2018). Selleks, et luua *P. putida* abil erinevaid efektiivseid biokatalüüsisüsteeme, on üritatud konstrueerida redutseeritud genoomiga *P. putida* tüvesid (Aparicio, de Lorenzo, ja Martínez-García, 2019; Zong et al., 2022; Liu et al., 2022). See toob kaasa aga ohu, et seni genoomis annoteerimata faagikaitstesüsteemid võidakse samuti eemaldada. Kui sellist tüve kasutada biokatalüüsil mingi loodusliku substraadi põhjal, on olemas oht, et faagid hävitavad reaktoris kasvava bakterikultuuri, mis toob kaasa aja- ja materjalikulu süsteemi puhastamiseks ning taaskäivitamiseks.

1.2.2. *Pseudomonas putida* faagikaitstesüsteemid

Eelnevalt on ennustatavaid *Pseudomonas putida* faagikaitstesüsteeme uuritud ühes teadusartiklis, kus näidati, et kolmeteistkümne toksiin-antitoksiin süsteemi deletsioonil PaW85 tüvest puudub efekt faagiresistentsusele. Samas näidati, et neli krüptilist profaagi suurendavad resistentsust mitme faagi vastu. Lisaks koostati ulatuslik faagikogu CEPEST, mida selles töös kasutan (Brauer et al., 2024). DefenseFinder ennustab PaW85 tüves 7 faagikaitstesüsteemi olemasolu (Tesson et al., 2022). Selle töö raames vaatlen lähemalt kolme ennustatavat faagikaitstesüsteemi: Wadjet, Gabija ja RloC.

1.2.3. Wadjet

Kaitstesüsteem Wadjet on nukleiinhappeid ära tundev ja lõikav süsteem. Kuigi Wadjet avastati kaitsekaartest uute faagikaitstesüsteemide otsimisel, ei tuvastatud tal faagivastast toimet (Doron et al., 2018). Wadjeti sihtmärgiks on plasmiidid, mida ta tunneb ära topoloogia alusel. Wadjet süsteem koosneb neljast geenist: *jetA*, *jetB*, *jetC* ja *jetD*, mis kodeerivad vastavalt nelja valku: JetA, JetB, JetC ja JetD. JetA, JetB ja JetC valkudest moodustub kahepoolne klamber-kompleks $JetA_2B_4C_4$, mille mõlemad pooled kinnituvad DNAle ja hakkavad vastassuundades DNAd endast läbi tõmbama. Kui nad tsirkulaarsel DNA molekulil uuesti kokku saavad, aktiveerub JetD dimeer, mis lõikab DNA katki. Peale seda kogu kompleks

vabaneb DNA küljest (Deep et al., 2022). Kõigist RefSeqi täielikest genoomidest leidub Wadjet kaitsesüsteem 10.31% genoomides (DefenseFinder andmebaas: Wadjet).

1.2.4. Gabija

Faagikaitsesüsteem Gabija on peremeesraku seisundit jälgiv süsteem, mis ründab nukleiinhappeid ja nukleotiide. Gabija koosneb kahest geenist/valgust: GajA ja GajB (Cheng et al., 2023). GajA on järjestusspetsiifiline DNAd naksav endonukleaas, mis tekitab vabad DNA otsad. Bakteri normaalses olekus inhibeerib seda ATP, mis seondub valgul DNA äratundmiskohaga. (Cheng et al., 2021; 2023). GajB on DNA vabadest otstest sõltuv ATPaas ja GTPaas (Cheng et al., 2023). GajA ja GajB moodustavad komplekse ja aktiveerivad teineteist, moodustades nii efektiivse Abi mehhanismi (Cheng et al., 2023). Kõigist RefSeqi täielikest genoomidest leidub Gabija kaitsesüsteem 13.15% genoomides (DefenseFinder andmebaas: Gabija).

1.2.5. RloC

Faagikaitsesüsteem RloC on peremeesraku seisundit jälgiv süsteem, mis ründab tRNAsid. RloC koosneb ühest geenist/valgust, millel on kolm domeeni: antikoodoni nukleaas (AKNaas), ATPaas ja *coiled-coil/zinc-hook*. Täpselt veel ei teata, kuidas RloC aktiveerub, aga arvatakse, et ta reguleerib ise enda aktiivsust läbi DNA seondumise. RloC lõikab tRNA-sid antikoodon-lingu *wobble* nukleotiidide kohalt ja seiskab seeläbi translatsiooni (Davidov ja Kaufmann, 2008; Klaiman et al., 2012). Kõigist RefSeqi täielikest genoomidest leidub RloC kaitsesüsteem 8.53% genoomides (DefenseFinder andmebaas: RloC).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Töö eesmärgiks oli tuvastada, kas kolm *Pseudomonas putida* genoomis ennustatud faagikaitseüsteemi: Wadjet, Gabija ja RloC ,pakuvad kaitset faagide vastu. Selleks, et käesolevale küsimusele vastata, olid esmasteks eesmärkideks:

1. PaW85 tüvest Wadjet, Gabija ja RloC deletant tüvede (ΔW , ΔG ja ΔR) valmistamine.
2. PaW85 tüve faagiresistentsuse võrdlemine ΔW , ΔG ja ΔR tüvega.
3. PaW85 tüve plasmidistabiilsuse võrdlemine ΔW ja ΔG tüvega.

2.2.2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Bakteritüved, söötmed ja kasvutingimused

Kõik tüved (Tabel 1), millega siin töös katseid tein, põlvnevad *P. putida* PaW85 tüvest (Bayley et al., 1977). *P. putida* kultuure kasvatati temperatuuril 30 °C, LB vedelsöötmes (Tabel 2) 180 rpm loksutamiseks. Erandiks olid bakteriofaagidega nakatamise katsed, kus kultuure kasvatati 20 °C juures, LB vedelsöötmes (Tabel 2) 150 rpm loksutamiseks.

Tabel 1. *P. putida* tüved

Tüvi	Iseloomustus	Allikas
PaW85	<i>P. putida</i> metsiktüvi	(Bayley et al., 1977)
ΔR	<i>P. putida</i> metsiktüvi, milles on kustutatud RloC kaitsesüsteem	Käesolev töö
ΔG	<i>P. putida</i> metsiktüvi, milles on kustutatud Gabija	Käesolev töö
ΔW	<i>P. putida</i> metsiktüvi, milles on kustutatud Wadjet	Käesolev töö
Δ13TA Δ4Φ	<i>P. putida</i> metsiktüvi, milles on kustutatud 13 TASI ja 4 profaagi	(Brauer et al., 2024)
Δ13TA Δ4Φ ΔR	<i>P. putida</i> metsiktüvi, milles on kustutatud 13 TASI, 4 profaagi ja RloC	Sirli Rosendahl
Δ13TA Δ4Φ ΔG	<i>P. putida</i> metsiktüvi, milles on kustutatud 13 TASI, 4 profaagi ja Gabija	Sirli Rosendahl
Δ13TA Δ4Φ ΔG ΔR	<i>P. putida</i> metsiktüvi, milles on kustutatud 13 TASI, 4 profaagi, Gabija ja RloC	Sirli Rosendahl
Δ13TA Δ4Φ ΔW	<i>P. putida</i> metsiktüvi, milles on kustutatud 13 TASI, 4 profaagi ja Wadjet	Sirli Rosendahl
Δ13TA Δ4Φ ΔW ΔR	<i>P. putida</i> metsiktüvi, milles on kustutatud 13 TASI, 4 profaagi, Wadjet ja RloC	Sirli Rosendahl
ΔR Tn7Gm-RloC	<i>P. putida</i> RloC deletanttüvi kuhu komplementeeritud RloC	Andres Ainele

Tabel 2. Söötmed

Sööde	Koostis
LB vedelsööde	1% trüpton, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl
LB pehmeagarsööde	1% trüpton, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl, 0.3% agar
LB agarsööde	1% trüpton, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl, 1,5% agar

2.2.2. Tüvede konstrueerimine

P. putida ΔR , ΔG ja ΔW tüved konstrueerisin vastavalt RloC, Gabija ja Wadjeti kaitsesüsteemi kustutamiseks *P. putida* PaW85 tüvest. Deletsioonid viisin sisse järgides eelnevalt koostatud protokolliga väikeste muutustega (Martínez-García ja de Lorenzo, 2011). Suitsiidplasmiidid, mis sisaldasid ennustatava faagikaitsesüsteemi deletsioonfragmente, viidi *P. putida* PaW85 tüve, kus plasmiid ei suutnud replitseeruda. Tabelis 5 on esitatud deletsioontüvede loomiseks kasutatavad plasmiidid. Tänu homoloogilisele rekombinatsioonile profaagi deletsioonfragmendi ja kromosoomi vahel, integreerub plasmiid bakteri kromosoomi. Selle tulemusena tekivad kanamütsiiniresistentsed kointegraadid, mis sisaldavad nii metsiktüüpku ka deletsioonlookust. Seejärel viidi kointegraatidesse elektroporatsiooni teel I-SceI nukleaasi kodeeriv plasmiid pSW(I-SceI). I-SceI endonukleas lõikab kromosoomi integreerunud plasmidi I-SceI restriksioonisaitidest mõlemalt poolt faagikaitsesüsteemi deletsioonfragmenti. I-SceI nukleaasi indutseerimiseks kasvatati rakke üleöö 3 mM meta-toluaati sisaldava LB vedelsöötmele. LB agarsöötmele plaaditud bakteritest selekteeriti välja kanamütsiinitundlikud kolooniad. Deletsiooni olemasolu kontrolliti PCR-iga kasutades . PCRi programm on tabelis 3 ja kasutatud oligonukleotiidid tabelis 4.

Tabel 3. PCR segu ühe reaktsiooni kohta.

Koostisosad	Kogused (µl)
H ₂ O	17.2
Dream Taq roheline buffer	2
dNTP 10mM	0.4
1. praimer 100 µM	0.1
2. praimer 100 µM	0.1
DreamTaq polümeraas (Thermo Scientific)	0.2
Matriits	bakterirakud
Kokku	20

Tabel 4. Kasutatud oligonukleotiidid

Nimi	Järjestus
Tn7R109	CTGAAATCAGTCCAGTTATGCTG
Tn7GImS	AATCTGGCCAAGTCGGTGAC
delWadjetFrontFwSal	ATGTCGACACACGAACCAACGCTAAAC
delWadjetRearRevSac	TAGAGCTCCAAGACTCAACTTCATCCGAAC
delGabijaFrontFwEco	TAGAATTCTTCACGAATGAGGCGGAATAG
delGabijaRearRevBam	TAGGATCCGTAGCTCTGTTAATGACCAAG
delRloCFrontFwEco	TAGAATTCAAATCAAGTCCGGGAATGATCC
delRloCRearRevBam	TAGGATCCTGGCGAGATCATTGAAACCAAAG

I-SceI nukleaasi kodeerivast bensüülpenitsilliini resistentsusgeeni kandvast plasmiidist vabanemiseks kasvatati deletsioontüvesid mõne päeva jooksul mitteselektiivsetes tingimustes ning valiti välja bensüülpenitsilliini suhtes tundlikud kolooniad.

Tabel 5. Plasmiidid

Plasmiid	Iseloomustus	Allikas
2580pr/9TTblacZ	PP_2580 promotori aktiivsuse mõõtmise plasmiid	Rita Hõrak
pKT-5516-5517+gfp	PP_5516 ja PP_5517-gfp ekspressiooni-plasmiid	Anita Lipu
PUXBF13	miniTn7 transpositsiooni abiplasmiid	https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90604-A
pGP704-miniTn7Gm-RloC	<i>rloC</i> geeni kandva miniTn7 transposooniga plasmiid	Andres Ainele
pSW(I-SceI)	I-SceI nukleaasi kodeeriv plasmiid	https://doi.org/10.1073/pnas.97.18.10191
pSNW2-delGabija	Gabija deletsioonlookust kandev plasmiid	Andres Ainele
pSNW2-delRloC	RloC deletsioonlookust kandev plasmiid	Andres Ainele
pSNW2-delWadjet	Wadjet deletsioonlookust kandev plasmiid	Andres Ainele

2.2.3. Faagide nakkuvuse mõõtmine

Faagide nakkuvuse mõõtmiseks kasvasin PaW85, ΔR , ΔG ja ΔW tüvesid üleöö. Enne katset tõstsin 350 μ l üleöökuultuuri 5ml LB vedelsöötmesse ja kasvasin veel 4 tundi 20 °C juures loksutil. Tegin steriilsesse mikrotiiterplaati igast faagilahusest 10-kordse lahjenduste rea kuni 10⁶ kordse lahjenduseni. Tabel 6 sisaldab kõiki kasutatud faage. Valmistasin LB-agarsöötmega Petri tassile bakterimuru LB pehmeagaris. Selleks segan 200 μ l nelja tunni kultuuri, 5 ml 42 °C juures hoitavat LB pehmeagarit ja 50 μ l 1M CaCl₂. Kallan saadud segu LB agarsöötme Petri tassile, millele on lisatud 0,03 μ g/ml Cip-i ja lasen tarduda. Tardunud pehmagarile kannan igast mikrotiiterplaadil olevast lahjendusest 1.5 μ l. Inkubeerin tase üleöö 20 °C juures. Loendasin faagilaikude arvu kõige kangema lahjenduse täpist, kus oli võimalik üksikuid laike eristada ja arvutasin sellest iga tüve kohta faagitiitri lüüsilaike moodustavate ühikute arvu milliliitris (LMÜ/ml).

Tabel 6. Faagid

Nimi	Liigiklaster	Perekonnaklaster
Amme-3	1A	G1
Illi-2	3A	G3
ErraM	5A	G5
Luke 3	6A	G6
Kallioja	7A	G7
Kurepalu-1	8A	G8
Kurepalu-2	9A	G9
ErraS	5A	G5
Vanda	5A	G5
Hammaste-2	5C	G5
BotAed	5C	G5
Kompost-1	5C	G5
Luutsna-3	5B	G5
Pori-2	5B	G5
Illi-1	5B	G5
Mora-3	5B	G5
Konnatiik	5B	G5
Kurenuki	5B	G5
Kaagvere	5B	G5
Ihaste	5B	G5

2.2.4. Kasvukõvera mõõtmine

Kasvukõvera mõõtmiseks kasvasin PaW85, ΔR , ΔG ja ΔW tüvesid. Mõõtsin kõikide üleöö kultuuride optilise tiheduse (OD) 580 nm juures spektrofotomeetriga. Lisasin viite milliliitrisse LB vedelsöötmesse piisavalt igat kultuuri, et OD oleks 0,05. Võtsin steriilse 96-kannulise mikrotiiterplaadi. Tõstsin igast lahjendatud kultuurist mikrotiiterplaadi kannudesse 21 korda 150 μ l. Allesjäänud 12 kannu täitsin LB vedelsöötmega. Panin mikrotiiterplaadile kaane peale. Sulgesin kaane ja aluse vahelise prao parafiinkilega. Panin mikrotiiterplaadi BioTek Synergy H1 mikroplaadilugejasse (Agilent). Mikroplaadilugeja mõõtis igas kannus ODD 580 nm juures 22 tundi 19 minutit ja 10 sekundit iga 10 minuti tagant.

2.2.5. Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon

Tsentrifuugisin toatemperatuuril üleöö rakukultuuri 13000 g juures ühe minuti. Eemaldas in söötme. Lisasin 1 ml 300 mM saharoosi lahust. Tsentrifuugisin 13000 g juures ühe minuti. Eemaldas in supernatandi. Lisasin 1 ml 300 mM saharoosi lahust. Tsentrifuugisin 13000 g juures ühe minuti. Eemaldas in supernatandi. Lisasin 1 ml 300 mM saharoosi lahust. Tsentrifuugisin 13000 g juures ühe minuti. Eemaldas in supernatandi, jättes 50 μ l alles. Lisasin

plasmiidid. Suspendeerisin segu, tõstsin 2 mm laiusesse küveti ja elektroporeerisin 2.5 kV-ga Bio-Rad MicroPulser elektroporaatoris. Kohe peale elektrilööki pesin rakud küvetist välja 500 µl LB vedelsöötme. Inkubeerisin rakke 30 °C juures loksutil.

2.2.6. RloC komplementatsioon

Komplementatsiooniks viisin ΔR tüve genoomi miniTn7 transposooni koosseisus *rloC* geeni. Selleks kasvasin ΔR tüve ning viisin 300 µl üleökultuuri 2,5 µl PUXBF13 ja 2,5 µl pGP704-miniTn7Gm-RloC plasmidi elektroporatsiooni teel. Pärast šokki inkubeerisin rakke 3 tundi. Plaatsin rakud LB agarsöötme (tabel 2) tassile, millele oli lisatud 10 µg/ml Gm. Inkubeerisin rakke üleöö 30 °C juures. Tegin PCR segu kasutades Tn7R109 ja Tn7GImS praimereid (Tabel 3 ja Tabel 4) ja PCRi (Tabel 7) kaheksale üleöö kultuuri kolooniale, et tuvastada, kas Tn7 oli eeldatavasse genoomsesse lookusesse integreerunud. PCRi tulemusi analüüsisin geelelektroforeesiga etiidumbromiidi (0,33 µg/ml) sisaldaval 1%-lisel agarosgeelil, mille katsin 1 x TAE puhvriga (50 mM Trisatsetaat; 1mM EDTA pH 8,2). Kandsin geelile 5 µl igat proovi ja foreesisin 13 minutit 130V juures. DNA fragmentide suuruse hindamiseks kasutasin 2 µl *Thermo Scientific ZipRuler Express DNA Ladder 2* markerit. Tüved, mis andsid 600 aluspaari pikkuse produkti, külvasin edasi. Tüvedel sekveneeriti RloC lookus, et kinnitada selles vigade puudumine.

Tabel 7. Tn7 PCRi programm.

Kordused	Aeg	Temp
1	5 min	98 °C
25	20 sek	98 °C
	20 sek	55 °C
	35 sek	72 °C
1	2 min	72 °C

2.2.7. Plasmidi transformatsioon

Plasmidi transformatsiooniks kasvasin ΔG ja ΔW tüvesid, võrdsustasin nende OD peale saharoosi pesu ja viisin 40 µl rakukultuuri 3 µl 9TT, pKT või pSW plasmidi elektroporatsiooni teel. Pärast šokki inkubeerisin rakke ühe tunni.

2.2.8. Plasmidi kadumise mõõtmine

Plasmidi kadumise mõõtmiseks tegin transformeeritud rakkudest kümnekordse lahjendusrea kuni 10⁻⁶ni. Igast lahjendusest kandsin 5 µl LB agarsöötme tassile, millele oli lisatud 1,5 mg/ml BpD ja LB agarsöötme tassile ning inkubeerisin üleöö 30 °C juures. Lisaks inokuleerisin

transformeeritud rakke LB vedelsöötmesse, mida inkubeerisin üleöö 30 °C loksutil. Mõõtsin ja võrdsustasin üleöö kultuuride ODd 580 nm juures ning kordasin protsessi algusest.

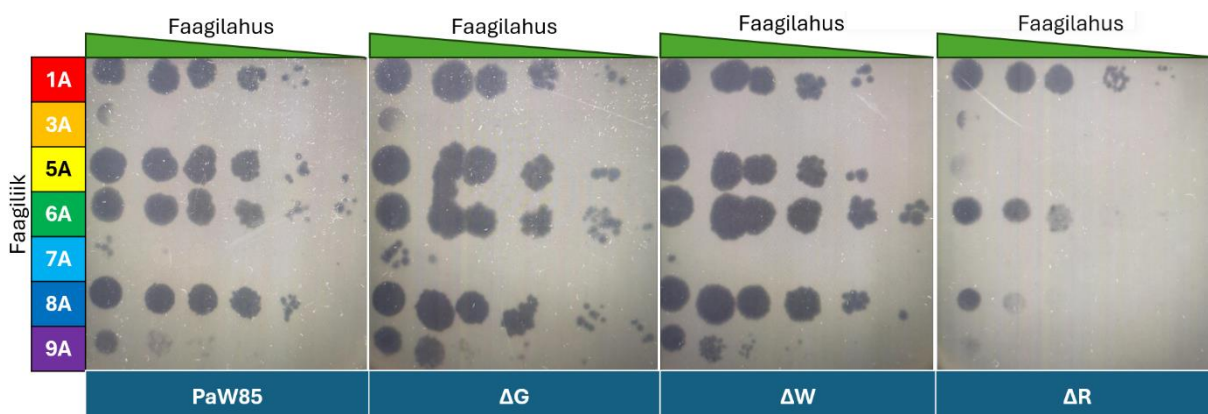
2.3 Tulemused

Laboris, kus töö läbi viidi ennustati, et *Pseudomonas putida* PaW85 tüvi sisaldab 15 faagikaitstesüsteemi, millest hakkasin testima kolme: Gabija, Wadjet ja RloC. Selleks, et nende funktsionaalsust testida, konstrueerisin PaW85 tüvest kolm deletanttüve:

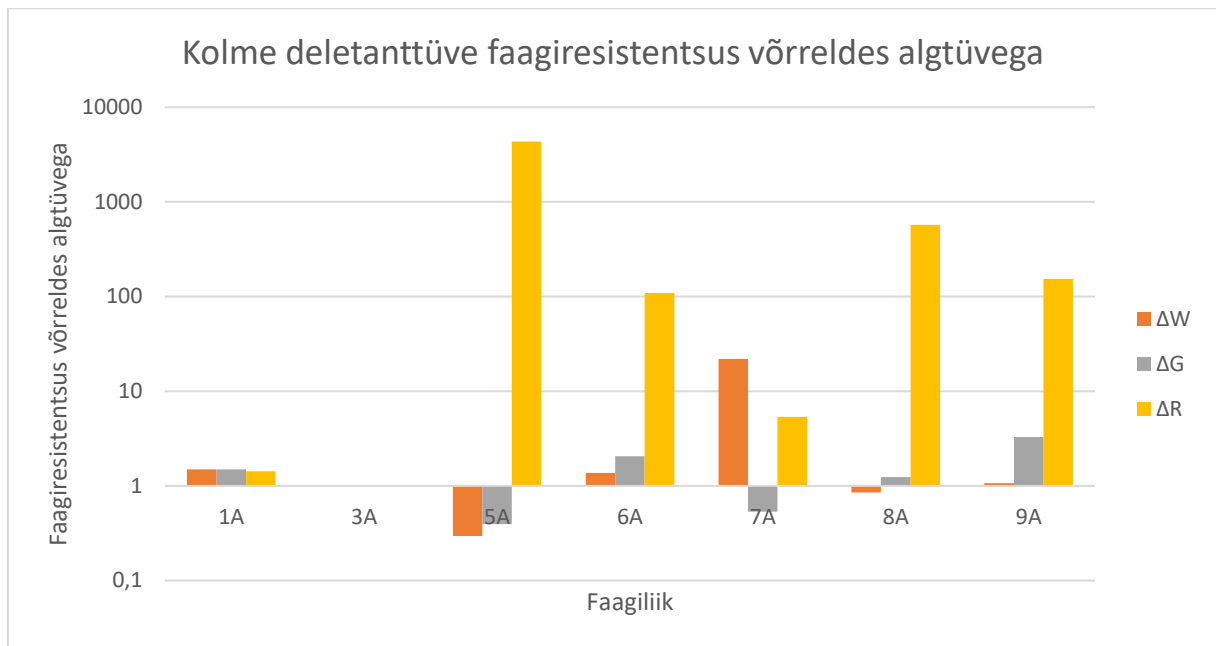
1. tüvi, kus puudub ennustatav kaitstesüsteem Gabija (ΔG);
2. tüvi, kus puudub ennustatav kaitstesüsteem Wadjet (ΔW);
3. tüvi, kus puudub ennustatav kaitstesüsteem RloC (ΔR).

2.3.1. RloC deletanttüve faagiresistentsus üldiselt suurenes võrreldes PaW85 tüvega.

Selleks, et kontrollida, kas süsteemide kustutamisel on mõju *P. putida* faagiresistentsusele, nakatasin PaW85, ΔG , ΔW ja ΔR tüvesid seitsme CEPEST kollektiooni (Brauer et al., 2024) perekonna faagidega (Joonis 2).

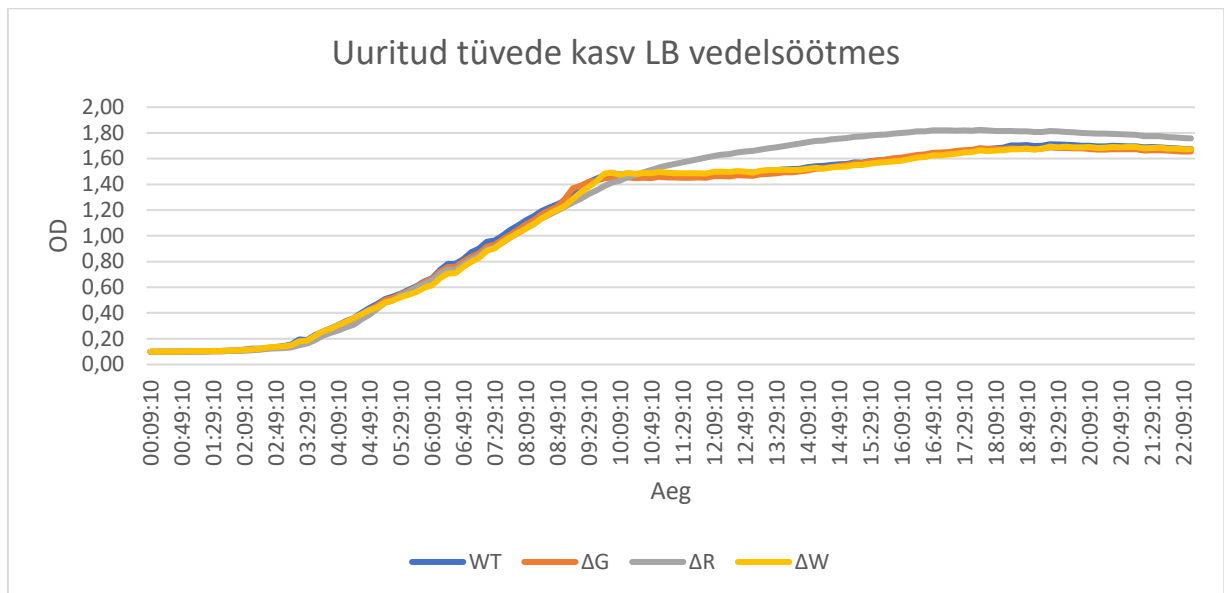


Joonis 2. Algtüve ja kolme ennustatava faagikaitstesüsteemi deletanttüve nakatamine faagidega. Kandsin bakterimurule faagide 10-kordesete lahjenduste reast 1.5 μL tilgad ja inkubeerisin tase temperatuuril 20°C üleöö. Nakatumisefektiivsust hindasin lüüsilaukude tekke järgi. Selgelt tuleb välja ΔR tüves 5A, 6A, 8A ja 9A faagide vähenenud nakatumisefektiivsus. ΔG ja ΔW tüvedes ei ole olulist muutust näha. Kordasin katset 3 korda. Peale kolme korduskatset leidsin iga faagi kohta, kui palju on keskmiselt laike moodustavaid üksuseid milliliitris (LMÜ/ml) algtüves ja deletanttüvedes ning võrdlesin saadud tulemusi, et näha kuidas deletsioon mõjutab faagiresistentsust (Joonis 3).



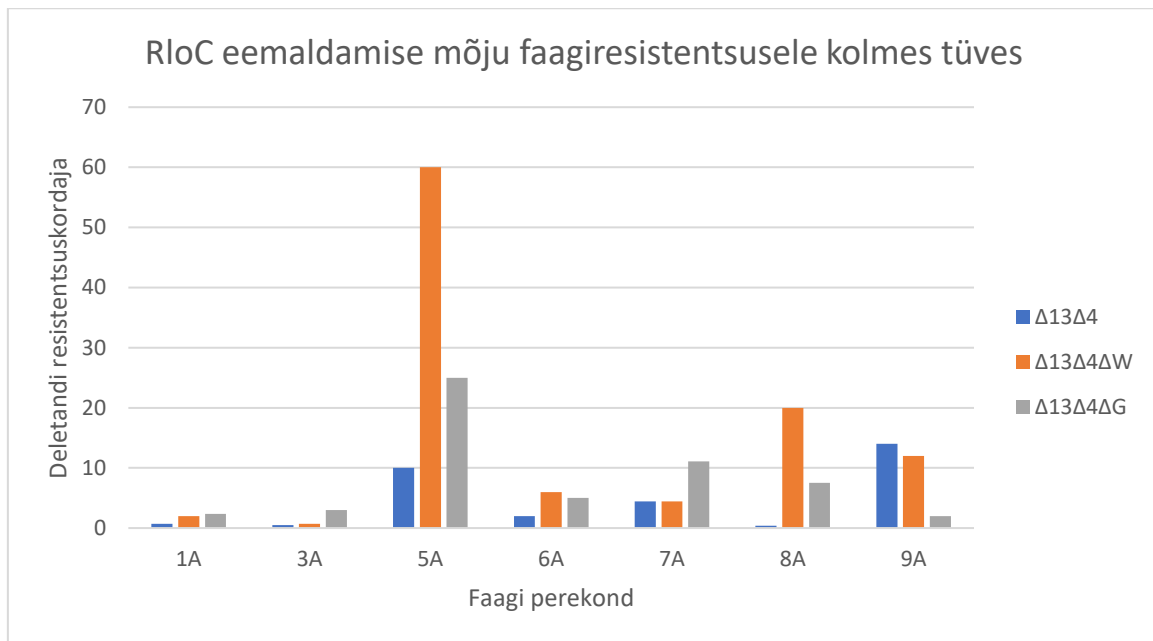
Joonis 3. Kolme ennustatud faagikaitstesüsteemi deletanttüve faagiresistentsus võrreldes algtüvega. Arvutasin iga tüve LMÜ/ml kõikides katsetes. Arvutasin iga tüve LMÜ/ml keskmise kolme katse peale. Arvutasin mitu korda vähem laike moodustavad deletandid võrreldes algtüvega. Selgelt tuleb välja ΔR tüve faagiresistentsuse kasv 5A, 6A, 8A ja 9A faagide suhtes. Eriti hästi on näha faagiresistentsuse kasvu 5A faagi suhtes, kus kasv on üle 1000 kordne. ΔW tüvel on näha kasvanud faagiresistentsust 7A faagi suhtes 22 korda. Kuna 7A faagi LMÜ/ml oli liiga madal (vahepeal 0) usaldusväärsete andmete jaoks, siis seda tulemust edaspidi ei arvestanud. ΔG tüvel ei ole märgata suurt efekti.

Tulemustest nägin, et Wadjeti ja Gabija deletsioon ei omanud suurt efekti aga RloC deletsioon tihti suurendas faagiresistentsust (Joonis 3). Selleks, et kontrollida, kas resistentsuse kasv tuli suurenenud paljunemiskiirusest või vähenenud faagide põhjustatud suremusest mõõtsin tüvede kasvu vedelkultuuris. Kasvukõverate mõõtmise tulemustest ei paistnud olulisi erinevusi (Joonis 4). Sellest järeldasin, et eelnevalt nähtud muutused faagiresistentsuses ei tulene kasvukiiruse erinevusest vaid otseselt RloC puudumisest.



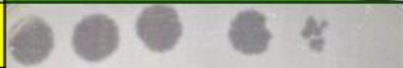
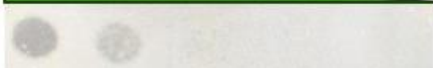

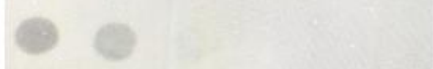
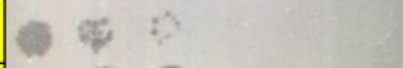
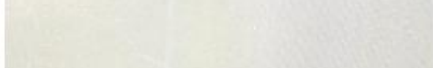

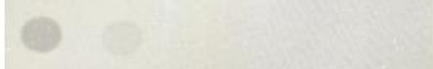

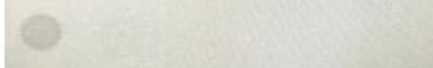





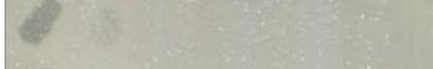

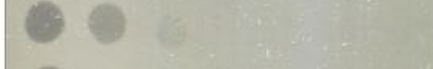



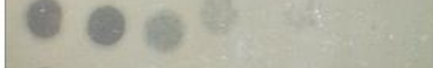

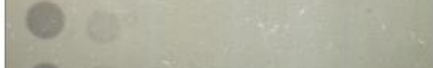

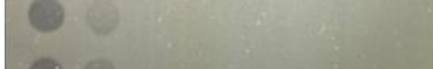
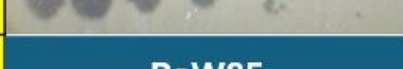

Joonis 4. Uuritavate tüvede kasv vedelsöötmes. Mõõtsin üleöö PaW85, ΔG , ΔR ja ΔW tüve OD muutust vedelsöötmes, et hinnata nende kasvu. Jooniselt on näha, et valdavalt kõik bakterid kasvavad sama kiirelt. RloC deletandi statsionaarse kasvufaas paistab küll olevat natuke kõrgemal, aga ühe mõõtmise põhjal järelduste tegemiseks on see liiga väike muutus.

Kõige suurem erinevus PaW85 tüve ja deletanttüvede kohasuses oli peaaegu läbivalt RloC süsteemi deletandil. Seega otsustasin edaspidi keskenduda RloC deletanttüvele. Kontrolli mõttes võrdlesin teiste laboris olemas olevate RloC deletanttüvede ja neile vastavate algtüvede faagiresistentsust. Tulemustest (Joonis 5) on näha, et endiselt esineb suurenenud resistentsus RloC deletanttüvedes 5A, 6A, 8A ja 9A faagide vastu. Seejuures on resistentsuse erinevus taas kõige suurem 5A faagi puhul. Sama efekt mitmes sõltumatus RloC deletanttüves viitab, et RloC puudumine mõjutab otseselt faagiresistentsust.



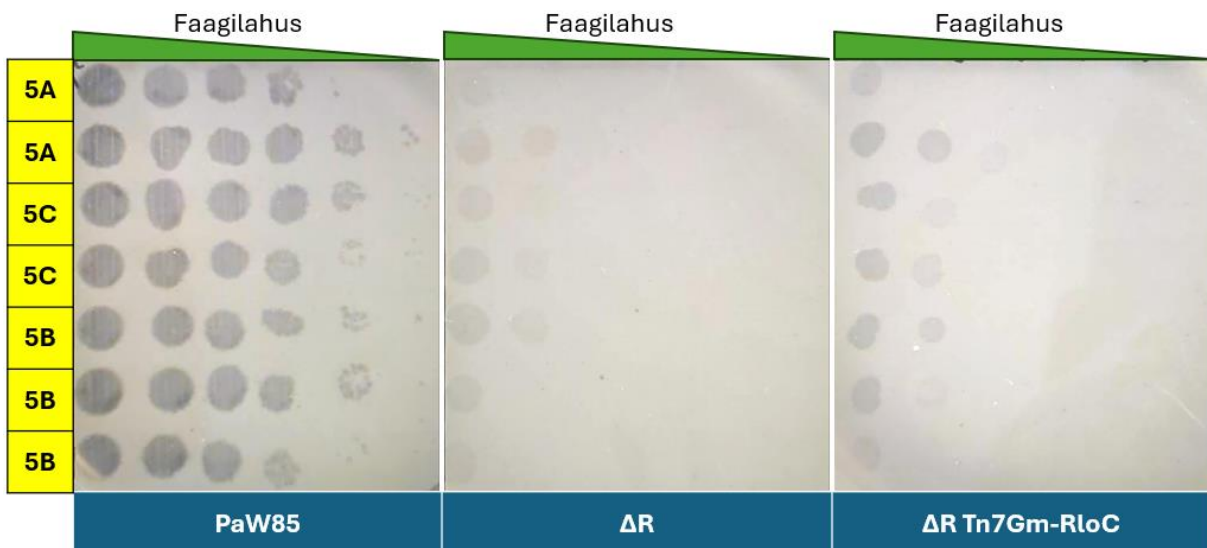
Joonis 5. $\Delta 13\text{T}\Delta 4\Phi$, $\Delta 13\text{T}\Delta 4\Phi\Delta W$, $\Delta 13\text{T}\Delta 4\Phi\Delta G$ ja vastavate RloC deletantide faagiresistentsuse erinevus. Arvutasin iga tüve LMÜ/ml üleöö faagitassi pealt. Leidsin, mitu korda väiksem on deletanttüve LMÜ/ml. Katset tehti üks kord.

Kuna ka siin katses oli RloC deletandi resistentsus kõige rohkem suurenenud 5. perekonna faagi vastu, otsustasin kontrollida, kas seaduspära kehtib ka teiste 5. perekonna faagide puhul. Selleks mõõtsin nakatamisefektiivsust 14ne viienda perekonna faagiga (Joonis 6).

Faagitüvi		Faagilahus	Faagilahus
ErraM	5A		
ErraS	5A		
Vanda	5A		
Hammaste-2	5C		
BotAed	5C		
Kompost-1	5C		
Luutsna-3	5B		
Pori-2	5B		
Illi-1	5B		
Mora-3	5B		
Konnatiik	5B		
Kurenuki	5B		
Kaagvere	5B		
Ihaste	5B		
Faagiliik		PaW85	ΔR

Joonis 6. PaW85 ja RloC deletanttüve faagitassid. Kandsin bakterimurule faagide 10-kordesete lahjenduste reast 1.5 µL tilgad ja inkubeerisi tase temperatuuril 20°C üleöö. Nakatumisefektiivsust hindasin lüüsilaukude tekke järgi. Selgelt on näha, et RloC deletsioon mõjutab kõikide katses olnud faagide nakkavust. Katset tehti 2 korda.

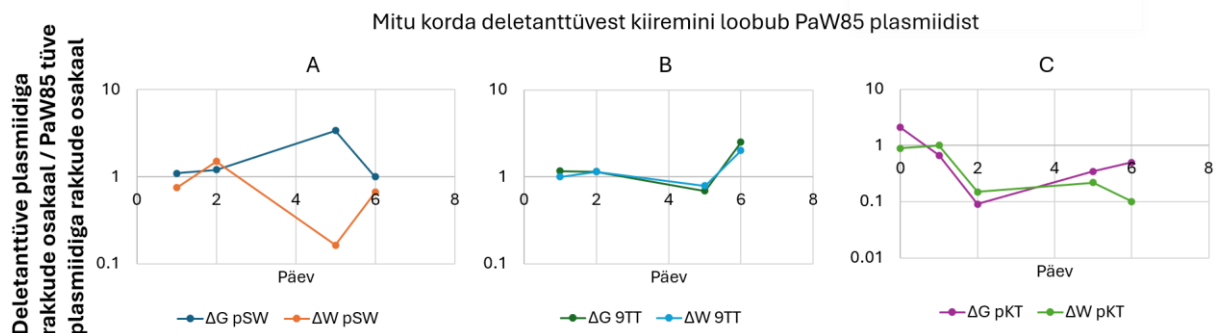
Tulemustest on selgelt näha, et RloC deletanttüve resistentsus kasvab kõikide katses olnud 5nda perekonna faagide vastu. Selleks, et veenduda, kas muutus oli tingitud RloCst või millestki muust, viisin RloC deletsiooni komplementatsiooniks RloC deletsioontüve minitransposooni koosseisus *rloC* geeni koos ~500 aluspaari pikkuse geenieelse alaga. Saadud komplementatsioonitüve, PaW85 ja RloC deletant-tüve nakatasin 5nda perekonna faagidega. Tulemustest oli näha, et minitransposooniga RloC komplementatsioonil PaW85 fenotüüp ei taastunud (Joonis 7).



Joonis 7. PaW85 tüve, ΔR ja ΔR -Tn7Gm-RloC tüve faagitassid. Kandsin bakterimurule faagide 10-kordesete lahjenduste reast 1.5 μL tilgad ja inkubeerisi tasse temperatuuril 20°C üleöö. Nakatumisefektiivsust hindasin lüüsilaukude tekke järgi. Selgelt on näha, et metsiktüüpi tunnus ei taastunud. Katset tehti üks kord.

2.3.2. Wadjeti ega Gabija deletsioon ei mõjutanud oluliselt plasmiidide stabiilsust.

Wadjet ega Gabija deletandid ei näidanud erilist efekti faagikaitses. Kuna Wadjeti homoloogide puhul on eelnevalt näidatud plasmiidide vastast efekti ja Gabija homoloogidel on nukleasne aktiivsus, otsustasin katsetada, kas nad omavad efekti plasmiiditõrjes (Doron et al., 2018; Cheng et al., 2021; 2023). RloC on ennustatavalt antikoodon nukleas ja seega ei ole alust arvata, et ta plasmiidide stabiilsusele mõjuks. Selleks, et tuvastada efekt plasmiiditõrjes, transformeerisin esiteks PaW85, Δ Wadjet ja Δ Gabija tüvedesse erinevaid antibiootikumiresistentsust kandvaid plasmide ja kasvasin neid ilma selektsioonita rikkas vedelsöötmes. Seejärel tegin teatud aja tagant väljakülve antibiootikumiga ja antibiootikumita söötmetele, et määrata plasmidi kandvate rakkude osakaal igas kultuuris. Saadud osakaale võrdlesin omavahel, et näha kui palju paremini säilisid plasmiidid deletanttüvedes võrreldes PaW85 tüvega (Joonis 8). Deletanttüvedes ei esinenud olulist efekti plasmidi säilimises.



Joonis 8. Erinevate plasmiidide säilimine deletanttüvedes võrreldes PaW85 tüvega. Tegin mitme päeva jooksul LB vedelsöötmes kasvavast plasmidi kandvast kultuurist 10-kordse lahjendusreana väljakülve LB agarsöötme ja 1.5 mg/ml BP LB agarsöötme tassidele. Inkubeerisin tasse üleöö ja leidsin neilt kolooniaid moodustaid ühikuid (KMÜ)/ml. Seejärel leidsin plasmiidiga rakkude (kasvavad BP tassil) ja kõikide rakkude (kasvavad LB tassil) KMÜ/ml suhte, mis näitab kui kiiresti plasmid kaob. Saadud loobumiskiirustest leidsin mitu korda kiiremini deletanttüvest loobub PaW85 plasmiidist. Tulemused ei näidanud piisavalt suurt erinevust, et ühe korduskatse järgi midagi järeldada saaks.

2.4 Arutelu

2.4.1. RloC langetab faagiresistentsust

Faagiresistentsuse mõõtmine näitas, et arvatava kaitsesüsteemi RloC deletsioon vastupidiselt oodatule hoopis suurendab P. putida faagikaitset. Võib oletada, et katses olnud faagid kasutavad kuidagi ära RloC kaitsesüsteemi oma kohasuse tõstmiseks. Kirjanduses on näiteid selle kohta, et faagid suudavad faagikaitsesüsteemide efektiivsust pärssida. Näiteks PrrC, RloC kauge homoloog, on faagikaitsesüsteem, mille vastu on osadel T4 faagidel välja kujunenud resistentsus (Davidov ja Kaufmann, 2008; Amitsur, Levitz, ja Kaufmann, 1987). On näiteid ka faagidest, kes modifitseerivad tRNAsid vältides sel viisil RloC laadsete süsteemide põhjustatavat translatsiooni inhibitsiooni (van den Berg et al., 2023). Lisaks on võimalik, et bakterilise metabolismi maha surumiseks aktiveerib faag ise mingi valguga RloC. Sellise valguga tuvastamiseks tuleks ekspresseerida bakteris puhastusmärgisega RloC-d, eraldada see rakulüsaadist ja RloC-ga seondunud ja kaaspuhastunud valgud identifitseerida mass-spektromeetriaga. Selleks, et kontrollida RloC rolli 5. perekonna faagide suurenenud infektsioonis, saab teha laborievolutsioonikatse PaW85 tüvega. Leida 5. perekonna vastu suurenenud resistentsusega mutandid ja kontrollida sekveneerimise teel, kui tihti on mutatsioon toimunud *rloC* geenis.

Huvitav korrelatsioon, mis RloC eemaldamise mõju uurimises välja paistis, oli Wadjeti deletsiooni positiivne mõju ΔR tüve faagiresistentsusele. See võib viidata, et Wadjet, olgugi et minu töös sellel süsteemil efekti ei tuvastatud, on siiski mingitel tingimustel aktiivne ja selle mõju võib olla kas otseselt või kaudselt RloC-ga seotud. Need on küll väga esialgsed tulemused ja järelduste tegemiseks on vaja süsteemide võimalikku interaktsiooni põhjalikumalt uurida.

Lisaks täheldasime, et RloC komplementatsioon ΔR tüvve ei taastanud metsiktüüp-tunnust, kuigi sekveneerimine kinnitas, et minitransposooni koosseisus olevas *rloC* konstruktsioonis mutatsioone ei olnud. See viitab, et minitransposooni lookuses ei ole *rloC* regulatsioon identne natiivse lookusega. Võib olla, et *rloC* regulaatorala paikneb geenist nii kaugel, et see jäi komplementatsioonikonstruktsioonist väljapoole ja uues lookuses ei ole RloC transkriptsioon piisavalt intensiivne.

2.4.2. Wadjet ja Gabija ei oma olulist efekti faagikaitstes ega plasmiidistabiilsuses

Faagiresistentsuse mõõtmise näitas väga väikeseid muutuseid Wadjeti ja Gabija deletsioonil bakteri faagikaitstes ja plasmiidikaitstes. Wadjeti puhul pole faagiresistentsuse puudumine üllatav, kuna ka varasemates katsetes pole seda nähtud (Doron et al., 2018).

Plasmiidistabiilsusele mõju puudumine polnud ka üllatav, kuna testitud plasmiide kasutatakse ilma probleemideta *P. putida*ga töötades. Kui tahta veenduda, kas PaW85 tüve Wadjet kaitstesüsteemil on üldse võimeline plasmiide lõikama, tuleks seda teha üleekspresiooni teel. Sel teel saab näha, kas suurem kogus Wadjeti-valke tekitaks mõõdetava muutuse plasmiidistabiilsuses. Gabijal ei ole ennustatud ega nähtud mõju plasmiidide stabiilsusele, nii et selle puudumine antud katses ei olnud üllatav. Kuna Gabija puhul on ennustatud osalust faagiresistentsuses, siis oli natuke üllatav, et efekti ei olnud näha (Doron et al., 2018).

Gabija, Wadjet ja RloC olemasolu PaW85-s, mis on metsiktüüpi tüvi, annab alust arvata, et looduses nad tõstavad tüve kohasust, aga ei kinnita seda täielikult, kuna tegu võib olla inaktiivsete geenidega, millest pole piisava surve tõttu veel loobutud. Kõik faagikatsed viidi läbi faagidega, mis olid loodusest eraldatud tüvega, millel olid Gabija, Wadjet ja RloC kaitstesüsteemid olemas (Brauer et al., 2024). Tõenäosus, et faagikogusse oleks sattunud faag, mida mõnigi neist kaitstesüsteemidest mõjutab on väga väike. Samas siiski saadi nende tüvedega faage loodusest kätte, mis tähendab, et juhul kui need süsteemid siiski omavad aktiivsust, on CEPEST kogu faagidel moodused nendest kõrvale hiilimiseks. Kirjanduses on viiteid valgule, mis inhibeerib Gabija kaitstesüsteemi aktiivsust (Yirmiya et al., 2024), aga CEPEST faagikollektsioonist pole seda siiani otsitud. Lisaks oleks huvitav analüüsida faagide genome, otsimaks konserveerunud järjesusi, mis võiksid potentsiaalselt aidata Wadjet, RloC ja Gabija vastu. Selleks, et veenduda RloC, Gabija ja Wadjeti efektiivsuses *P. putida* PaW85 tüve faagikaitstes, tuleks katset alustada deletanttüvedega loodusest faagide eraldamisest. Sel teel saadud faagidega tuleks läbi viia faagi nakkuvuse mõõtmise katse PaW85 tüve ja deletant tüve vahel. Nendest tulemustest saaks järeldada, kas looduses pakuvad Gabija, Wadjet ja RloC *P. putida*-le faagide vastu kaitset.

KOKKUVÕTE

Bakterid ja faagid on pidevas olelusvõitluses, mille tõttu on mõlemal välja arenenud palju süsteeme enda kaitsmiseks ja teise tapmiseks. Nendest ilma jäämine oleks laastav ja seetõttu on vastastikune võidurelvastumine pidevalt toimuv protsess.

Pseudomonas putida on keskkonnabakter, keda kasutatakse laialdaselt bioremedatsiooniks ja biosünteesiks. Bakterist maksimaalse kasu saamiseks on palju tegeletud genoomi optimeerimisega. Sellega kaasneb aga bakterile oht ilma jääda oma faagikaitstesüsteemidest. Vältimaks sellist olukorda üritasin selles töös tuvastada kolme ennustatava faagikaitstesüsteemi (Gabija, RloC, Wadjet) efektiivsust. Tulemused osutusid ootamatuks, sest üks ennustatav faagikaitstesüsteem, RloC, hoopis suurendas faagitundlikust. Eriti selgelt tuli efekt välja 5. perekonna faagide puhul. Wadjet ja Gabija seevastu ei paistnud mõjutavat faagiresistentsust. Samuti puudus neil efekt plasmiidide stabiilsusele. Selline tulemus oli üllatav eriti Wadjetil, sest eelnevalt on näidatud ta homologidel plasmiidivastast aktiivsust. Faagikaitse puudumine testitud süsteemidel võib olla tingitud katses kasutatud faagide isoleerimiseks kasutatud tüvest, millel olid RloC, Wadjet ja Gabija kaitstesüsteemid olemas. RloC tingitud kasv faagitundlikuses võib viidata süsteemi ära kasutamisele faagide poolt. Seega, kuigi *Pseudomonas putida* genoomi optimeerimine võib suurendada selle kasulikkust bioremedatsioonil ja biosünteesil, tuleb olla ettevaatlik, et mitte ohustada bakteri loomulikku kaitset faagide eest. Töö tulemused näitavad, et faagikaitstesüsteemide mõistmine on keeruline ja ettearvamatu, eriti kui arvestada faagide võimet neid süsteeme ära kasutada. Edasised uuringud peaksid keskenduma sellele, kuidas optimeerida *Pseudomonas putida* genoomi, säilitades samal ajal selle võime end faagide eest kaitsta. See nõuab põhjalikku mõistmist nii bakterite kui ka faagide bioloogiast ning nende vahelisest dünaamilisest suhtest.

Testing of predicted phage defense systems in *Pseudomonas putida*

Joosep Jagomägi

SUMMARY

Phages are viruses that infect bacteria, leading to the evolution of diverse defense systems. *Pseudomonas putida*, an environmental bacterium with potential in bioremediation and biosynthesis, is being genetically optimized, which may inadvertently remove some phage defense systems. To prevent that it should be determined which genes play a role in bacterial defense.

The thesis tests three predicted defense systems in the *Pseudomonas putida* PaW85 strain. The results suggest that RloC, contrary to expectations, increases phage sensitivity, especially for 5th family phages. Wadjet and Gabija showed minimal changes in phage resistance and plasmid protection. The lack of phage resistance of Wadjet was not surprising, as it has not been seen in previous studies. The absence of effect on plasmid stability of Wadjet and Gabija was also expected, as the tested plasmids are used without problems when working with *P. putida*.

The presence of Gabija, Wadjet, and RloC in PaW85 suggests they may increase fitness. All phage tests were carried out with phages isolated from nature with PaW85 strain, which had Gabija, Wadjet, and RloC defense systems. To verify the effectiveness of RloC, Gabija, and Wadjet in *P. putida* PaW85 strain phage defense, the test should start with a strains devoid of these systems used for phage isolation from nature. Then it can be determined whether Gabija, Wadjet, and RloC provide *P. putida* with protection against phages in nature.

TÄNUAVALDUSED

Soovin tänada Milvi Sinirohtu kõikide puhaste katseklaaside eest ja Andres Ainelot rahuliku suhtumise, muheda olemise ja perfektse juhendamise eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Akkaya, Özlem, Danilo R. Pérez-Pantoja, Belén Calles, Pablo I. Nickel, ja Victor de Lorenzo. (2018). The Metabolic Redox Regime of *Pseudomonas Putida* Tunes Its Evolvability towards Novel Xenobiotic Substrates. *bioRxiv*.
- Amitsur, M, R Levitz, ja G Kaufmann. (1987). Bacteriophage T4 anticodon nuclease, polynucleotide kinase and RNA ligase reprocess the host lysine tRNA. *The EMBO Journal* 6 (8): 2499–2503.
- Aparicio, Tomás, Víctor de Lorenzo, ja Esteban Martínez-García. (2019). Improved Thermotolerance of Genome-Reduced *Pseudomonas Putida* EM42 Enables Effective Functioning of the PL/cl857 System. *Biotechnology Journal* 14 (1): 1800483.
- Bayley, Susan A., Clive J. Duggleby, Michael J. Worsey, Peter A. Williams, Kimber G. Hardy, ja Paul Broda. (1977). Two Modes of Loss of the Tol Function from *Pseudomonas Putida* Mt-2. *Molecular and General Genetics MGG* 154 (2): 203–4.
- Berg, Daan F van den, Baltus A van der Steen, Ana Rita Costa, ja Stan JJ Brouns. (2023). Phage tRNAs evade tRNA-targeting host defenses through anticodon loop mutations. *eLife* 12 (juuni):e85183.
- Brauer, Age, Sirli Rosendahl, Anu Kängsep, Alicja Cecylia Lewańczyk, Roger Rikberg, Rita Hõrak, ja Hedvig Tamman. (2024). Isolation and Characterization of a Phage Collection against *Pseudomonas Putida*. *bioRxiv*.
- Cheng, Rui, Fengtao Huang, Xueling Lu, Yan Yan, Bingbing Yu, Xionglue Wang, ja Bin Zhu. (2023). Prokaryotic Gabija complex senses and executes nucleotide depletion and DNA cleavage for antiviral defense. *Cell Host & Microbe* 31 (8): 1331-1344.e5.
- Cheng, Rui, Fengtao Huang, Hui Wu, Xuelin Lu, Yan Yan, Bingbing Yu, Xionglue Wang, ja Bin Zhu. (2021). A nucleotide-sensing endonuclease from the Gabija bacterial defense system. *Nucleic Acids Research* 49 (9): 5216–29.
- Davidov, Elena, ja Gabriel Kaufmann. (2008). RloC: A Wobble Nucleotide-Excising and Zinc-Responsive Bacterial tRNase. *Molecular Microbiology* 69 (6): 1560–74.
- Deep, Amar, Yajie Gu, Yong-Qi Gao, Kaori M. Ego, Mark A. Herzik, Huilin Zhou, ja Kevin D. Corbett. (2022). The SMC-Family Wadjet Complex Protects Bacteria from Plasmid Transformation by Recognition and Cleavage of Closed-Circular DNA. *Molecular Cell* 82 (21): 4145-4159.e7.
- Doron, Shany, Sarah Melamed, Gal Ofir, Azita Leavitt, Anna Lopatina, Mai Keren, Gil Amitai, ja Rotem Sorek. (2018). Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. *Science* 359 (6379): eaar4120.
- Duncan-Lowey, Brianna, Nitzan Tal, Alex G. Johnson, Shaun Rawson, Megan L. Mayer, Shany Doron, Adi Millman, et al. (2023). Cryo-EM structure of the RADAR supramolecular anti-phage defense complex. *Cell* 186 (5): 987-998.e15.
- Gabija. s.a. DefenseFinder Webservice and Knowledge Base. Vaadatud 20. mai 2024. <https://defensefinder.mdmlab.fr/wiki/defense-systems/gabija>.
- Gao, Linyi Alex, Max E. Wilkinson, Jonathan Strecker, Kira S. Makarova, Rhiannon K. Macrae, Eugene V. Koonin, ja Feng Zhang. (2022). Prokaryotic Innate Immunity via Pattern Recognition of Conserved Viral Proteins. *Science (New York, N.Y.)* 377 (6607): eabm4096.
- Georjon, Héloïse, ja Aude Bernheim. (2023). The Highly Diverse Antiphage Defence Systems of Bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 21 (10): 686–700.
- Guegler, Chantal K., ja Michael T. Laub. (2021). Shutoff of host transcription triggers a toxin-antitoxin system to cleave phage RNA and abort infection. *Molecular cell* 81 (11): 2361-2373.e9.

- Güemes, Ana Georgina Cobián, Merry Youle, Vito Adrian Cantú, Ben Felts, James Nulton, ja Forest Rohwer. (2016). Viruses as Winners in the Game of Life. *Annual Review of Virology* 3 (Volume 3, 2016): 197–214.
- Herrmann, Heidrun, Dieter Janke, Synnöve Krejsa, ja Michael Roy. (1988). In Vivo Generation of R68.45-pPGH1 Hybrid Plasmids Conferring a Phl+ (Meta Pathway) Phenotype. *Molecular and General Genetics MGG* 214 (1): 173–76.
- Kim, Jisun, ja Woojun Park. (2014). Oxidative Stress Response in *Pseudomonas Putida*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (16): 6933–46.
- Kivisaar, Maia. (2020). Narrative of a versatile and adept species *Pseudomonas putida*. *Journal of Medical Microbiology* 69 (3): 324–38.
- Klaiman, Daniel, Emmanuelle Steinfeld-Kohn, Ekaterina Krutkina, Elena Davidov, ja Gabriel Kaufmann. (2012). The wobble nucleotide-excising anticodon nuclease RloC is governed by the zinc-hook and DNA-dependent ATPase of its Rad50-like region. *Nucleic Acids Research* 40 (17): 8568–78.
- LeRoux, Michele, Sriram Srikant, Gabriella I. C. Teodoro, Tong Zhang, Megan L. Littlehale, Shany Doron, Mohsen Badiie, Anthony K. L. Leung, Rotem Sorek, ja Michael T. Laub. (2022). The DarTG Toxin-Antitoxin System Provides Phage Defence by ADP-Ribosylating Viral DNA. *Nature Microbiology* 7 (7): 1028–40.
- Liu, Honglu, Yaping Chen, Yiting Zhang, Wanwan Zhao, Hongfu Guo, Siqi Wang, Wenjie Xia, Shufang Wang, Ruihua Liu, ja Chao Yang. (2022). Enhanced production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* KT2440 by a combination of genome streamlining and promoter engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* 209 (juuni):117–24.
- Makarova, Kira S., Yuri I. Wolf, Sagi Snir, ja Eugene V. Koonin. (2011). Defense Islands in Bacterial and Archaeal Genomes and Prediction of Novel Defense Systems ▽. *Journal of Bacteriology* 193 (21): 6039–56.
- Martínez-García, Esteban, ja Víctor de Lorenzo. (2011). Engineering Multiple Genomic Deletions in Gram-Negative Bacteria: Analysis of the Multi-Resistant Antibiotic Profile of *Pseudomonas Putida* KT2440. *Environmental Microbiology* 13 (10): 2702–16.
- Nikel, Pablo I., ja Víctor de Lorenzo. (2018). *Pseudomonas putida* as a functional chassis for industrial biocatalysis: From native biochemistry to trans-metabolism. *Metabolic Engineering, Metabolic Engineering Host Organism Special Issue*, 50 (november):142–55.
- Ofir, Gal, Ehud Herbst, Maya Baroz, Daniel Cohen, Adi Millman, Shany Doron, Nitzan Tal, et al. (2021). Antiviral Activity of Bacterial TIR Domains via Immune Signalling Molecules. *Nature* 600 (7887): 116–20.
- Payne, Leighton J, Sean Meaden, Mario R Mestre, Chris Palmer, Nicolás Toro, Peter C Fineran, ja Simon A Jackson. (2022). PADLOC: a web server for the identification of antiviral defence systems in microbial genomes. *Nucleic Acids Research* 50 (W1): W541–50.
- Penner, Michal, Ilan Morad, Larry Snyder, ja Gabriel Kaufmann. (1995). Phage T4-coded Stp: Double-Edged Effector of Coupled DNA and tRNA-Restriction Systems. *Journal of Molecular Biology* 249 (5): 857–68.
- RloC. s.a. DefenseFinder Webservice and Knowledge Base. Vaadatud 20. mai 2024. <https://defensefinder.mdmlab.fr/wiki/defense-systems/rloc>.
- Roca, Amalia, Paloma Pizarro-Tobías, Zulema Udaondo, Matilde Fernández, Miguel A. Matilla, M. Antonia Molina-Henares, Lázaro Molina, Ana Segura, Estrella Duque, ja Juan-Luis Ramos. (2013). Analysis of the Plant Growth-Promoting Properties Encoded by the Genome of the Rhizobacterium *Pseudomonas Putida* BIRD-1. *Environmental Microbiology* 15 (3): 780–94.

- Rousset, François, Florence Depardieu, Solange Miele, Julien Dowding, Anne-Laure Laval, Erica Lieberman, Daniel Garry, Eduardo P.C. Rocha, Aude Bernheim, ja David Bikard. (2022). Phages and their satellites encode hotspots of antiviral systems. *Cell Host & Microbe* 30 (5): 740-753.e5.
- Suttle, C. A. (1994). The Significance of Viruses to Mortality in Aquatic Microbial Communities. *Microbial Ecology* 28 (2): 237–43.
- Zhang, Tong, Hedvig Tamman, Kyo Coppieters 't Wallant, Tatsuaki Kurata, Michele LeRoux, Sriram Srikant, Tetiana Brodiazhenko, et al. (2022). Direct Activation of a Bacterial Innate Immune System by a Viral Capsid Protein. *Nature* 612 (7938): 132–40.
- Zong, Qiu-Jin, Tao Xu, He Liu, Li Xu, Ren-Kuan Zhang, Bing-Zhi Li, Zhi-Hua Liu, ja Ying-Jin Yuan. (2022). Microbial Valorization of Lignin to Bioplastic by Genome-Reduced *Pseudomonas Putida*. *Frontiers in Microbiology* 13 (mai).
- Tal, Nitzan, Adi Millman, Avigail Stokar-Avihail, Taya Fedorenko, Azita Leavitt, Sarah Melamed, Erez Yirmiya, et al. (2022). Bacteria Deplete Deoxynucleotides to Defend against Bacteriophage Infection. *Nature Microbiology* 7 (8): 1200–1209.
- Tesson, Florian, Alexandre Hervé, Ernest Mordret, Marie Touchon, Camille d’Humières, Jean Cury, ja Aude Bernheim. (2022). Systematic and Quantitative View of the Antiviral Arsenal of Prokaryotes. *Nature Communications* 13 (1): 2561.
- Tock, Mark R, ja David TF Dryden. (2005). The biology of restriction and anti-restriction. *Current Opinion in Microbiology*, Host--microbe interactions: fungi / edited by Howard Bussey · Host--microbe interactions: parasites / edited by Artur Scherf · Host--microbe interactions: viruses / edited by Margaret CM Smith, 8 (4): 466–72.
- Vassallo, Christopher N., Christopher R. Doering, Megan L. Littlehale, Gabriella I. C. Teodoro, ja Michael T. Laub. (2022). A functional selection reveals previously undetected anti-phage defence systems in the E. coli pangenome. *Nature Microbiology* 7 (10): 1568–79.
- Williams, Peter A., ja Keith Murray. (1974). Metabolism of Benzoate and the Methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: Evidence for the Existence of a TOL Plasmid. *Journal of Bacteriology* 120 (1): 416–23.
- Xu, Yuanyuan, ja Zhanjun Li. (2020). CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 18 (september):2401–15.
- Yirmiya, Erez, Azita Leavitt, Allen Lu, Adelyn E. Ragucci, Carmel Avraham, Ilya Osterman, Jeremy Garb, et al. (2024). Phages Overcome Bacterial Immunity via Diverse Anti-Defence Proteins. *Nature* 625 (7994): 352–59.

Defensefinder andmebaas (vaadatud 27.05.2024)

Gabija – <https://defensefinder.mdmlab.fr/wiki/defense-systems/gabija>

RloC – <https://defensefinder.mdmlab.fr/wiki/defense-systems/rloc>

Wadjet – <https://defensefinder.mdmlab.fr/wiki/defense-systems/wadjet>

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Joosep Jagomägi,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose
Pseudomonas putida ennustatavate faagikaitstesüsteemide testimine,

mille juhendaja on Andres Ainelu,

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 27.05.2026 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.

Joosep Jagomägi

27.05.2024