

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

ppGpp *Pseudomonas putida* faagivastases kaitstes

Bakalaureusetöö

Bioloogia ja elustiku kaitse

12 EAP

Elise Mägi

Juhendaja PhD Hedvig Tamman

TARTU 2023

INFOLEHT

ppGpp *Pseudomonas putida* faagivastases kaitses

Bakterid peavad elu jooksul toime tulema väga erinevate stressitingimustega, teiste seas bakteriofaagide (faagide) rünnakutega. Paljude stressitingimuste üleelamiseks on bakteritel vajalik poomisvastus, mille vallandab alarmoonmolekul ppGpp. Lisaks teistele stressiolukordadele on ppGpp vahendatud poomisvastuse olulisust täheldatud ka bakteri kaitses faagirünnakute vastu, kuid selle täpsed mehhanismid pole veel selged. Samuti pole seda *Pseudomonas putida* puhul varasemalt uuritud, kuna varasemalt on isoleeritud vaid üksikuid seda bakterit nakatavaid faage. Käesoleva töö eesmärk oli faagide ppGpp-sõltuvust uurides välja selgitada ppGpp ja ühtlasi ka poomisvastuse mõju *P. putida* faagitaluvusele. Tulemused näitavad, et ppGpp-l on faagiresistentsuses oluline roll, suurendades *P. putida* faagitaluvust 74% uuritud faagide korral ning osade faagide puhul kuni ligi 100 korda võrreldes ppGpp deletsioontüvega. Veel näitavad tulemused, et ppGpp-sõltuvuse tugevus on varieeruv ning erineb uuritud faagidel tugevalt. Samuti ilmnes poomisvastuse kaitse erinev tugevus tahkel ja vedelas söötmes.

Märksõnad: *Pseudomonas putida*, faagiresistentsus, ppGpp, poomisvastus

CERCS kood: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

ppGpp in *Pseudomonas putida*'s phage defense

Bacteria must manage living in various stressful conditions during their lifetime, bacteriophage (phage) infection among them. The stringent response, induced by the alarmone molecule ppGpp, is needed to survive many of those harmful conditions. In addition to being crucial in other stressful situations, ppGpp-induced stringent response has also been observed to protect bacteria against bacteriophage infection, though the exact mechanisms of the process have yet to be uncovered. This phenomenon has not yet been explored in *Pseudomonas putida* due to lack of phages known to infect it. The aim of this study was to ascertain the effect ppGpp, and thus stringent response, have on the phage resistance of *P. putida*, by studying the ppGpp-dependency of phages. The results show that ppGpp has an important role in phage resistance, increasing *P. putida*'s phage tolerance against 74% of tested phages and for some, as much as 100-fold compared to the ppGpp deletion strain. Additionally, the results show a strong variability in the ppGpp-dependency of the studied phages. Also, the protective effect of the bacterial stringent response differed depending on whether bacteria were grown on solid medium or in liquid culture.

Keywords: *Pseudomonas putida*, phage resistance, ppGpp, stringent response

CERCS code: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Sisukord

INFOLEHT.....	2
Kasutatud lühendid	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Faagid ja bakteri kaitsesüsteemid	7
1.1.1. Bakteriofaagid	7
1.1.2. Bakterite faagivastased kaitsesüsteemid	7
1.2. Poomisvastus ja (p)ppGpp	8
1.2.2. (p)ppGpp akumulatsioonimõju bakteri rakuliste mehhanismidele	9
1.2.3. (p)ppGpp mõju antibiootikumitaluvusele ja virulentsusele	10
1.3. (p)ppGpp roll faagiresistentsuses	11
1.4. <i>Pseudomonas putida</i> faagivastane kaitse	12
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	13
2.1. Töö eesmärgid	13
2.2. Materjal ja meetodika	14
2.2.1. Kasutatud söötmed ja bakteritüved.....	14
2.2.2. Kasutatud faagid.....	15
2.2.3. Poomisvastuse puudumise mõju uurimine bakterite faagitaluvusele tahkel söötmel.....	17
2.2.4. Poomisvastuse puudumise mõju uurimine bakterite faagitaluvusele vedelsöötmes	17
2.3. Tulemused	19
2.3.1. Poomisvastuse puudumise mõju bakterite faagitaluvusele tahkel söötmel	19
2.3.1.1. ppGpp pärsib G1 ja G9 perekonna faagide nakatamisefektiivsust	20
2.3.1.2. Suuri lüüsilaike moodustavad faagid perekondadest G2 ja G4 sõltuvad ppGpp-st vähe .	21
2.3.1.3. ppGpp ei avalda mõju profaag-tundlike G3 perekonna faagide nakatamisefektiivsusele	23
2.3.1.4. G5 perekonna faagide nakatamisefektiivsus on enamasti ppGpp poolt pärstitud	23
2.3.1.5. Perekonnasisene ppGpp-sõltuvuse varieeruvus on G6, G7 ja G8 perekondades väike....	24
2.3.2. Poomisvastuse mõju bakterite faagitaluvusele vedelsöötmes.....	26
2.3.2.1. ppGpp kaitseb G1 perekonna faagide Kõpa 4 ja Kassivere 1 nakkuse vastu vedelsöötmes suuresl määral	27
2.3.2.2. G2 perekonna faagid nakatavad vedelsöötmes poomisvastuse mutanti efektiivsemalt kui metsiktüve	28
2.3.2.3. G3 perekonna bakteriofaag Aura vajab efektiivsemaks nakatamiseks poomisvastuse olemasolu.....	28
2.3.2.4. ppGpp kaitseb G5 perekonna bakteriofaagide Erra muld S1 ja Laguja oja 2 vastu vedelsöötmes vaid vähesel määral.....	29
2.3.2.5. ppGpp mõjutab G9 perekonna bakteriofaag Kurepalu 2 nakatamisefektiivsust vedelsöötmes vähesel määral	30

2.4.	Faagiraamatukogu ppGpp-sõltuvus on varieeruv	31
3.	Arutelu.....	32
3.1.	ppGpp puudumine vähendab bakteri faagitaluvust	32
3.2.	Erinevused poomisvastuse mõjus faagitaluvusele tahkel ja vedelas söötmes	33
3.3.	Faagikollektsiooni faagide ppGpp-sõltuvus on varieeruv	33
3.3.1.	ppGpp faaginakkuse vastane kaitsev efekt on varieeruv.....	33
3.3.2.	ppGpp-sõltuvus varieerub erinevatel perekondadel erineval määral	35
	Kokkuvõte.....	36
	Summary.....	37
	Tänuõnad.....	38
	Kasutatud kirjandus.....	39
	Lisa 1. Tulemused tahkel söötmel	45
	Lisa 2. Tulemused vedelsöötmes	51

Kasutatud lühendid

ATP - adenosin

Cip – tsiprofloksatsiin (ciprofloxacin)

EF-Tu – elongatsioonifaktor Tu

GDP - guanosiindifosfaat

GTP – guanosin

IF2 – initsatsioonifaktor kaks

LB – rikas sööde (Lysogeny Broth)

MOI – nakatamiskordaja (Multiplicity of Infection)

OD – optiline tihedus (Optical Density)

ppGpp – guanosiintetrafosfaat

pppGpp – guanosiinpentafosfaat

RSH – RelA ja SpoT homoloogid

SAH – väike alarmooni hüdrolaas (Small Alarmone Hydrolase)

SAS – väike alarmooni süntetaas (Small Alarmone Synthetase)

SISSEJUHATUS

Bakterid, nagu ka kõik teised organismid, puutuvad oma elukeskkonnas paratamatult kokku erinevate stressiallikatega. Üheks selliseks stressoriks on baktereid nakatavad viirused ehk (bakterio)faagid, mida võib leida hulgaliselt kõikjal, kus bakterid elutsevad. Need obligaatsete parasiitide on enda paljundamiseks võimelised ära kasutama bakteri rakulisi mehhanisme. Selline paljundamine kulmineerub sageli bakteri lüüsisega. Surma vältimiseks ja ka nakatumise ennetamiseks on bakteritel aga välja kujunenud mitmeid kaitsemehhanisme. Üheks oletatavaks viirusevastaseks kaitsemehhanismiks on bakteri poomisvastus.

Poomisvastus on bakterite stressivastus, mis vallandub eelkõige aminohapete nälja korral. Selle vallandumist indutseerib alarmoonide ppGpp ehk guanosiiintetrafosfaadi ja pppGpp ehk guanosiiinpentaosfaadi akumulatsioon rakus. Poomisvastus kujundab ümber bakteri metaboolseid radu ning mõjutab geeniekspressiooni mustrit, et halbades keskkonnatingimustes ressurside kasutust optimeerida ja seeläbi suurendada bakteri elumust. Kuna ka faagid on bakterile stressorid, võib oletada, et (p)ppGpp vahendatud poomisvastusel kui stressivastusel on roll ka faagivastases kaitstes. Samuti on faaginakkuse järgselt täheldatud (p)ppGpp kontsentratsiooni kasvu.

Varasemad uurimused on näidanud, et (p)ppGpp-l on roll *Escherichia coli* faagiresistentsuse tagamisel. Samuti on leitud, et poomisvastus soodustab faagidel lüsogeense tsükli eelistamist lüütilisele, suurendades bakteri elumust. Seost (p)ppGpp ja faagivastase kaitse vahel on korduvalt välja toodud, kuid seni pole läbi viidud laiapõhjalist uurimust selle seose ulatuse kirjeldamiseks. Ei ole teada, kas poomisvastus kaitseb väheste faagide vastu või on tegemist üldisema kaitseefektiga.

Samuti pole uuritud poomisvastuse mõju *Pseudomonas putida* faagiresistentsusele. Selle tööstuslikult olulise keskkonnabakteriga pole üldse varasemalt faagiuuringuid läbi viidud. Seetõttu on käesoleva töö eesmärgiks selgitada välja, kas *P. putida* poomisvastus osaleb ppGpp vahendusel selle bakteri faagivastases kaitstes ning kui üldine on poomisvastuse tagatud kaitse.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Faagid ja bakteri kaitsesüsteemid

1.1.1. Bakteriofaagid

Bakteriofaage (faage) ehk baktereid nakatavaid viiruseid võib arvukalt leida igast ökosüsteemist. Neil on ookeanides näiteks oluline roll nii süsinikuringes kui ka fotosünteesis, vabastades bakterite lüüsimisega süsinikku tagasi ringlusesse ning suurendades tsüanobakterite fotosünteesiks vajalike valkude hulka (Sanmukh *et al.*, 2015; Lindell *et al.*, 2005). Faagide baktereid kahjustava iseloomu tõttu on nad ka võimalik abivahend antibiootikumiresistentsete patogeensete bakterite vastu võitlemisel (Hatfull *et al.*, 2022), mistõttu on bakteri ja faagi vaheliste interaktsioonide uurimine ka meditsiiniliselt oluline.

Üks faag võib olla spetsiifiline – nakatada vaid ühte bakteriliiki (või isegi vaid mõnda kindlat bakteritüve) või olla üldisem – omada laiemat peremeesringi (Flores *et al.*, 2011). Selline nakatumisspetsiifika erinevus tuleneb nakatamiseks vajalikust retseptorspetsiifikast (Rakhuba *et al.*, 2010). Samuti klassifitseeritakse faage ka morfoloogia ja genoomijärjestuse alusel. Faagid võivad olla erineva kujuga, näiteks olla ikosaeedriline või filamentsed, samuti võib neil erineda genoomi aluseks olev nukleiinhape. See võib olla nii üheaahelaline kui ka kaheaahelaline DNA või RNA, samuti võib faagi genoom olla lineaarne või tsirkulariseerunud (Hatfull ja Hendrix, 2012).

Nagu kõik viirused, hakkab faag nakatamise järgselt peremeesbakteri rakuliste mehhanismide abil paljunema. Bakteris paljunemiseks on faagidel vajalik peremeesraku metaboolne aktiivsus, sest faagide genoomilt infektsiooniks vajalike geenide transkribeerimiseks ning valkudeks transleerimiseks on olulised nii bakteri transkriptsiooni kui ka translatsiooni eest vastutavad mehhanismid (Yang *et al.*, 2014; Li, 2019). Paljunemise meetodika alusel jaotatakse faagid lüütilise või lüsogeense paljunemistsükliga faagideks. Lüütilise tsükli tagajärg on bakteriraku lüüs ning faagipartiklite bakterist vabanemine. Lüsogeenses tsükli integreerub faagi genoom peremeesrakku ning replitseerub koos peremehe genoomiga. Sellist peremehe genoomi integreerunud faagi kutsutakse profaagiks (Sharma *et al.*, 2016).

1.1.2. Bakterite faagivastased kaitsesüsteemid

Bakteritel on faagide vastu kujunenud mitmeid kaitsemehhanisme, alates faagide raku sisenemise inhibeerimisest kuni nende rakus paljunemise pärssimiseni. Nakatumise vältimiseks võivad bakterid näiteks muuta oma pinnaomadusi, inhibeerides faagide antireseptorite seondumist rakupinna retseptoritega (Hampton *et al.*, 2020). Bakteritel on levinud ka erinevad

restriktsiooni-modifikatsiooni süsteemid, mis põhinevad bakteri enda DNA eristamisel võõrast, et nakatumise järgselt võõras faagi DNA tuvastada ja hävitada (Loenen *et al.*, 2014). Faagivastast adaptiivset immuunsust tagab bakteril CRISPR-Cas süsteem, mis talletab faagide genoomide osi lühikeste kordusjärjestustena bakteri genoomis, et korduval nakkusel võõrad genoomijärjestused ära tunda ja lõhkuda (Hampton *et al.*, 2020). Lisaks võib bakter faagi leviku pärssimiseks kasutada toksiin-antitoksiin süsteeme, mille eesmärk on toksiooni abil häirida nakatanud raku metabolismi (normaalses rakus on toksiin inhibeeritud antitoksiini poolt), et takistada faagi paljunemist bakteri rakuliste mehhanismide abil (LeRoux ja Laub, 2022). Kaitsesüsteemides osalevaid valke võivad kodeerida ka bakteri genoomi integreerunud profaagid (Owen *et al.*, 2021). Faagitaluvust võivad profaagid suurendada ka teiste mehhanismide kaudu (Bondy-Denomy *et al.*, 2016).

1.2. Poomisvastus ja (p)ppGpp

Bakteritel on välja kujunenud mitmed kaitsemehhanismid, et stressitingimustes ellu jääda ja paljuneda. Üks neist kaitsesüsteemidest on poomisvastus, mida reguleerib guanosiintetrafosfaadi (ppGpp) ja guanosiinpentafosfaadi (pppGpp) kontsentratsioon rakus (sageli nimetatakse ühiselt (p)ppGpp-ks). Nende alarmoonide kontsentratsiooni kasv vallandab poomisvastuse ja mõjutab bakteri geeniekspressiooni ja metaboolseid radu, et bakter suudaks stressitingimustes, näiteks nälja korral, ellu jääda (Wu *et al.*, 2020).

1.2.1. (p)ppGpp kontsentratsiooni regulatsioon

Kuna (p)ppGpp on oluline bakteri stressitalumisel, siis mõjutab tema kontsentratsiooni eelkõige bakteri elukeskkond. Vastavalt keskkonnast tulevatele signaalidele reguleerivad (p)ppGpp kontsentratsiooni RSH (RelA/SpoT homoloog) superperekkonna valgud ehk (*Escherichia coli*) RelA ja SpoT valkude homoloogid (Atkinson *et al.*, 2011). Nii RelA kui ka SpoT on võimelised (p)ppGpp-d sünteesima, kuid erinevad nende sünteesiintensiivsus ja aktivatsiooni põhjustavad stressorid. (p)ppGpp-d sünteesivad need ensüümid vastavalt GDP-st (guanosiindifosfaat) ja ATP-st (adenosiinrifosfaat) või GTP-st (guanosiinrifosfaat) ja ATP-st, millega kaasneb rakulise GTP kontsentratsiooni langus (Lopez *et al.*, 1981; Gallant *et al.*, 1971). Lisaks osalevad (p)ppGpp kontsentratsiooni regulatsioonis ka väikesed alarmooni süntetaasid (SAS) ja hüdrolaasid (SAH). Need ensüümid on rohkem spetsialiseerunud, omades kas vaid sünteesi (SAS) või hüdrolüüsi (SAH) domeeni (Atkinson *et al.*, 2011).

Ribosoomi-seoseline valk RelA on peamine (p)ppGpp sünteesi eest vastutav ensüüm, mida aminohapete nälja korral aktiveerivad ribosoomi A-saiti seonduvad laadimata tRNA-d (Haseltine ja Block, 1973). Selle ensüümi allosteeriliseks aktivaatoriks on positiivse tagasiside

alusel (p)ppGpp ise, mis seondub ensüümi katalüütilise alaühiku külge, stabiliseerimaks valgusünteesiasendit (Roghianian *et al.*, 2021). Siiski, on näidatud, et ainult (p)ppGpp-st ei piisa RelA maksimaalse katalüütilise aktiivsuse saavutamiseks, vaid oluline on ka seandumine ribosoomile (Shyp *et al.*, 2012). Ehkki RelA-l on olemas ka (p)ppGpp hüdrolüüsi domeen, on see inaktiivne (Atkinson *et al.*, 2011). RelA on SpoT-st efektiivsem (p)ppGpp sünteesija ja aktiveerub eelkõige aminohapete nälja korral (Hauryliuk *et al.*, 2015). Samuti indutseerib RelA poolset (p)ppGpp sünteesi kuumašokk (Gallant *et al.*, 1977).

Enamasti bifunktsionaalne SpoT valk on võimeline nii ppGpp-d sünteesima kui ka hüdrolüüsima ehk sel valgul on nii sünteesi kui ka hüdrolüüsi domeenid aktiivsed. RelA-ga võrreldes on SpoT sünteesiaktiivsus madal (Atkinson *et al.*, 2011), kuid oluline näiteks rasvhapete (Seyfzadeh *et al.*, 1993) või süsinikuallika puudumisel (Sarubbi *et al.*, 1989). Erinevalt RelA-st on SpoT-l tugev (p)ppGpp-hüdrolüüsi võimekus, mis töötab vastu RelA (p)ppGpp sünteesile, et tasakaalustada alarmooni kontsentratsiooni rakus või vähendada (p)ppGpp kogust stressieelse seisundi taastamiseks. Osadel bakteritel (näiteks *Acinetobacter baumannii*) on SpoT sünteesiaktiivsuse hoopis kaotanud ja muutunud monofunktsionaalseks hüdrolüüsiensüümiks (Tamman *et al.*, 2023). (p)ppGpp hüdrolüüs on bakterile äärmiselt vajalik, sest on näidatud, et SpoT puudumine viib sellise (p)ppGpp kontsentratsiooni tõusuni, mis on bakterile letaalne (Xiao *et al.*, 1991).

Erinevate näljaolukordade modelleerimisel on leitud, et (p)ppGpp akumulereerumist võib tagada intensiivsem süntees ja vähenenud lagundamine või olukord, kus nii süntees kui ka hüdrolüüs on alla reguleeritud. Näiteks glükoosi puudujäägi korral, mil vähenevad nii sünteesi- kui ka lagundamiskiirused on (p)ppGpp hüdrolüüs alla surutud rohkem kui süntees, mis tagab seeläbi (p)ppGpp kontsentratsiooni kasvu. (Murray, 1996)

1.2.2. (p)ppGpp akumulereerumise mõju bakteri rakulistele mehhanismidele

Kuna (p)ppGpp ülesanne on reguleerida bakteri vastuseid stressile, on tema mõju ulatus suur. (p)ppGpp kontsentratsiooni tõusu korral programmeeritakse raku geeniekspressioon ümber. Seeläbi või otseselt inhibeerib (p)ppGpp ka replikatsiooni (Wang *et al.*, 2007) ja translatsiooni (Svitil *et al.*, 1993). On leitud, et alarmoonide akumulereerumine muu hulgas inhibeerib puriinide (Kriel *et al.*, 2012; Vogeleer ja Létisse, 2022) ja ATP (Wang *et al.*, 2019) sünteesi, optimeerides seeläbi näljas oleva bakteri vähete ressurside kasutust. *Pseudomonas protegens*-i puhul on (p)ppGpp puudumisel ülesreguleeritud nii DNA replikatsiooni, transkriptsiooni ja translatsiooni kui ka aminohapete metabolismiga seotud geenide ekspressioon ning vähenenud

on sekundaarsete metaboliitide (näiteks antibiootikumid) geeniklastrite ekspressioon (Wu *et al.*, 2020). Lisaks inhibeerib (p)ppGpp ka bakteri kasvu (Potrykus *et al.*, 2011) ning rRNA-de sünteesi (Schreiber *et al.*, 1991).

DNA replikatsiooni reguleerib (p)ppGpp näiteks praimerite sünteesi inhibitsiooni kaudu, seondudes otse DNA primaasi DnaG aktiivtsentrisse (Wang *et al.*, 2007). Lisaks vähendab (p)ppGpp ka DNA replikatsiooni initsiatsiooni, saavutades selle transkriptsiooni vähendamise kaudu. Transkriptsiooni inhibeerimine vähendab oriC järjestuse juures DNA negatiivset superspiralisatsiooni, mille tulemusena on DNA replikatsiooni initsiatsiooniks vajaliku DnaA seondumine oriC saiti takistatud (Kraemer, 2019).

Translatsiooni inhibeerib (p)ppGpp lisaks mainitud rRNAde sünteesi vähenemisega ka translatsiooni initsiatsioonikompleksi moodustumise takistamisega, seondudes ribosomaalsetele GTP-aasidele, takistades seeläbi 70S ribosoomi moodustumist ning aeglustades bakteri kasvu (Corrigan *et al.*, 2016). Translatsiooni initsiatsioonil inhibeerib (p)ppGpp ka ensüümi IF2 (initsiatsioonifaktor 2), takistades selle allosteerilist aktivatsiooni (Diez *et al.*, 2020). Samuti võib (p)ppGpp inhibeerida ensüümi EF-Tu (elongatsioonifaktor Tu) aktiivsust, mis viib translatsiooni aeglustumiseni, sest EF-Tu vastutab translatsiooni elongatsioonifaasis aminoatsüleeritud tRNA transpordi eest ribosoomile (Hamel ja Cashel, 1974).

1.2.3. (p)ppGpp mõju antibiootikumitaluvusele ja virulentsusele

Kuigi poomisvastus vallandub klassikaliselt aminohapete nälja või mõne muu keskkonnastressori mõjul, on näidatud (p)ppGpp olulisust ka antibiootikumide põhjustatud stressi korral. On leitud, et (p)ppGpp suurendab *Pseudomonas aeruginosa* antibiootikumitaluvust biofilmis, näiteks tõstab (p)ppGpp bakteri ofloksatsiini taluvust ligi 1000 korda (Khakimova *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2014). Seetõttu panustab poomisvastus ka patogeensete bakterite antibiootikumiravile allumatuse levikusse, sest patogeensed bakterid kasutavad samuti poomisvastust ära, et infektsiooni ajal esinevates stressitingimustes ellu jääda (Dalebroux *et al.*, 2010). Näiteks on leitud, et kõrge rakulise (p)ppGpp kontsentratsiooniga aeglasemalt kasvavad *Salmonella Typhimurium*-i rakud on fluorokinolonide suhtes vähem tundlikud kui kiirelt paljunevad rakud (Claudi *et al.*, 2014). Lisaks antibiootikumitaluvuse suurendamisele soodustab (p)ppGpp vahendatud poomisvastus ka virulentsust, kuna soodustab biofilmi maatriksi teket (Gupta *et al.*, 2016). Samuti reguleerib (p)ppGpp virulentsusgeenide ekspressiooni erinevates patogeenides, tõstes näiteks kvoorumitundlikkusega seotud virulentsusfaktorite geenide ekspressiooni (Dalebroux *et al.*, 2010).

1.3. (p)ppGpp roll faagiresistentsuses

Lisaks eelkirjeldatud stressidele, tekitavad bakteritele stressi ka bakteriofaagide rünnakud. Võib arvata, et kuna poomisvastus on stressivastus ning bakteriofaag on stressor, siis bakteril võiks (p)ppGpp reguleeritud süsteem panustada ka faagiresistentsusesse ning poomisvastus võiks olla bakteri üldine faagivastane kaitsemehhanism. Samuti on ka faaginakkuse tagajärjel täheldatud (p)ppGpp kontsentratsiooni kasvu rakus (Tabib-Salazar *et al.*, 2018).

ppGpp pärssivat mõju faaginakkusele on näidatud *E. coli* faagide puhul, kus RSH ensüümide deletsioontüve (ppGpp⁰ tüve) bakterimurul olid suuremad lüüsilaidud kui metsiktüve bakterimuruga tassidel ning lisaks soodustas ppGpp kogunemine lüsogeense tsükli eelistamist lüütilisele ja vähendas faagi DNA replikatsiooni efektiivsust (Nowicki *et al.*, 2013). Näiteks on (p)ppGpp akumulatsioonil negatiivset mõju faagi nakatamisefektiivsusele täheldatud *E. coli* faag T7 suhtes (Tabib-Salazar *et al.*, 2018). Ühes varasemas uurimuses leiti samuti, et funktsionaalse RelA valguga bakteril on faag lambda replikatsioon inhibeeritud, kuid relA deletsioonmutandil faagi genoomi replikatsioon toimub (Szalewska-Pałasz ja Wegrzyn, 1995).

Samuti on leitud, et (p)ppGpp rakuline kontsentratsioon mõjutab faag lambda lüsogeensusega seotud promootorite aktivaatori CII hulka. Nimelt vähendab kõrgem (p)ppGpp hulk HflB/FtsH proteaasi hulka rakus. Kuna see proteaas vastutab valgu CII lagundamise eest, soodustab (p)ppGpp suurem kontsentratsioon faag lambda lüsogeensete promootorite aktivatsiooni ja seega lüsogeensuse eelistamist lüütilisele tsüklile. (Slomińska *et al.*, 1999)

Poomisvastuse üldisele faaginakkuse vastasele kaitsvale efektile võib viidata selle inhibeerimine mõne faagi poolt. Faagid võivad kodeerida valke, mis pärssivad (p)ppGpp akumulatsiooni ja seeläbi ka poomisvastuse vallandumist. Ühe tsüanofaagi valk MazG hüdrolüüsib GTP-d, mistõttu ei ole sellest enam võimalik (p)ppGpp-d sünteesida ning (p)ppGpp rakuline kontsentratsioon püsib madal (Rihtman *et al.*, 2019).

Siiski on kirjeldatud ka (p)ppGpp faaginakkust soodustavat mõju. Faag Mu replikatsiooni tõhustab (p)ppGpp olemasolu rakus. Alarmoon toetab faagil replikatsiooni inhibitsioonist mööda pääsemist PriA-PriC raja kaudu, mille kaudu on translatsioon siiski endiselt inhibeeritud. (North *et al.*, 2007)

Faagiresistentsuse ja (p)ppGpp-vahendatud poomisvastuse seose kohta on palju viiteid, kuid laiapõhjalist uurimust poomisvastuse seosest faagikaitsega ei ole seni läbi viidud. Seega ei ole teada, kas poomisvastuse tagatud faagivastane kaitse on üldine või esineb vaid mõnel bakteril või väheste faagide nakkuse korral.

1.4. *Pseudomonas putida* faagivastane kaitse

Pseudomonas putida on gramnegatiivne pulgakujuline gammaproteobakter, mida võib keskkonnas leida mullast ja veest. *P. putida* on metaboolselt väga mitmekülgne, mistõttu kasutatakse teda bioremediatsioonil ning ka tööstuslikult kemikaalide ja biokütuste tootmisel (Nikel *et al.*, 2014). Samuti on ta oma hea kohanemisvõime tõttu suurepärase mudelorganism mikroobide füsioloogia uurimiseks (López-Sánchez *et al.*, 2020).

P. putida genoomis on 4 profaagi, millel on täheldatud kaitsvat efekti faaginakkuse vastu (Piirmets, 2022). Põhjalikult pole profaagi kaitset uuritud, kuna seni pole palju *P. putida*-nakatavaid faage isoleeritud. Samuti ei ole palju teada selle bakteri teiste faagikaitse süsteemide kohta. (p)ppGpp kontsentratsiooni kasvu mõju *P. putida* metabolismile on vähesel määral varasemalt uuritud ning leiti, et (p)ppGpp mõjutab bakteri tsentraalset süsiniku-metabolismi ja inhibeerib puriinide sünteesi (Vogeleer ja Létisse, 2022). Poomisvastuse mõjust *P. putida* faagitaluvusele aga seni palju teada ei ole. Seetõttu on oluline uurida *P. putida* kui tööstuslikult olulise bakteri faagikaitse ja poomisvastuse seoseid.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

P. putida faaginakkust pole seni palju uuritud, sest varasemalt ei olnud isoleeritud seda bakterit nakatavaid faage. Poomisvastuse rolli teiste bakterite faaginakkusel on aga mõnel juhul näidatud (Nowicki *et al.*, 2013; Tabib-Salazar *et al.*, 2018; Slomińska *et al.*, 1999). Minu töögrupp on viimastel aastatel alustanud *P. putida* PaW85 nakatavate faagide raamatukogu loomist, alates keskkonnaproovidest faagide eraldamisest kuni faagide genoomide sekveneerimise, liigitamise ja kirjeldamiseni. Minu töö eesmärk oli selgitada välja, kas *P. putida* poomisvastus osaleb ppGpp vahendusel selle bakteri faagivastases kaitses ning kui üldine on poomisvastuse tagatud kaitses. Selle eesmärgi saavutamiseks oli vaja:

- 1) sõeluda *P. putida* faagiraamatukogu ppGpp-sõltuvate faagide leidmiseks
- 2) selgitada täpsemalt kasvukõveraid analüüsides, kas poomisvastus on *P. putida*-le oluline valitud faagide vastases kaitses
- 3) testida erinevate poomisvastust reguleerivate valkude osalust poomisvastuse pakutavas kaitses

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Kasutatud söötmed ja bakteritüved

Söötmena kasutati LB (*Lysogeny Broth*) söödet (1% trüpton, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl). Lisaks vedelale LB söötmele, kasutati LB agarit (lisakoostisosa 1,5% agar) ning LB pehmet agarit (lisakoostisosa 0,3% agar). Pehmesse LB agarsöötmesse lisati veel CaCl₂ (lõppkontsentratsioon 10 mM). Sõltuvalt katsest lisati vajadusel (v.a. G2 ja G4 faagide korral) LB agarisse tsiprofloksatsiini (cip) lõppkontsentratsiooniga 0,03 µg/ml. Cip tekitab DNA kahjustusi, mis aktiveerib SOS vastuse ja on oluline faagide lüütilise tsükli aktivatsiooniks. CaCl₂ lisati, sest mõned kollektiooni kuuluvad faagid vajavad seda efektiivseks nakatamiseks. Lahjendusi tehti SM puhvril (50 mM Tris.HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄, 0,01% želatiin).

Töös kasutatud *P. putida* tüved on välja toodud Tabelis 1. Δ4φ tüved ehk tüved, millest on eemaldatud neli *P. putida* genoomset profaagi, on vajalikud G3 perekonna faagidega katsete läbiviimisel, sest selle perekonna faagid on profaagide kaitse suhtes eriti tundlikud ning ei suuda nakatada profaage sisaldavat bakteritüve.

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

Tüvi	Kirjeldus	Viide allikale
PaW85	Metsiktüvi	Bayley <i>et al.</i> , 1977
ΔRelA	Tüvel puudub ensüümi RelA sünteesimise võime; ppGpp süntees osaliselt tagatud valgu SpoT poolt	Hedvig Tamman
ΔRelASpoT	Tüvel puudub ensüümide RelA ja SpoT sünteesimise võime; bakter ei sünteesi ppGpp-d	Hedvig Tamman
Δ3ppGpp	Tüvel puudub ensüümide RelA, SpoT ning ennustatava SAH valgu PP_2450 sünteesimise võime; bakter ei sünteesi ppGpp-d	Hedvig Tamman
Δ2450	Tüvel puudub ennustatava SAH valgu PP_2450 sünteesimise võime	Hedvig Tamman
Δ4φ	Tüvel puuduvad kõik 4 profaagi	Piirmets, 2022
Δ4φΔRelA	Tüvel puuduvad kõik 4 profaagi ning ensüümi RelA sünteesimise võime; ppGpp süntees osaliselt tagatud valgu SpoT poolt	Hedvig Tamman
Δ4φΔRelASpoT	Tüvel puuduvad kõik 4 profaagi ning ensüümide RelA ja SpoT sünteesimise võime; bakter ei sünteesi ppGpp-d	Hedvig Tamman
Δ4φΔ3ppGpp	Tüvel puuduvad kõik 4 profaagi ning ensüümide RelA, SpoT ja ennustatava SAH valgu PP_2450 sünteesimise võime; bakter ei sünteesi ppGpp-d	Hedvig Tamman
Δ4φΔ2450	Tüvel puuduvad kõik 4 profaagi ning ennustatava SAH valgu PP_2450 sünteesimise võime	Hedvig Tamman

2.2.2. Kasutatud faagid

Sõelumiseks kasutatud faagiraamatukogus on 70 *P. putida* faagi (Tabel 2), mis on genoomide sekveneerimistulemuste alusel jaotatud perekondadesse ja liikidesse. Perekonnasisese geneetilise identsuse alampiir on 70% ning liigi määratlemisel on piir 95%. Faagiraamatukogus on üheksa erinevat faagiperekonda (G1-G9).

G1 perekonnas on 5 faagi. G2 ja G4 perekondades on vastavalt 18 ja 2 faagi. G3 perekonna kõik 11 faagi on tundlikud profaagi kaitse suhtes ning nakatavad vaid *P. putida* tüvesid, mille genoomist on puudu kõigi nelja profaagi järjestused ($\Delta 4\phi$ tüved). G5 on kollektiooni suurim faagiperekond, siia kuulub 26 faagi 70st. G6 ja G7 faagiperekonnas on mõlemas 2 faagi. G8 perekonnas on vaid 1 faag ning perekonnas G9 on 3 faagi. Kõik töös kasutatud faagid on toodud Tabelis 2. Kuna faagikollektiooni alles koostatakse, ei ole faagid veel nimetatud ametlike nimedega vaid vastavalt kohale, kust faag isoleeriti, kui ühest keskkonnaproovist eraldati mitu faagi on faagi nime taga järjekorranumber.

Tabel 2. Töös kasutatud faagid. Rasvases kirjas faagide tulemused on toodud töö põhiosas.

Faag	Perekond-Liik	Lisa LB söötmele	Testitav taust	Eraldaja(d)	
Amme 3	G1-A	+ Cip + CaCl ₂	M E T S I K T Ü V I	R. Hõrak	
Kõpa 4	G1-B	+ Cip + CaCl ₂		R. Hõrak	
Nõo 2	G1-C	+ Cip + CaCl ₂		R. Hõrak	
Kassivere 1	G1-D	+ Cip + CaCl ₂		H. Tamman	
Rõõmu 2	G1-E	+ Cip + CaCl ₂		R. Hõrak	
Eino 1	G2-A	+ CaCl ₂		H. Tamman	
F1	G2-A	+ CaCl ₂		A. Ainelo	
Haage	G2-A	+ CaCl ₂		S. Rosendahl	
Hammaste oja 5	G2-A	+ CaCl ₂		S. Rosendahl	
IPA 1	G2-A	+ CaCl ₂		R. Hõrak	
Issaku	G2-A	+ CaCl ₂		A. Lipu / R. Hõrak	
Keeri	G2-A	+ CaCl ₂		R. Hõrak	
Kriimani	G2-A	+ CaCl ₂		R. Hõrak	
Kõpa 1	G2-A	+ CaCl ₂		R. Hõrak	
Känksi	G2-A	+ CaCl ₂		R. Hõrak	
Mäksa 1	G2-A	+ CaCl ₂		R. Hõrak	
Nõuni	G2-A	+ CaCl ₂		R. Hõrak	
Rõõmu 1	G2-A	+ CaCl ₂		R. Hõrak	
Tõrvandi	G2-A	+ CaCl ₂		S. Rosendahl	
Tõrve	G2-A	+ CaCl ₂		H. Tamman	
Vasula oja 1	G2-A	+ CaCl ₂		S. Rosendahl	
Keila jõgi	G2-B	+ CaCl ₂		S. Blei / S. Rosendahl	
Vasula järv	G2-C	+ CaCl ₂		R. Hõrak / S. Rosendahl	
Aura	G3-A	+ Cip + CaCl ₂		$\Delta 4\phi$	S. Blei
Illi oja 2	G3-A	+ Cip + CaCl ₂			S. Blei
Kakumetsa 1	G3-A	+ Cip + CaCl ₂			R. Hõrak

Faag	Perekond- Liik	Lisa söötmele	LB	Testitav taust	Eraldaja(d)
S-ka 4	G3-A	+ Cip + CaCl ₂		Δ4φ	H. Tamman
Amme 1	G3-B	+ Cip + CaCl ₂			R. Hõrak
Kõpa 5	G3-B	+ Cip + CaCl ₂			R. Hõrak
Pori 4	G3-B	+ Cip + CaCl ₂			R. Hõrak / S. Rosendahl
Lauda oja 3	G3-C	+ Cip + CaCl ₂			S. Rosendahl
Peetri tiik	G3-D	+ Cip + CaCl ₂			H. Tamman
Aardla 2	G3	+ Cip + CaCl ₂			H. Tamman
Laeva 1	G3	+ Cip + CaCl ₂			R. Hõrak
Emajõgi	G4-A	+ CaCl ₂		M E T S I K T Ü V I	H. Tamman
Luke 1	G4-B	+ CaCl ₂			R. Hõrak
Erra muld M1	G5-A	+ Cip + CaCl ₂			K. Piirmets
Erra muld S1	G5-A	+ Cip + CaCl ₂			K. Piirmets
Vända F1	G5-A	+ Cip + CaCl ₂			K. Piirmets
Ihaste	G5-B	+ Cip + CaCl ₂			H. Tamman
Illi oja 1	G5-B	+ Cip + CaCl ₂			S. Blei
Kaagvere 1	G5-B	+ Cip + CaCl ₂			R. Hõrak
Kitseküla 3	G5-B	+ Cip + CaCl ₂			H. Tamman
Konnatiik	G5-B	+ Cip + CaCl ₂			S. Rosendahl
Laguja oja 2	G5-B	+ Cip + CaCl ₂			R. Hõrak
Laguja oja 5	G5-B	+ Cip + CaCl ₂			R. Hõrak
Luutsna jõgi 1	G5-B	+ Cip + CaCl ₂			R. Rikberg
Luutsna jõgi 3	G5-B	+ Cip + CaCl ₂			R. Rikberg
Luutsna jõgi 6	G5-B	+ Cip + CaCl ₂			R. Rikberg
Mõra jõgi 3	G5-B	+ Cip + CaCl ₂			A. Lipu
Mõra jõgi 5	G5-B	+ Cip + CaCl ₂			A. Lipu
Pori 2	G5-B	+ Cip + CaCl ₂			R. Hõrak / S. Rosendahl
Päidla	G5-B	+ Cip + CaCl ₂			R. Hõrak
S-ka 3	G5-B	+ Cip + CaCl ₂			H. Tamman
Savi-Peeda 1	G5-B	+ Cip + CaCl ₂			S. Rosendahl
Urmase lomp 1	G5-B	+ Cip + CaCl ₂			R. Hõrak
Viia tiik 1	G5-B	+ Cip + CaCl ₂			R. Hõrak
Villemi	G5-B	+ Cip + CaCl ₂			H. Tamman
Hammaste oja 2	G5-C	+ Cip + CaCl ₂			S. Rosendahl
Bot aed	G5-D	+ Cip + CaCl ₂			R. Hõrak
Kompost 1	G5-D	+ Cip + CaCl ₂			H. Tamman
Kakumetsa 2	G5	+ Cip + CaCl ₂			R. Hõrak
Luke 3	G6-A	+ Cip + CaCl ₂			R. Hõrak
IPA 2	G6-B	+ Cip + CaCl ₂			R. Hõrak
Kallioja	G7-A	+ Cip + CaCl ₂			R. Hõrak / H. Tamman
Kompost 2	G7-B	+ Cip + CaCl ₂			H. Tamman
Kurepalu 1	G8-A	+ Cip + CaCl ₂		R. Hõrak	
Kurepalu 2	G9-A	+ Cip + CaCl ₂		R. Hõrak	
Pori 3	G9-A	+ Cip + CaCl ₂		R. Hõrak / S. Rosendahl	
Mudajõgi	G9-B	+ Cip + CaCl ₂		R. Hõrak	

2.2.3. Poomisvastuse puudumise mõju uurimine bakterite faagitaluvusele tahkel söötmel

Katse tahkel söötmel põhineb erinevate bakteritüvede bakterimuruga topeltagariga tassidele lüüsilaiikude tegemisel, tilgutades neile kindla tiitriga faagilahuseid. Moodustunud lüüsilaiikude arvu võrdlemisel on võimalik teha hinnangulisi järeldusi tüvede faagiresistentsuse kohta. Katse sooritati kolmes korduses.

Metsiktüve ja metsiktüve taustas tehtud poomisvastuse deletsioontüvesid kasutati G1-G2, G4-G9 perekonnaga faagide puhul ning profaag-miinstüve ($\Delta 4\phi$) ja sellest konstrueeritud vastavaid deletsioontüvesid G3 perekonna faagidega katseid läbi viies. Suuri lüüsilaiike tegevate faagide puhul (perekondade G2 ja G4 faagid) oli alumiseks tahkeks agarsöötmeks LB sööde, ülejäänud perekondade faagide puhul sisaldasid LB tassid cip 0,03 $\mu\text{g/ml}$ (vaata ka Tabel 2). Pehme LB agarikiht sisaldas lisaks testitud tüve bakteritele ka 10 mM CaCl_2 .

Protokoll:

- 1) Bakteritüvesid kasvatati üleöö (20 h) aereerides 5 ml LB vedelsöötmes temperatuuril 20 °C.
- 2) Bakterimuru valamiseks segati kokku iga bakteritüve jaoks ühe Petri tassi kohta: 50 μl üleöö kasvanud bakterikultuuri, 50 μl 1M CaCl_2 (lõppkontsentratsioon 10 mM) ning LB 0,3% agarit kuni 5 ml-ni.
- 3) Igale Petri tassi tahkele söötmele (20 ml LB agar 1,5%) valati 5 ml bakterimuru segu.
- 4) Faagilahused lahjendati kuni faagitiitriini $10^7/\text{ml}$ SM-puhvriss.
- 5) $10^7/\text{ml}$ faagitiitriga faagilahustest tehti kümnekordsete lahjenduste rida 10^{-1} kuni 10^{-6} SM puhvriss mikrotiiterplaadile.
- 6) Tahenenud tassidele külvati igast faagilahjendusest (10^{-1} kuni 10^{-6}) 1,5 μl tilk.
- 7) Kui faagitilgad olid kuivanud, inkubeeriti tase üleöö (20 h) temperatuuril 20 °C.

2.2.4. Poomisvastuse puudumise mõju uurimine bakterite faagitaluvusele vedelsöötmes

Katsed vedelsöötmes põhinevad bakterilahuse optilise tiheduse mõõtmisel, mille alusel on võimalik hinnata bakterite arvukust. Optilise tiheduse mõõtmiseks kasvatati baktereid 96 kannuga mikrotiiterplaadil plaadilugeja-inkubaatoris (TECAN Infinite 200 PRO), mis perioodiliselt mõõtis iga kannu optilist tihedust lainepikkusel 580 nm. Faagide nakatamiseefektiivsuse võrdlemiseks mõõdeti optilist tihedust seitsme erineva nakatumiskordaja (MOI - *multiplicity of infection*) korral: MOI väärtused 10^{-5} kuni 10. MOI väärtus väljendab nakatumisvõimeliste virionide ja bakterite arvu suhet.

Vedelsöötmes viidi katse läbi kahes korduses valitud faagidega (8) erinevatest perekondadest. Varieeruvuse tagamiseks arvestati valiku tegemisel faagide ppGpp-sõltuvust tahkel söötmel ning perekondlikku kuuluvust. Kasutati nelja bakteritüve: metsiktüvi ja $\Delta 3ppGpp$ ning $\Delta 4\phi$ ja $\Delta 4\phi\Delta 3ppGpp$. Lihtsuse huvides ei kasutatud $\Delta RelASpoT$ tüve, sest selle tüve vastuvõtlikkus faaginakkusele oli tahkel söötmel $\Delta 3ppGpp$ tüvele sarnane. Mõlema tüve rakkudes puudub ppGpp, sest puuduvad kõik ppGpp-d sünteesivad valgud, $\Delta 3ppGpp$ tüvel on lisaks puudu ka üks ennustatud SAH valk (eemaldatud geen PP_2450).

Protokoll:

a) Suuri lüüsilaike tekitavad faagid (G2 ja G4):

- 1) Bakteritüvesid kasvatati üleöö (20 h) aereerides 5 ml LB vedelsöötmes temperatuuril 20 °C.
- 2) Üleöö kasvanud bakterikultuuri optiline tihedus (OD_{580}) mõõdeti spektrofotomeetriga ning lahjendati värskesse söötmesse nii, et arvutuslikult oleks $OD_{580} = 0,1$. Sellest pipeteeriti 100 μ l bakterikultuuri mikrotiiterplaadi igasse kannu. Aurustumise vältimiseks suleti mikrotiiterplaadi kaas parafilmiga.
- 3) Baktoreid kasvatati 3 h (kuni $OD_{580} \approx 0,12$) loksutamata temperatuuril 20 °C TECAN Infinite 200 PRO masinas, et jälgida optilist tihedust.
- 4) Faagidest tehti lahjendused erinevate MOI-de (10^{-5} kuni 10) jaoks SM puhvrise, arvestades, et 100 μ l mikrotiiterplaadi kannu bakterikultuuris ($OD_{580} 0,12$) on ligikaudu 10^6 rakku.
- 5) Peale 3 h kasvatamist mikrotiiterplaadil võeti mikrotiiterplaat inkubaatorist välja ning bakterikultuuridele lisati 10 μ l sobivat faagilahjendust. Kontrollile (MOI = 0) lisati 10 μ l SM puhvrit.
- 6) Seejärel kasvatati baktoreid TECAN Infinite 200 PRO masinas loksutamata üleöö (18 h) ja OD_{580} registreeriti iga 10 minuti tagant.

b) Väikeseid ja keskmisi lüüsilaike tekitavad faagid (kõik faagiperekonnad v.a. G2 ja G4):

- 1) Bakteritüvesid kasvatati üleöö (20 h) aereerides 5 ml LB vedelsöötmes temperatuuril 20 °C.
- 2) 300 μ l üleöö bakterikultuuri külvati värskesse 5 ml LB söötmesse ning kasvatati aereerides temperatuuril 20 °C umbes 3,5 h kuni $OD_{580} \approx 1$ (rakke 10^8 /ml).
- 3) Mikrotiiterplaadile pipeteeriti kannu kohta 80 μ l söödet – LB, millele oli lisatud 0,03 μ g/ml cip ja 10 mM $CaCl_2$ (lõppkontsentratsioonid).
- 4) Kui bakter oli saavutanud $OD \approx 1$, lisati igasse kannu 10 μ l bakterikultuuri.
- 5) Bakterikultuurile lisati sobivat faagilahjendust 10 μ l. Kontrollile (MOI = 0) lisati 10 μ l SM puhvrit.
- 6) TECAN Infinite 200 PRO masinas kasvatati baktoreid loksutamata üleöö (18 h) ja OD_{580} registreeriti iga 10 minuti tagant.

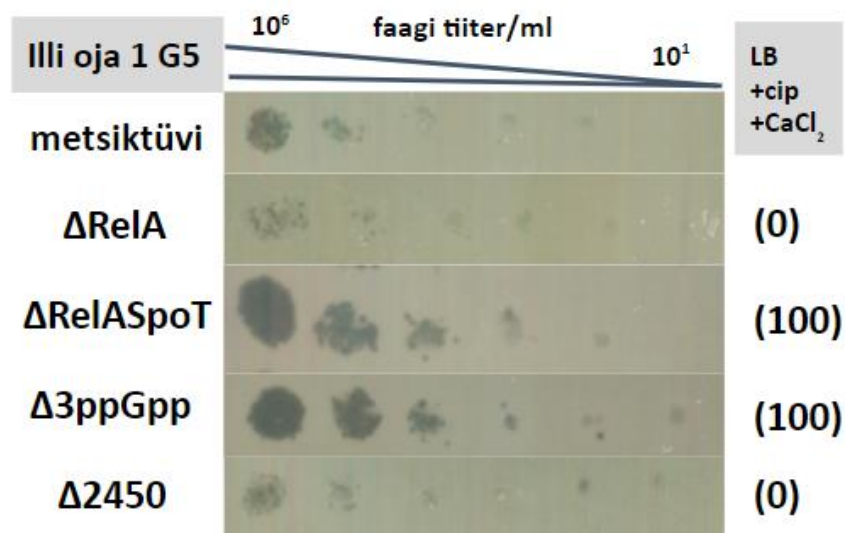
2.3. Tulemused

Käesoleva töö on põhiosas välja toodud valitud tulemused. Kõik tulemused on esitatud Lisades 1 ja 2.

2.3.1. Poomisvastuse puudumise mõju bakterite faagitaluvusele tahkel söötmel

Erinevate ppGpp metabolismi ensüümide osaluse uurimiseks faaginakkuse vastases kaitses viidi tahkel söötmel läbi nakatamiskatsed erinevate *P. putida* tüvedega: metsiktüvi, Δ RelA, Δ RelASpoT, Δ 3ppGpp ja Δ 2450 (või Δ 4 ϕ paralleelid). Nende deletsioontüvede faaginakkuse vastuvõtlikkuse või faagi nakatamisefektiivsuse ppGpp-sõltuvuse määramiseks võrdlesin erinevate tüvede bakterimurudega tassidele tekkivate lüüsilaiakude hulka.

Δ RelA ja Δ 2450 tüvede bakterimuruga tassidel oli faagi nakatamisefektiivsus sarnane metsiktüve tassiga. Erandina oli mõnes katses märgatav nõrk ppGpp efekt ühes või teises suunas, kuid selline tulemus ei kordunud või oli see erinevus väiksem kui (Δ 4 ϕ) Δ 3ppGpp ja (Δ 4 ϕ) Δ RelASpoT tüvede korral (Joonis 1). Seega kasutasin faagiraamatukogu sõelumisel selguse huvides deletsioontüvesid, millel rakusisene ppGpp täielikult puudus [(Δ 4 ϕ) Δ 3ppGpp ja (Δ 4 ϕ) Δ RelASpoT].

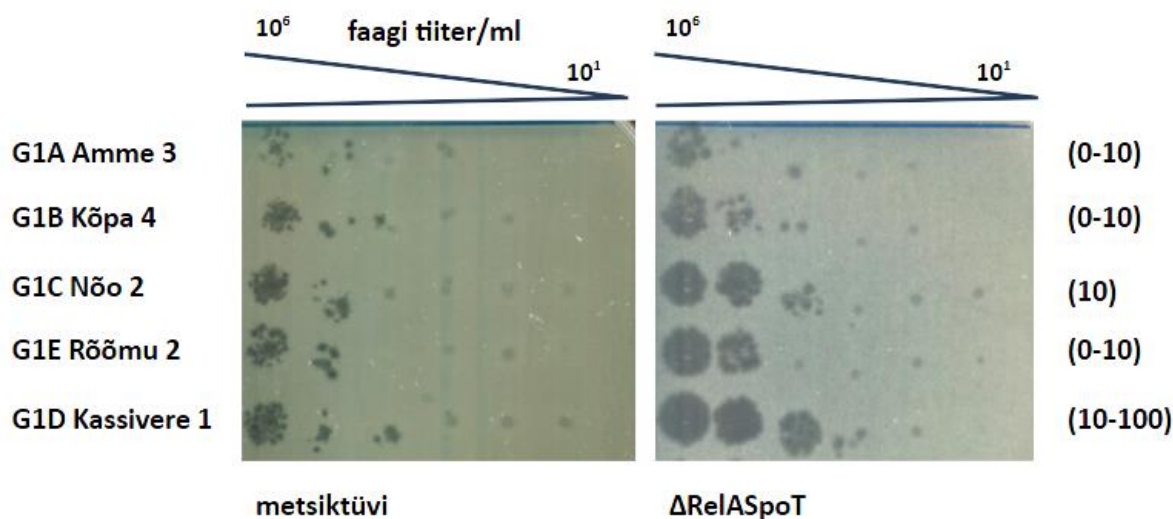


Joonis 1. ppGpp täielikul puudumisel on nähtav efekt faaginakkusele. G5 perekonna bakteriofaag Illi oja 1 lüüsilaiakud uuritud *P. putida* metsiktüve ja ppGpp-metabolismi ensüümide suhtes defektsete tüvede bakterimurudel. Kõrval on sulgudesse lisatud faagi nakatamisefektiivsuse erinevus vastaval tüvel metsiktüvega võrreldes. Joonise kohal on märgitud faagi tiiter, millest bakterimurule tilk külvati. Esitatud on ühe iseloomuliku katse tulemus kahest korduskatses. Pilt on tehtud pärast 20 h kasvu temperatuuril 20 °C

Joonistel esitatud ppGpp-sõltuvuse tugevus on kolme eraldiseisva katse tulemuste keskmine. Seetõttu ei ole tulemuseks alati konkreetne 10-kordne väärtus, mis tuleneb faagilüsaadi lahjendusemäärast, vaid tulemused jaotuvad vastavalt: -10-0 (metsiktüvi nakatub paremini kui deletsioontüvi, vähem kui 10 korda), 0-10, 10, 10-100, 100 korda (ppGpp kaitseb baktereid vastavalt alla 10 kuni ligi 100-kordselt).

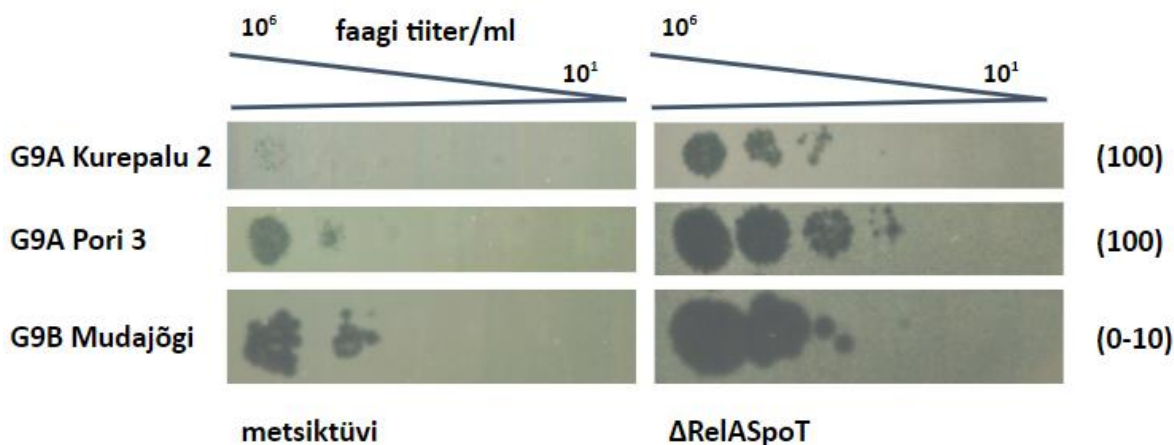
2.3.1.1. ppGpp pärsib G1 ja G9 perekonna faagide nakatamiseefektiivsust

G1 perekonna faagide puhul tõstab bakteris ppGpp puudumine faagi nakatamiseefektiivsust (Tabel 3). Viiest testitud G1 faagist kaks (G1C Nõo 2 ja G1E Rõõmu 2) nakatavad *P. putida* deletsioontüvesid ligikaudu 10 korda efektiivsemalt ehk keskmiselt tekib deletsioontüvede bakterimuruga tassile lüüsilaike 10 korda lahjema tiitriga nakatamisel võrreldes metsiktüve bakteritassiga. Faagide G1A Amme 3 ja G1B Kõpa 4 puhul on samuti näha ppGpp faaginakkust pärssiv efekt, kuid nakatamiseefektiivsuse erinevus metsiktüve ja deletsioontüve bakterimuruga tasside vahel on vähem kui 10-kordne. See väljub mõlema tüve puhul suuremate lüüsilaikudena deletsioontüve tassidel (Joonis 2). Üks G1 perekonna faag Kassivere 1 (G1D) nakatab deletsioontüvesid keskmiselt rohkem kui 10 korda paremini ehk deletsioontüve tassil võib lüüsilaike näha ka kuni 100 korda lahjema faagitiitri korral kui metsiktüve bakterimuruga tassil (Joonis 2).



Joonis 2. G1 perekonna faagid nakatavad ppGpp deletsioontüve kuni 100 korda lahjema faagitiitri korral. G1 faagiperekonna faagide lüüsilaigud metsiktüve ja Δ RelASpoT bakterimurudel. Esitatud on faagide Amme 3, Kõpa 4, Nõo 2, Kassivere 1 ja Rõõmu 2 erinevate lahjenduste lüüsilaigud (10-kordsed lahjendused). Faagitiiter, millest tilkkülv tehti, on märgitud joonise kohal ning deletsioontüve nakatamiseefektiivsus metsiktüvega võrreldes on pildi kõrval sulgudes. Esitatud on kolmest korduskatses ühe katse tulemused. Pilt on tehtud pärast 20 h kasvu temperatuuril 20 °C.

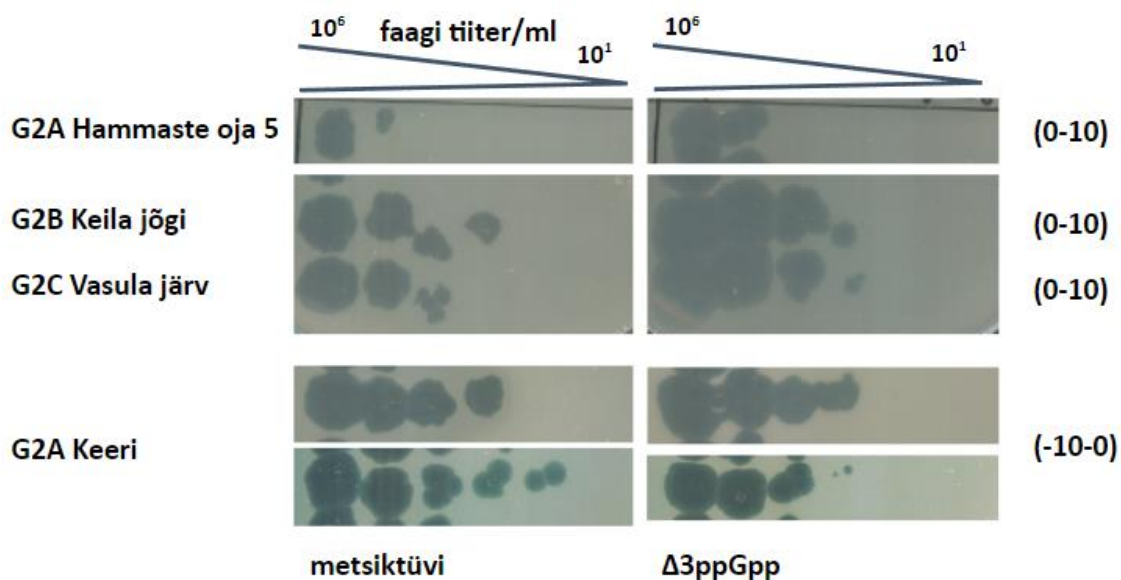
Ka G9 perekonna faagide puhul soosib ppGpp puudumine faaginakkust, kuid G9 liikide vaheline ppGpp sõltuvuse erinevus on suur. G9A liigi nakatamisefektiivsus sõltub tugevalt ppGpp olemasolust: poomisvastuse deletsioonmutandid nakatuvad 100 korda lahjema faagitiitri korral (Joonis 3). G9B liigi faag Mudajõgi aga sõltub nakatamisel ppGpp-st vähe. Faag Mudajõgi puhul väljendub ppGpp puudumise mõju selgelt suuremate lüüsilaiadena deletsioontüve bakterimuruga tassidel metsiktüve tassidega võrreldes (Joonis 3).



Joonis 3. G9 perekonna faagide ppGpp deletsioontüvesid metsiktüvest efektiivsemalt. G9 perekonna faagide lüüsilaiatud metsiktüve ja Δ RelASpoT bakterimurudel. Esitatud on faagide Kurepalu 2, Mudajõgi ja Pori 3 erinevate lahjenduste lüüsilaiatud (10-kordsed lahjendused). Faagitiiter, millest tilkkülv tehti, on märgitud joonise kohal ning deletsioontüve nakatamisefektiivsus metsiktüvega võrreldes on pildi kõrval sulgudes. Esitatud on kolmest korduskatsesest ühe iseloomustava katse tulemused. Pilt on tehtud pärast 20 h kasvu temperatuuril 20 °C.

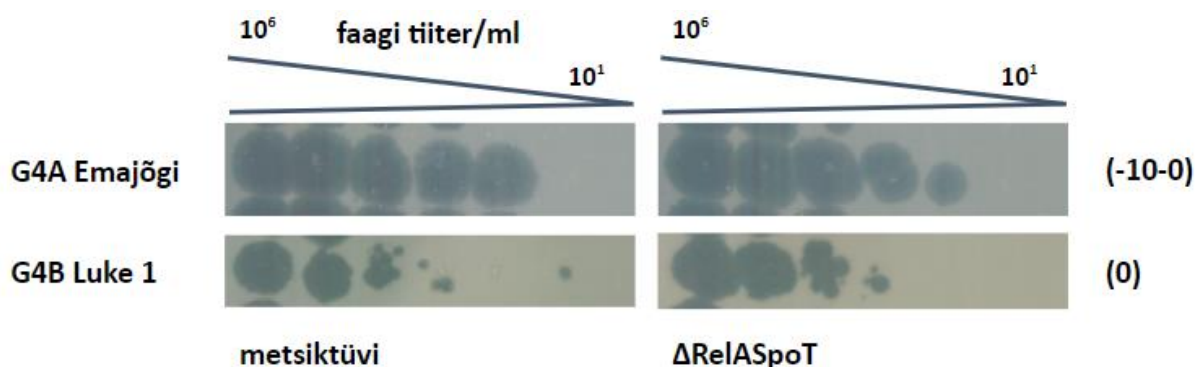
2.3.1.2. Suuri lüüsilaike moodustavad faagid perekondadest G2 ja G4 sõltuvad ppGpp-st vähe

G2 perekonna faagidele avaldab ppGpp kontsentratsioon vähe mõju. 18 faagist 16 (89%) nakatamise efektiivsus on deletsioontüve bakterimuruga tassidel vaid kuni 10 korda suurem ehk erinevate faagitiitrite arv, milles lüüsilaike on näha, on deletsioontüve ja metsiktüve vahel sarnane (Lisa 1, Tabel 1). Poomisvastuse puudumise väike positiivne efekt nende faagide nakatamisefektiivsusele väljendub suuremate lüüsilaiadena deletsioontüve bakterimurul kui metsiktüve tassil. Sellised faagid on näiteks G2A Hammaste oja 5, G2B Keila jõgi ja G2C Vasula järv (Joonis 4). Erand on G2A faag Keeri, mille nakatamisefektiivsus on ppGpp puudumisel vastupidi halvem, kuid see efekt on siiski väike ning ei kordu igas katses. Keskmiselt nakatab Keeri deletsioontüvesid metsiktüvest siiski kuni 10 korda halvemini (Joonis 4). Kõikide G2 perekonna faagide lüüsikatsete tulemused on toodud Lisa 1 Joonisel 2.



Joonis 4. ppGpp puudumisel on G2 perekonna faagide nakatamisefektiivsusele väike mõju. Valitud G2 faagiperekonna faagide lüüsilaigud metsiktüve ja $\Delta 3ppGpp$ bakterimurudel. Esitatud on faagide Hammaste oja 5, Keila jõgi, Vasula järv ja Keeri erinevate lahjenduste lüüsilaigud (10-kordsed lahjendused). Faagitiiter, millest tilkkülv tehti, on märgitud joonise kohal ning deletsioontüve nakatamisefektiivsus metsiktüvega võrreldes on pildi kõrval sulgudes. Esitatud on kolmest korduskatses ühe või kahe (Keeri) iseloomustava katse tulemus. Pilt on tehtud pärast 20 h kasvu temperatuuril 20 °C.

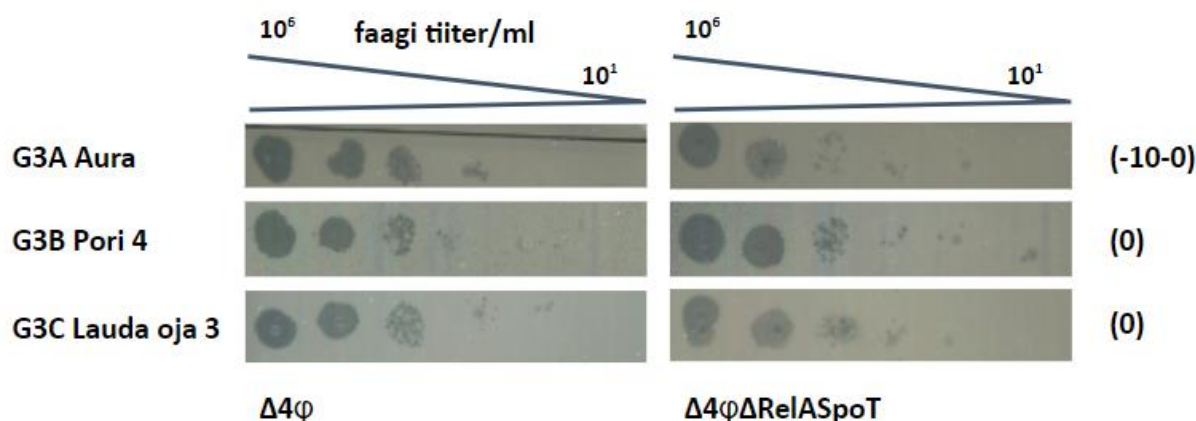
G4 perekonna faagide nakatamisefektiivsusele on ppGpp puudumisel väike mõju. Ühel perekonda G4 kuuluval faagil kahest (G4A Emajõgi) ilmnes, et ppGpp soodustab faaginakkust, kuid see efekt oli pigem väike. See tähendab, et mõnel katsel ilmnemid lüüsilaigud faag Emajõgiga metsiktüve rakkude nakatamisel 10 korda lahjema faagitiitri korral kui deletsioontüve bakterirakkude nakatamisel, kuid see ei kordunud igas katses (Joonis 5). G4B faag Luke 1 nakatamisefektiivsusel puudub seos ppGpp rakusisese kontsentratsiooniga (Joonis 5).



Joonis 5. ppGpp avaldab G4 faagide nakatamisefektiivsusele vähe mõju. G4 perekonna faagide lüüsilaigud metsiktüve ja $\Delta RelASpoT$ bakterimurudel. Esitatud on faagide Emajõgi ja Luke 1 erinevate lahjenduste lüüsilaigud (10-kordsed lahjendused). Faagitiiter, millest tilkkülv tehti, on märgitud joonise kohal ning deletsioontüve nakatamisefektiivsus metsiktüvega võrreldes on pildi kõrval sulgudes. Esitatud on kolmest korduskatses ühe iseloomustava katse tulemused. Pilt on tehtud pärast 20 h kasvu temperatuuril 20 °C.

2.3.1.3. ppGpp ei avalda mõju profaag-tundlike G3 perekonna faagide nakatamisefektiivsusele

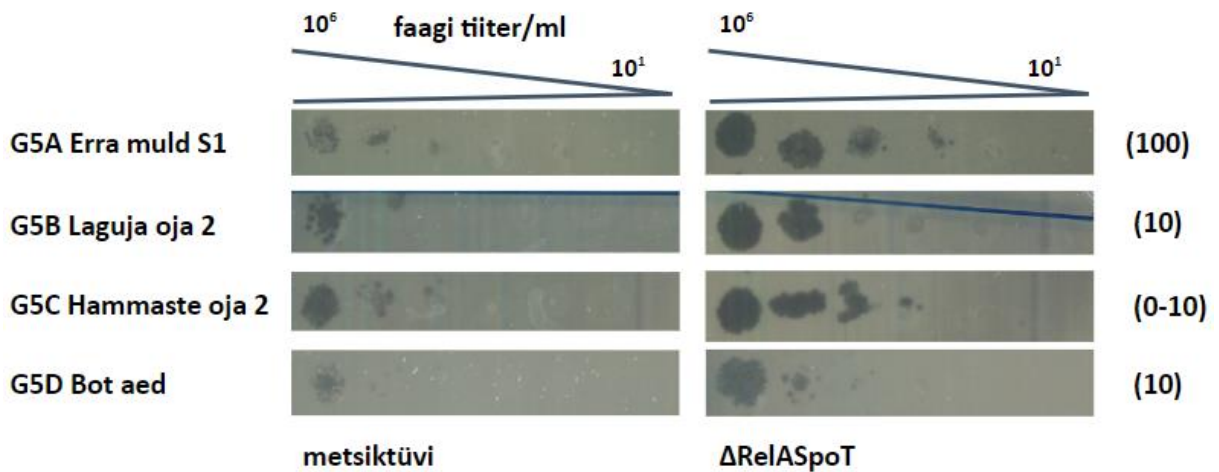
Sarnaselt G4B faag Luke 1 nakkusele, ei avalda ppGpp kontsentratsioon mõju ka G3 perekonna faagidele. Perekonnas on ka erandlik faag Aura (liik G3A), mille nakatamisefektiivsusele mõjub ppGpp positiivselt (Joonis 6). Kõikide G3 perekonna faagide lüüsilatsete tulemused on toodud Lisas 1 (Lisa 1, Joonis 3).



Joonis 6. G3 perekonna faagide nakkusele ppGpp valdavalt mõju ei avalda. Valitud G3 perekonna faagide lüüsilatsete metsiktüve ja $\Delta 4\phi\Delta RelASpoT$ bakterimuruga. Esitatud on faagide Aura, Pori 4 ja Lauda oja 3 erinevate lahjenduste lüüsilatsete (10-kordsed lahjendused). Faagitiiter, millest tilkkülv tehti, on märgitud joonise kohal ning deletsioontüve nakatamisefektiivsus metsiktüvega võrreldes on pildi kõrval sulgudes. Esitatud on kolmest korduskatsest ühe iseloomustava katse tulemused. Pilt on tehtud pärast 20 h kasvu temperatuuril 20 °C.

2.3.1.4. G5 perekonna faagide nakatamisefektiivsus on enamasti ppGpp poolt pärssitud

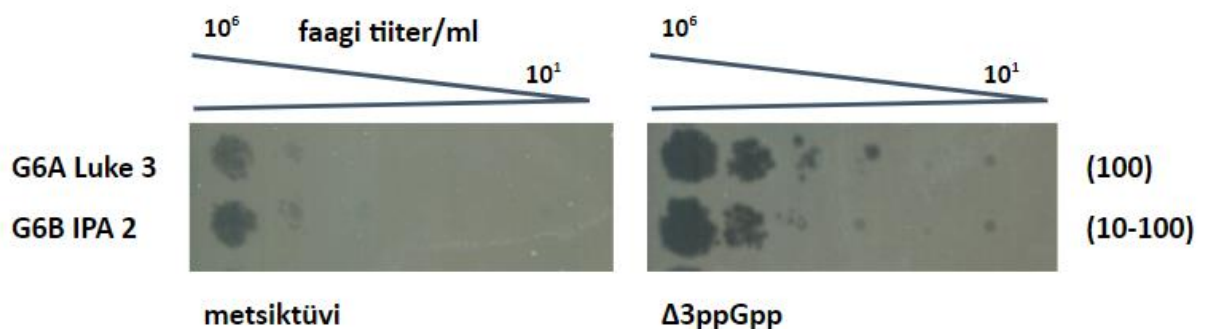
Üldiselt G5 perekonna faagidel soosib ppGpp puudumine faaginakkust (Lisa 1, Tabel 1). G5 perekonna üheksal faagil (35% G5 faagidest) on nakatamisefektiivsus ppGpp puudumisel (deletsioontüvede tassidel) isegi kümme kuni 100 korda tugevam kui ppGpp olemasolul (metsiktüve tassil). 12 faagi korral tagab ppGpp ligi 10-kordse kaitse ning nelja faagi nakatamisefektiivsus sõltub ppGpp kontsentratsioonist vaid vähesel määral, mis väljendub vaid deletsioontüvede rakkudega tassidel suuremates lüüsilatsetes (Joonis 7). Erand perekonnas G5 (ja G5B liikide hulgas) on faag Mõra jõgi 3, mille nakatamisefektiivsus ei sõltu ppGpp kontsentratsioonist üldse (Lisa 1, joonis 4). Kõikide faagide tulemused on toodud Lisas 1.



Joonis 7. ppGpp puudumine soosib G5 faagide nakkust. Valitud G5 perekonna faagide lüüsilaiatud metsiktüve ja Δ RelASpoT bakterimurudel. Esitatud on faagide Erra muld S1, Laguja oja 2, Hammaste oja 2 ja Bot aed erinevate lahjenduste lüüsilaiatud (10-kordsed lahjendused). Faagitiiter, millest tilkkülv tehti, on märgitud joonise kohal. Esitatud on kolmest korduskatses ühe iseloomustava katse tulemused. Pilt on tehtud pärast 20 h kasvu temperatuuril 20 °C.

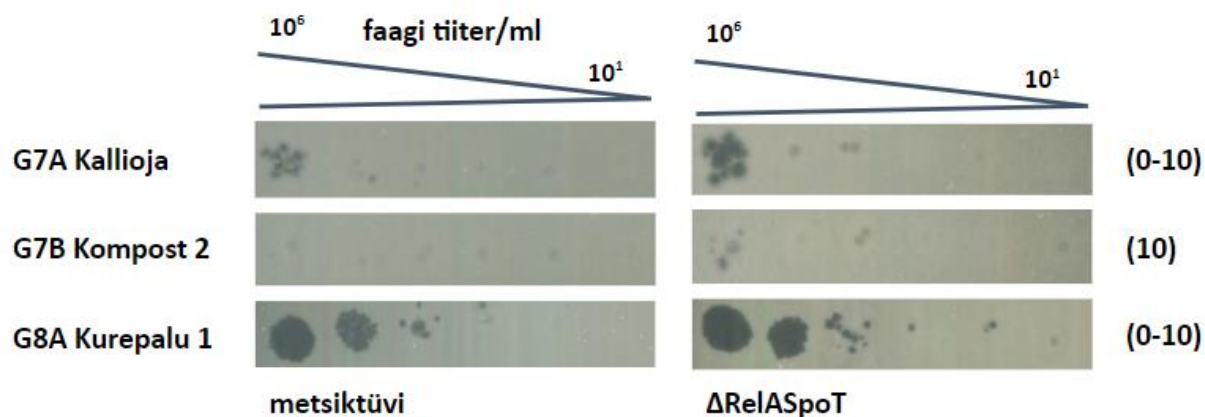
2.3.1.5. Perekonnasisene ppGpp-sõltuvuse varieeruvus on G6, G7 ja G8 perekondades väike

G6 perekonna faagide nakatumiseefektiivsusele avaldab ppGpp puudumine mõlema liigi puhul tugevat positiivset mõju. Perekonda kuuluvate bakteriofaagide nakatumiseefektiivsus on ppGpp deletsioontüvedel üle kümne korra suurem kui metsiktüvel. Faag Luke 3 (liik G6A) nakatab deletsioontüvesid ligikaudu 100 korda efektiivsemalt kui metsiktüve. Faag IPA 2 (liik G6B) nakatamisel on ppGpp mõju mõnevõrra väiksem, kuid keskmiselt siiski 10-100 korda. Lisaks on mõlema faagi tekitatud lüüsilaiatud deletsioontüvede bakterimurul suuremad kui metsiktüve tassil (Joonis 8).



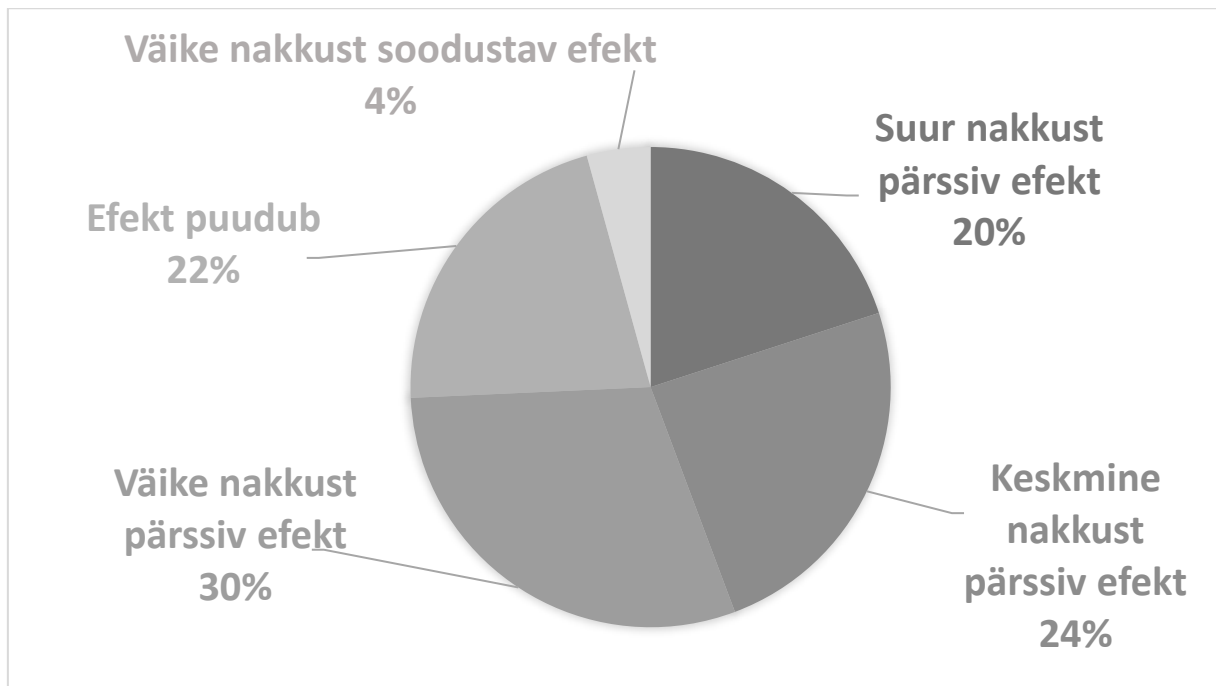
Joonis 8. G6 perekonna faagide nakatumiseefektiivsusele on ppGpp-l suur mõju. G6 perekonna faagide lüüsilaiatud metsiktüve ja Δ 3ppGpp bakterimurudel. Esitatud on faagide Luke 3 ja IPA 2 erinevate lahjenduste lüüsilaiatud (10-kordsed lahjendused). Faagitiiter, millest tilkkülv tehti, on märgitud joonise kohal ning nakatumiseefektiivsus metsiktüvega võrreldes on pildi kõrval sulgudes. Esitatud on kolmest korduskatses ühe iseloomustava katse tulemused. Pilt on tehtud pärast 20 h kasvu temperatuuril 20 °C.

G7 ja G8 perekonna faagide nakatamisefektiivsusele avaldab ppGpp kontsentratsioon vaid vähe mõju. G7A faag Kalliojaga nakatamisel moodustuvad ppGpp puudusel suuremad lüüsilaidud, kuid lüüsilaidude arv tüvede vahel ei erine (Joonis 9). Perekonna teine faag G7B Kompost 2 nakatab deletsioontüvesid 10 korda efektiivsemalt kui metsiktüve. G8 perekonna ainsa faagi Kurepalu 1 nakkusele on ppGpp puudumine samuti nõrgalt positiivse mõjuga, nakatades deletsioontüvesid metsiktüvest vähem kui 10 korda paremini (Joonis 9).



Joonis 9. G7 ja G8 perekonna faagide nakatamisefektiivsusele on ppGpp mõju väike. G7 ja G8 perekonna faagide lüüsilaidud metsiktüve ja Δ RelASpoT bakterimurudel. Esitatud on faagide Kallioja, Kompost 2 ja Kurepalu 1 erinevate lahjenduste lüüsilaidud (10-kordsed lahjendused). Faagitiiter, millest tilkkülv tehti, on märgitud joonise kohal ning nakatamisefektiivsus metsiktüvega võrreldes on pildi kõrval sulgudes. Esitatud on kolmest korduskatses ühe iseloomustava katse tulemused. Pilt on tehtud pärast 20 h kasvu temperatuuril 20 °C.

Lüüsiakatsetes tahkel söötmel on ppGpp mõju faagiresistentsusele varieeruv (Joonis 10), kuid enamiku faagide korral (74% faagidest) ppGpp takistab faaginakkust. Samuti erineb faagide ppGpp-sõltuvus nii perekondade vahel kui ka perekonnasiseselt. Keskmiselt oli ppGpp-l väiksem efekt näiteks G2 ja G3 perekonna faagide nakatamisefektiivsusele, G5 perekonnas esines aga mitmel faagil tugev sõltuvus ppGpp-st (Lisa 1, Tabel 1). Perekonnasiseselt on ppGpp-sõltuvuse tugevus sarnane perekondades G2, G3, G4, G6 ja G7. ppGpp poolt faaginakkusele avaldatava efekti määr oli varieeruvam perekondades G1, G5 ja G9. Lisaks esines varieeruvust ppGpp mõju osas ka liigisiselt, mida ilmestavad eriti G5B liigi faagide tulemused (Lisa 1, Tabel 1).



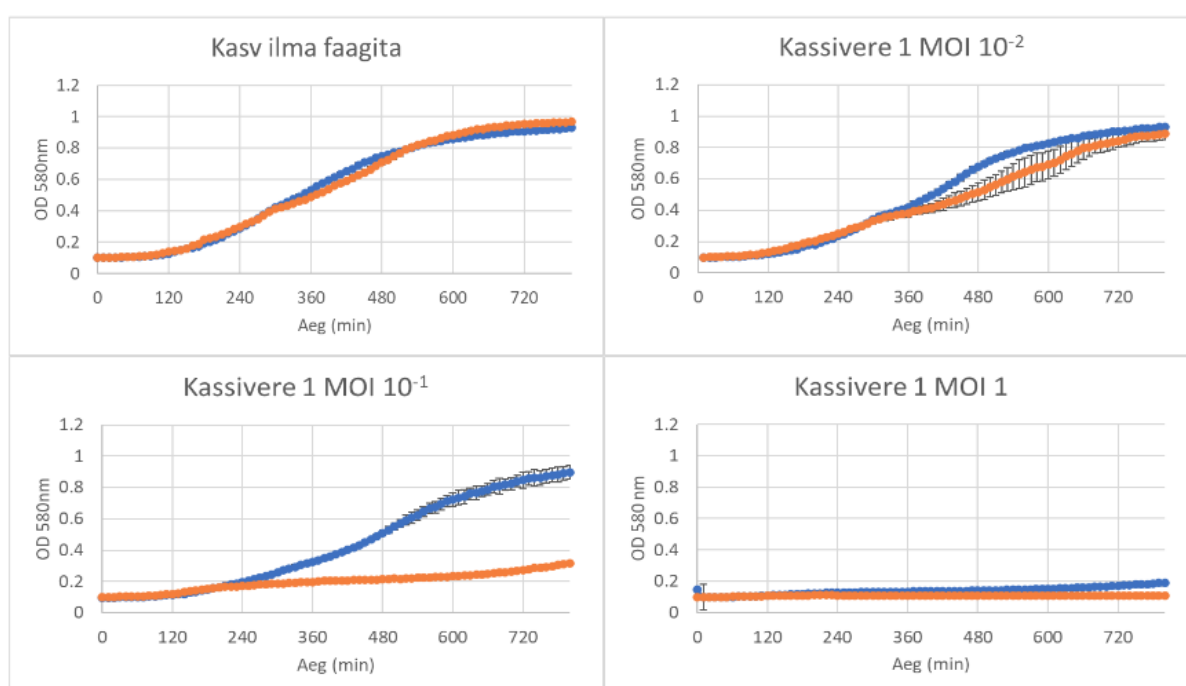
Joonis 10. Üldiselt kaitseb ppGpp faaginakkuse vastu. Uuritud faagide jaotumine ppGpp mõju alusel. 21 faagi nakkuse puhul (30%) on ppGpp kaitsev mõju bakterile väike, alla 10-kordne efekt. 17 faagile (24%) avaldas ppGpp keskmist mõju ehk suurendas bakteri elumust ligi 10 kordselt. Suurt mõju avaldas ppGpp 14 faagile (20%), mille puhul ppGpp kaitse oli rohkem kui 10-ne kuni ligi 100-kordne. ppGpp ei avalda aga mõju 15 faagile (22%) ning kolme faagi (4%) puhul poomisvastus vastupidi soodustab vähesel määral faaginakkust (kordaja -10-0).

2.3.2. Poomisvastuse mõju bakterite faagitaluvusele vedelsöötmes

Tahkel söötmel faaginakkuse sõltuvuse vaatlemine võib jääda ebamääraseks, sest lüüsilaiikude, eriti nende suuruse arvestamine on hinnanguline. Samuti võib lahja faagitiitri korral sattuda faagipartikkel igasse 1,5 µl tilka veidi juhuslikkuse alusel, mis ei pruugi peegeldada tüve tundlikkust ja võib seega keskmist ppGpp-sõltuvust vähesel määral mõjutada. Selleks, et täpsemalt mõõta faagide nakatamise sõltuvust raku ppGpp tasemest, mõõdeti faagiga nakatatud bakterite kasvukõveraid ka vedelsöötmes, mis võimaldavad täpsemalt jälgida faaginakkuse dünaamikat. Selleks valiti välja 8 faagi erinevatest perekondadest nii, et esindatud oleksid erinevad ppGpp-sõltuvuse määrad. Vedelsöötmes kasvatamisel näitab ppGpp sõltuvuse efekti *P. putida* metsiktüve (või $\Delta 4\phi$) ja $(\Delta 4\phi)\Delta 3ppGpp$ tüve kasvukõverate võrdlemine erinevate nakatumiskordajate (MOI-de) korral. Kaheksa faagiga nakatamisel saadud kasvukõverad on peatükidesse jaotatud perekondliku kuuluvuse alusel.

2.3.2.1. ppGpp kaitseb G1 perekonna faagide Kõpa 4 ja Kassivere 1 nakkuse vastu vedelsöötmes suurel määral

G1 perekonna faagidega viidi vedelkatsed läbi, et selgitada tahkel söötmel saadud tugevat ppGpp kaitseefekti. Faagid Kõpa 4 (G1B) ja Kassivere 1 (G1D) nakatavad mõlemad vedelsöötmes metsiktüve vähem kui $\Delta 3ppGpp$ tüve. Mõlema faagi nakkus oli ppGpp puudumisel 10 kuni 100 korda suurem (Joonisel 11 on esitatud bakterite kasvukõverad Kassivere 1 faagiga nakatamisel, kasvukõverad Kõpa 4 faagiga nakatamisel on toodud Lisas 2 Joonisel 1). Kassivere 1 faagi juuresolekul madala MOI väärtusega (10^{-2}) kasvasid nii $\Delta 3ppGpp$ tüve kui ka metsiktüve rakud. Kümme korda kangema MOI korral $\Delta 3ppGpp$ tüvi enam kasvada ei suutnud. Veel 10 korda kangema MOI korral ei kasvanud kumbki tüvi.

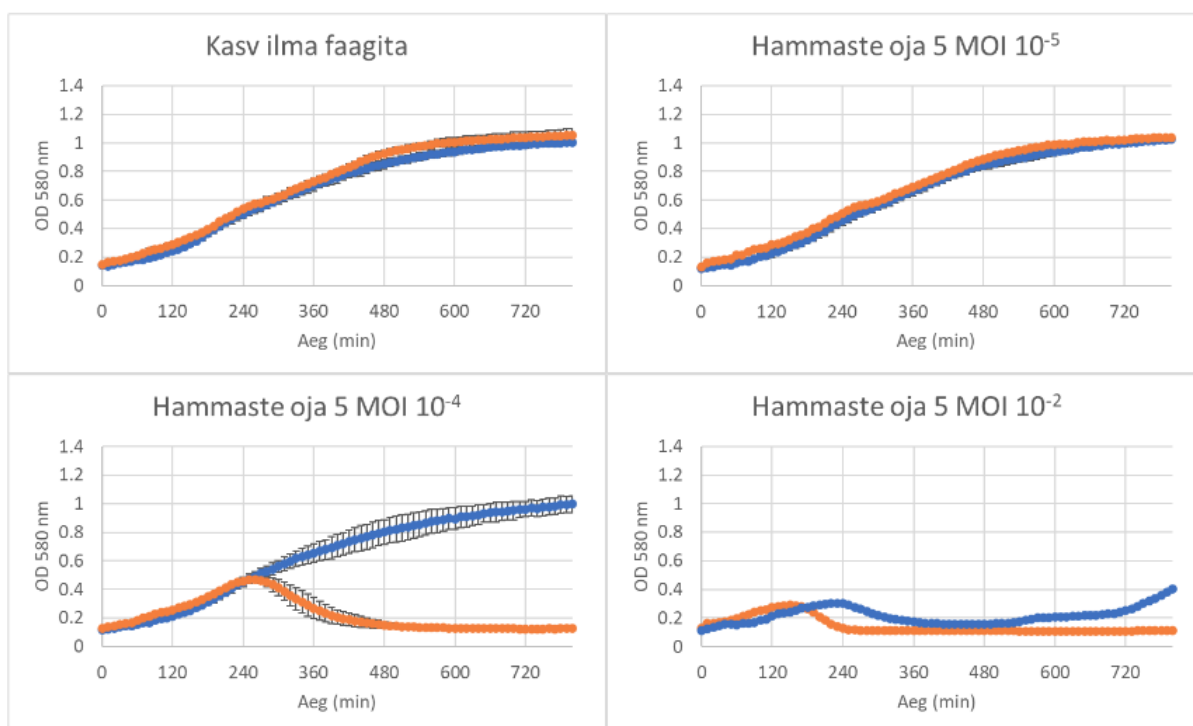


● metsiktüvi ● $\Delta 3ppGpp$

Joonis 11. Metsiktüvi talub faag Kassivere 1 nakkust 10 korda paremini kui poomisvastuse suhtes defektne tüvi. Metsiktüve (sinine) ja $\Delta 3ppGpp$ (oranž) tüve kasvukõverad G1D faag Kassivere 1-ga nakatamise järgselt erinevate MOI-de korral ühes vedelsöötme katses. Veapiirid tähistavad standardhälvet kolme paralleeli keskmisest. X-teljel on aeg minutites, Y-teljel vastaval ajahetkel mõõdetud OD lainepikkusel 580 nm. Toodud on kahest kolme tehnilise paralleeliga katses ühe iseloomustava katse tulemused.

2.3.2.2. G2 perekonna faagid nakatavad vedelsöötmes poomisvastuse mutanti efektiivsemalt kui metsiktüve

G2 perekonna faagid valiti vedelsöötme katsesse, et selgitada nõrga ppGpp kaitse tagamaid. G2A liigi faagi Hammaste oja 5 vedelsöötme katse näitas, et ppGpp tagab bakterile 10- kuni 100-kordse kaitse (Joonis 12). Nii $\Delta 3ppGpp$ tüve kui ka metsiktüve rakud kasvasid Hammaste oja 5 väga madala nakatamiskordajaga nakatamisel ($MOI 10^{-5}$), kuid kümme korda kangema MOI korral $\Delta 3ppGpp$ tüvi enam ei kasvanud. Ka nakatamiskordajaga $MOI 10^{-3}$ nakatamisel kasvasid vaid metsiktüve rakud (ei ole joonisel näidatud). Metsiktüvi ei suutnud kasvada alles $MOI 10^{-2}$ nakatamisel. Ka G2A faag Keeri vedelsöötme katse tulemused näitavad ppGpp 10 kuni 100-kordset pärssivat mõju faaginakkusele (Lisa 2, Joonis 2).

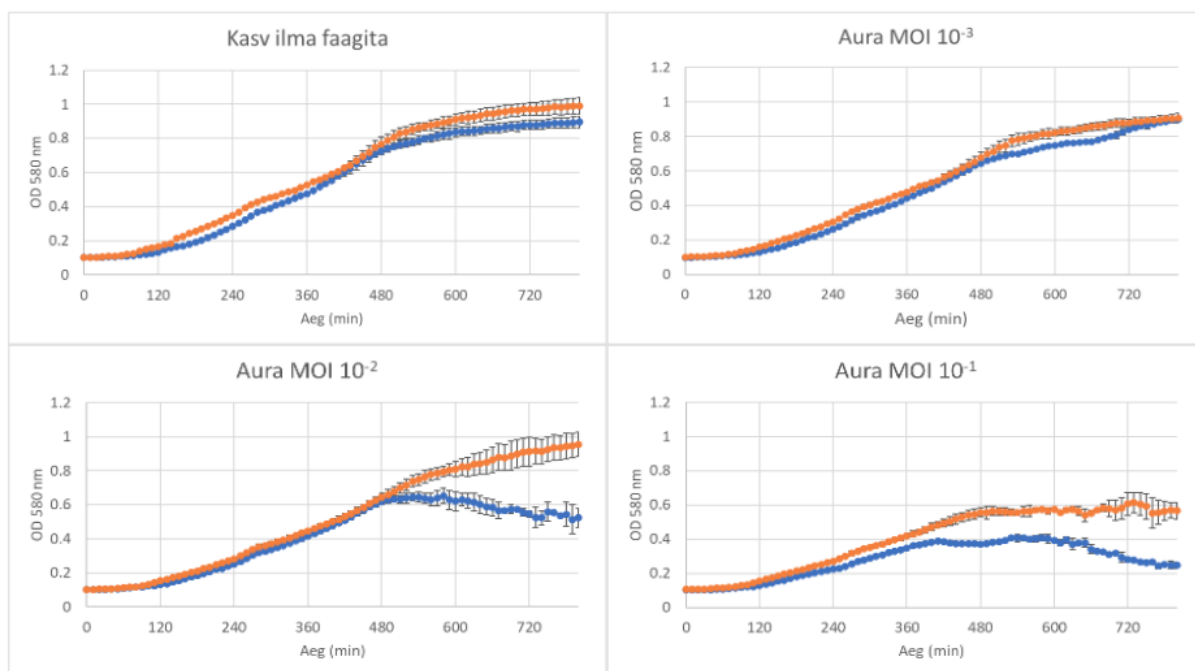


Joonis 12. Hammaste oja 5 nakatab poomisvastuseta rakke 100 korda paremini kui metsiktüve. Metsiktüve (sinine) ja $\Delta 3ppGpp$ (oranž) tüve kasvukõverad G2A faag Hammaste oja 5-ga nakatamise järgselt erinevate MOI-de korral teises vedelsöötme katses. Veapiirid tähistavad standardhälvet kolme paralleeli keskmisest. X-teljel on aeg minutites, Y-teljel vastaval ajahetkel mõõdetud OD lainepikkusel 580 nm. Toodud on kahest kolme tehnilise paralleeliga katses ühe iseloomustava katse tulemused.

2.3.2.3. G3 perekonna bakteriofaag Aura vajab efektiivsemaks nakatamiseks poomisvastuse olemasolu

G3A faagi Aura valisin vedelsöötme katsesse, kuna see on üks vähestest faagidest faagiraamatukogus, mille nakatamisefektiivsust ppGpp puudumine hoopis vähendab. Aura

faagiga nakatamisel mõõdetud kasvukõverad tõestasid, et ppGpp puudumine tõepoolest vähendas faaginakkuse efektiivsust (nakatumiseefektiivsus ppGpp puudumisel kuni 10 korda väiksem) (Joonis 13). Kuigi efekt on väike, oli see korduvalt samaväärne. Nii $\Delta 4\phi$ kui ka $\Delta 4\phi\Delta 3ppGpp$ tüve rakud kasvasid katses MOI 10^{-3} väärtusel faagiga nakatamisel, kuid kümme suurema faagi hulga kasvas $\Delta 4\phi\Delta 3ppGpp$ tüvi halvemini. Veel 10 korda kangema MOI (10^{-1}) korral oli mõlema tüve kasv tugevalt häiritud. Kõrge nakatumiskordajaga nakatamisel (MOI 1) ei kasvanud enam kumbki tüvi üldse (ei ole näidatud).



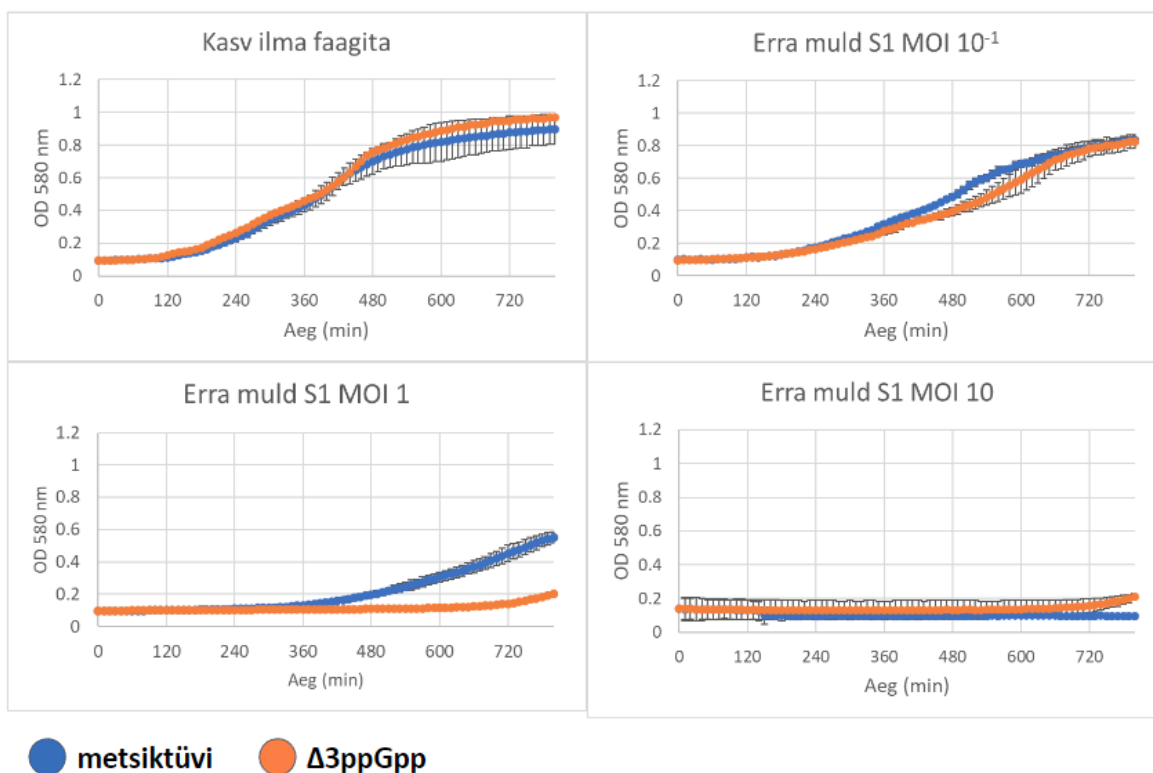
● $\Delta 4\phi$ ● $\Delta 4\phi\Delta 3ppGpp$

Joonis 13. Faag Aura nakatab $\Delta 4\phi$ tüve vähesel määral paremini kui $\Delta 4\phi\Delta 3ppGpp$ tüve. $\Delta 4\phi$ (sinine) ja $\Delta 4\phi\Delta 3ppGpp$ (oranž) tüvede kasvukõverad G3A faag Aura-ga nakatamise järgselt erinevate MOI-de korral esimeses vedelsöötme katses. Veapiirid tähistavad standardhälvet kolme paralleeli keskmisest. X-teljel on aeg minutites, Y-teljel vastaval ajahetkel mõõdetud OD lainepikkusel 580 nm. Toodud on kahest kolme tehnilise paralleeliga katsest ühe iseloomustava katse tulemused.

2.3.2.4. ppGpp kaitseb G5 perekonna bakteriofaagide Erra muld S1 ja Laguja oja 2 vastu vedelsöötmes vaid vähesel määral

G5 perekonna faagide tugeva ppGpp-sõltuvuse uurimiseks kaasasin vedelsöötme katsesse ka faagid Erra muld S1 ja Laguja oja 2, vastavalt liikidest G5A ja G5B. Erra muld S1 kasvukõverate mõõtmisel ilmnes, et nii $\Delta 3ppGpp$ tüve kui ka metsiktüve rakud kasvasid MOI 10^{-1} korral võrdväärselt, kuigi aeglasemalt kui faaginakkuseta katses (Joonis 14). Kümme korda kangema faagitiitriga nakatamisel (MOI 1) ei suutnud $\Delta 3ppGpp$ tüvi 12 tunni jooksul kasvama hakata, samas kui metsiktüvi suutis mingil määral kasvada. Veel 10 korda kangema

nakatamiskordaja puhul, kui 1 bakteriraku kohta oli arvutuslikult 10 faagipartiklit, ei kasvanud kumbki tüvi. Seega on ppGpp mõju faagi nakatamiseefektiivusele väike, pärssides faaginakkust vaid väga vähesel määral (nakatamiseefektiivsus 0-10 korda tugevam ppGpp puudumisel, Joonis 14). Veel enam, G5B faag Laguja oja 2 kummaski vedelsöötme katses ei mõjutanud ppGpp faaginakkust ja erinevate nakatumiskordajate korral olid deletsioontüve ja metsiktüve kasvukõverad alati sarnased (Lisa 2, Joonis 3).



Joonis 14. Faag Erra muld S1 nakatamiseefektiivsusele on ppGpp mõju väike. Metsiktüve (sinine) ja $\Delta 3ppGpp$ (oranž) tüve kasvukõverad G5A Erra muld S1-ga nakatamise järgselt erinevate MOI-de korral teises vedelsöötme katses. Veapiirid tähistavad standardhälvet kolme paralleeli keskmisest. X-teljel on aeg minutites, Y-teljel vastaval ajahetkel mõõdetud OD lainepikkusel 580 nm. Toodud on kahest kolme tehnilise paralleeliga katses ühe iseloomustava katse tulemused.

2.3.2.5. ppGpp mõjutab G9 perekonna bakteriofaag Kurepalu 2 nakatamiseefektiivsust vedelsöötmes vähesel määral

G9 perekonna faag Kurepalu 2 valiti vedelsöötme katsesse tugeva ppGpp-sõltuvuse tõttu tardsöötmes, ent vedelsöötmes nakatades mõjutab ppGpp selle faagi nakatamiseefektiivsust vähe. Iseloomustava tulemuse graafikud on toodud Lisa 2 Joonisel 4.

2.4. Faagiraamatukogu ppGpp-sõltuvus on varieeruv

Lõplike järelduste tegemiseks faagiraamatukogu ppGpp-sõltuvuse kohta võrdlesin agarsöötme bakterimuruga tassidel läbiviidud lüüskatseid vedelsöötmes mõõdetud kasvukõverate tulemustega. Enamasti sai tahkel söötme saadud ppGpp mõju faaginakkusele vedelsöötme katsetega kinnitust, kuigi mõju tugevus oli mõnel juhul erinev.

Kahel faagil kaheksast avaldas ppGpp faaginakkusele sarnast mõju nii vedelas kui tahkel söötme (Tabel 3). Katsed vedelsöötmes kinnitasid vastavalt ppGpp keskmist kaitseefekti G1D faagi Kassivere 1 suhtes ning nõrka faaginakkust soodustavat efekti G3A faagi Aura suhtes. Kuuel faagil kaheksast erines ppGpp poolt faaginakkusele avaldatav mõju tugevus vedelas ja tahkel söötmes. Kusjuures, faagi Keeri puhul selgus, et kuigi tahkel söötme näis ppGpp nakkusefektiivsust suurendavat, siis vedelsöötmes vähendas ppGpp Keeri nakatamiseefektiivsust rohkem kui 10 korda.

Tabel 3. Töö põhiosas väljatoodud faagide nakatamiseefektiivsuse määr tahkel ja vedelas söötmes.

Faag	Liik	ppGpp kaitse tugevus tahkel söötme	ppGpp kaitse tugevus vedelsöötmes
Kõpa 4	G1B	0-10	10-100
Kassivere 1	G1D	10-100	10-100
Amme 3	G1A	0-10	
Nõo 2	G1C	10	
Rõõmu 2	G1E	10	
Hammaste oja 5	G2A	0-10	10-100
Keeri	G2A	-10-0	10-100
Keila jõgi	G2B	0-10	
Vasula järv	G2C	0-10	
Aura	G3A	-10-0	-10-0
Pori 4	G3B	0	
Lauda oja 3	G3C	0	
Erra muld S1	G5A	100	0-10
Laguja oja 2	G5B	10	0
Hammaste oja 2	G5C	0-10	
Bot aed	G5D	10	
Luke 3	G6A	100	
IPA 2	G6B	10-100	
Kallioja	G7A	0-10	
Kompost 2	G7B	10	
Kurepalu 1	G8A	0-10	
Kurepalu 2	G9A	100	0-10
Pori 3	G9A	100	
Mudajõgi	G9B	0-10	

3. Arutelu

3.1. ppGpp puudumine vähendab bakteri faagitaluvust

Erinevate ppGpp metabolismiensüümide deletsioontüvede võrdluses erinesid faaginakkusele vastuvõtlikkuse poolest metsiktüvest enim deletsioontüved $(\Delta 4\phi)\Delta RelA SpoT$ ja $(\Delta 4\phi)\Delta 3ppGpp$. See oli ka eeldatav, sest erinevalt $\Delta RelA$ või $\Delta 2450$ tüvedest, ei suuda need tüved üldse ppGpp-d sünteesida, sest mõlema genoomist on puudu mõlemad ppGpp sünteesiks võimelised ensüümid RelA ja SpoT. Kuna nende kahe tüve puhul võis efekti näha 74% testitud faagidega, võib järeldada, et ppGpp kaitseb enamuse faagide vastu (Lisa 1, Tabel 1). Sellest omakorda on võimalik järeldada, et poomisvastus kaitseb faaginakkuse korral ka *P. putida*-t, nagu on varem kirjeldatud katsetes *E. coli*-ga (Nowicki *et al.*, 2013). Järeldusi kinnitavad tulemused, mis näitavad ppGpp sünteesiks võimeliste deletsioontüvede $(\Delta 4\phi)\Delta RelA$ ja $(\Delta 4\phi)\Delta 2450$ faaginakkusele vastuvõtlikkuse sarnasust metsiktüvega, erinedes samal ajal teiste, ppGpp sünteesiks võimetute deletsioontüvede tulemustest (Lisa 1, Joonis 1). Mõlemad tüved on võimelised sünteesima ensüümi SpoT ning $\Delta 2450$ tüvi lisaks ka valku RelA, mistõttu on ppGpp süntees neil tüvedel tagatud. Seetõttu ei erine nende tüvede nakatumine märkimisväärselt metsiktüvest. Minu tulemustest saab järeldada, et ensüüm SpoT kompenseerib $\Delta RelA$ tüve puhul efektiivselt ppGpp sünteesi puudujäägi faaginakkuse olukorras.

Teadu on, et ensüümid RelA ja SpoT reageerivad erinevate stressiallikate korral erinevalt, mis mõjutab ka ensüümide ppGpp sünteesi võimet (käesoleva töö kirjanduse ülevaade, Atkinson *et al.*, 2011), kuid seni pole põhjalikult võrreldud RelA ja SpoT ppGpp sünteesi efektiivsust faaginakkuse korral. Kahjuks ei ole SpoT geeni deleteerimine võimalik (Xiao *et al.*, 1991), muidu oleks huvitav teha veel katseid $\Delta SpoT$ tüvega ning võrrelda, kas see tüvi erineb kuidagi teistest faaginakkusele vastuvõtlikkuse suhtes. Selleks, et rakkudes tõsta ppGpp taset metsiktüvest kõrgemale, saaks katset läbi viia seriin-hüdroksamaadiga. Nimelt on katsetes näidatud, et seriin-hüdroksamaadi lisamine söötmesse indutseerib RelA aktivatsiooni, mille tagajärjel ppGpp tase rakkudes tõuseb (Vogeleer & Létisse, 2022).

PP_2450 on vaid ennustatud SAH valk (Atkinson *et al.*, 2011) ja tegelikku ppGpp lagundamiseefektiivsust ei ole sel valgul tõestatud. Seega ei ole kindel, et PP_2450 geeni eemaldamine üldse rakusisest ppGpp taset mõjutab. Kuna $\Delta 2450$ tüve vastuvõtlikkus faaginakkusele on katsetes sarnane nii $\Delta RelA$ kui ka metsiktüvega (Lisa 1, Joonis 1), võib järeldada, et ennustataval SAH valgul PP_2450 puudub märkimisväärne roll faagide vastases kaitses, isegi kui tal on ppGpp lagundamise võimekus. Seda kinnitab veel $\Delta RelA \Delta SpoT$ ja

$\Delta 3ppGpp$ tüvede sarnasus nakkusele vastuvõtlikkuses, sest tüvesid eristab vaid $\Delta 3ppGpp$ genoomist puuduv PP_2450 valk.

3.2. Erinevused poomisvastuse mõjus faagitaluvusele tahkel ja vedelas söötmes

Katsed vedelsöötmes kinnitasid tahkel söötmel saadud ppGpp mõju suunda seitsme faagi puhul kaheksast (Tabel 3), kinnitades ühtlasi ka ppGpp-sõltuvate faagide esinemist, mis oli ka vedelsöötme katse eesmärk. Siiski erines see ühe faagi puhul: G2A Keeri oli tahkel söötmel läbi viidud lüüskatsetes ppGpp-st vähesel määral positiivselt, vedelsöötme katsetes tugevalt negatiivselt sõltuv (Lisa 2, Joonis 2). Lisaks, teiste faagide puhul oli mõju suund küll sama, kuid kuuel faagil erines ppGpp-sõltuvuse tugevus tahkel ja vedelas söötmes. Neist kolmel faagil mõjutas ppGpp faaginakkust vedelsöötmes tugevamalt ja kolmel nõrgemalt kui tahkel söötmel keskmiselt.

Tulemuste erinevus võib tuleneda mitmest asjaolust. Esiteks, bakteri interaktsioonid faagidega tahkel substraadil kasvades erinevad olukorrast, kus bakter kasvab vedelikus vabalt. Tahkel söötmel on bakter paremini kaitstud biofilmi maatriksi tõttu, mille heterogeensus piirab faagide difundeerumist bakteriteni (Flemming ja Wingender, 2010). Ka bakteri pinnaomadused tahkel ja vedelas söötmes erinevad kohati üksteisest (Costerton *et al.*, 1995). Sellised erinevused võivad mõjutada ppGpp taset metsiktüve rakkudes. Kui mõne faagi puhul on ppGpp-sõltuvus sarnane nii vedelas kui tahkel söötmel, võib oletada, et nakatamine ei sõltu nende faagide puhul raku omadustest, mis muutuvad.

Et oleks võimalik võrrelda, kas tahkel söötmel esinevad perekonna- või liigisisese erinevused on sarnased ka vedelsöötmes, tuleks vedelsöötmes ka teiste faagidega katseid läbi viia. Vedelsöötmes testitud faagide puhul on perekonnasisene erinevus väike või puudub (Tabel 3), kuid väikese valimi tõttu ei saa väita, et see on reegel, mitte juhus. Siiski näitas katse tahkel söötmel enamasti ppGpp mõju ära, kuigi efekti tugevus oli mõnikord erinev. Seega sobib kiiremaks faagiraamatukogu sõelumiseks katset läbi viia ka tahkel söötmel.

3.3. Faagikollektsiooni faagide ppGpp-sõltuvus on varieeruv

3.3.1. ppGpp faaginakkuse vastane kaitsev efekt on varieeruv

Alarmoon ppGpp deletsioontüvesid ($\Delta 4\phi$) $\Delta RelA\Delta SpoT$ ja ($\Delta 4\phi$) $\Delta 3ppGpp$ nakatasid tahkel söötmel metsiktüvest paremini 74% sõelatud faagidest (Lisa 1, Tabel 1). Kuna deletsioontüved erinevad metsiktüvest vaid ppGpp sünteesi võimekuse poolest ($\Delta RelA\Delta SpoT$ ja $\Delta 3ppGpp$ ei

ole võimelised ppGpp-d sünteesima), siis järelikult kaitses just ppGpp metsiktüve faaginakkuse eest. Kuna ppGpp-l oli katsetes kaitsev efekt 74% juhtudest, võib järeldada, et ppGpp-l on oluline roll faagivastases kaitses.

ppGpp kaitsev mõju nende faagide nakkuse suhtes oli aga varieeruv. 70-st faagist mõjus ppGpp nakkusele pärssivalt 21 faagile vähesel, 17 faagile keskmisel ja 14 faagile suurel määral (Lisa 1, Tabel 1). Seega pole ppGpp faagivastase kaitse tagamisel alati võrdse efektiivsusega, kuid peaaegu poolte sõelutud faagide korral on näha ppGpp 10–100-kordset kaitsvat efekti: metsiktüvi suutis katsetes elada 10–100 korda suurema faagitiitri korral kui deletsioontüved ($\Delta RelA\Delta SpoT$ ja $\Delta 3ppGpp$). Seega tagab ppGpp üldiselt faagide vastu kaitse.

Nelja faagi puhul 70-st oli efekt aga vastupidine: mõnel deletsioontüve bakterimuruga tassil esines vähem lüüsilaike või need olid väiksemad kui metsiktüve omadel. Selle põhjuseks võiks olla, et need faagid kasutavad ppGpp-d või poomisvastust enda kasuks ära, suurendades selle abil oma virulentsust või vajavad efektiivsemaks nakatamiseks ppGpp (või seda sünteesivate valkude) olemasolu. ppGpp faaginakkust soodustav mõju oli nende faagide puhul siiski väike (vähem kui kümnekordne efekt) ning sellist efekti võib pidada erandlikuks. Kõik neli faagi kuuluvad perekondadesse, kus ppGpp mõju faaginakkusele on pigem väike. Siiski leidsid agarsöötmele saadud tulemused neist ühe faagi (G3A Aura) puhul kinnitust ka vedelsöötmes (Tabel 3). Sarnaselt neile tulemustele, on varasemalt näidatud oksüdatiivse stressi vastuse vajalikkus faaginakkuseks *Campylobacter jejuni* nakatamisel T4-tüüpi faagiga (Sacher *et al.*, 2018). Seega on ka varem näidatud, et bakteri stressivastused võivad olla efektiivselt faaginakkuseks vajalikud ja sarnaselt *C. jejuni* nakatamiskatsetes nähtule (Sacher *et al.*, 2018), võib ka poomisvastus olla mõne faagi puhul nakkuseks vajalik.

15 faagi korral (22%) ei tõestanud katsed tahkel söötmele keskmiselt ei ppGpp kaitsvat ega faaginakkust soodustavat mõju. See annab veidi tugevust juurde selle töö tulemustele – kuna kõik faagid ei sõltu ppGpp-st, kinnitavad nende faagidega saadud tulemused, et ppGpp deletsioontüvede elumus on suurema ppGpp-sõltuvusega faagide puhul halvem faaginakkuse, mitte aga muu kaudse asjaolu tõttu. Kui kõikide faagide puhul oleks ppGpp-l faaginakkust pärssiv efekt, oleks suure tõenäosusega tegemist just ppGpp puudumisest tingitud kaudse efektiga deletsioontüvede elumusele, mida on varasemalt näidatud (Dalebroux *et al.*, 2010). Mõju puudumine võib siiski mõne faagi puhul olla näiline ning tingitud katsete detektsioonipiirist. Katsetes on vahepealse tulemuse aluseks lüüsilaiigu suurus, mis on pigem hinnanguline väärtus. Täpsemate tulemuste saamiseks tuleks lisaks läbi viia katsed väiksema kordsusega lahjendusemääraga (näiteks kahekordsete lahjenduste rida). Nii oleks võimalik

tuvastada ka väga väikest efekti ning samuti täpsemalt kaardistada faagide jaotumist ppGpp tundlikkuse alusel.

3.3.2. ppGpp-sõltuvus varieerub erinevatel perekondadel erineval määral
Testitud faagiperekondadest olid ühtseimad perekonnad G2 ja G3 (perekondades vastavalt 18 ja 11 faagi), mille nakatamisefektiivsusele oli ppGpp mõju keskmiselt väike või puudus (Lisa 1, Tabel 1). Kuna G2 perekonnas olid enamused faagid samast liigist, siis on vähene erinevus eeldatav, sest liigisiselt erinevad faagide genoomijärjestused vaid 5% osas. Arvuliselt väiksema faagide esindatusega perekondade kohta, kus varieeruvus oli väike (G4, G6, G7, G8), ei ole väikese valimi tõttu võimalik perekonnaüleseid järeldusi teha (Lisa 1, Tabel 1). Faagiraamatukogu täiendamisel saaks täpsemaid järeldusi teha ka nende faagiperekondade kohta.

ppGpp mõju suhtes varieeruvamaks võib pidada perekondi G1, G5 ja G9. Kuigi G1 ja G9 on faagiraamatukogus väiksema esindatusega (perekondades vastavalt 5 ja 3 faagi), esineb neis väljatoomist väärivat varieeruvust. G1 perekonnasisene suurem varieeruvus on seletatav liikide arvukusega selles perekonnas. Kõik G1 faagid kuuluvad erinevatesse liikidesse (genoomide identsus 70-95%), seega on nende genoomid suurel määral erinevad. Tõepoolest, vaid G1A ja G1B liikidel on ppGpp tundlikkuse määr sama (Joonis 2). G9 perekonnas on liikide G9A ja G9B vahel ppGpp pärssiv mõju ligi 100-kordselt erinev (Joonis 3). Selliseid erinevusi võiks ära kasutada, et leida põhjus, miks ühe faagi nakkus on ppGpp poolt takistatud. Kuna nende liikide genoomid on suurel määral identsed (vähemalt 70%), siis võiks genoomide võrdlusel leida ka suurt varieeruvust põhjustava teguri.

Kõige tõhusam oleks selliselt võrrelda ühe liigi esindajaid, kes ppGpp tundlikkuse osas suurel määral erinevad. Kuna identsuse määr liigisiselt on kõrgem, on suurem ka tõenäosus leida ppGpp tundlikkuse suhtes varieeruvust põhjustavat genoomi osa. Lisaks võib ppGpp mõju faagi nakatamisefektiivsusele ka liigisiselt suurel määral erineda. Sõelatud G5 perekonna faagidest kuuluvad enamused (18 faagi 26-st) liiki G5B, kus liigisisene varieeruvus oli maksimaalselt 100 korda: Kitseküla 3 faagi vastu kaitses ppGpp 100-kordselt ja Mõra jõgi 3 nakatumine ei sõltunud ppGpp-st (Lisa 1, Tabel 1). Nende kahe faagi genoomide võrdlemisel on suur tõenäosus leida varieeruvuse põhjus. Nii saaks arvatavasti paremini mõista, milliste mehhanismide kaudu panustab poomisvastus faagivastasesse kaitsesse. See võib omakorda aidata seletada, miks osad faagid on ppGpp suhtes tundlikumad kui teised.

Kokkuvõte

Käesoleva töö praktilise osa eesmärk oli välja selgitada, kas *P. putida* poomisvastus osaleb ppGpp vahendusel selle bakteri faagivastases kaitses ning kui üldine on poomisvastuse tagatud kaitse.

Poomisvastuse faagitaluvust suurendavat mõju võis näha 74% testitud faagide puhul ning ppGpp pärssiv mõju faaginakkusele varieerus uuritud faagidel kohati nii perekonna- kui ka liigisiselt. Esines ka üksikuid faage, mille nakatamisefektiivsusele oli ppGpp-l vastupidi positiivne mõju. Kasvukõverate analüüs vedelsöötme katsetes valdavalt kinnitas tahkel söötmel nähtud ppGpp kaitsvat mõju, kuigi selle tugevus võis erineda.

ppGpp regulatsiooniensüümide deletsioontüvede ja *P. putida* metsiktüve PaW85 elumuse võrdlemisel faaginakkuse järgselt selgus, et Δ RelASpoT ja Δ 3ppGpp tüvesid lüüsis faag metsiktüvest efektiivsemalt. Δ RelA ja Δ 2450 kui vähemalt osalise ppGpp sünteesi võimekusega tüvede elumus oli metsiktüvega sarnane. Need tulemused kinnitavad (p)ppGpp vajalikkust faagitaluvuse tõstmiseks. Samuti näitavad tulemused, et ennustatav SAH valk PP_2450 ei ole oluline poomisvastuse faagivastases kaitses ning peamiselt ppGpp-d hüdrolyüsiv ensüüm SpoT on RelA puudumise korral võimeline tagama ppGpp kontsentratsiooni kasvu poomisvastuse vallandumiseks.

Käesoleva tööga on kirjeldatud poomisvastuse kaitsev efekt *Pseudomonas putida* faagide vastu nii tahkel kui ka vedelas söötmes. Tulemuste põhjal võib järeldada, et poomisvastus üldiselt, kuid varieeruva tugevusega kaitses faaginakkuse eest..

ppGpp in *Pseudomonas putida*'s phage defense

Elise Mägi

Summary

The stringent response is a bacterial response to stress, especially in the case of amino acid deficiency, and it is triggered by an accumulation of the alarmone (p)ppGpp. Previous studies have also suggested that the stringent response has a defensive role against bacteriophage infection (Nowicki *et al.*, 2013; Tabib-Salazar *et al.*, 2018; Slomińska *et al.*, 1999), though the exact mechanisms are yet to be understood. The aim of this study was to ascertain whether *P. putida*'s cellular ppGpp concentration, and thus stringent response, is involved in the bacteria's phage resistance and to determine how general is the defence provided.

In order to study this, experiments were carried out on a solid growth medium to screen the phage library of *Pseudomonas putida* in search of ppGpp-dependent phages. The stringent response increased phage resistance against 74% of the tested phages and the infection inhibiting effect of ppGpp varied in both the phage families and species. There were a few phages whose infection ppGpp contrarily benefited. Analysis of bacterial growth curves in liquid medium largely corroborated the defensive effect of ppGpp seen on solid growth medium, although its intensity may have varied.

Comparing bacterial growth between ppGpp regulatory enzyme deficient strains and *P. putida* wild type PaW85 post infection revealed that phages lysed the Δ RelASpoT and Δ 3ppGpp strain cells more efficiently. Wild type *P. putida*'s susceptibility to infection was similar to that of Δ RelA ja Δ 2450 strains, which are both able to synthesize ppGpp. These results confirm the need for (p)ppGpp to increase phage resistance. The results also show that the hypothesized SAH PP_2450 is not important in inducing phage tolerance by the stringent response, and that SpoT, a mainly ppGpp-hydrolysis enzyme, can ensure the accumulation of ppGpp and induce the stringent response even in the absence of RelA.

This study has described the defensive effect stringent response has against *Pseudomonas putida*'s bacteriophages in both solid and liquid growth mediums. From these results it can be deduced that stringent response has a general inhibitory effect with variable strength against bacteriophage infection.

Tänuõnad

Soovin siinkohal tänada oma juhendajat Hedvigi suurepärase juhendamise eest. Samuti tahaksin nõuannete eest tänada Ritat ja Andrest.

Kasutatud kirjandus

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.

Bondy-Denomy, J., Qian, J., Westra, E. R., Buckling, A., Guttman, D. S., Davidson, A. R., & Maxwell, K. L. (2016). Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms. *The ISME journal*, *10*(12), 2854–2866.

Cashel, M., & Gallant, J. (1969). Two compounds implicated in the function of the RC gene of *Escherichia coli*. *Nature*, *221*(5183), 838–841.

Claudi, B., Spröte, P., Chirkova, A., Personnic, N., Zankl, J., Schürmann, N., Schmidt, A., & Bumann, D. (2014). Phenotypic variation of *Salmonella* in host tissues delays eradication by antimicrobial chemotherapy. *Cell*, *158*(4), 722–733.

Corrigan, R. M., Bellows, L. E., Wood, A., & Gründling, A. (2016). ppGpp negatively impacts ribosome assembly affecting growth and antimicrobial tolerance in Gram-positive bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(12), E1710–E1719.

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual review of microbiology*, *49*, 711–745.

Dalebroux, Z. D., Svensson, S. L., Gaynor, E. C. & Swanson, M. S. (2010). ppGpp conjures bacterial virulence. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, *74*(2), 171–199.

Diez, S., Ryu, J., Caban, K., Gonzalez, R. L., Jr, & Dworkin, J. (2020). The alarmones (p)ppGpp directly regulate translation initiation during entry into quiescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(27), 15565–15572.

Fernández, L., González, S., Campelo, A. B., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2017). Low-level predation by lytic phage phiIPLA-RODI promotes biofilm formation and triggers the stringent response in *Staphylococcus aureus*. *Scientific reports*, *7*, 40965.

Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews. Microbiology*, *8*(9), 623–633.

- Flores, C. O., Meyer, J. R., Valverde, S., Farr, L., & Weitz, J. S. (2011). Statistical structure of host-phage interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(28), E288–E297.
- Gallant, J., Irr, J., & Cashel, M. (1971). The mechanism of amino acid control of guanylate and adenylate biosynthesis. *The Journal of biological chemistry*, *246*(18), 5812–5816.
- Gallant, J., Palmer, L., & Pao, C. C. (1977). Anomalous synthesis of ppGpp in growing cells. *Cell*, *11*(1), 181–185.
- Gupta, K. R., Baloni, P., Indi, S. S., & Chatterji, D. (2016). Regulation of Growth, Cell Shape, Cell Division, and Gene Expression by Second Messengers (p)ppGpp and Cyclic Di-GMP in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of bacteriology*, *198*(9), 1414–1422.
- Hamel, E., & Cashel, M. (1974). Guanine nucleotides in protein synthesis. Utilization of pppGpp and dGTP by initiation factor 2 and elongation factor Tu. *Archives of biochemistry and biophysics*, *162*(1), 293–300.
- Hampton, H. G., Watson, B. N. J., & Fineran, P. C. (2020). The arms race between bacteria and their phage foes. *Nature*, *577*(7790), 327–336.
- Haseltine, W. A., & Block, R. (1973). Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *70*(5), 1564–1568.
- Hatfull, G. F., & Hendrix, R. W. (2011). Bacteriophages and their genomes. *Current opinion in virology*, *1*(4), 298–303.
- Hatfull, G. F., Dedrick, R. M., & Schooley, R. T. (2022). Phage Therapy for Antibiotic-Resistant Bacterial Infections. *Annual review of medicine*, *73*, 197–211.
- Hauryliuk, V., Atkinson, G. C., Murakami, K. S., Tenson, T., & Gerdes, K. (2015). Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nature reviews. Microbiology*, *13*(5), 298–309.

- Kamarthapu, V., Epshtein, V., Benjamin, B., Proshkin, S., Mironov, A., Cashel, M., & Nudler, E. (2016). ppGpp couples transcription to DNA repair in *E. coli*. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6288), 993–996.
- Khakimova, M., Ahlgren, H. G., Harrison, J. J., English, A. M., & Nguyen, D. (2013). The stringent response controls catalases in *Pseudomonas aeruginosa* and is required for hydrogen peroxide and antibiotic tolerance. *Journal of bacteriology*, 195(9), 2011–2020.
- Kraemer, J. A., Sanderlin, A. G. & Laub, M. T. (2019). The Stringent Response Inhibits DNA Replication Initiation in *E. coli* by Modulating Supercoiling of *oriC*. *mBio*, 10(4), e01330-19.
- Kriel, A., Bittner, A. N., Kim, S. H., Liu, K., Tehranchi, A. K., Zou, W. Y., Rendon, S., Chen, R., Tu, B. P. & Wang, J. D. (2012). Direct regulation of GTP homeostasis by (p)ppGpp: a critical component of viability and stress resistance. *Molecular cell*, 48(2), 231–241.
- LeRoux, M., & Laub, M. T. (2022). Toxin-Antitoxin Systems as Phage Defense Elements. *Annual review of microbiology*, 76, 21–43.
- Li S. (2019). Regulation of Ribosomal Proteins on Viral Infection. *Cells*, 8(5), 508.
- Lindell, D., Jaffe, J. D., Johnson, Z. I., Church, G. M., & Chisholm, S. W. (2005). Photosynthesis genes in marine viruses yield proteins during host infection. *Nature*, 438(7064), 86–89.
- Loenen, W. A., Dryden, D. T., Raleigh, E. A., Wilson, G. G., & Murray, N. E. (2014). Highlights of the DNA cutters: a short history of the restriction enzymes. *Nucleic acids research*, 42(1), 3–19.
- Lopez, J. M., Dromerick, A., & Freese, E. (1981). Response of guanosine 5'-triphosphate concentration to nutritional changes and its significance for *Bacillus subtilis* sporulation. *Journal of bacteriology*, 146(2), 605–613.
- Murray, K. D. & Bremer, H. (1996). Control of *spoT*-dependent ppGpp synthesis and degradation in *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology*, 259(1), 41–57.
- North, S. H., Kirtland, S. E., & Nakai, H. (2007). Translation factor IF2 at the interface of transposition and replication by the PriA-PriC pathway. *Molecular microbiology*, 66(6), 1566–1578.

- Nowicki, D., Kobiela, W., Węgrzyn, A., Węgrzyn, G., & Szalewska-Pałasz, A. (2013). ppGpp-dependent negative control of DNA replication of Shiga toxin-converting bacteriophages in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, *195*(22), 5007–5015.
- Nguyen, D., Joshi-Datar, A., Lepine, F., Bauerle, E., Olakanmi, O., Beer, K., McKay, G., Siehnel, R., Schafhauser, J., Wang, Y., Britigan, B. E., & Singh, P. K. (2011). Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, *334*(6058), 982–986.
- Owen, S. V., Wenner, N., Dulberger, C. L., Rodwell, E. V., Bowers-Barnard, A., Quinones-Olvera, N., Rigden, D. J., Rubin, E. J., Garner, E. C., Baym, M., & Hinton, J. C. D. (2021). Prophages encode phage-defense systems with cognate self-immunity. *Cell host & microbe*, *29*(11), 1620–1633.e8.
- Piirmets, K. (2022). *Kromosomaalsete toksiin-antitoksiin süsteemide ja profaagide mõju Pseudomonas putida faagiresistentsusele* [Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool].
- Potrykus, K., Murphy, H., Philippe, N., & Cashel, M. (2011). ppGpp is the major source of growth rate control in *E. coli*. *Environmental microbiology*, *13*(3), 563–575.
- Rakhuba, D. V., Kolomiets, E. I., Dey, E. S., & Novik, G. I. (2010). Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish journal of microbiology*, *59*(3), 145–155.
- Rihtman, B., Bowman-Grahl, S., Millard, A., Corrigan, R. M., Clokie, M. R. J., & Scanlan, D. J. (2019). Cyanophage MazG is a pyrophosphohydrolase but unable to hydrolyse magic spot nucleotides. *Environmental microbiology reports*, *11*(3), 448–455.
- Roghanian, M., Van Nerom, K., Takada, H., Caballero-Montes, J., Tamman, H., Kudrin, P., Talavera, A., Dzhygyr, I., Ekström, S., Atkinson, G. C., Garcia-Pino, A., & Hauryliuk, V. (2021). (p)ppGpp controls stringent factors by exploiting antagonistic allosteric coupling between catalytic domains. *Molecular cell*, *81*(16), 3310–3322.e6.
- Sacher, J. C., Flint, A., Butcher, J., Blasdel, B., Reynolds, H. M., Lavigne, R., Stintzi, A., & Szymanski, C. M. (2018). Transcriptomic Analysis of the *Campylobacter jejuni* Response to T4-Like Phage NCTC 12673 Infection. *Viruses*, *10*(6), 332.

- Slomińska, M., Neubauer, P., & Wegrzyn, G. (1999). Regulation of bacteriophage lambda development by guanosine 5'-diphosphate-3'-diphosphate. *Virology*, *262*(2), 431–441.
- Tabib-Salazar, A., Liu, B., Barker, D., Burchell, L., Qimron, U., Matthews, S. J., & Wigneshweraraj, S. (2018). T7 phage factor required for managing RpoS in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(23), E5353–E5362.
- Sanmukh, S., Khairnar, K., Paunikar, W., & Lokhande, S. (2015). Understanding carbon regulation in aquatic systems - Bacteriophages as a model. *F1000Research*, *4*, 138.
- Sarubbi, E., Rudd, K. E., Xiao, H., Ikehara, K., Kalman, M., & Cashel, M. (1989). Characterization of the spoT gene of *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, *264*(25), 15074–15082.
- Seyfzadeh, M., Keener, J., & Nomura, M. (1993). spoT-dependent accumulation of guanosine tetraphosphate in response to fatty acid starvation in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(23), 11004–11008.
- Sharma, S., Chatterjee, S., Datta, S., Prasad, R., Dubey, D., Prasad, R. K., & Vairale, M. G. (2017). Bacteriophages and its applications: an overview. *Folia microbiologica*, *62*(1), 17–55.
- Shyp, V., Tankov, S., Ermakov, A., Kudrin, P., English, B. P., Ehrenberg, M., Tenson, T., Elf, J., & Hauryliuk, V. (2012). Positive allosteric feedback regulation of the stringent response enzyme RelA by its product. *EMBO reports*, *13*(9), 835–839.
- Svitil, A. L., Cashel, M., & Zyskind, J. W. (1993). Guanosine tetraphosphate inhibits protein synthesis in vivo. A possible protective mechanism for starvation stress in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, *268*(4), 2307–2311.
- Szalewska-Pałasz, A. & Wegrzyn, G. (1995). Inhibition of transcription starting from bacteriophage lambda pR promoter during the stringent response in *Escherichia coli*: implications for lambda DNA replication. *Acta biochimica Polonica*, *42*(2), 233–239.
- Tamman, H., Ernits, K., Roghanian, M., Ainelo, A., Julius, C., Perrier, A., Talavera, A., Ainelo, H., Dugauquier, R., Zedek, S., Thureau, A., Pérez, J., Lima-Mendez, G., Hallez, R., Atkinson, G. C., Hauryliuk, V., & Garcia-Pino, A. (2023). Structure of SpoT reveals

evolutionary tuning of catalysis via conformational constraint. *Nature chemical biology*, 19(3), 334–345.

Vogeleer, P., & Létisse, F. (2022). Dynamic Metabolic Response to (p)ppGpp Accumulation in *Pseudomonas putida*. *Frontiers in microbiology*, 13, 872749.

Wang, J. D., Sanders, G. M. & Grossman, A. D. (2007). Nutritional control of elongation of DNA replication by (p)ppGpp. *Cell*, 128(5), 865–875.

Wang, B., Dai, P., Ding, D., Del Rosario, A., Grant, R. A., Pentelute, B. L. & Laub, M. T. (2019). Affinity-based capture and identification of protein effectors of the growth regulator ppGpp. *Nature chemical biology*, 15(2), 141–150.

Wu, L., Wang, Z., Guan, Y., Huang, X., Shi, H., Liu, Y. & Zhang, X. (2020). The (p)ppGpp-mediated stringent response regulatory system globally inhibits primary metabolism and activates secondary metabolism in *Pseudomonas protegens* H78. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(7), 3061–3079.

Xiao, H., Kalman, M., Ikehara, K., Zemel, S., Glaser, G., & Cashel, M. (1991). Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of relA null mutants can be eliminated by spoT null mutations. *The Journal of biological chemistry*, 266(9), 5980–5990.

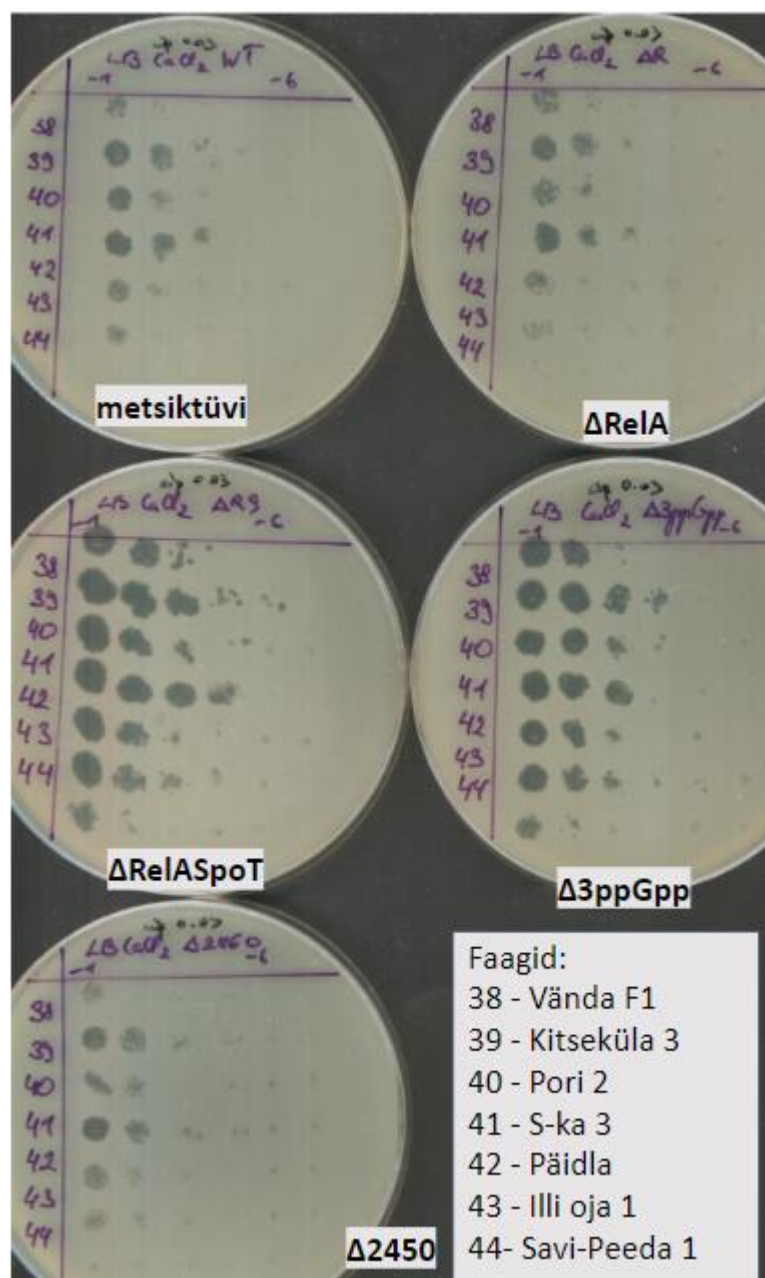
Yang, H., Ma, Y., Wang, Y., Yang, H., Shen, W., & Chen, X. (2014). Transcription regulation mechanisms of bacteriophages: recent advances and future prospects. *Bioengineered*, 5(5), 300–304.

Lisa 1. Tulemused tahkel söötmel

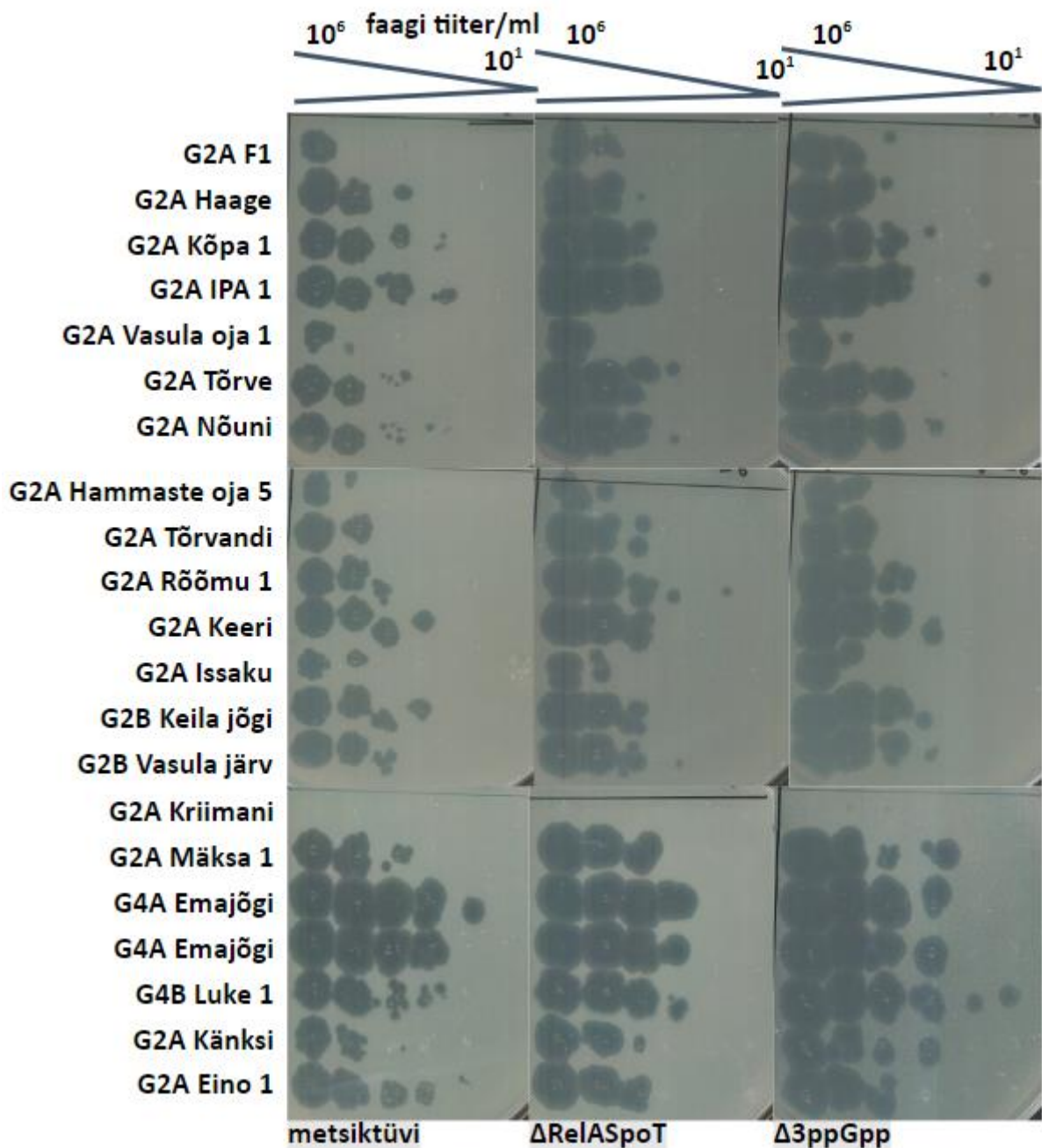
Tabel 1. Kõikide töös kasutatud faagide ppGpp keskmised faagivastase kaitse määrad tahkel söötmel.

Faag	Liik	ppGpp kaitse tugevus
Amme 3	G1A	0-10
Kõpa 4	G1B	0-10
Nõo 2	G1C	10
Kassivere 1	G1D	10-100
Rõõmu 2	G1E	10
Eino 1	G2A	0
F1	G2A	10
Haage	G2A	0-10
Hammaste oja 5	G2A	0-10
IPA 1	G2A	0-10
Issaku	G2A	0
Keeri	G2A	-10-0
Kriimani	G2A	0-10
Kõpa 1	G2A	0-10
Känksi	G2A	10
Mäksa 1	G2A	0-10
Nõuni	G2A	0-10
Rõõmu 1	G2A	0
Tõrvandi	G2A	0-10
Tõrve	G2A	0-10
Vasula oja 1	G2A	0-10
Keila jõgi	G2B	0-10
Vasula järv	G2C	0-10
Aura	G3A	-10-0
Illi oja 2	G3A	0
Kakumetsa 1	G3A	0
S-ka 4	G3A	0
Amme 1	G3B	0
Kõpa 5	G3B	0
Pori 4	G3B	0
Lauda oja 3	G3C	0
Peetri tiik	G3D	0
Aardla 2	G3	0
Laeva 1	G3	0
Emajõgi	G4A	-10-0
Luke 1	G4B	0
Erra muld M1	G5A	10-100
Erra muld S1	G5A	100
Vända F1	G5A	10-100
Ihaste	G5B	10
Illi oja 1	G5B	10-100
Kaagvere 1	G5B	10
Kitseküla 3	G5B	100

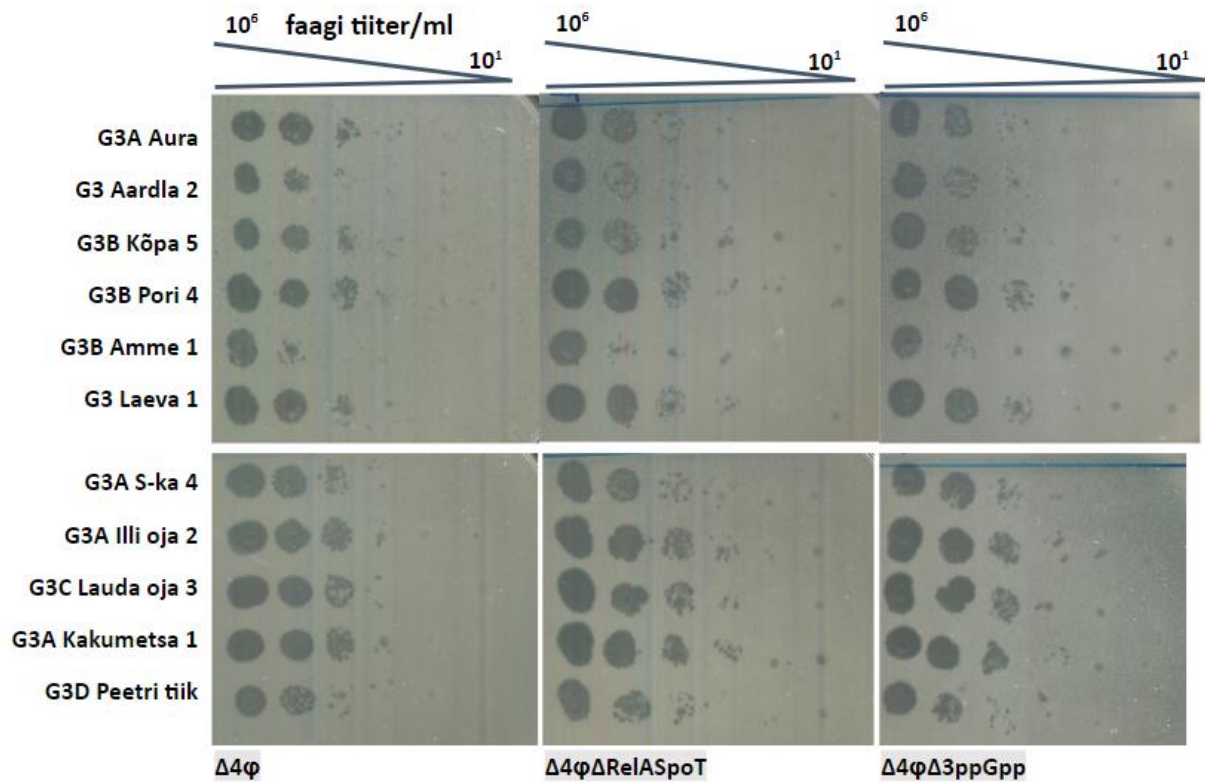
Konnatiik	G5B	10-100
Laguja oja 2	G5B	10
Laguja oja 5	G5B	10-100
Luutsna jõgi 1	G5B	10
Luutsna jõgi 3	G5B	10
Luutsna jõgi 6	G5B	10
Mõra jõgi 3	G5B	0
Mõra jõgi 5	G5B	10
Pori 2	G5B	10
Päidla	G5B	0-10
S-ka 3	G5B	0-10
Savi-Peeda 1	G5B	10
Urmase lomp 1	G5B	10
Viia tiik 1	G5B	10-100
Villemi	G5B	10
Hammaste oja 2	G5C	0-10
Bot aed	G5D	10
Kompost 1	G5D	10-100
Kakumetsa 2	G5	0-10
Luke 3	G6A	100
IPA 2	G6B	10-100
Kallioja	G7A	0
Kompost 2	G7B	10
Kurepalu 1	G8A	0-10
Kurepalu 2	G9A	100
Pori 3	G9A	100
Mudajõgi	G9B	0-10



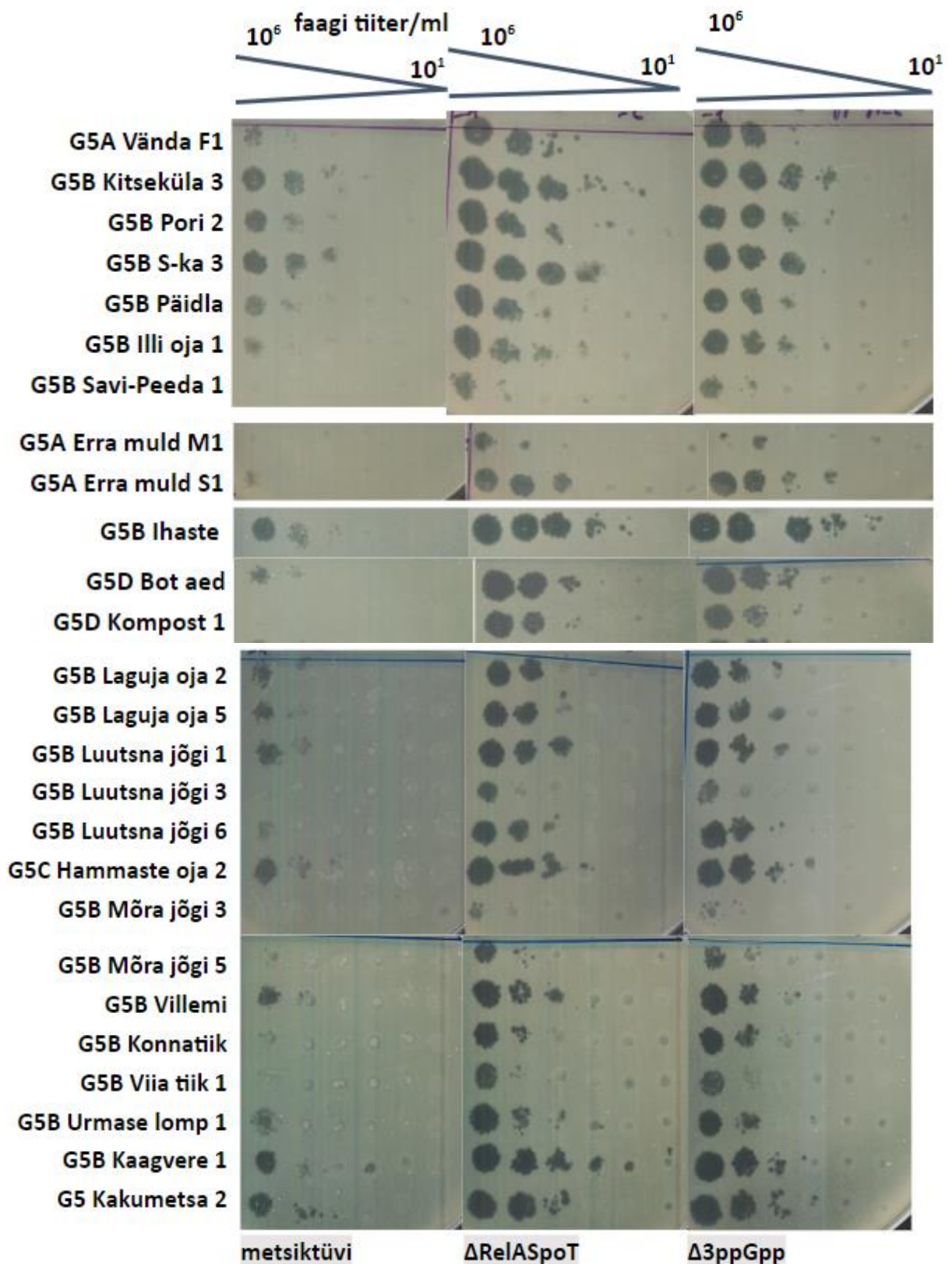
Joonis 1. Valitud faagide lüüsilaidud viie testitud bakteritüve tassil. Toodud on faagide Vända F1, kitseküla 3, Pori 2, S-Ka 3, Päidla, Illi oja 1 ja Savi-Peeda 1 lüüsilaidud metsiktüve ning Δ RelA, Δ RelASpoT, Δ 3ppGpp ja Δ 2450 tüvede bakterimuruga tassidel.



Joonis 2. G2 ja G4 perekonna faagide lüüsilaidud metsiktüve ja ppGpp deletsioontüvede bakterimurudel. Faagitiiter, millest tilkkülv tehti on märgitud joonise kohal. Esitatud on kolmest läbiviidud katses ühe katse tulemused. Pilt on tehtud pärast 20 h kasvu temperatuuril 20 °C.

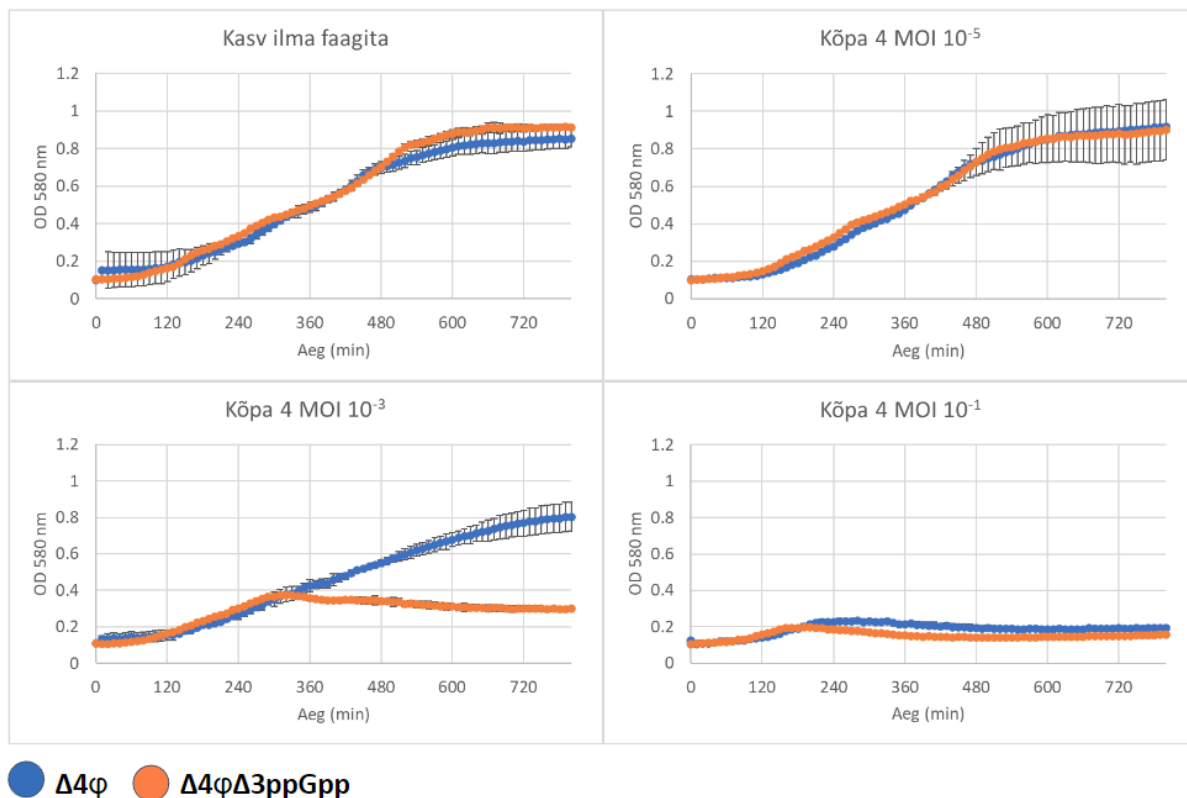


Joonis 3. G3 perekonna faagide lüüsilagud metsiktüve ja ppGpp deletsioontüvede bakterimurudel. Faagitiiter, millest tilkylv tehti on märgitud joonise kohal. Esitatud on kolmest läbiviidud katses ühe katse tulemused. Pilt on tehtud pärast 20 h kasvu temperatuuril 20 °C.

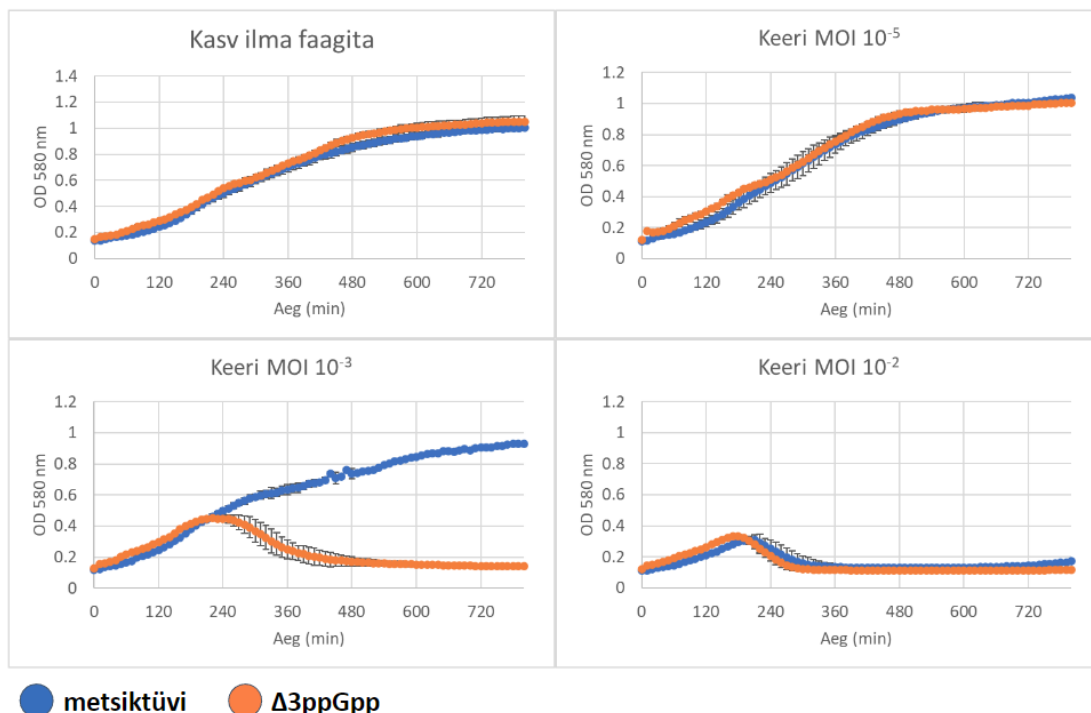


Joonis 4. G5 perekonna faagide lüüsilaiatud metsiktüve ja ppGpp deletsioontüvede bakterimurudel. Faagitiiter, millest tilkkülv tehti on märgitud joonise kohal. Esitatud on kolmest läbiviidud katsest 2. katse tulemused. Pilt on tehtud pärast 20 h kasvu temperatuuril 20 °C.

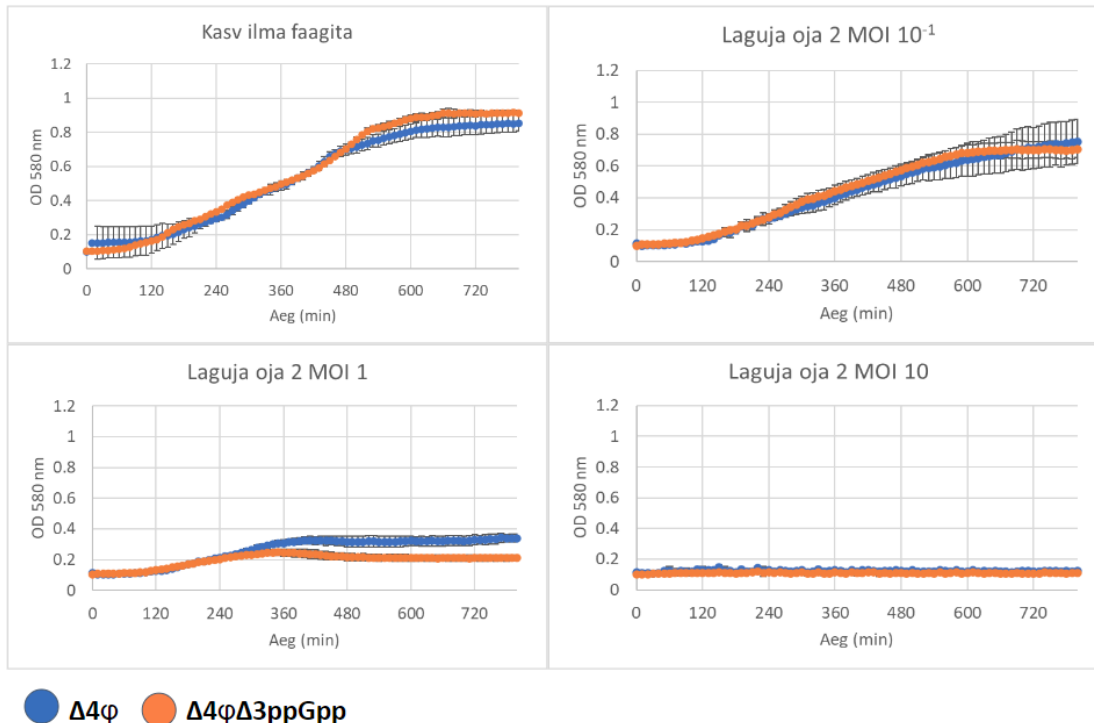
Lisa 2. Tulemused vedelsöötmes



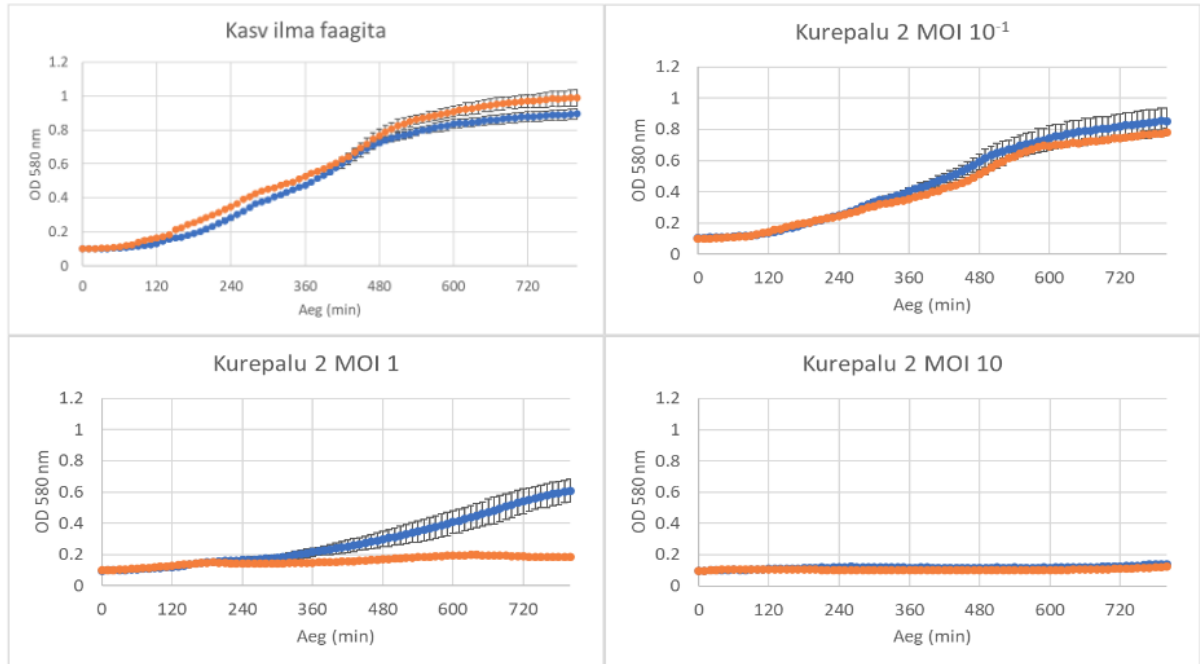
Joonis 1. Faag Kõpa 4 nakatab $\Delta 4\phi\Delta 3ppGpp$ tüve kuni 100 korda paremini kui $\Delta 4\phi$ tüve. $\Delta 4\phi$ (sinine) ja $\Delta 4\phi\Delta 3ppGpp$ (oranž) tüvede kasvukõverad Kõpa 4-ga nakatamise järgselt erinevate MOI-de korral. Veapiirid tähistavad standardhälvet kolme paralleeli keskmisest. X-teljel on aeg (min), Y-teljel vastaval ajahetkel mõõdetud OD lainepikkusel 580 nm. Toodud on kahest kolme tehnilise paralleeliga tehtud katses ühe katse tulemused.



Joonis 2. Faag Keeri nakatab Δ3ppGpp tüve efektiivsemalt kui metsiktüve. Metsiktüve (sinine) ja Δ3ppGpp tüve (oranž) kasvukõverad Keeri-ga nakatamise järgselt erinevate MOI-de korral. Veapiirid tähistavad standardhälvet kolme paralleeli keskmisest. X-teljel on aeg (min), Y-teljel vastaval ajahetkel mõõdetud OD lainepikkusel 580 nm. Toodud on kahest kolme tehnilise paralleeliga tehtud katses ühe katse tulemused.



Joonis 3. Faag Laguja oja 2 nakatab Δ4φ tüve sama efektiivselt kui Δ4φΔ3ppGpp tüve. Δ4φ (sinine) ja Δ4φΔ3ppGpp (oranž) tüvede kasvukõverad Laguja oja 2-ga nakatamise järgselt erinevate MOI-de korral. Veapiirid tähistavad standardhälvet kolme paralleeli keskmisest. X-teljel on aeg (min), Y-teljel vastaval ajahetkel mõõdetud OD lainepikkusel 580 nm. Toodud on kahest kolme tehnilise paralleeliga tehtud katses ühe katse tulemused.



● metsiktüvi ● $\Delta 3ppGpp$

Joonis 4. Faag Kurepalu 2 nakatab metsiktüve sarnaselt $\Delta 3ppGpp$ tüvele. Metsiktüve (sinine) ja $\Delta 3ppGpp$ tüve (oranž) kasvukõverad Kurepalu 2-ga nakatamise järgselt erinevate MOI-de korral. Veapiirid tähistavad standardhälvet kolme paralleeli keskmisest. X-teljel on aeg (min), Y-teljel vastaval ajahetkel mõõdetud OD lainepikkusel 580 nm. Toodud on kahest kolme tehnilise paralleeliga tehtud katses ühe katse tulemused.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Elise Mägi,

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

ppGpp *Pseudomonas putida* faagivastases kaitses

mille juhendaja on Hedvig Tamman,

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

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates 05.06.2025 kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Elise Mägi

29.05.2023