

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

***Pseudomonas putida* faagide peremees- ja retseptorspetsiifika**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Anu Kängsep

Juhendaja PhD Rita Hõrak

TARTU 2023

## INFOLEHT

### ***Pseudomonas putida* faagide peremees- ja retseptorspetsiifika**

*Pseudomonas* perekonna faagid on üldiselt tugevalt peremeesspetsiifilised. Nad kasutavad retseptoritena lipopolüsahhariide, poriine ja pinnastruktuure. Käesoleva töö eesmärk oli uurida, kui peremeesspetsiifilised on labori faagiraamatukogus leiduvad *P. putida* faagid ja milliseid retseptoreid nad bakteri pinnale kinnitumiseks kasutavad. Seda põhjusel, et *P. putida* faagiresistentsuse kohta pole midagi teada. Eesmärgi saavutamiseks nakatati mitmeid *Pseudomonas*'e perekonna liike ja tüvesid 66 *P. putida* faagiga. Katsed näitasid, et *P. putida* faagid on tugevalt peremeesspetsiifilised. Retseptorspetsiifika uurimiseks testiti 20 *P. putida* mutanti, kellel oli defektne mõni potentsiaalselt retseptoriks sobivat membraanivalku või lipopolüsahhariidide sünteesil osalevat valku kodeeriv geen. Katsed näitasid, et enamus labori faagiraamatukogus olevatest faagidest kasutavad retseptoritena lipopolüsahhariide,

Märksõnad: *Pseudomonas putida*, faag, peremeesspetsiifika, retseptorspetsiifika

CERCS kood: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

### **Host and receptor specificity of *Pseudomonas putida* phages**

Phages of the *Pseudomonas* genus are generally highly host specific. They use lipopolysaccharides, porins and surface structures as receptors. The aim of this work was to investigate how host-specific are *P. putida* phages from our laboratory's phage library and which receptors they use for attachment, as there is nothing known about the phage resistance of *P. putida*. To achieve this goal, several species and strains of the genus *Pseudomonas* were infected with 66 *P. putida* phages. Data showed that *P. putida* phages are highly host specific. To study the receptor specificity, 20 *P. putida* strains were tested, which had a mutant gene coding for a membrane or lipopolysaccharide synthesis protein potentially suitable as a phage receptor. Data showed that many of the phages in our phage library use lipopolysaccharides as receptors.

Keywords: *Pseudomonas putida*, phage, host specificity, receptor specificity

CERCS Code: B230 Microbiology, Bacteriology, Virology, Mycology

# SISUKORD

INFOLEHT.....	2
KASUTATUD LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS .....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Faagide struktuur ja elutsükkel .....	7
1.1.1. Struktuur .....	7
1.1.2. Elutsükkel .....	9
1.2. Faagide peremeesspetsiifika ja retseptorsõltuvus.....	10
1.3. Faagi sisenemine ja selle takistamine.....	11
1.4. Faagide kasutatavad retseptorid .....	11
1.4.1. Lipopolüsahhariidid.....	11
1.4.2. Poriinid .....	12
1.4.3. Pinnastruktuurid .....	13
2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....	14
2.1. Töö eesmärgid.....	14
2.2. Materjal ja meetodika .....	14
2.2.1. Kasutatud söötmed, bakteritüved ja faagid .....	14
2.2.2. Faagitolerantsuse testimine agarsöötmele .....	18
2.3. Tulemused.....	18
2.3.1. Tüvede valimine faagide peremeesspetsiifika testimiseks .....	18
2.3.2. Tsiprofloksatsiini kontsentratsiooni valimine peremeesspetsiifika katseteks ....	19
2.3.3. Peremeesspetsiifika määramine.....	19
2.3.4. Retseptorspetsiifika määramine.....	21
2.3.5. LPS-defektsete tüvede efektide täpsem testimine lahjendusriidadega .....	23
2.4. Arutelu .....	24
2.4.1. <i>P. putida</i> faagide peremeesspetsiifika .....	24
2.4.2. <i>P. putida</i> faagide retseptorspetsiifika .....	25

KOKKUVÕTE .....	28
SUMMARY .....	29
TÄNUSÕNAD .....	30
KASUTATUD ALLIKAD .....	31
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks .....	37

## KASUTATUD LÜHENDID

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

dsDNA/RNA – kaksikahelaline DNA/RNA (ingl. k. *doublestranded DNA/RNA*)

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

LPS – lipopolüsahhariid (ingl. k. *lipopolysaccharide*)

PFU – lüüsilaike tekitav ühik (ingl. k. *plaque forming units*)

RBP – retseptorit siduv valk (ingl. k. *receptor binding protein*)

WT – algne tüvi (ingl. k. *wild-type*)

## SISSEJUHATUS

Bakteriofaagid on baktereid nakatavad viirused. Faagide elutsükli oluliseks etapiks on looduslikus keskkonnas tuvastada just need bakterid, keda nad nakatada suudavad ja kelle abil oma genoomi levitada saab (Fortier ja Sekulovic, 2013). Peremeesbakteri pinnale seondumiseks kasutab faag oma saba tipus olevaid retseptoreid siduvaid valke (RBP) (Hyman, 2017). Need valgud võimaldavad faagil ära tunda peremehe retseptoreid, mille külge kinnituda ja oma elutsükli alustada. Faag kasutab bakterite pinnale seondumiseks kolme põhilist retseptorit: membraani lipopolüsahhariide, porine ja pinnastruktuure. See, millistele ja kui erinevatele retseptoritele on faag võimeline kinnituma, sõltub faagi perekonnast ja mõjutab faagi peremeesspetsiifika (Nobrega *et al.*, 2018).

*Pseudomonas putida* on laialt levinud gram-negatiivne bakter (Loeschcke ja Thies, 2015). Kuna *P. putida* arvatakse olevat suure biotehnoloogilise potentsiaaliga (Nikel *et al.*, 2014), on tähtis teada, milline on *P. putida* faagiresistentsus ja kuidas bakter end faagide eest kaitseb. *P. putida* faagiresistentsust pole seni peaaegu üldse uuritud, mistõttu on huvitav teada, millised on *P. putida*'t nakatavad faagid ja milline on nende peremeesspetsiifika.

Uurimustöö eesmärk oli analüüsida keskkonnast eraldatud *P. putida*'t nakatavate faagide peremeesspetsiifika ja selgitada välja, milline on *P. putida*'t nakatavate faagide retseptorspetsiifika.

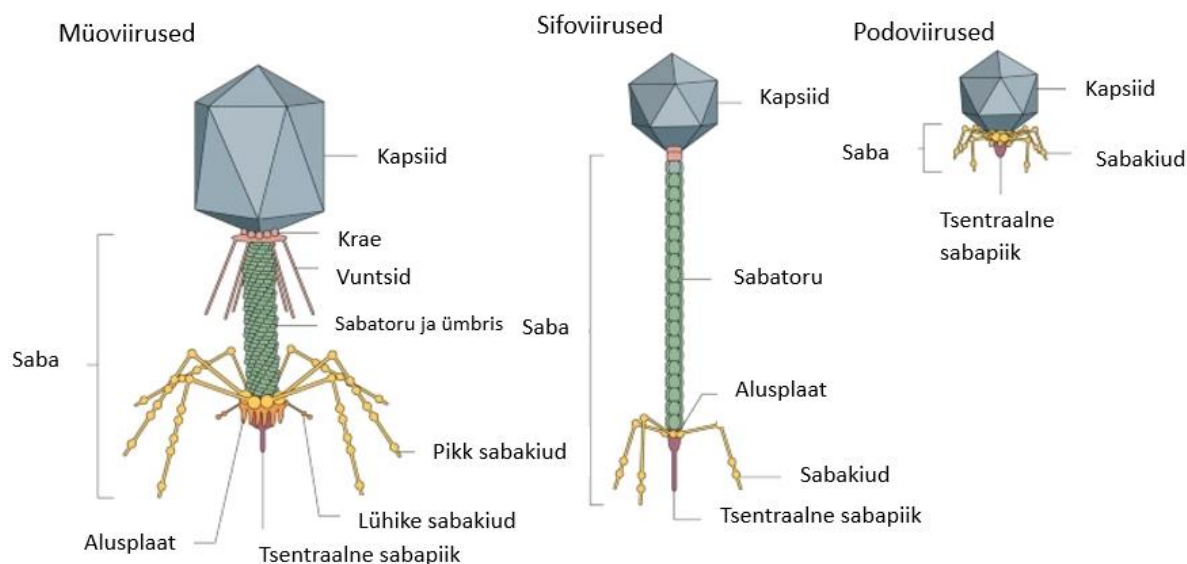
# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Faagide struktuur ja elutsükkel

Bakteriofaagid ehk faagid on viirused, mis nakatavad baktereid (Fortier ja Sekulovic, 2013). Faage loetakse kõige arvukamateks bioloogilisteks organismideks. Samuti arvatakse, et tegemist on kõige vanemate viirustega (Dy *et al.*, 2014). Biosfääris arvatakse olevat umbes  $10^{31}$  faagiosakest ehk neid on 10 korda rohkem kui baktereid (Fortier ja Sekulovic, 2013). Faagid on lihtsa ehitusega, koosnedes nukleiinhappest – DNA-st või RNA-st – ning seda kaitsvast valgulisest kapsiidist (Moineau ja Tremblay, 2017). Faage võib jagada fenotüübi ja genoomi suuruse järgi kolmeks: sabaga ja tüüpiliselt suure dsDNA genoomiga faagid, lipiidisisaldavate kapsiidide ja keskmise genoomi suurusega dsDNA või dsRNA faagid ning väikese genoomiga üheaahelised DNA või RNA faagid (Abedon, 2009). Järgnevalt tuleb juttu just sabaga faagidest ehk seltsist *Caudovirales* (Ackermann, 1998).

### 1.1.1. Struktuur

Kõigil sabaga faagidel on kapsiid, mis katab ja kaitseb nende genoomi ning mille küljes on erineva ehituse ja pikkusega saba (Nobrega *et al.*, 2018). Saba alusel jagunevad faagid kolme sugukonda: müoviirused, sifoviirused ja podoviirused (Joonis 1) (Ackermann, 1998). Müoviirustel on pikk kokkutõmbuv saba, mis võimaldab kapsiidi toomist bakteri plasmamembraanile lähedale (King *et al.*, 2012). Sifoviiruste ja podoviiruste saba on aga jäik ega tõmbu kokku. Podoviirustel on erinevalt müo- ja sifoviirustest oluliselt lühem saba (Ackermann, 1998; Nobrega *et al.*, 2018). Struktuuriliseks erinevuseks on veel ka saba tipus asuva alusplaadi olemasolu ning retseptoreid siduvate valkude asukoht. Nii müo- kui sifoviirustel on retseptoreid siduvad valgud kinnitunud saba tipus olevale alusplaadile (Joonis 1). Podoviirustel alusplaat puudub ja seega on retseptoreid siduvad valgud kinnitunud otse sabale (Nobrega *et al.*, 2018). Nimetatuid sugukondi on omakorda võimalik jagada kolmeks kapsiidi pea pikkuse järgi – isomeetrilised, mõõdukalt pikad ja väga pikad (Ackermann, 1998).



**Joonis 1. Sabaga faagide struktuur.** Joonisel on kujutatud müoviiruste, sifoviiruste ja podoviiruste struktuure. Välja on toodud põhilised struktuurielemendid ja nende vahelised erinevused (Nobrega *et al.*, 2018, kohandatud).

Sobiva peremehe äratundmiseks on faagidel erinevaid mooduseid (Hampton *et al.*, 2020). Kõige enam on kasutusel saba otsas asuvad retseptoreid siduvad valgud (RBP), mis paiknevad tipmistel sabakiududel ja piikidel (Hyman, 2017; Nobrega *et al.*, 2018). Müoviirustel on kahe erineva pikkusega sabakiude (Joonis 1). Pikemad sabakiud kinnituvad retseptoritele, saates seejärel signaali alusplaadile, mis võimaldab lühikestel sabakiududel pöördumatult oma retseptoritele kinnituda (Nobrega *et al.*, 2018). Peremehe äratundmiseks kasutatakse ka faagi saba adhesiine, mis tunnevad ära nii esmaseid kui ka teiseid retseptoreid (Letarov ja Kulikov, 2017).

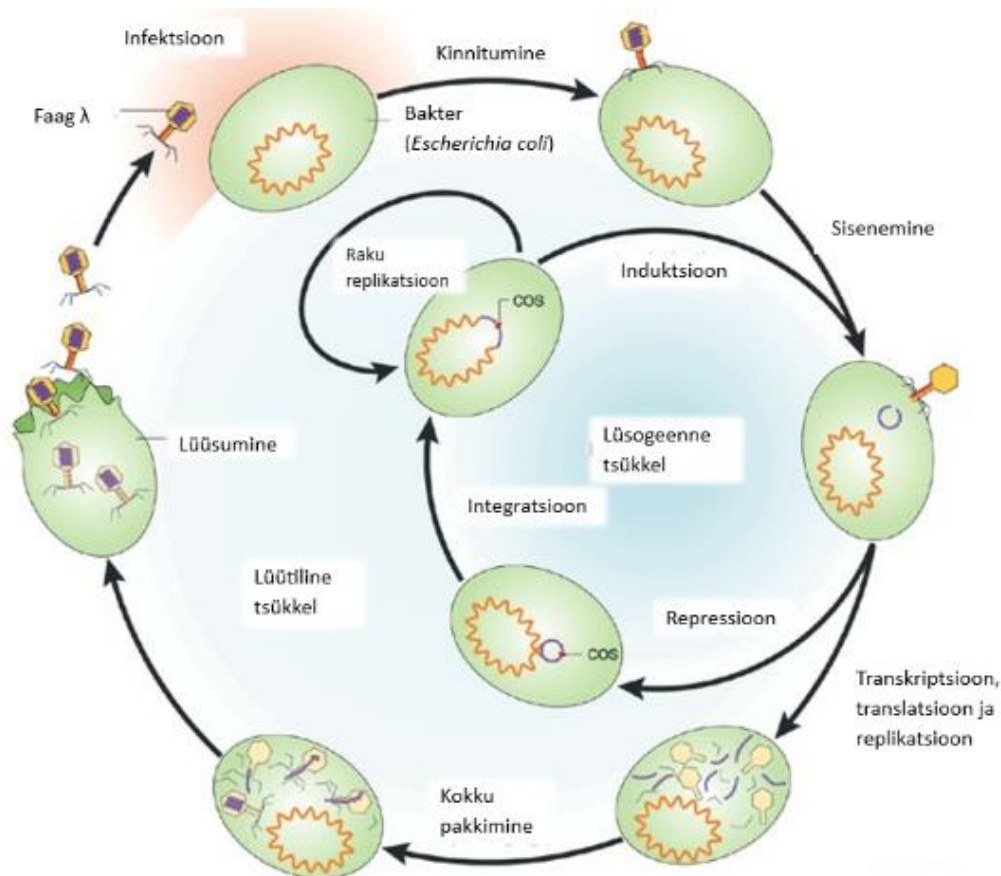
Faagide struktuurist võib sõltuda, milliseid peremehi ja retseptoreid nad ära tunnevad. Näiteks gram-positiivseid baktereid nakatavad sifoviirused kasutavad retseptoritega seondumiseks erinevaid sabaosi. Kui retseptoriks on membraanivalk, siis seondub faag sellega enamasti alusplaadil asuva sirge sabakiu või -piigi abil (Nobrega *et al.*, 2018). Kui retseptoriks on aga lipopolüsahhariid, siis on selle äratundmiseks faagil külgiid (Fokine ja Rossmann, 2014). Gram-negatiivseid baktereid nakatavatel sifoviirustel alusplaati enamasti ei ole. Põhiline erinevus gram-negatiivseid ja gram-positiivseid baktereid nakatavate faagide vahel on vastavalt alusplaadi puudumine või olemasolu. Struktuurilised erinevused on omakorda põhjuseks, miks gram-positiivseid baktereid nakatavad faagid ei ole teadaolevalt suutelised gram-negatiivseid baktereid nakatama ja vastupidi (Nobrega *et al.*, 2018).

Mõnedel faagidel toimub RBP valkude kiire muteerumine, mis suurendab nende konkurentsivõimet. Mõned kasutavad aga mitut tüüpi RBP valke, et oleks võimalik rohkemate bakterite pinnale kinnituda (Hampton *et al.*, 2020).

### 1.1.2. Elutsükkel

Faage võib nende elutsükli järgi jagada kaheks: virulentsed ja mõõdukad. Virulentsetele faagidele on omane lüütiline tsükkel (Erez *et al.*, 2017), mis tähendab, et faagi paljunemine lõpeb bakteri lüüsimisega (Fortier ja Sekulovic, 2013). Mõõdukad faagid kasutavad põhiliselt lüsogeenset tsükli, kuid lähevad aeg-ajalt, eriti stressiolukorras, üle lüütilisele tsükli (Erez *et al.*, 2017; Olszak *et al.*, 2017). Lüsogeenses tsükli siseneb mõõduka faagi DNA peremehe kromosoomi, olles seal profaagina ja replitseerudes koos peremehe genoomiga (Nawel *et al.*, 2022; Olszak *et al.*, 2017; Tzipilevich *et al.*, 2017). Mõõduka faagi lüütiline elutsükkel on identne lüütilise faagi elutsükliga (Olszak *et al.*, 2017).

Faagi elutsükkel koosneb viiest faasist (Joonis 2). Esimesena satub faag kokku sobiva peremehega ja kinnitub retseptori külge. Kui faag on pöördumatult rakule kinnitunud, toimub faagi ensüümide abil rakukestast läbi tungimine (Jonge *et al.*, 2019; Olszak *et al.*, 2017). Kolmandas faasis toimub põhiliselt faagi geenide ekspressioon (transkriptsioon ja translatsioon) ja genoomi replikatsioon (Olszak *et al.*, 2017). Sõltuvalt sellest, kas tegemist on virulentse või mõõduka faagiga, alustatakse kas lüütilise või lüsogeense tsükliga. Lüütilise tsükli korral programmeeritakse rakk tootma nii palju faagpartikleid kui võimalik, kasutades peremehe ressursse (Campbell, 2003; Jonge *et al.*, 2019). Kui aga faag siseneb lüsogeensesse tsükli, siis sisestatakse faagi DNA peremehe genoomi profaagina, kus ta replitseerub seni peremehe genoomi osana, kuni toimub ümberlülitumine lüütilisele tsükli (Olszak *et al.*, 2017). Järgnevalt toimub faagipartiklite kokkupakkimine ja lüütilise tsükli viimases faasis lahkuvad faagi järglased rakust ja alustavad oma elutsükli jälle algusest peale (Jonge *et al.*, 2019).



**Joonis 2. Faagi lüsogeenne ja lüütiline elutsükkel.** Joonisel on kujutatud mõõduka faagi kahte võimalikku elutsükli ja välja on toodu nende etapid (Campbell, 2003, kohandatud).

## 1.2. Faagide peremeesspetsiifika ja retseptorsõltuvus

Peremeesspetsiifika kujutab endast seda, kui paljusid erinevaid bakteriliike ja -tüvesid on üks faag võimeline nakatama. Faagid, mis kinnituvad vaid ühele kindlale retseptorile, on suurema tõenäosusega väiksema peremeesspetsiifikaga võrreldes faagidega, mis on võimelised kinnituma erinevatele retseptoritele (Jonge *et al.*, 2019). Põhiliselt kasutavad faagid retseptoritena bakteri välismembraani lipopolüsahhariide (LPS). Laiema peremeeste ringiga on need faagid, kes kasutavad kinnitumiseks lipopolüsahhariidi tuumikosa, kuna tuumik on ühe perekonna liikidel sarnasem ja muutumatum. O-antigeen on aga pea kõigil bakteritel väga erinev ja seega faagid, kes kasutavad retseptorina LPS-i O-antigeenset osa, on kitsama peremeesspetsiifikaga (Nobrega *et al.*, 2018).

Faagi peremeesspetsiifilisust on võimalik laiendada, kui teha geneetilisi muudatusi tema retseptoreid siduvates valkudes, et oleks võimalik rohkemaid baktereid nakatada (Myers *et al.*, 2023).

### **1.3. Faagi sisenemine ja selle takistamine**

Faagi ja bakteriraku pinna vahel peab toimuma mitmeid interaktsioone, et faagil oleks võimalik rakule püsivalt kinnituda ja seejärel siseneda. Pinnale kinnitumise võib jagada kolmeks etapiks. Kõigepealt peab toimuma kokkupuude bakteriga ja pöörduv seondumine esmase retseptoriga, mis tähendab, et faag võib iga hetk retseptorist lahti lasta (Bertozzi Silva *et al.*, 2016; Thanki *et al.*, 2018). Viimases etapis on vajalik, et faagi sabavalgu ja peremehe retseptori vahel toimuks pöördumatu, nõ luku ja võtme (*lock-and-key*) tüüpi seondumine (Gordillo Altamirano ja Barr, 2021). Siin seondub faag lõplikult, kas sama esmase retseptori külge või mõne teise nn teisese retseptori külge. Pöördumatu seondumise tagajärjel toimub faagi struktuuris muutusi, mis võimaldab faagi DNA raku sisestada (Bertozzi Silva *et al.*, 2016; Thanki *et al.*, 2018).

Bakteritel on mitmesuguseid faagivastaseid mehhanisme, mis võivad faagi erinevas faasis häirida ja seega faagide rünnaku mõju bakterile vähendada (Hampton *et al.*, 2020; Labrie *et al.*, 2010). Ilma sobiva retseptorita pole faag võimeline bakteri pinnale seonduma ja seetõttu saab bakter ennast faagi vastu edukalt kaitsta, muutes või blokeerides oma pinnaretseptoreid. Faagi kinnitumise inhibeerimiseks võib bakter näiteks toota rakuväliseid polümeere, mis on füüsiliseks takistuseks. Samuti võib ta toota molekule, mis seonduvad retseptoritele ja takistavad faagi kinnitumist (Dy *et al.*, 2014). Mida enam bakter faagi vastu võitlemiseks evolutsioneerub, seda rohkem muteerub ka faag. See tähendab, et bakteri ja faagi vahel toimub ellu jäämise nimel pidev võidurelvastumine (Samson *et al.*, 2013).

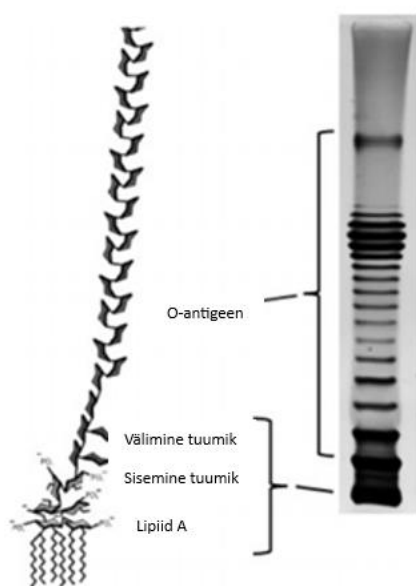
### **1.4. Faagide kasutatavad retseptorid**

Bakteriofaagid on võimelised kinnituma erinevatele retseptoritele bakteri membraanis või pinnastruktuuridel (Bertozzi Silva *et al.*, 2016). Põhilisteks retseptoriteks on välismembraanis asuvad lipopolüsahhariidid ja poriinid. Mõned faagid kasutavad retseptoritena ka vibureid või piile (Nobrega *et al.*, 2018). Samas võib üks faag kasutada kinnitumiseks ka mitmeid erinevaid retseptoreid, näiteks esmase retseptorina piile ja teisese retseptorina lipopolüsahhariide (Bertozzi Silva *et al.*, 2016).

#### **1.4.1. Lipopolüsahhariidid**

Kõige enam levinud retseptorid, mida faagid bakteri pinnale seondumiseks kasutavad, on membraanis asuvad lipopolüsahhariidid (Bertozzi Silva *et al.*, 2016). Lipopolüsahhariidid koosnevad kolmest osast (Joonis 3), mille külge retseptoreid siduvad valgud võivad kinnituda.

Bakteri membraani on sukeldunud LPS'i lipiid A osa. Järgmiseks osaks on tuumikoligosahhariid, mis jaguneb omakorda sisemiseks ja välimiseks osaks. Võrreldes sisemise osaga on välimine osa teise retseptorina rohkem kasutusel. Kõige kaugemal raku pinnast asub O-antigeen, mille struktuur varieerub bakteritel väga palju. Tegemist on faagide poolt kõige enam kasutatava retseptoriga ja O-antigeeni kasutatakse põhiliselt just esmase retseptorina (Letarov ja Kulikov, 2017). Näiteks kasutab podoviirus T7 *Escherichia coli* rakule kinnitumiseks lipopolüsahhariidi tuumikoligosahhariidi (González-García *et al.*, 2015), müoviirus JG004 *Pseudomonas aeruginosa* rakule kinnitumiseks aga ainult lipopolüsahhariidi O-antigeeni (Le *et al.*, 2013).



**Joonis 3. Lipopolüsahhariidi struktuur.** Joonisel on välja toodud lipopolüsahhariidi skemaatiline struktuur (vasakul) ja bakterist puhastatud LPS analüüs SDS-poliakrüülamiid geelis (paremal). LPS koosneb lipiid A-st, seesmisest ja välimisest tuumikoligosahhariidist ning O-antigeenist (Letarov ja Kulikov, 2017, kohandatud).

#### 1.4.2. Poriinid

Poriinid on välismembraanis asuvad valgulised kanalid, mille kaudu käib vee ja muude ainete vahetus. Neid kasutatakse nii esmaste kui teiseste retseptoritena (Letarov ja Kulikov, 2017). Poriine võib jagada kahte gruppi. Peamisi membraaniporiine, nagu OmpA, OmpC ja OmpF, ekspresseeritakse pidevalt, seega on need poriinid võimelised kogu aeg retseptoritena funktsioneerima. Teised faagide kasutatavad retseptorid, nagu LamB, Tsx ja TonB, on aga indutseeritavad ja neid saavad faagid kasutada retseptoritena vaid kindlas keskkonnas. Seega ei sõltu retseptori valik ainult bakterist, vaid ka keskkonnast, kus retseptor on indutseeritud (Hantke, 2020). Poriinidest võib välja tuua OmpC, mis käitub nii esmase kui ka

teisese retseptorina (Nobrega *et al.*, 2018). Müoviirus T4, kelle peremeheks on *E. coli* tüvi K-12, võib rakule kinnituda ühe või kahe etapina. Esimesel juhul kinnitub T4 otse OmpC-le, teisel juhul toimub esmane ehk pöörduv kinnitumine lipopolüsahhriidile ja teisene ehk pöördumatu seondumine poriinile OmpC (Yu ja Mizushima, 1982).

### **1.4.3. Pinnastruktuurid**

Piilid ja viburid on samuti väga tavalised faagide retseptorid. Põhiliselt kasutatakse neid esmaste retseptoritena ehk nende kinnitumine on pöörduv. Mõnel puhul võivad nende membraanipoolsemad osad olla ka teisesteks retseptoriteks (Letarov ja Kulikov, 2017). Piilid ja viburid on retseptoritena kasutusel kõige enam just keskkondades, kus peremehi on vähem ning faagil on neid raskem kohata. Tegemist on raku pinnalt väljaulatuvate struktuuridega, mistõttu suureneb võimalus, et faag nendega kokku puutub. Kõigepealt kinnitatakse pinnastruktuuride külge ja seejärel leitakse teisene retseptor, millega pöördumatult seonduda (Nobrega *et al.*, 2018). Pinnastruktuure kasutab esmase retseptorina näiteks sifoviirus DMS3, kes seondub *P. aeruginosa* raku piilidele (Budzik *et al.*, 2004). Müoviirus SPN3US kinnitub *Salmonella enterica*'le aga hoopis viburi kaudu (Lee *et al.*, 2012).

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1. Töö eesmärgid

*Pseudomonas putida* on gram-negatiivne bakter, keda leidub nii mullas kui ka vees. Tegemist on kasuliku bakteriga, kes kaitseb taime patogeenide eest ja soodustab tema kasvu (Loeschcke ja Thies, 2015). Tänu oma metaboolsele võimekusele ja suurele stressitaluvusele on *P. putida* väga suure biotehnoloogilise potentsiaaliga bakter, keda kasutatakse väga paljudes erinevates biokatalüüsi ja sünteetilise bioloogia alastes uuringutes (Nikel *et al.*, 2014). *P. putida* suureks eeliseks on see, et teda on lihtne geneetiliselt manipuleerida. See on võimaldanud uurida põhjalikult tema metabolismi ja stressitaluvust (Loeschcke ja Thies, 2015). Pseudomonaadide puhul on suhteliselt hästi uuritud *P. aeruginosa* faagiresistentsust (Castledine *et al.*, 2022). Samas pole *P. putida* faagiresistentsuse ja teda nakatavate faagide kohta peaaegu üldse informatsiooni.

Uurimistöö peamised eesmärgid olid:

- 1) Analüüsida keskkonnast eraldatud *P. putida*'t nakatavate faagide peremeesspetsiifikat
- 2) Selgitada *P. putida*'t nakatavate faagide retseptorspetsiifikat

### 2.2. Materjal ja meetodika

#### 2.2.1. Kasutatud söötmed, bakteritüved ja faagid

Töös kasutatud bakteritüved on esitatud Tabelis 1 ja faagid Tabelis 2. Söötmena kasutati LB (*lysogeny broth*) söödet (1% trüpton, 0,5% NaCl, 0,5% pärmiekstrakt). LB tardsööde sisaldas 1,5% agarit. Bakterimurude valamiseks kasutatud pehmeagar (42 °C) sisaldas LB söötmes 0,3% agarit. Baktereid kasvatati temperatuuril 20 °C, kui pole öeldud teisiti. Vedelsöötmes kasvatamisel aereeriti kultuure loksutil.

Faagiga nakatamisel lisati LB agarsöötmele peremeesspetsiifika katsetes 0,01 ja retseptorspetsiifika katsetes 0,03 µg/ml DNA metabolismi stressi põhjustavat antibiootikumi tsiprofloksatsiini. Kõigis katsetes sisaldas bakterimuruga pehmeagar 10 mM CaCl<sub>2</sub>.

**Tabel 1. Töös kasutatud bakteritüved**

Bakter	Iseloomustus	Viide allikale
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAO1-L	Inimese haavandist eraldatud PAO1	Stephan Heeb

	derivaat	
KAR21	Eraldatud kartulist	(Kõiv <i>et al.</i> , 2015)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
Pf 0-1	Eraldatud saviliivmullast	(Compeau <i>et al.</i> , 1988)
KAR29	Eraldatud kartulist	(Kõiv <i>et al.</i> , 2015)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>		
37 EPH	Eraldatud kase risosfäärist	Eeva Heinaru
2C23	Eraldatud Narva lahe veest	(Vedler <i>et al.</i> , 2013)
<i>Pseudomonas syringae</i>		
DC3000	Eraldatud tomatist	(Cuppels, 1986)
KAR24	Eraldatud kartulist	(Kõiv <i>et al.</i> , 2015)
<i>Pseudomonas putida</i>		
PaW85	Metsiktüvi	(Bayley <i>et al.</i> , 1977)
KAR36	Eraldatud kartulist	(Kõiv <i>et al.</i> , 2015)
$\Delta$ flhF	PP_4343 ( <i>flhF</i> ) deletsioontüvi	(Ainsaar <i>et al.</i> , 2019)
oprB-2::Tn	<i>oprB-2</i> (PP_1445) Tn5SmlacItac transposoonmutant, colR taustas	Hedvig Tamman
oprN::Tn	<i>oprN</i> (PP_3427) Tn5SmlacItac transposoonmutant, colR taustas	Hedvig Tamman
$\Delta$ oprH	<i>oprH</i> (PP_1185) deletsioontüvi	Rita Hõrak
$\Delta$ 4994 $\Delta$ flhF	PP_4994 ( <i>tonB3</i> ) ja PP_4343 ( <i>flhF</i> ) topeltdelletsioontüvi	(Ainsaar <i>et al.</i> , 2019)
algD::Sm	<i>algD</i> (PP_1288) katkestusmutant	(Mumm <i>et al.</i> , 2016)
oprQ::Sm	<i>oprQ</i> (PP_0268) katkestusmutant	(Ainsaar <i>et al.</i> , 2014)
$\Delta$ oprE	<i>oprE</i> (PP_0234) deletsioontüvi	Rita Hõrak
oprF::Sm	<i>oprF</i> (PP_2089) katkestustüvi	(Putrinš <i>et al.</i> , 2011)
$\Delta$ 773 ( <i>ompA</i> ) 1	<i>ompA</i> lipovalgu geeni (PP_0773) deletsioontüvi (ei uju, viburiteta)	Rita Hõrak
$\Delta$ 773 ( <i>ompA</i> ) 2	<i>ompA</i> lipovalgu geeni (PP_0773) deletsioontüvi (ujub)	Rita Hõrak
$\Delta$ oprE $\Delta$ oprD	<i>oprE</i> (PP_0234) ja <i>oprD</i> (PP_1206) topeltdelletsioontüvi	Rita Hõrak
$\Delta$ oprC	<i>oprC</i> (PP_4838) deletsioontüvi	Rita Hõrak
$\Delta$ oprD	<i>oprD</i> (PP_1206) deletsioontüvi	Rita Hõrak
oprB1::Km	<i>oprB1</i> katkestustüvi	(Kivistik <i>et al.</i> , 2006)
algY::Tn	<i>algY</i> (PP_1430) Tn5Smgus	Marta Putrinš

	transposoonmutant	
bcsA::Sm	<i>bcsA</i> (PP_2635) katkestustüvi	Rita Hõrak
ompA::Sm	<i>ompA</i> (PP_1122) katkestustüvi	Rita Hõtak
wbpM::Tn	<i>wbpM</i> (PP_1805) Tn5Smlactac transposoonmutant	Hedvig Tamman
wbpL::Tn	<i>wbpL</i> (PP_1804) Tn5Smlactac transposoonmutant	Hedvig Tamman
Δ1804	<i>wbpL</i> (PP_1804) deletsioontüvi	Rita Hõrak

Katseteks said valitud kõik sel hetkel laboris olnud 66 faagi (Tabel 2). Sekveneerimise tulemuste või faagiperekonna-spetsiifilise PCR-i järgi on nüüdseks teada, et need faagid kuuluvad üheksasse perekonda (identsus 70%) ja 20'sse liiki (identsus 95%). Paljud faagid vajasisid nakatamiseks kas tsiprofloksatsiini, CaCl<sub>2</sub> või mõlemat (Tabel 2).

**Tabel 2. Töös kasutatud bakteriofaagid**

Number	Nimi	Perekond/ liik	Söötmesse lisati CaCl <sub>2</sub> ja tsiprofloksatsiin
1.	Amme 3	1/1A	CaCl <sub>2</sub>
2.	Kõpa 4	1/1B	Cipro + CaCl <sub>2</sub>
3.	Nõo 1	1/1C	Cipro + CaCl <sub>2</sub>
4.	Rõõmu 2	1/1E	CaCl <sub>2</sub>
5.	AnF1	2/2A	-
6.	Haage	2/2A	-
7.	Hammaste oja 5	2/2A	-
8.	IPA 1	2/2A	-
9.	Issaku	2/2A	-
10.	Keeri	2/2A	-
11.	Kõpa 1	2/2A	-
12.	Luutsna jõgi 1 suur	2/2A	-
13.	Nõuni	2/2A	-
14.	Rõõmu 1	2/2A	-
15.	Tõrvandi	2/2A	-
16.	Tõrve	2/2A	-
17.	Vasula oja 1	2/2A	-
18.	Kriimani	2/2A	-

19.	Mäksa 1	2/2A	-
20.	Keila	2/2B	-
21.	Vasula järv	2/2C	-
22.	Aura	3/3A	CaCl <sub>2</sub>
23.	Suure-Kambja 4	3/3A	CaCl <sub>2</sub>
24.	Illi oja 2	3/3A	CaCl <sub>2</sub>
25.	Amme 2	3/3A	CaCl <sub>2</sub>
26.	Aardla 1	3/3A	Cipro + CaCl <sub>2</sub>
27.	Kakumetsa 1	3/3A	Cipro + CaCl <sub>2</sub>
28.	Laeva 2	3/3A	CaCl <sub>2</sub>
29.	Vasula oja 6	3/3B	Cipro + CaCl <sub>2</sub>
30.	Pori 4	3/3B	CaCl <sub>2</sub>
31.	Amme 1	3/3B	CaCl <sub>2</sub>
32.	Kõpa 5	3/3B	Cipro + CaCl <sub>2</sub>
33.	Lauda oja 3	3/3C	CaCl <sub>2</sub>
34.	Laeva 1	3	CaCl <sub>2</sub>
35.	Emajõgi	4/4A	-
36.	RiV1	4/4A	-
37.	Luke 2	4/4B	-
38.	Erra muld M1	5/5A	CaCl <sub>2</sub>
39.	Erra muld S1	5/5A	CaCl <sub>2</sub>
40.	Vända F2	5/5A	CaCl <sub>2</sub>
41.	Illi oja 1	5/5B	CaCl <sub>2</sub>
42.	Kitseküla 3	5/5B	Cipro + CaCl <sub>2</sub>
43.	Konnatiik	5/5B	CaCl <sub>2</sub>
44.	Laguja oja 2	5/5B	CaCl <sub>2</sub>
45.	Laguja oja 5	5/5B	CaCl <sub>2</sub>
46.	Luutsna jõgi 1 v	5/5B	CaCl <sub>2</sub>
47.	Luutsna jõgi 3	5/5B	-
48.	Luutsna jõgi 6	5/5B	-
49.	Mõra jõgi 3	5/5B	CaCl <sub>2</sub>
50.	Mõra jõgi 5	5/5B	CaCl <sub>2</sub>
51.	Päidla	5/5B	Cipro + CaCl <sub>2</sub>
52.	Pori 2	5/5B	Cipro + CaCl <sub>2</sub>
53.	Savi-Peeda tee kraav	5/5B	CaCl <sub>2</sub>
54.	Villemi	5/5B	CaCl <sub>2</sub>
55.	Viia tiik 1	5/5B	Cipro + CaCl <sub>2</sub>

56.	Urmase lomp	5/5B	Cipro + CaCl <sub>2</sub>
57.	Kaagvere 1	5/5B	Cipro + CaCl <sub>2</sub>
58.	Hammaste oja 2	5/5C	CaCl <sub>2</sub>
59.	Suure-Kambja 3	5/5D	CaCl <sub>2</sub>
60.	Kakumetsa 2	5	Cipro + CaCl <sub>2</sub>
61.	Luke 3	6/6A	Cipro
62.	IPA 2	6/6A	-
63.	Kurepalu 1	8/8A	Cipro + CaCl <sub>2</sub>
64.	Kurepalu 2	9/9A	Cipro + CaCl <sub>2</sub>
65.	Pori 3	9/9A	Cipro + CaCl <sub>2</sub>
66.	Mudajõgi	9/9B	Cipro + CaCl <sub>2</sub>

### 2.2.2. Faagitolerantsuse testimine agarsöötmeil

Faagitolerantsuse testimiseks agarsöötmeil kasutati Tabelis 1 toodud bakteriliike ja -tüvesid. Kõiki tüvesid kasvatati ette üleöö (umbes 24 h) LB vedelsöötmes 20 °C. Eksponentsiaalse kasvufaasi rakkude saamiseks tehti üleöö bakterikultuurist ~12,5 kordne lahjendus värskesse LB vedelsöötmesse ning kasvatati rakke umbes 4 tundi 20 °C juures.

Kõigist tüvedest tehti bakterimuruga tassid, milleks segati kokku umbes 5 ml 0,3% LB pehmeagarit (42 °C) ning 200 µl eksponentsiaalse kasvufaasi rakke. Iga tüve kohta kasutati ühte tsiprofloksatsiini (0,01 µg/ml) sisaldavat LB agarsöötmega tassi.

Peremees- ja retseptorspetsiifika katseteks kasutati kõrge tiitriga faagifiltraate, mis sõltuvalt faagist olid vahemikus 10<sup>7</sup>-10<sup>11</sup> PFU/ml. Retseptorspetsiifika täpsemaks uurimiseks tehti katseid ka lahjendatud faagilahustega. Selleks tehti uuritavatest faagifiltraatidest 10-kordsete lahjenduste rida SM puhvrise (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,01% želatiin) lahjendustega 10<sup>1</sup>-10<sup>8</sup> ning pipeteeriti iga lahjendust 1,5 µl bakterimurule. Tasse inkubeeriti üleöö 20 °C.

## 2.3. Tulemused

### 2.3.1. Tüvede valimine faagide peremeesspetsiifika testimiseks

Faagide peremeesspetsiifika määramiseks valiti CELMS kollektsioonist viis enimuuritud *Pseudomonas*'e perekonna liiki, milleks olid *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas aeruginosa* ja *Pseudomonas stutzeri*. Liikide valik sai tehtud selle põhjal, mis keskkonnas need bakterid kasvavad. Kuna *Pseudomonas putida* PaW85, mida kasutati faagide eraldamisel peremehena, elab põhiliselt mullas, siis eelistati

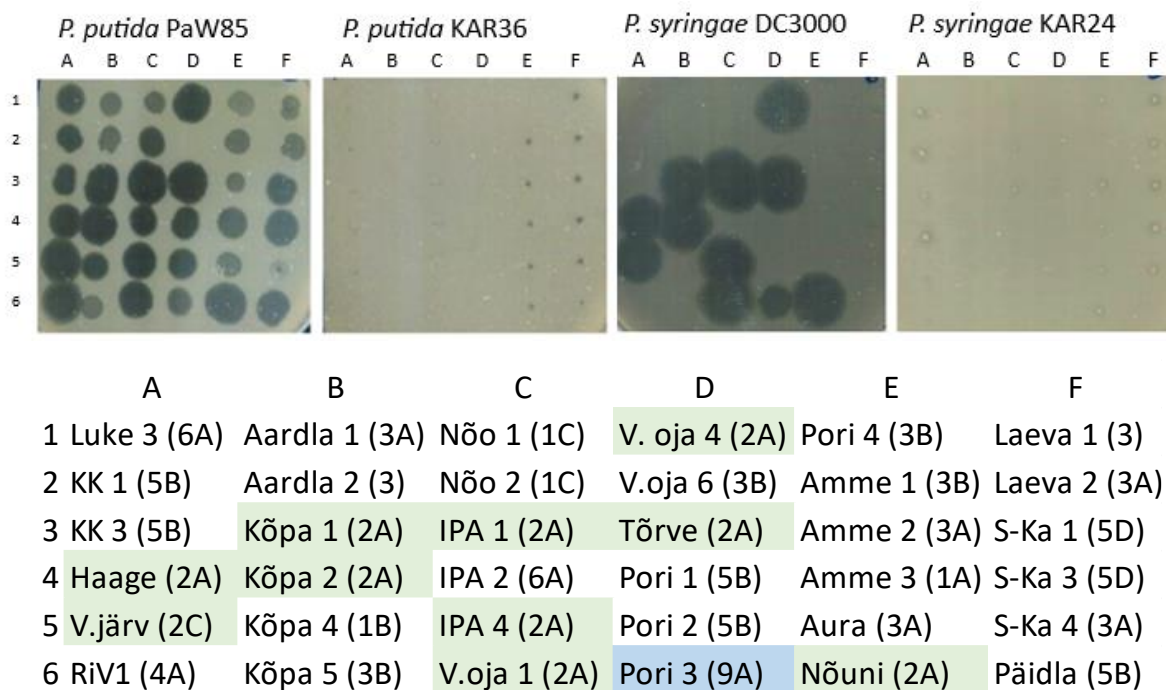
mullast või kartulist isoleeritud liike. Igast liigist sai valitud kaks tüve (Tabel 1). Üks, mida on rohkem uuritud ja mille genoom on sekveneeritud (*P. fluorescens* Pf 0-1, *P. syringae* DC3000, *P. putida* PaW85 ja *P. aeruginosa* PAO1-L) ja teine, mis oli 16S RNA geeni järjestuse alusel liiki paigutatud. *P. stutzeri* puhul polnud kummagi kasutatud tüve täisgenoom teada. Enne katsete alustamist testiti, et kõik tüved oleksid võimelised kasvama 20 °C juures, kus faagiga nakatamise katsed toimusid.

### **2.3.2. Tsiprofloksatsiini kontsentratsiooni valimine peremeesspetsiifika katseteks**

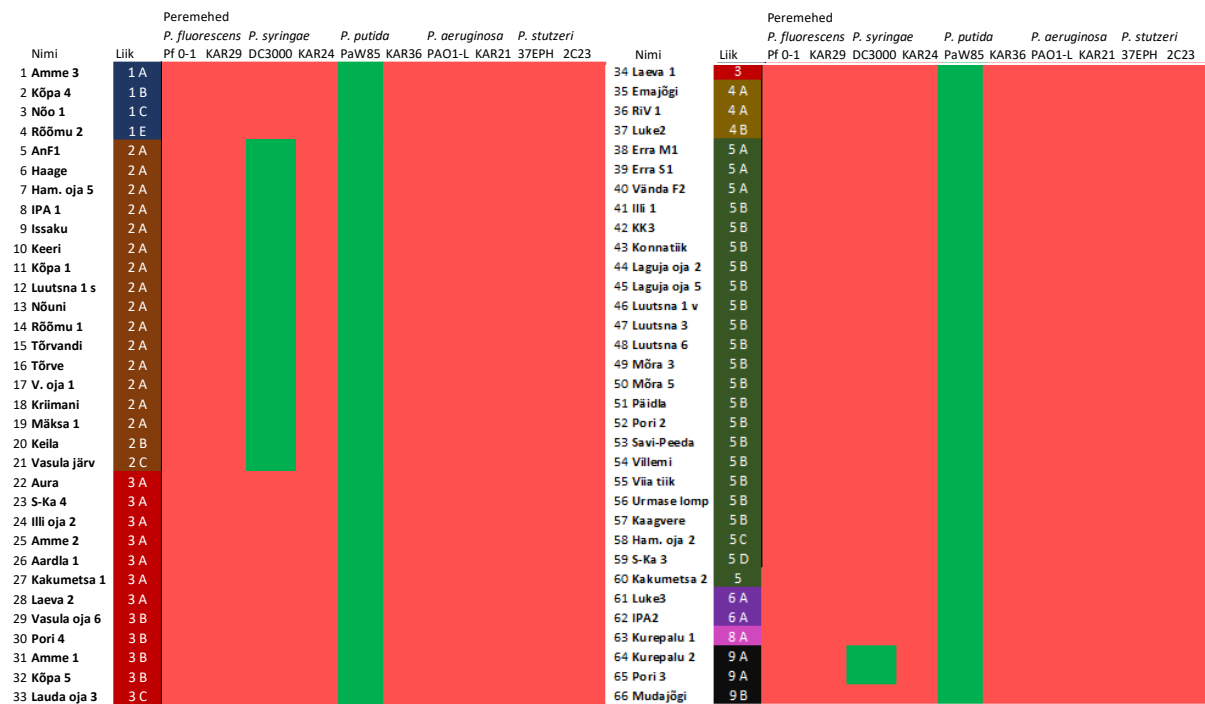
Mõned faagid nakatavad *P. putida*'t paremini kui söötmele on lisatud tsiprofloksatsiini (Tabel 2), seega oli vaja välja selgitada, kas ja kui palju erinevad bakteritüved seda antibiootikumi taluvad. Selleks külvati kõik tüved nii LB tassile kui ka LB tassile, millele oli lisatud 0,03 µg/ml tsiprofloksatsiini. Selline tsiprofloksatsiini kontsentratsioon pärssis tugevalt *P. syringae* DC3000 ja *P. stutzeri* 2C23 kasvu, kuigi LB söötmel kasvasid mõlemad väga hästi. Ülejäänud tüved talusid 0,03 µg/ml tsiprofloksatsiini paremini. Bakterite testimine madalama antibiootikumi kontsentratsiooniga LB tassidel näitas, et kõik katseks välja valitud bakteriliigid ja -tüved kasvasid võrreldavalt 0,01 µg/ml tsiprofloksatsiiniga LB söötmel. Seega kasutati peremeesspetsiifika määramise katsetes just seda tsiprofloksatsiini kontsentratsiooni.

### **2.3.3. Peremeesspetsiifika määramine**

*P. putida* faagide peremeesspetsiifika uurimiseks nakatati kümmet pseudomonaadi (*P. putida* PaW85 ja *P. putida* KAR36, *P. fluorescens* Pf 0-1 ja KAR29, *P. syringae* DC3000 ja KAR24, *P. aeruginosa* PAO1-L ja KAR21 ning *P. stutzeri* 37EPH ja 2C23) 66 Tabelis 2 esitatud faagiga. Enamik kasutatud faage ei suutnud nakatada ühtegi teist bakterit välja arvatud *P. putida* tüve PaW85, ainult väiksem osa oli suuteline nakatama ka *P. syringae* tüve DC3000 (Joonis 4 ja 5). Joonisel 4 on toodud lisaks faagitundlikele *P. putida* PaW85'le ja *P. syringae* DC3000'le veel ka *P. syringae* KAR24 ja *P. putida* KAR36 tulemused, mille puhul polnud ühtegi lüüsilaiku näha. Ülejäänud tüved käitusid samamoodi nagu viimased kaks. Faagid, mis suutsid nakatada *P. syringae* tüve DC3000 kuuluvad perekondadesse 2 (liigid 2A, 2B ja 2C) ja 9 (liik 9A). Joonisel 5 on esitatud peremeesspetsiifika määramise koondandmed ja neist võib teha järelduse, et laboris kolleksioneeritud *P. putida* raamatukogu faagid on tugevalt peremeesspetsiifilised.



**Joonis 4. Faagide lüüsilaidud erinevate *Pseudomonas*'e liikide tüvede bakterimurudel.** Esitatud on 36 faagi lüüsilaidud neljal erineval bakterimurul: *P. putida* tüved PaW85 ja KAR36 ning *P. syringae* tüved DC3000 ja KAR24. Ülejäänud kolme testitud bakteriliigi mõlemad tüved käitusid sarnaselt *P. syringae* KAR24 ja *P. putida* KAR36 tüvedega, st olid resistentsed kõigi *P. putida* faagide suhtes. Nimede maatriksis on sulgudes esitatud faagi liik või perekond kui liik pole teada. Värviliselt on ära märgitud faagid, kes suutsid nakatada bakterit *P. syringae* DC3000, rohelised kuulusid perekonda 2 ja sinised perekonda 9. Pilt on tehtud peale ~24h kasvatamist 20 °C juures. Katset korrati 3 korda ja esitatud on ühe katse tulemused.

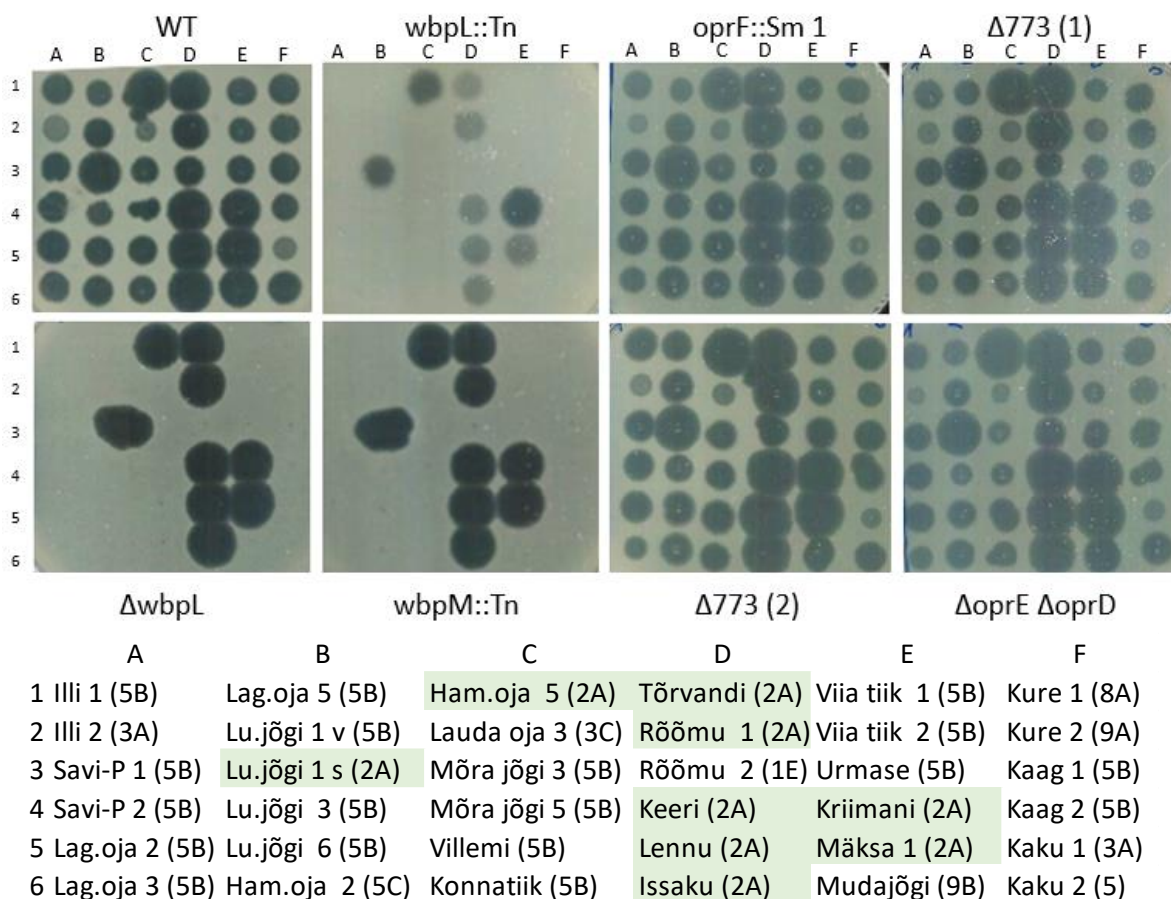


**Joonis 5. *P. putida* faagide peremeesspetsiifika määramise koondtulemused.** Esitatud on kõik faagid ja tüved, millega peremeesspetsiifika katset tehti. Rohelisega on märgitud bakteri lüüsumine vastava faagiga, punane näitab, et bakter on faagile resistentne. Seega nakatuvad uuritud faagidega ainult faagide isoleerimiseks kasutatud *P. putida* tüvi PaW85 ja mõne faagiperekonna puhul ka *P. syringae* DC3000.

### 2.3.4. Retseptorspetsiifika määramine

Retseptorspetsiifika määramiseks sai labori kollektsioonist valitud 21 erinevat *P. putida* PaW85 mutanti (Tabel 1), millel oli defektne kas lipopolüsahhariidide sünteesis osalev geen (*wbpL*, *wbpM*), poriini geen (*PP\_0773*, *oprF*, *oprC*, *oprD*, *oprE*, *oprH*, *oprN*, *oprB-2*, *oprQ*, *oprB1*, *ompA*) või eksopolüsahhariidi (alginaat, tselluloos) sünteesi reguleeriv või kodeeriv geen (*algD*, *algY*, *bcsA*). Viburidefektset tüve labori kollektsioonis ei olnud, aga retseptorspetsiifika katsetesse võeti spontaanne ujumisvõimetu *ompA* deletsioonmutant ja *flhF*-defektne tüvi, millel on häiritud viburite süntees ja asetuse (Ainsaar *et al.*, 2019).

Retseptorspetsiifika määramiseks nakatati 21 *P. putida* PaW85 mutanti (Tabel 1) tabelis 2 toodu 66 faagiga. Kasutatud faagid olid suutelised nakatama kõiki tüvesid võrreldavalt *P. putida* algse tüvega PaW85 välja arvatud *wbpL::Tn*, *wbpM::Tn* ja  $\Delta wbpL$  mutandid (Joonis 6 ja 7). Neid kolme tüve suutsid nakatada ainult teise (liigid 2A, 2B ja 2C) ja neljanda (liik 4A) perekonna faagid. Kõigi kolme tüve puhul on tegemist mutantidega, millel on eeldatavasti häiritud lipopolüsahhariidi O-antigeeni süntees (Rocchetta *et al.*, 1999). Joonisel 6 on esitatud vaid kaheksa tüve andmed, sest kõik mutandid, millel oli defektne poriini või eksopolüsahhariidi sünteesi geen või oli viburi süntees häiritud nakatusid sarnaselt *P. putida* algse tüvega.



**Joonis 6. Faagide lüüsilaidud erinevate *P. putida* PaW85 mutantide bakterimurudel.** Esitatud on 36 faagi lüüsilaidud kaheksal erineval bakterimurul (WT, *wbpL::Tn*, *oprF::Sm*,  $\Delta 773$  (1),  $\Delta wbpL$ , *wbpM::Tn*,  $\Delta 773$  (2) ja  $\Delta oprE \Delta oprD$ ). Ülejäänud 13 testitud bakteritüve käitumist sarnaselt algsele tüvele. Nimede matriksis on sulgudes esitatud faagi liik või perekond kui liik pole teada. Värviliselt on välja toodud faagid teisest perekonnast, kes suutsid nakatada kõiki tüvesid. Pildid on tehtud peale ~24 h kasvatamist 20 °C juures. Katset korrati 3 korda ja esitatud on ühe katse tulemused.

Katseid tehes oli näha, et osad LPS-mutante nakatavad faagid lüüsisid *wbpL* geeni transposoonmutanti (*wbpL::Tn*) ja deletsioonmutanti ( $\Delta wbpL$ ) erineva efektiivsusega (Joonis 6). Joonisel 7 on esitatud 7 tüvega ja kõigi faagidega tehtud kokkuvõtlikud tulemused. Nende tüvede puhul, mida pole joonisel 7 välja toodud, toimus nakatumine sarnaselt WT-le.

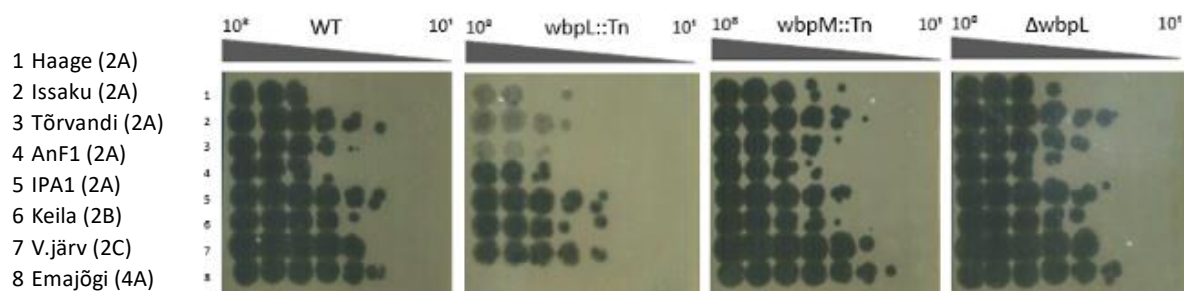
Retseptorsõltuvuse katsetest võib järeldada, et esimese (1A, 1B, 1C ja 1E), kolmanda (3A, 3B ja 3C), neljanda (4B), viienda (5A, 5B, 5C ja 5D), kuuenda (6A), kaheksanda (8A) ja üheksanda (9A ja 9B) faagide perekonna liigid kasutavad retseptoritena lipopolüsahhariide.

Faagi nimi	Liik	Tüved					Faagi nimi	Liik	Tüved				
		oprF::Sm	ΔoprD	algD::Sm	bcsA::Sm	wbpL::Tn			oprF::Sm	ΔoprD	algD::Sm	bcsA::Sm	wbpL::Tn
1 Amme 3	1 A						34 Laeva 1	3					
2 Kõpa 4	1 B						35 Emajõgi	4 A					vähem
3 Nõo	1 C						36 RIV 1	4 A					vähem
4 Rõõmu 2	1 E						37 Luke 2	4 B					
5 Haage	2 A					vähem	38 Erra M1	5 A					
6 Ham. oja 5	2 A					vähem	39 Erra S1	5 A					
7 Issaku	2 A					vähem	40 Vända F2	5 A					
8 Keeri	2 A					vähem	41 Illi oja 1	5 B					
9 Rõõmu 1	2 A					vähem	42 KK3	5 B					
10 Tõrvandi	2 A					vähem	43 Konnatiik	5 B					
11 Tõrve	2 A					vähem	44 Laguja 2	5 B					
12 V. oja 1	2 A					vähem	45 Laguja 5	5 B					
13 Mäksa 1	2 A					vähem	46 Luutsna 1 väike	5 B					
14 Anf1	2 A						47 Luutsna 3	5 B					
15 IPA 1	2 A						48 Luutsna 6	5 B					
16 Kõpa 1	2 A						49 Mõra 3	5 B					
17 Luutsna 1 suur	2 A						50 Mõra 5	5 B					
18 Nõuni	2 A						51 Päidla	5 B					
19 Kriimani	2 A						52 Pori 2	5 B					
20 Keila	2 B						53 Savi-Peeda	5 B					
21 Vasula järv	2 C						54 Villemi	5 B					
22 Aura	3 A						55 Viia tiik	5 B					
23 S-Ka 4	3 A						56 Urmase lomp	5 B					
24 Illi oja 2	3 A						57 Kaagvere	5 B					
25 Amme 2	3 A						58 Ham. oja 2	5 C					
26 Aardla 1	3 A						59 S-Ka 3	5 D					
27 Kakumetsa 1	3 A						60 Kakumetsa 2	5					
28 Laeva 2	3 A						61 Luke3	6 A					
29 Vasula oja 6	3 B						62 IPA2	6 A					
30 Pori 4	3 B						63 Kurepalu 1	8 A					
31 Amme 1	3 B						64 Kurepalu 2	9 A					
32 Kõpa 5	3 B						65 Pori 3	9 A					
33 Lauda oja 3	3 C						66 Mudajõgi	9 B					

**Joonis 7. *P. putida* faagide retseptorspetsiifika määramise koondtulemused.** Esitatud on kõigi faagide nakatamistulemused seitsme *P. putida* mutandi kohta. Ülejäänud 14 mutandi tulemusi pole esitatud, sest nende puhul toimus nakatumine sarnaselt *P. putida* algsele tüvele PaW85. Rohelisega on märgitud bakteri lüüsumine vastava faagiga, punane näitab, et bakter on faagile resistentne. Rohelisele märgitud „vähem“ tähendab, et lüüsilaiku oli näha, kuid see oli silmnähtavalt vähem läbipaistvam kui algse tüve puhul. LPS-mutandid oli resistentsed kuue faagi perekonna suhtes. Neid suutsid nakatada ainult teise (2A, 2B ja 2C) ja neljanda (4A) perekonna liigid.

### 2.3.5. LPS-defektsete tüvede efektide täpsem testimine lahendusriidadega

Retseptorspetsiifika katsed näitasid, et faagid, mis suutsid LPS-defektseid mutante nakatada lüüsisid wbpL::Tn tüve kehvemini kui tüvesid wbpM::Tn ja ΔwbpL (Joonis 8). Nende erinevuste täpsemaks analüüsimiseks tehti lisakatseid uuritavate faagide lahendusriidadega. Nakatamiseks kasutati teise ja neljanda perekonna faage, mis suutsid LPS-mutante nakatada (Joonised 6 ja 7). Faagide tiitrite ühtlustamiseks tehti vajalikud eellahtlused nii, et bakterimurule sai kanda faagid kontsentratsioonidega 10<sup>8</sup> kuni 10<sup>1</sup> PFU/ml. Kui faagi algitiiter oli 10<sup>7</sup> PFU/ml, sai tassile nii 10<sup>8</sup> kui ka 10<sup>7</sup> koha peale kantud ainult kontsentratsioon 10<sup>7</sup> PFU/ml. Võrdluseks oli kasutusel *P. putida* algne tüvi PaW85 (WT).



**Joonis 8. WbpL geeni transposoonmutandi faagiresistentsus on suurem kui *wbpL* deletsioonmutandil.** Esitatud on *P. putida* algse tüve PaW85 (WT) ja  $\Delta wbpL$ , *wbpM::Tn* ning *wbpL::Tn* tüvede 8 erineva faagiga nakatatud bakterimurude pildid. Nakatamiseks on kasutatud faagilahjendusi kontsentratsioonidega  $10^8$  kuni  $10^1$  PFU/ml. Pildid on tehtud peale ~24 h kasvatamist  $20^\circ\text{C}$  juures. Katset korrati 4 korda ja esitatud on ühe katse tulemused.

Katsed näitasid, et kõik faagid nakatasid tüvesid *wbpM::Tn* ja  $\Delta wbpL$  peaaegu võrdväärselt WT-ga, kuid tüvi *wbpL::Tn* oli osade faagide suhtes resistentsem. Teise perekonna 2A liiki kuuluvad faagid käitusid kahte erinevat moodi. Osad 2A faagid (Haage, Issaku, Tõrvandi) nakatasid tüve *wbpL::Tn* 10-100 korda kehvemini kui algset tüve, kuid teised (AnF1, IPA1) samaväärselt algse tüvega (Joonis 8). Väga suur oli erinevus liigi 4A faagiga (Emajõgi) nakatumise korral *wbpL::Tn* ja teiste tüvede vahel. Tüve *wbpL::Tn* polnud see faag lahjendusi tehes üldse võimeline nakatama, kuigi teisi tüvesid jälgides oli tegemist ühe parima nakatajaga (Joonis 8).

LPS-defektsete tüvede lahjendusriidadega tehtud katsetest võib järeldada, et tüvi *wbpL::Tn* on osade teise ja neljanda perekonna faagide suhtes palju resistentsem kui tüved *wbpM::Tn* ja  $\Delta wbpL$ .

## 2.4. Arutelu

### 2.4.1. *P. putida* faagide peremeesspetsiifika

Faagid on tüüpiliselt väga peremeesspetsiifilised, suutes nakatada ainult kindlaid bakteri perekondi, liike või isegi tüvesid (Hyman ja Abedon, 2010). Osade *Pseudomonas*'e perekonna liike nakatavate faagidega on varem katseid tehtud, et aru saada kui peremeesspetsiifilised nad on. Näiteks on *P. syringae* faagid väga peremeesspetsiifilised ja mitmed neist suudavad nakatada ainult kindlaid tüvesid, mis on omavahel sarnased, kuid mitte teisi sama liigi tüvesid (Koskella ja Meaden, 2013). Kuna *P. putida* faagiresistentsust pole uuritud, ei ole ka andmeid selle kohta, milline on *P. putida*'t nakatavate faagide peremeesspetsiifika. Seetõttu saigi käesolevas töös uuritud laboris kollektioneeritud *P. putida* faagiraamatukogu peremeesspetsiifikat. Selgus, et need faagid ei olnud suutelised nakatama teisi tüvesid peale *P. putida* PaW85, mistõttu on nende puhul tegemist tugevalt

peremeesspetsiifiliste faagidega. Ainsaks erandiks uuritud bakterite hulgas oli *P. syringae* tüvi DC3000, keda suutsid nakatada labori kollektsiooni faagide teise perekonna liigid 2A, 2B ja 2C ning üheksanda perekonna liik 9A. See viitab, et faagid, mis kuuluvad liikidesse 2A, 2B, 2C ja 9A, kasutavad arvatavasti bakterile kinnitumiseks sarnaseid retseptoreid, mis on olemas nii *P. putida* tüvel PaW85 kui ka *P. syringae* tüvel DC3000, kuid mitte teistel kasutatud tüvedel. Huvitavaks teeb asjaolu veel see, et miskipärast pole liik 9B suuteline *P. syringae* DC3000 nakatama. Mistõttu on põhjust edaspidi 9A ja 9B faagide genome täpsemalt uurida ning otsida võimalikke põhjuseid, miks need ühe perekonna faagid erinevalt käituvad.

Saadud tulemused on ootuspärased selle poolest, et nagu paljud teised faagid on ka *P. putida* faagid väga peremeesspetsiifilised, kuid huvitava asjaoluna selgus, et mõned faagid olid siiski suutelised nakatama ka *P. syringae* tüve DC3000.

#### **2.4.2. *P. putida* faagide retseptorspetsiifika**

Faagid kasutavad bakteri pinnale kinnitumiseks retseptoritena piile, poriine ja lipopolüsahhariide. Lipopolüsahhariidides kasutatakse kinnitumiseks kõige enam LPS'i O-antigeenset osa (Nobrega *et al.*, 2018). *P. putida* faagide poolt kasutatavate retseptorite väljaselgitamiseks uuriti käesolevas töös kümneid *P. putida* PaW85 mutante, kellel oli defektne mõni potentsiaalset retseptorit kodeeriv geen. Kui faag ei olnud võimeline mutanti nakatama, tähendas see seda, et see retseptor, mille töö oli antud tüves häiritud, oli vajalik faagi kinnitumiseks. Ainsad tüved, kelle puhul oli paljude faagidega nakatumine häiritud, olid defektse lipopolüsahhariidi geeniga tüved *wbpL::Tn*, *wbpM::Tn* ja  $\Delta$ *wbpL*. Seega faagid, mis ei suutnud nakatada neid mutante, kasutavad retseptorina lipopolüsahhariidi. See on kooskõlas eelnevate töödega, kus ka teised *Pseudomonas*'e perekonna bakterite faagid, nagu näiteks *P. syringae* faagid (Koskella ja Meaden, 2013), kasutavad kõige enam retseptoritena lipopolüsahhariide.

Kolmel mutandil (*wbpL::Tn*, *wbpM::Tn* ja  $\Delta$ *wbpL*), keda paljud faagid nakatada ei suutnud, oli defektne O-antigeeni sünteesis osalevat valku kodeeriv geen. *WbpL* vastutab pseudomonaadides O-antigeeni sünteesi alustamise eest (Kutschera *et al.*, 2019). Lisaks *wbpL*'le sõltub pseudomonaadide O-antigeeni süntees ka geenist *wbpM* (Creuzenet ja Lam, 2001). Kui on rikitud vähemalt üks neist geenidest, pole bakter suuteline O-antigeeni sünteesima (Dean ja Goldberg, 2000; Kutschera *et al.*, 2019). See tähendab, et need faagid, kes kasutavad retseptorina just O-antigeeni, pole suutelised mutandile kinnituma. Seetõttu võib spekuloida, et paljud labori faagiraamatukogu faagid (liigid 1A, 1B, 1C, 1E, 3A, 3B,

3C, 4B, 5A, 5B, 5C, 5D, 6A, 8A, 9A ja 9B) kasutavad retseptorina lipopolüsahhariidi O-antigeeni.

Teiste faagide (2A, 2B, 2C ja 4A) retseptorite kohta pole midagi teada. Nemad võivad kasutada kinnitumiseks nii piile, poriine kui ka lipopolüsahhariide, viimaste puhul siis pigem LPS tuumikoligosahhariidset osa. Retseptoritena saab välistada vaid need, mille mutantidega sai katseid läbi viidud.

LPS-mutantide nakatamisefektiivsust mõõtes ilmnes üks huvitav asjaolu. Tüved *wbpL::Tn* ja  $\Delta wbpL$  oleksid võinud nakatuda sarnaselt, kuna mõlemal on geen *wbpL* defektne. Kuna tüved  $\Delta wbpL$  ja *wbpM::Tn* käitusid samamoodi, siis on alust arvata, et erinevus tuleneb tüve *wbpL::Tn* eripärast. Arvestades, et tegemist on transposoonmutandiga, siis poleks üllatav kui lisaks mutatsioonile geen *wbpL* võis transposoonmutageneesi käigus olla toimunud mutatsioone ka mujal genoomis, tehes selle tüve faaginakkusele resistentsemaks.

Teine huvitav leid seoses *wbpL::Tn* tüvega oli asjaolu, et teise perekonna faagid käitusid *wbpL::Tn* tüve nakatades kahte erinevat moodi – osad nakatasid mutanti sarnaselt algsele tüvele ja teised palju kehvemini. Selleks, et aru saada, kas sellel erinevusel võiks ka mingi täpsem põhjus olla, võrdles Age Brauer teise perekonna faagide genome. Ühe sabakiu valgu analüüsimisel (Joonis 9) märkas ta selget erinevust, mille järgi võis teise perekonna faagid kahte gruppi jagada.



## KOKKUVÕTE

Enamik faage kasutavad peremeestena ainult kindlaid bakteriliike või -tüvesid, mis viitab nende tugevale peremeesspetsiifilisusele (Hyman ja Abedon, 2010). Selleks, et faag oleks suuteline sobivale peremehele kinnituma, peab tema retseptoreid siduv valk ära tundma õige retseptori bakteri pinnal. Faagid võivad ära tunda mitmeid retseptoreid ja levinumaks neist on lipopolüsahhariidid (Nobrega *et al.*, 2018). Mitmete *Pseudomonas*'e perekonna liikide faagidega on tehtud katseid, et välja selgitada nende peremeesspetsiifilisus ja milliseid retseptoreid need faagid kasutavad (Dean ja Goldberg, 2000; Koskella ja Meaden, 2013; Kutschera *et al.*, 2019). Teadaolevalt pole sarnaseid katseid tehtud *P. putida* faagidega. Seda tõeses oli käesoleva töö eesmärk analüüsida keskkonnast eraldatud *P. putida* faagide peremeesspetsiifikat ja lisaks välja selgitada, milliseid retseptoreid võivad *P. putida*'t nakatavad faagid kinnitumiseks kasutada. Tehtud katsete tulemusena saab järeldada:

- 1) *P. putida*'t nakatavad faagid on tugevalt peremeesspetsiifilised;
- 2) labori faagiraamatukogu teise ja üheksanda perekonna faagid kasutavad nakatamiseks retseptoreid, mis on olemas nii *P. putida* tüvel PaW85 kui ka *P. syringae* tüvel DC3000;
- 3) esimese, kolmanda, viienda, kuuenda, kaheksanda ja üheksanda perekonna faagid kasutavad retseptoriteks lipopolüsahhariide, tõenäoliselt LPS'i O-antigeenset osa.

Seega võib tõdeda, et *P. putida* faagid on peremeesspetsiifilised ja paljud neist kasutavad bakteri pinnale kinnitumiseks lipopolüsahhariide.

## Host and receptor specificity of *Pseudomonas putida* phages

Anu Kängsep

### SUMMARY

Most bacteriophages use only specific bacterial species or strains as hosts, suggesting their strong host specificity (Hyman and Abedon, 2010). For a phage to be able to attach to a suitable host, its receptor-binding protein must recognize the correct receptor on the bacterial surface. Phages can recognize several receptors, the most common ones being used are lipopolysaccharides (Nobrega *et al.*, 2018). Experiments have been performed with phages from several species of the genus *Pseudomonas* to find out their host specificity and which receptors these phages use (Dean and Goldberg, 2000; Koskella and Meaden, 2013; Kutschera *et al.*, 2019). To our knowledge, similar experiments have not been performed with *P. putida* phages. Recognizing this, the aim of this work was to analyze the host specificities of *P. putida* phages isolated from the environment and to find out which receptors the phages infecting *P. putida* can use for attachment. From the data obtained, it can be concluded:

- 1) the phages infecting *P. putida* are highly host-specific;
- 2) phages of the second and ninth genera use receptors for infection, which are present in both *P. putida* strain PaW85 and *P. syringae* strain DC3000;
- 3) phages of the first, third, fifth, sixth, eighth and ninth genera use lipopolysaccharides, especially the O-antigene part of LPS, as receptors.

Thus, it can be concluded that *P. putida* phages are host-specific and many of them use lipopolysaccharides for attachment.

## TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma juhendajat Rita Hõrakut, kes oli alati valmis aitama nii nõu kui ka abistava käega. Tänu temale said kõik mu küsimused põneva selgituse. Samuti ei pidanud ma kunagi muretsema, kui midagi kadunud või otsas oli – see tähendas vaid uut huvitavat seiklust, mille me koos ette saime võtta.

Lisaks soovin tänada oma laborikaaslaseid, kellelt sain alati abi küsida. Aitäh ka Hedvigile, kes mind nõu ja jõuga aitas, kui Ritat juhuslikult laboris ei olnud.

Suured tänud ka minu kursusekaaslastele, kellega veetsime pikki õhtuid koos kirjutades ning üksteist motiveerides.

## KASUTATUD ALLIKAD

- Abedon, S. T. (2009). *Chapter 1 Phage Evolution and Ecology* (Kd 67, lk 1–45). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)01001-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)01001-0)
- Ackermann, H. W. (1998). Tailed bacteriophages: The order caudovirales. *Advances in Virus Research*, 51, 135–201. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(08\)60785-x](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(08)60785-x)
- Ainsaar, K., Mumm, K., Ilves, H., ja Hõrak, R. (2014). The ColRS signal transduction system responds to the excess of external zinc, iron, manganese, and cadmium. *BMC Microbiology*, 14, 162. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-162>
- Ainsaar, K., Tamman, H., Kasvandik, S., Tenson, T., ja Hõrak, R. (2019). The TonB(m)-PocAB System Is Required for Maintenance of Membrane Integrity and Polar Position of Flagella in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, 201(17). <https://doi.org/10.1128/JB.00303-19>
- Bayley, S. A., Duggleby, C. J., Worsey, M. J., Williams, P. A., Hardy, K. G., ja Broda, P. (1977). Two modes of loss of the tol function from *Pseudomonas putida* mt-2. *Molecular and General Genetics MGG*, 154(2), 203–204. <https://doi.org/10.1007/BF00330838>
- Bertozi Silva, J., Storms, Z., ja Sauvageau, D. (2016). Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiology Letters*, 363(4), fnw002. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw002>
- Budzik, J. M., Rosche, W. A., Rietsch, A., ja O'Toole, G. A. (2004). Isolation and Characterization of a Generalized Transducing Phage for *Pseudomonas aeruginosa* Strains PAO1 and PA14. *Journal of Bacteriology*, 186(10), 3270–3273. <https://doi.org/10.1128/JB.186.10.3270-3273.2004>
- Campbell, A. (2003). The future of bacteriophage biology. *Nature Reviews. Genetics*, 4(6), 471–477. <https://doi.org/10.1038/nrg1089>

- Castledine, M., Padfield, D., Sierocinski, P., ... Buckling, A. (2022). Parallel evolution of *Pseudomonas aeruginosa* phage resistance and virulence loss in response to phage treatment in vivo and in vitro. *eLife*, *11*, e73679. <https://doi.org/10.7554/eLife.73679>
- Compeau, G., Al-Achi, B. J., Platsouka, E., ja Levy, S. B. (1988). Survival of rifampin-resistant mutants of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* in soil systems. *Applied and Environmental Microbiology*, *54*(10), 2432–2438. <https://doi.org/10.1128/aem.54.10.2432-2438.1988>
- Creuzenet, C., ja Lam, J. S. (2001). Topological and functional characterization of WbpM, an inner membrane UDP-GlcNAc C6 dehydratase essential for lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, *41*(6), 1295–1310. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02589.x>
- Cuppels, D. A. (1986). Generation and Characterization of Tn5 Insertion Mutations in *Pseudomonas syringae* pv. Tomato. *Applied and Environmental Microbiology*, *51*(2), 323–327. <https://doi.org/10.1128/aem.51.2.323-327.1986>
- Dean, C. R., ja Goldberg, J. B. (2000). The wbpM gene in *Pseudomonas aeruginosa* serogroup O17 resides on a cryptic copy of the serogroup O11 O antigen gene locus. *FEMS Microbiology Letters*, *187*(1), 59–63. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09137.x>
- Dy, R. L., Richter, C., Salmond, G. P. C., ja Fineran, P. C. (2014). Remarkable Mechanisms in Microbes to Resist Phage Infections. *Annual Review of Virology*, *1*(1), 307–331. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085500>
- Erez, Z., Steinberger-Levy, I., Shamir, M., ... Sorek, R. (2017). Communication between viruses guides lysis–lysogeny decisions. *Nature*, *541*(7638), 488–493. <https://doi.org/10.1038/nature21049>
- Fokine, A., ja Rossmann, M. G. (2014). Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages. *Bacteriophage*, *4*(1), e28281. <https://doi.org/10.4161/bact.28281>

- Fortier, L.-C., ja Sekulovic, O. (2013). Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence*, 4(5), 354–365. <https://doi.org/10.4161/viru.24498>
- González-García, V. A., Pulido-Cid, M., Garcia-Doval, C., Bocanegra, R., Raaij, M. J. van, Martín-Benito, J., Cuervo, A., ja Carrascosa, J. L. (2015). Conformational Changes Leading to T7 DNA Delivery upon Interaction with the Bacterial Receptor\*. *Journal of Biological Chemistry*, 290(16), 10038–10044. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.614222>
- Gordillo Altamirano, F. L., ja Barr, J. J. (2021). Unlocking the next generation of phage therapy: The key is in the receptors. *Systems Biology • Nanobiotechnology*, 68, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.10.002>
- Hampton, H. G., Watson, B. N. J., ja Fineran, P. C. (2020). The arms race between bacteria and their phage foes. *Nature*, 577(7790), 327–336. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1894-8>
- Hantke, K. (2020). Compilation of Escherichia coli K-12 outer membrane phage receptors – their function and some historical remarks. *FEMS Microbiology Letters*, 367(2), fnaa013. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa013>
- Hyman, P. (2017). Phage Receptor☆. *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.06884-9>
- Hyman, P., ja Abedon, S. T. (2010). Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Advances in Applied Microbiology*, 70, 217–248. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)70007-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)70007-1)
- Jonge, P. A. de, Nobrega, F. L., Brouns, S. J. J., ja Dutilh, B. E. (2019). Molecular and Evolutionary Determinants of Bacteriophage Host Range. *Trends in Microbiology*, 27(1), 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.08.006>

- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., ja Lefkowitz, E. J. (Toim). (2012). Family—Myoviridae. *Virus Taxonomy* (lk 46–62). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384684-6.00002-1>
- Kivistik, P. A., Putrins, M., Püvi, K., Ilves, H., Kivisaar, M., ja Hõrak, R. (2006). The ColRS two-component system regulates membrane functions and protects *Pseudomonas putida* against phenol. *Journal of Bacteriology*, *188*(23), 8109–8117. <https://doi.org/10.1128/JB.01262-06>
- Koskella, B., ja Meaden, S. (2013). Understanding bacteriophage specificity in natural microbial communities. *Viruses*, *5*(3), 806–823. <https://doi.org/10.3390/v5030806>
- Kutschera, A., Schombel, U., Wröbel, M., Gisch, N., ja Ranf, S. (2019). Loss of wbpL disrupts O-polysaccharide synthesis and impairs virulence of plant-associated *Pseudomonas* strains. *Molecular Plant Pathology*, *20*(11), 1535–1549. <https://doi.org/10.1111/mpp.12864>
- Kõiv, V., Roosaare, M., Vedler, E., Kivistik, P. A., Toppi, K., Schryer, D. W., Remm, M., Tenson, T., ja Mäe, A. (2015). Microbial population dynamics in response to *Pectobacterium atrosepticum* infection in potato tubers. *Scientific Reports*, *5*, 11606. <https://doi.org/10.1038/srep11606>
- Labrie, S. J., Samson, J. E., ja Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(5), 317–327. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2315>
- Le, S., He, X., Tan, Y., Huang, G., Zhang, L., Lux, R., Shi, W., ja Hu, F. (2013). Mapping the Tail Fiber as the Receptor Binding Protein Responsible for Differential Host Specificity of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophages PaP1 and JG004. *PLOS ONE*, *8*(7), null. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068562>
- Lee, J.-H., Shin, H., ja Ryu, S. (2012). Complete Genome Sequence of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Bacteriophage SPN3UB. *Journal of Virology*, *86*(6), 3404–3405. <https://doi.org/10.1128/JVI.07226-11>

- Letarov, A. V., ja Kulikov, E. E. (2017). Adsorption of Bacteriophages on Bacterial Cells. *Biochemistry. Biokhimiia*, 82(13), 1632–1658. <https://doi.org/10.1134/S0006297917130053>
- Loeschcke, A., ja Thies, S. (2015). Pseudomonas putida-a versatile host for the production of natural products. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(15), 6197–6214. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6745-4>
- Moineau, S., ja Tremblay, D. M. (2017). Bacteriophage☆. *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.06122-7>
- Mumm, K., Ainsaar, K., Kasvandik, S., Tenson, T., ja Hörak, R. (2016). Responses of Pseudomonas putida to Zinc Excess Determined at the Proteome Level: Pathways Dependent and Independent of ColRS. *Journal of Proteome Research*, 15(12), 4349–4368. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00420>
- Myers, J., Davis II, J., Lollo, M., Hudec, G., ja Hyman, P. (2023). More's the Same-Multiple Hosts Do Not Select for Broader Host Range Phages. *Viruses*, 15(2). <https://doi.org/10.3390/v15020518>
- Nawel, Z., Rima, O., ja Amira, B. (2022). An overview on Vibrio temperate phages: Integration mechanisms, pathogenicity, and lysogeny regulation. *Microbial Pathogenesis*, 165, 105490. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105490>
- Nikel, P., Martinez-Garcia, E., ja de Lorenzo, V. (2014). Biotechnological domestication of pseudomonads using synthetic biology. *Nat Rev Microbio*, 12(5), 368–379. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3253>
- Nobrega, F. L., Vlot, M., de Jonge, P. A., Dreesens, L. L., Beaumont, H. J. E., Lavigne, R., Dutilh, B. E., ja Brouns, S. J. J. (2018). Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nature Reviews Microbiology*, 16(12), 760–773. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0070-8>

- Olszak, T., Latka, A., Roszniowski, B., Valvano, M. A., ja Drulis-Kawa, Z. (2017). Phage Life Cycles Behind Bacterial Biodiversity. *Current Medicinal Chemistry*, 24(36), 3987–4001. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170413100136>
- Putrinš, M., Ainelo, A., Ilves, H., ja Hõrak, R. (2011). The ColRS system is essential for the hunger response of glucose-growing *Pseudomonas putida*. *BMC Microbiology*, 11, 170. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-170>
- Rocchetta, H. L., Burrows, L. L., ja Lam, J. S. (1999). Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 63(3), 523–553. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.3.523-553.1999>
- Samson, J. E., Magadán, A. H., Sabri, M., ja Moineau, S. (2013). Revenge of the phages: Defeating bacterial defences. *Nature Reviews Microbiology*, 11(10), 675–687. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3096>
- Thanki, A. M., Taylor-Joyce, G., Dowah, A., Nale, J. Y., Malik, D., ja Clokie, M. R. J. (2018). Unravelling the Links between Phage Adsorption and Successful Infection in *Clostridium difficile*. *Viruses*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/v10080411>
- Tzipilevich, E., Habusha, M., ja Ben-Yehuda, S. (2017). Acquisition of Phage Sensitivity by Bacteria through Exchange of Phage Receptors. *Cell*, 168(1), 186–199.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.003>
- Vedler, E., Heinaru, E., Jutkina, J., Viggor, S., Koressaar, T., Remm, M., ja Heinaru, A. (2013). *Limnobacter* spp. As newly detected phenol-degraders among Baltic Sea surface water bacteria characterised by comparative analysis of catabolic genes. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(8), 525–532. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.07.004>
- Yu, F., ja Mizushima, S. (1982). Roles of lipopolysaccharide and outer membrane protein OmpC of *Escherichia coli* K-12 in the receptor function for bacteriophage T4. *Journal of Bacteriology*, 151(2), 718–722. <https://doi.org/10.1128/jb.151.2.718-722.1982>

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

Mina, Anu Kängsep,

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

***Pseudomonas putida* faagide peremees- ja retseptorspetsiifika,**

mille juhendaja on Rita Hõrak,

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

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, 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.

*Anu Kängsep*

**29.05.2023**