

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

GENEETIKA ÕPPETOOL

Kromosomaalsete toksiin-antitoksiin süsteemide ja profaagide mõju *Pseudomonas putida* faagiresistentsusele

Bakalaureusetöö

12 EAP

Kendra Piirmets

Juhendajad MSc Sirli Rosendahl

PhD Rita Hõrak

TARTU 2022

INFOLEHT

Kromosomaalsete toksiin-antitoksiin süsteemide ja profaagide mõju *Pseudomonas putida* faagiresistentsusele

Kromosomaalseid toksiin-antitoksiin süsteeme ja profaage peetakse bakteri faagikaitsemehhanismideks. Profaagid kaitsevad bakterit endasarnaste faagide eest, kuid toksiin-antitoksiin süsteemide roll faagiresistentsuses pole veel selge. Sellest lähtuvalt oli käesoleva töö eesmärgiks välja selgitada, kas kromosomaalsetel toksiin-antitoksiin süsteemidel ja profaagidel on mõju *Pseudomonas putida* faagiresistentsusele. Tulemused näitasid: (1) profaagid suurendavad *P. putida* faagiresistentsust Vända F1, Vända F2, Erra S1 ja Erra M1 faagidega nakatamisel; (2) *P. putida* kromosomaalsed toksiin-antitoksiin süsteemid pole faaginakkuse korral kasulikud, vaid pigem kulukad (Erra M1) või ei avalda faaginakkuse korral mingit mõju (Vända F1, Vända F2, Erra S1, Erra jõgi, Emajõgi).

Märksõnad: *Pseudomonas putida*, toksiin-antitoksiin süsteem, profaag, faagiresistentsus

CERCS kood: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

The role of chromosomal toxin-antitoxin systems and prophages in phage resistance of *Pseudomonas putida*

It has been supposed that chromosomal toxin-antitoxin systems and prophages are phage protection mechanisms of bacteria. Prophages protect bacteria from similar phages, but the role of toxin-antitoxin systems in phage resistance is unclear. Based on this, the study aimed to determine if chromosomal toxin-antitoxin systems and prophages have an impact on phage resistance of *Pseudomonas putida*. The results revealed: (1) prophages increase phage resistance of *P. putida* against phages Vända F1, Vända F2, Erra S1 and Erra M1; (2) chromosomal toxin-antitoxin systems are not beneficial for *P. putida* under condition of phage infection, rather they are costly (Erra M1) or do not have any impact on phage resistance (Vända F1, Vända F2, Erra S1, Erra jõgi, Emajõgi).

Key words: *Pseudomonas putida*, toxin-antitoxin system, prophage, phage resistancy

CERCS code: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

INFOLEHT	3
SISUKORD	4
KASUTATUD LÜHENDID	6
SISSEJUHATUS	7
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1 Bakterite kaitsemehhanismid faagide vastu	8
1.1.1 Faagi rakupinnale kinnitumise ja rakku sisenemise inhibeerimine	8
1.1.2 Faasivariatsioon	9
1.1.3 Restriksiooni-modifikatsioonisüsteemid	10
1.1.4 CRISPR-Cas adaptiivne immuunsus	12
1.1.5 Abi süsteemid ja bakteripopulatsiooni kaitsmine	13
1.1.6 Toksiin-antitoksiin süsteemide roll faagi resistentsuses.....	14
1.1.7 Profaagide kodeeritud kaitsesüsteemid superinfektsiooni vastu	15
1.2 <i>Pseudomonas putida</i>	16
1.2.1 <i>Pseudomonas putida</i> olulisus biotehnoloogias.....	16
1.2.2 <i>Pseudomonas putida</i> genoomsed profaagid ja TA süsteemid	17
2 EKSPERIMENTAALNE OSA	18
2.1 Töö eesmärgid	18
2.2 Materjal ja meetodika.....	19
2.2.1 Kasutatud söötmed, faagid, bakteritüved ja plasmiidid.....	19
2.2.2 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR).....	20
2.2.3 Gelelektroforees.....	21
2.2.4 Bakterite elektroporeerimine	22
2.2.5 Deletsioonmutantide konstrueerimine	22
2.2.6 Faagide eraldamine keskkonnaproovidest.....	22
2.2.7 Faagitolerantsuse testimine agarsöötmele	24
2.2.8 Faagitolerantsuse testimine vedelsöötmes.....	25
2.3 Tulemused	25
2.3.1 $\Delta 4\Phi$ ja $\Delta 13TA\Delta 4\Phi$ tüvede konstrueerimine.....	25
2.3.2 <i>P. putida</i> 't nakatavate faagide eraldamine keskkonnaproovidest	26
2.3.3 Profaagide ja toksiin-antitoksiin süsteemide puudumise mõju <i>P. putida</i> faagiresistentsusele agarsöötme tassidel.....	26
2.3.4 Profaagide ja toksiin-antitoksiin süsteemide puudumise mõju <i>P. putida</i> faagiresistentsusele vedelsöötmes kasvatamisel.....	28
2.4 Arutelu	30
2.4.1 Kromosomaalsete profaagide mõju <i>P. putida</i> faagiresistentsusele	30
2.4.2 Kromosomaalsete TA-süsteemide mõju <i>P. putida</i> faagiresistentsusele.....	31

KOKKUVÕTE	33
SUMMARY	34
KASUTATUD KIRJANDUS	36

KASUTATUD LÜHENDID

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

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

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

CRISPR - rühmitatud korrapärase vahedega lühikesed palindroomsed kordusjärjestused (ingl. k. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)

crRNA - CRISPR-RNA (ingl. k. *CRISPR-RNA*)

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

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

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

OMV - välismembraani vesiikulid (ingl. k. *outer membrane vesicles*)

PFU - faagilaike moodustav ühik (ingl. k. *plaque-forming unit*)

Pgl - faagi paljunemist pidurdav (ingl. k. *phage growth limitation*)

PSK - segregatsioonijärgne tapmine (ingl. k. *post-segregational killing*)

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

RGN - RNA-juhitud nukleas (ingl. k. *RNA-guided nucleases*)

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

rpm - pööret minutis (ingl. k. *revolutions per minute*)

Sie süsteem - superinfektsiooni välistamise süsteem (ingl. k. *superinfection exclusion system*)

TA - toksiin-antitoksiin (ingl. k. *toxin-antitoxin*)

wt - metsiktüvi (ingl. k. *wild-type*)

SISSEJUHATUS

Bakterid peavad hakkama saama bakteriofaagide põhjustatud survega ning selleks on neil evolutsioonis välja arenenud immuunmehhanismid. Faagide maailm on mitmekesine ja sellest johtuvalt on bakteritel palju eri mehhanisme, mis neid faagide eest kaitsevad (R. Dy et al., 2014; Hampton et al., 2020). Üheks selliseks mehhanismiks on bakteri genoomis leiduvad profaagid, mis kaitsevad bakterit uute nakkuste eest profaagile sarnaste faagidega. Viimased uuringud viitavad, et ka bakterite genoomides laialt levinud toksiin-antitoksiin süsteemid võivad osaleda faagivastases kaitses (LeRoux & Laub, 2022).

Alates esimese toksiin-antitoksiin lookuse leidmisest plasmiidist teatakse, et üheks TA-süsteemide funktsiooniks on plasmidi säilitamine rakus (LeRoux & Laub, 2022). Toksiin-antitoksiin süsteemid koosnevad rakule kahjulikust toksiinist ja toksiooni inhibeerivast antitoksiinist, kusjuures antitoksiin on tavaliselt labiilsem kui toksiin. Kui raku jagunemisel peaks juhtuma, et mõni tütar-rakk ei saa plasmidi, siis selline rakk konkureeritakse populatsioonist välja, sest antitoksiini kontrolli alt väljunud toksiin inhibeerib bakteri kasvu (Gerdes *et al.*, 1986; LeRoux & Laub, 2022). Kromosomaalsete TA-süsteemide funktsiooni kohta nii ühest seisukohta siiani ei ole. On pakutud, et nad võiks olla olulised bakterile stressitingimustes hakkama saamiseks (LeRoux & Laub, 2022), kuid samas on näidatud, et kromosomaalsete TA-süsteemide eemaldamisel pole mingit mõju bakteri kohasusele või nende olemasolu on bakterile hoopis kulukas (Goormaghtigh *et al.*, 2018; Rosendahl *et al.*, 2020).

Profaagid on bakteri genoomi integreerunud faagid, mis annavad bakterile mitmeid kasulikke funktsioone, suurendades seeläbi nende kohasust. Profaagide stabiilseks püsimiseks peremehe genoomis on nende enamike geenide, eelkõige lüütiliste geenide, ekspressioon maha surutud (Owen *et al.*, 2020). Samas on profaagides leitud regioone või geene, mis võivad kodeerida peremeesrakule kaitsesüsteeme faagide vastu, takistades näiteks faagi DNA rakku sisenemist või faagi kinnitumist pinnavalguga (Cumby, Davidson, *et al.*, 2012).

Pseudomonas putida genoomist on leitud kuni 15 kromosomaalset TA operoni (Xie *et al.*, 2018) ja 4 genoomset profaagi (Martínez-García *et al.*, 2015). Käesoleva töö praktilise osa eesmärgiks oli selgitada, kas kromosomaalsetel toksiin-antitoksiin süsteemidel ja profaagidel on mõju *P. putida* faagiresistentsusele.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Bakterite kaitsemehhanismid faagide vastu

Bakteriofaagid on kõige levinumad bioloogilised eluvormid Maal (R. Dy *et al.*, 2014), hinnanguliselt on neid biosfääris 10^{31} ehk 10 korda rohkem kui baktereid (Fortier & Sekulovic, 2013). Seetõttu on bakterid faagide tõttu suure evolutsioonilise surve all ning et sellega toime tulla on bakteritel välja kujunenud palju erinevaid, nii kaasasündinud kui ka omandatud, faagiresistentsusmehhanisme. Faagid omakorda kasutavad mitmesuguseid strateegiaid, et võidelda bakterite kaitsemehhanismide vastu (Hampton *et al.*, 2020).

1.1.1 Faagi rakupinnale kinnitumise ja rakku sisenemise inhibeerimine

Bakteri nakatamiseks peavad faagid esmalt kinnituma rakupinnale, kus nad seonduvad mingite kindlate molekulidega – retseptoritega (R. Dy *et al.*, 2014; Hampton *et al.*, 2020). Bakteriofaagi retseptoritena võivad toimida nii membraani polüsahhariidid (Rakhuba *et al.*, 2010), teihhuhapped (Nordström & Forsgren, 1974), lipopolüsahhariidid ja valgud, kui ka struktuursed elemendid nagu piilid ja viburid. Adsorptsiooni takistamiseks võivad bakterid rakupinna modifitseerimise teel retseptoreid muuta või maskeerida (R. Dy *et al.*, 2014; Hampton *et al.*, 2020). Näiteks kasutab *Vibrio cholerae* faag ICP2 rakupinnale kinnitumiseks välismembraani poriini OmpU-d ning *ompU* mutatsioonid annavad bakterile faagi suhtes resistentsuse (Seed *et al.*, 2014).

Faagi seondumise inhibeerimiseks võib bakter toota ka faagiga konkureerivaid retseptori inhibiitoreid ning varjestada retseptoreid ekstratsellulaarse maatriksi komponentidega (R. Dy *et al.*, 2014). Faagid ise kodeerivad samuti adsorptsiooni mõjutavaid geene. Selline näide on *E. coli* Φ V10 faag, mille atsetüültransferaas Oac modifitseerib bakteri O157 antigeeni, mis on ühtlasi ka faagiretseptor. Φ V10 on võimeline nakatama *E. coli* tüvesid, millel on muutmata O157 antigeen. Seega blokeerib Φ V10 Oac valk O157 antigeeni atsetüülimise kaudu retseptori äratundmist, kaitstes sellega bakterit superinfektsiooni eest (Perry *et al.*, 2009). Lisaks on leitud, et faagi adsorptsiooni mõjutab ka retseptorite asukoht, kogus ja tihedus raku pinnal (Rakhuba *et al.*, 2010).

Gramnegatiivsed bakterid toodavad välismembraani vesiikuleid (OMV), mis aitavad kaitsta baktereid välismembraani mõjutavate stressitegurite eest. Leiti, et OMV-d aitavad kaitsta *E.*

coli't T4 faagi eest. OMV-de lisamisel faagiga nakatatud bakterikultuuridesse täheldati faagipopulatsiooni vähenemist, kuna OMV-d sidusid T4 faage ja kaitsesid seega bakterit infektsiooni eest (Manning & Kuehn, 2011).

Bakteritel on leitud ka superinfektsiooni välistamise süsteeme (Sie süsteemid), mis takistavad faagi DNA rakku sisenemist. Neid valke kodeerivaid geene leidub tihti profaagides ja on leitud, et nad takistavad bakteri nakatumist endasarnaste faagidega. Näiteks peatavad kolifaag T4 Sie valgud Imm ja Sp teiste T4-sarnaste faagide DNA translokatsiooni (Labrie *et al.*, 2010). Imm valk inhibeerib DNA ülekandumist tsütoplasmasse ja Sp inhibeerib T4 lüotsüümi aktiivsust, mis takistab peremeesraku peptidoglükaani lagunemist (Lu & Henning, 1994).

1.1.2 Faasivariatsioon

Faasivariatsioon ehk faasivahetus on protsess, kus pidevalt muutuv keskkonnas läbivad bakterid sagedasi ja pöörduvaid fenotüübilisi muutusi. Muutused tulenevad rekombinatsioonilistest ümberkorraldustest või pöörduvast metüleerimisest spetsiifilistes lookustes, mis põhjustab nende lookuste geenide ekspressiooni sisse- või väljalülitumise (Hallet, 2001). Faasivariatsioon hõlmab endas stohhastilisi muutusi pinnal eksponeeritud molekulide ja struktuuride nagu lipopolüsahhariidide, piilide, vibur, biosünteesis, mille tulemusena muutub bakteripopulatsioon nende tunnuste suhtes heterogeenseks. Üldiselt tähendab see pöörduvat lülitust (ingl. k. *on-off*) kahe ekspressioonifaasi vahel, mille tulemiks on ühe või mitme valgu ekspressioonitaseme erinevus üksikute rakkude vahel populatsioonis. Klassikalisest geeniregulatsioonist erineb faasivariatsioon selle poolest, et ekspressioonifaas pärandub edasi ka tütarrakkudele, jäädes seejuures põlvkondade vahel pöörduvaks. Faasivahetuse sagedust on raske hinnata, kuna lülitussageduste määramiseks kasutatakse erinevaid meetodeid ning faasivahetust võivad mõjutada kasvutingimused. Siiski on faasivahetus suhteliselt sage ja võib toimuda sagedusega 1 lülitus 10^3 raku kohta ühes põlvkonnas (Woude & Bäumler, 2004).

Faasivariatsioon osaleb ka faagivastases kaitses. Näiteks on *Streptomyces coelicolor* A3(2)-l leitud faasivahetust kasutav faagiresistentsusmehhanism, mida kutsutakse faagi paljunemist pidurdavaks (Pgl – *phage growth limitation*) süsteemiks (Chinenova *et al.*, 1982). Pgl koosneb neljast geenist: *pglW*, *pglX*, *pglY* ja *pglZ*. PglX on DNA metüültransferaas, mis on

funktsionaalse PglY puudumisel toksiline, PglY on ATPaas ning PglW proteiinkinaas (Hoskisson *et al.*, 2015). *S. coelicolor*'i Pgl⁺ fenotüübiga bakterid modifitseerivad neid nakatavat mõõdukat faagi ΦC31 nii, et faag on võimeline küll bakterit nakatama, kuid esimese infektsioonitsükli järel vabanevad faagid on järgmises infektsioonitsükli tugevalt nõrgenenud (Chinenova *et al.*, 1982). Arvatakse, et esmasel infektsioonil tekkinud faagi järglased on modifitseeritud nii, et Pgl⁺ tüve teistkordsel nakatamisel on infektsioon häiritud, kuid Pgl⁻ tüve nakatavad modifitseeritud faagid normaalselt (Hoskisson *et al.*, 2015). Arvatakse, et Pgl faasivariatsiooni võib põhjustada DNA metüültransferaasi geen *pglX* leiduva G-rikka järjestuse (PolyGs) lühenemine või pikenemine (Sumbly & Smith, 2003). Hüpotetiliselt täidab *pglX* DNA-d modifitseeriva komponendi rolli Pgl süsteemis (Sumbly & Smith, 2002). Pgl⁺ tüvel esineb 8-nukleotiidi pikkune G-järjestus ning Pgl⁻ tüvel 7- või 9-nukleotiidine järjestus. G-rikka järjestuse pikkuse varieerumine tuleneb tõenäoliselt DNA polümeraasi libisemisest ja ahela valesti paardumisest DNA replikatsiooni ajal (Sumbly & Smith, 2003).

1.1.3 Restriksiooni-modifikatsioonisüsteemid

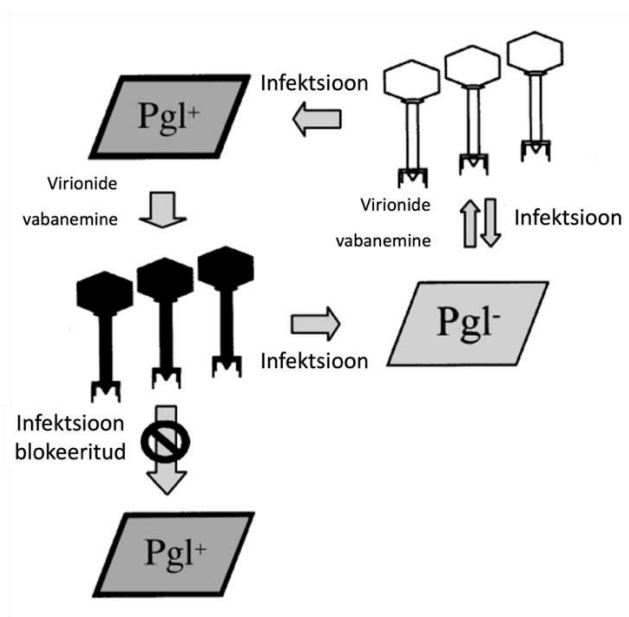
Kõige paremini iseloomustatud faagiresistentsuse mehhanism bakterites on restriksiooni-modifikatsioonisüsteemid (RM-süsteemid), mis toimivad kui bakteri immuunsüsteemid ning hävitavad rakku sisenenud võõr-DNA (Bertani & Weigle, 1953; Pingoud *et al.*, 2014). Tavaliselt kuuluvad restriksiooni-modifikatsiooni süsteemidesse kaks ensüümi: restriksiooni endonukleas ehk restriктаas (RE) ja metüültransferaas (MT). RE funktsiooniks on ära tunda ja lõigata spetsiifilist DNA järjestust ning MT metüülib äratundmisjärjestuses adeniini või tsütosiini, kaitstes bakteri DNA-d restriктаaside lagundamise eest (Pingoud & Jeltsch, 2001).

Restriктаase on neli põhitüüpi (I, II, III, IV tüüp) ning nad vajavad toimimiseks tihti kofaktorina kahevalentset metalliiooni nagu näiteks Mg²⁺ (Loenen *et al.*, 2014). II tüüpi restriктаasid tunnevad ära tavaliselt lühikesed palindroomsed, 4-8 aluspaari pikad, järjestused. II tüüpi restriктаasid lõikavad DNA'd Mg²⁺ juuresolekul, kas äratundmisjärjestuse sees või selle läheduses (Pingoud & Jeltsch, 2001).

Kui bakterirakku sisenenud faagi DNA ei ole metüleeritud, siis bakteri RM-süsteem tunneb selle ära kui võõr-DNA ning restriктаas lagundab selle, et vältida faagi lüütilisse tsükli minemist. Samas võivad bakteri metülaasid ka rakku sisenenud faagi DNA'd metüleerida, mis

soodustab faagi lüütilisse tsüklisse minemist, kuna faagi DNA ei ole enam restriктаasile äratuntav. Metüleeritud genoomiga faagid on tuntud sarnaste restriksiooniensüümide suhtes ka järgmistes infektsioonitsüklites, kui vabanenud virionid nakatavad sama RM-süsteemiga naaberrakke. Samas pole metüleeritud DNA'ga faag kaitstud siis, kui ta nakatab mingi teistsuguse RM-süsteemiga bakterit. Sellisel juhul kaob tolerantsus ka algse RM-süsteemi suhtes, mille poolt faagi DNA varasemalt metüleeritud oli, kuna moodustuvad uued virionid jäävad metüleerimata (Labrie *et al.*, 2010).

Üheks RM-süsteemi sarnaseks faagikaitsemehhanismiks *Streptomyces coelicolor*'is on faagi ΦC31 paljunemist pidurdav süsteem Pgl (vt ka eelmist peatükki). See on ebatüüpiline RM-süsteem, mis sarnaneb olemuselt ka toksiin-antitoksiin süsteemile (vt ka peatükki 1.7), kus PglX metüültransferaas on bakterile toksiline ja PglZ toimib antitoksiinina. Faagid, mis nakatavad Pgl⁺ baktereid, metüleeritakse rakkudes ning virionid vabanevad (Joonis 1). Kui modifitseeritud DNA-ga faagid nakatavad naaberrakke, siis nende faagide DNA lagundatakse. Arvatakse, et Pgl⁺ raku nakatumisel metüleeritud ΦC31 faagiga edastab PglW signaali teistele Pgl valkudele, mille tulemusena moodustub Pgl valkudest restriksiooniline kompleks, mis lagundab metüleeritud genoomiga faagi DNA. Seega surevad faaginakkuse tõttu vaid need bakterid, keda nakatavad *Streptomyces coelicolor*'i RM-süsteemi poolt metüleerimata faagid. Esmasel nakatumisel metüleeritakse faagid, mille käigus nakatatud bakter sureb, kuid edaspidi on bakteripopulatsioon selle faagi eest kaitstud (Hoskisson *et al.*, 2015).



Joonis 1. Pgl süsteemi toimimise mehhanism. *S. coelicolor* Pgl⁺ rakud on joonisel kujutatud tumehalli taustaga ja jämedate ääristega, Pgl⁻ rakk on helehalli taustaga ja peenemate ääristega. Mustad faagid on modifitseeritud ja valged on modifitseerimata faagid (Sumby & Smith, 2002, kohandatud).

1.1.4 CRISPR-Cas adaptiivne immuunsus

CRISPR-Cas süsteemid sisaldavad endas korrapäraste vahedega lühikeste palindroomsete kordusjärjestuste klastreid ja CRISPR-iga seotud *cas* geene, mis sarnaselt RM-süsteemidele lagundavad järjestusspetsiifiliselt faagide DNA-d. CRISPR-Cas salvestab varasemad kokkupuuted faagidega ning loob bakterile adaptiivse immuunsuse edaspidiste nakkuste suhtes (Barrangou *et al.*, 2007; Hynes *et al.*, 2014; Strotskaya *et al.*, 2017).

CRISPR klatri kõrval asuvad Cas valke kodeerivad geenid, mis osalevad faagivastase immuunsuse tekke kolmes faasis: kohanemine, CRISPR RNA (crRNA) biogenees ja interferents. Kohanemine on protsess, mille käigus integreeritakse võõr-DNA lühikesi järjestusi CRISPR klatriksse, mis tagab teistkordsel faagiga nakatumisel kaitse (Hille *et al.*, 2018). CRISPR klatriksse integreeritakse nn *spacer*'id, mis on homoloogsed faagi *protospacer*'iga (Strotskaya *et al.*, 2017). Seega omavad CRISPR-Cas adaptiivsed immuunsüsteemid mälu varasematest infektsioonidest ning teistkordsel infektsioonil kasutatakse RNA-juhitud nukleaase (RGN – *RNA-guided nucleases*) faagide järjestusspetsiifiliseks vaigistamiseks (Hille *et al.*, 2018). Kuid on ka tulemusi, mis viitavad, et kui CRISPR interferentsile tundlik lüütiline faag nakatab rakku, siis tugevdatakse abortiivse infektsiooni rada (vt järgmist peatükki), mis tapab raku ilma, et faagipartikleid vabaneks (Strotskaya *et al.*, 2017). Integreeritava osa valimise eest vastutab Cas1-Cas2 kompleks. Kui sama viirus uuesti bakterit nakatab, siis transkribeeritakse CRISPR lookusest CRISPR RNA prekursor (pre-crRNA), mida protsessitakse Cas-alkude või RNAaside poolt ja lõpuks saadakse küpsed crRNA-d. Interferentsi faasis seonduvad crRNA-d komplementaarsuse alusel võõrale nukleiinhappele ning Cas nukleaasid lagundavad nukleiinhappe (Hille *et al.*, 2018). CRISPR-Cas süsteemi võõr-DNA hävitamise efektiivsus oleneb faagi elutsüklist, *protospacer*'i asukohast ja faagi nukleiinhappe seisukorrast (Strotskaya *et al.*, 2017).

Streptococcus thermophilus'e 2. klassi kuuluv II-A tüüpi süsteem oli esimene otsene tõend sellele, et CRISPR-Cas tekitab bakteritele faagide vastu immuunsuse. 2. klassi kuuluvad II, V ja VI tüüpi CRISPR-Cas süsteemid. V tüüpi CRISPR-Cas süsteemide kohta teatakse, et see osaleb *Escherichia coli* faagiresistentsuses. On leitud, et *Leptotrichia shahii* tüüp VI süsteemi Cas13 on RNAas, mis lagundab faagi MS2 RNA, pakkudes bakterile resistentsust dsDNA faagide vastu (Hampton *et al.*, 2020).

1.1.5 Abi süsteemid ja bakteripopulatsiooni kaitsmine

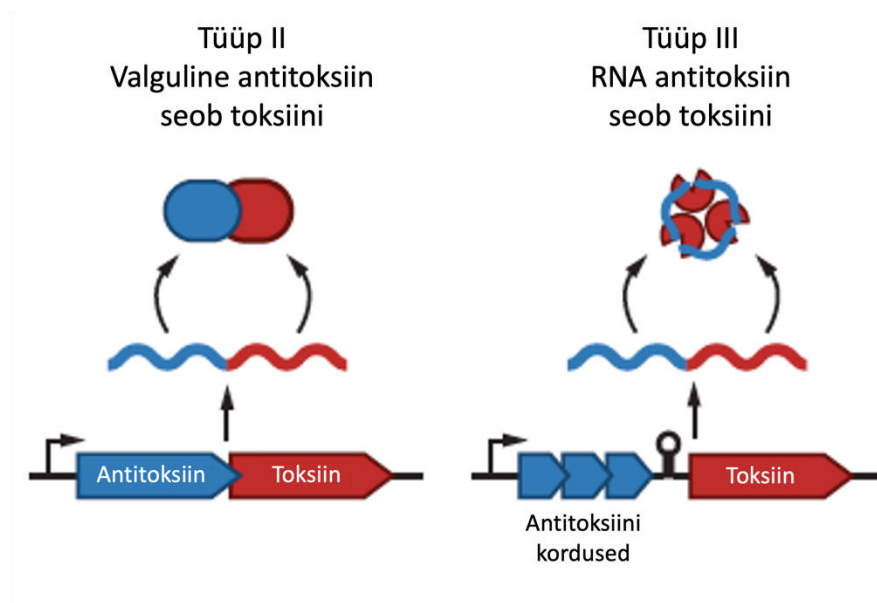
Erinevalt eelnevalt mainitud bakterite faagiresistentsuse mehhanismidest, mis annavad bakterile individuaalse resistentsuse, kaitsevad abortiivse infektsiooni süsteemid (Abi-süsteemid) kogu bakteripopulatsiooni, mille hüvanguks läheb nakatunud bakter apoptoosi enne, kui faag jõuab küpseda ja bakteri lüüsida, vältides nii teiste bakterite nakatumist (Lopatina *et al.*, 2020). Abi süsteemi toimel katkeb faagi areng nakatunud rakus, mistõttu vabanevad rakust vähesed faagid või ei vabane neid üldse (Hampton *et al.*, 2020). Abi-süsteemide roll on kaitsta bakteripopulatsiooni siis, kui bakteri esmased kaitsemehhanismid pole suutnud infektsiooni peatada ja raku ellujäämise tõenäosus on juba madal (Lopatina *et al.*, 2020). Kui bakter on faagiga nakatunud, siis Abi-süsteemid inhibeerivad raku olulisi metaboolseid protsesse (Dy *et al.*, 2014).

Esimene avastatud Abi-süsteem oli *E. coli* profaag λ kodeeritud RexAB. RexAB on kahekomponentne süsteem, mis katkestab viiruse lüütilise tsükli. Arvatakse, et Rex valgud lokaliseeruvad bakteri membraanis, mis viib rakumembraani depolariseerumiseni, mis omakorda mõjutab makromolekulide sünteesi, aktiivset transporti, ATP taset rakus ja viib lõpuks raku surmani (Parma *et al.*, 1992). Hiljuti näidati, et *Staphylococcus epidermis*'e Abi-süsteem sisaldab seriini/treoniini kinaasi Stk2, mis fosforüleerides bakteri elutegevuseks vajalikke valke, nagu translatsiooni, transkriptsiooni, rakutsükli kontrolli, metabolismi, DNA topoloogia ja DNA parandamisega seotud valke, põhjustab nakatunud bakterite surma (Depardieu *et al.*, 2016).

1.1.6 Toksiin-antitoksiin süsteemide roll faagi resistentsuses

Toksiin-antitoksiin süsteem (TA-süsteem) koosneb toksiinist ja kotranskribeeritud antitoksiinist (Hampton *et al.*, 2020), mis neutraliseerib toksiini (Joonis 2) (Harms *et al.*, 2018). Toksiinide sihtmärkideks on bakterile elutähtsad protsessid, mille häirimine põhjustab raku kasvu pärssimist või surma (Harms *et al.*, 2018), mis faaginakkuse korral võib takistada faagi levimist bakteripopulatsioonis (Hampton *et al.*, 2020). Normaalsetes kasvutingimustes pärssivad antitoksiinid vastavaid toksiine, kuid stressitingimustes võib antitoksiinide lagunemine suurened ja nii saavad toksiinid raku eluks vajalikke protsesse, nagu replikatsiooni ja translatsiooni, inhibeerida (Page & Peti, 2016). Praegu on geeniproductide ja toksiini ja antitoksiini omavaheliste interaktsioonide põhjal kirjeldatud kaheksat toksiin-

antitoksiin süsteemi tüüpi, mida eristatakse vastavalt sellele, millise mehhanismi järgi antitoksiin toksiini neutraliseerib (Jurėnas *et al.*, 2022).



Joonis 2. Tüüp II ja tüüp III toksiin-antitoksiin süsteemid. Tüüp II TA-süsteem on enim levinud mudel TA-süsteemidest, kus valguline antitoksiin (sinine) seondub toksiiniga (punane). Tüüp III TA-süsteemi korral on antitoksiiniks RNA mis toksiiniga seondub (LeRoux & Laub, 2022, kohandatud).

Ligi nelikümmend aastat tagasi avastati esimene toksiin-antitoksiin lookus *ccd* ning leiti, et see TA-süsteem on oluline plasmidi säilitamisel rakus. Leiti, et kui rakkudes läheb *ccd* piirkonda sisaldav mini-F plasmid kaotsi, siis on nende rakkude jagunemine inhibeeritud (Ogura & Hiraga, 1983). Seda põhjustab antitoksiini kontrolli alt vabanenud toksiin. Peaaegu kolm aastat peale *ccd* piirkonda kandvate plasmidide mõju avastamist rakkude paljunemisele, leiti veel teine TA-süsteemi lookus *parB*+ R1 plasmidis. Leiti, et jagunenud rakud, mis ei saanud endale *parB*+ plasmidi surid. Seega tagas *parB* lookus R1 plasmidi sisaldavate rakkude eluvõime. Nende lookuste vahendatud plasmidi stabiilsuse mehhanismi kutsuti toona segregatsioonijärgseks tapmiseks (PSK – *post-segregational killing*) (Gerdes *et al.*, 1986). Toksiin-antitoksiin süsteemide lookuseid on leitud peale plasmidide (Gerdes *et al.*, 1986; Ogura & Hiraga, 1983) ka faagides (Lehnherr *et al.*, 1993) ja bakterite kromosoomides (Gotfredsen & Gerdes, 1998) ning on viiteid, et nad võivad osaleda bakterite ja faagide omavahelises võidurelvastumises.

TA-süsteemide rolli faagiresistentsuses on kirjeldatud vaid üksikutes artiklites (Dy *et al.*, 2014; Fineran *et al.*, 2009; Hazan & Engelberg-Kulka, 2004; Pecota & Wood, 1996). TA-süsteemid omandatakse ja kaotatakse, nagu üldiselt omane bakterite immuunsüsteemidele,

bakterite poolt evolutsiooni käigus üsna kiiresti. Samuti on leitud, et TA-süsteemid on tihti ka profaagide koosseisus ning on seotud ka bakteri immuunsaartega (LeRoux & Laub, 2022). *Pectobacterium atrosepticum*'i III tüüpi TA-süsteem ToxIN on esimene näide faagivastasest Abi süsteemist, mis funktsioneerib toksiin-antitoksiin mehhanismina ning seda on täheldatud ka teiste Abi süsteemide puhul (Fineran *et al.*, 2009; Hampton *et al.*, 2020). Tüüp III TA-süsteemide korral on antitoksiiniks RNA. Kui T4 faag nakatab *E. coli*'t, siis inhibeerib ta peremeesraku transkriptsiooni. See viib toksiooni ToxN vabanemiseni, sest antitoksiin ToxI laguneb. ToxN lagundab faagi transkriptid ja seeläbi ei saa moodustuda uusi virione. Nakatatud bakter siiski sureb ka peale efektiivset faagide piiramist, kuna T4 faag aktiveerib peremeesraku kromosoomi lagundamise (LeRoux & Laub, 2022).

1.1.7 Profraagide kodeeritud kaitsesüsteemid superinfektsiooni vastu

Profaagid on genoomi integreerunud faagielemendid, mis suurendavad bakteri kohasust, andes neile kasulikke funktsioone (Owen *et al.*, 2020). Profraagide genoomides on leitud regioone või geene, mis võivad kodeerida peremeesrakule kaitsesüsteeme faagide vastu. Tihti asuvad need geenid profaagi geneetilistes elementides, mida nimetatakse „*moron*“iteks, mis levivad faagide genoomide vahel horisontaalse geeniülekanne kaudu (Cumby, Davidson, *et al.*, 2012), millele vihib suurem GC sisaldus võrreldes ümbritsevate geenidega (Juhala *et al.*, 2000). Samuti on täheldatud, et nende geneetilised järjestused on tugevalt konserveerunud (Cumby, Davidson, *et al.*, 2012). Suur osa profraagide genoomist kodeerib valke virionide moodustumiseks ja raku lüüsimiseks. Stabiilseks eksisteerimiseks profaagi kujul on aga enamike struktuursete geenide ekspressioon maha surutud ja ekspresseeruvad ainult need geenid, mis on vajalikud lüsogeneesiks (Owen *et al.*, 2020).

Üle kahekümne aasta tagasi leiti esimesed *moron*'id kui võrreldi *E. coli* faage HK97 ja HK022 (Juhala *et al.*, 2000). *Escherichia coli* mõõduka faagi HK97 saba morfogeneesi piirkonnas leiti *moron* element, mis kodeerib gp15 valku, mis takistab faagi DNA sisenemist tsütoplasmasse ilma, et ta blokeeriks bakteri rakupinna retseptoreid. Autorid oletasid, et gp15 seondub bakteri sisemembraanile, kus ta takistab faagi DNA sisenemiseks vajaliku kanali moodustumist. On näidatud, et gp15 tagab *E. coli*'le resistentsuse faagide HK97 ja HK75 superinfektsiooni suhtes (Cumby, Edwards, *et al.*, 2012).

E. coli faagi HK022 Cor-valgud takistavad nakatumist selliste faagidega, mis vajavad sisenemiseks välismembraani valku FhuA. Cor-valgud inhibeerivad faagi seondumist FhuA-le ning pärsivad FhuA transpordi aktiivsust (Uc-Mass *et al.*, 2004).

1.2 *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida on gramnegatiivne pulkbakter, keda leidub nii mullas kui vees. *P. putida* koloniseerib taimede risosfääri, kaitstes sellega taime patogeenide eest ning soodustades taime kasvu.

1.2.1 *Pseudomonas putida* olulisus biotehnoloogias

Biotehnoloogias kasutatakse mikroorganisme kahjulike jäätmete kõrvaldamiseks ja mitmesuguste biomolekulide tootmiseks. Üheks suure biotehnoloogilise potentsiaaliga bakteriks on *Pseudomonas putida* (Puchałka *et al.*, 2008), keda on viimaste aastakümnete jooksul palju uuritud ja hakatud kasutama laboratoorse „tööhobusena“ (Poblete-Castro *et al.*, 2012). *Pseudomonas putida* KT2440 ja temaga isogeense tüve PaW85 genoom on täielikult sekveneeritud (Puchałka *et al.*, 2008; Rosendahl *et al.*, 2020), mis annab võimaluse tema metaboolsetest võrgustikest arusaamiseks ning uute tüvede konstrueerimiseks, mida oleks võimalik kasutada praktilistel eesmärkidel (Martínez-García *et al.*, 2014; Martínez-García & de Lorenzo, 2019).

Pseudomonas putida on laboris hästi kultiveeritav ning on välja kujunenud oluliseks laboratoorseks bakteriks, kelle geneetiliseks manipuleerimiseks on aegade jooksul välja töötatud mitmesuguseid tõhusaid tehnikaid. *P. putida*’t kasutatakse looduslike produktide rekombinantses biosünteesis. Samuti on ta kasutuses kemikaalide tootmises ja toksiliste ainete lagundamises. Looduslike produktide ja kemikaalide biosünteesil ning toksiliste ühendite lagundamisel on *P. putida*’l eeliseid teiste laboris kultiveeritavate bakteritega, sest tal on mitmekülgne metabolism ja laialdased ensümaatilised võimed. Samuti talub *P. putida* edukalt erinevaid keskkonna- ja stressitingimusi, mis suurendab selle bakteri potentsiaali keskkonna- ja tööstuslikes rakendustes (Dos Santos *et al.*, 2004; Loeschcke & Thies, 2015; Puchałka *et al.*, 2008).

1.2.2 *Pseudomonas putida* genoomsed profaagid ja TA süsteemid

P. putida KT2440 (PaW85) genoomist on leitud neli profaagi, mis moodustavad 2,6% kogu genoomist. Leiti, et *P. putida* genoomsete profaagide puudumine suurendab bakteri UV-kiirguse taluvust ja ka tolerantsust DNA'd kahjustavate antibiootikumide suhtes (Martínez-García *et al.*, 2015). Seda, kas *P. putida* genoomsed profaagid võiksid osaleda bakteri faagiresistentsuses, on vähe uuritud. Enamgi veel, kuigi *P. putida* KT2440 ja PaW85 on laialdaselt kasutatavad mudelorganismid mitmesugustes uuringutes, ei ole nende bakterite faagiresistentsust uuritud ja vaid mõned esimesed neid nakatavad faagid on identifitseeritud meie laboris. Enne minu töö algust oli meie laboris isoleeritud kaks *P. putida*'t nakatavat faagi: Pp_F1 ja Pp_F2. Mõlema faagi puhul leiti, et *P. putida* profaagid kaitsevad osaliselt bakterit Pp_F1 ja Pp_F2 nakkuse eest (Kärgerberg, 2021).

P. putida genoomis on bioinformaatsiliselt ennustatud kuni 15 kromosomaalset TA operoni (Xie *et al.*, 2018). Neist on eksperimentaalselt uuritud nelja: *graTA* (Ainelo *et al.*, 2019; Tamman *et al.*, 2014), *mqsRA* (Sun *et al.*, 2017), *res-xre* (Skjærning *et al.*, 2019) ja *mazEF* (Miyamoto *et al.*, 2016). On arvatud, et kromosomaalsed TA-süsteemid osalevad bakteri stressitaluvuses, kuid meie laboris konstrueeritud *P. putida* $\Delta 13TA$ mutandiga tehtud katsed näitasid, et kolmeteistkümne TA-süsteemi operoni puudumine ei mõjuta bakteri stressitolerantsust. *P. putida* algse tüve ja $\Delta 13TA$ segakultuuriga tehtud konkurentsikatsed näitasid, et kromosomaalsed TA-süsteemid on bakterile heades kasvutingimustes hoopis kulukad, kuna $\Delta 13TA$ tüvi sai võrreldes metsiktüvega bakterite segapopulatsioonis konkurentsieelise (Rosendahl *et al.*, 2020). Seda, kas *P. putida* kromosomaalsed TA-süsteemid võiksid osaleda bakteri faagiresistentsuses Rosendahl *et al.*, (2020) artiklis ei uuritud. Objektiivseks põhjuseks oli *P. putida* 't nakatavate faagide puudumine.

2 EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva uurimistöö peamiseks eesmärgiks oli testida hüpoteesi, et *P. putida* kromosomaalsed toksiin-antitoksiin süsteemid ja profaagid osalevad bakteri faagiresistentsuses. Selleks, et seda hüpoteesi testida, olid minu eesmärkideks:

- 1) Eraldada keskkonnaproovidest *P. putida*'t nakatavaid faage;
- 2) konstrueerida *P. putida* $\Delta 4\Phi$ ja $\Delta 13TA\Delta 4\Phi$ mitmikmutandid, milledest on eemaldatud kõik 4 profaagi;
- 3) testida profaagide ja kromosomaalsete TA-süsteemide rolli *P. putida* faagiresistentsuses.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Kasutatud söötmed, faagid, bakteritüved ja plasmiidid

Töös kasutatud bakteritüved on toodud Tabelis 1. Söötmena kasutati LB (*lysogeny broth*) söödet (1% trüpton, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl). Tardsöötme saamiseks lisati söötmesse agarit 15 g/l. Baktereid kasvatati temperatuuril 30°C (tüvede konstrueerimiskatsed) või 20°C (faagiga nakatamiskatsed). Vedelsöötmes kasvatamisel aereeriti kultuure loksutil. Tüvede selektsiooniks kasutati antibiootikume kanamütsiin (50 µg/ml) ja bensüülpenitsilliin (1500 µg/ml).

Faagiga nakatamisel lisati LB agarsöötmele ja LB vedelsöötmele 0,03 µg/ml DNA metabolismi stressi põhjustavat antibiootikumi tsiprofloksatsiini.

Tabel 1. Töös kasutatud *P. putida* tüved, faagid ja plasmiidid

Bakteritüvi	Iseloomustus	Viide allikale
<i>Pseudomonas putida</i>		
PaW85	Metsiktüvi	
ΔP1	PaW85 spontaanne deletsioonimutant, millel puudub profaag P1	Sirli Rosendahl
Δ2Φ	ΔP1, millest on eemaldatud profaag P4	Käesolev töö
Δ3Φ	Δ2Φ, millest on eemaldatud profaag P3	Käesolev töö
Δ4Φ	Δ3Φ, millest on eemaldatud profaag P2	Käesolev töö
Δ13TA	PaW85 mitmikdeletsioonimutant, millest on eemaldatud 13 TA süsteemi	Rosendahl <i>et al.</i> , 2020
Δ13TAΔP1	Δ13TA spontaanne deletsioonimutant, millel puudub profaag P1	Sirli Rosendahl
Δ13TAΔ2Φ	Δ13TAΔP1, millest on eemaldatud profaag P4	Käesolev töö

$\Delta 13TA\Delta 3\Phi$	$\Delta 13TA\Delta 2\Phi$, millest on eemaldatud profaag P3	Käesolev töö
$\Delta 13TA\Delta 4\Phi$	$\Delta 13TA\Delta 3\Phi$, millest on eemaldatud profaag P2	Käesolev töö
Plasmiidid		
pEMG-P2	Plasmiid profaag P2 deleteerimiseks	Martinez-Garcia <i>et al.</i> , 2015
pEMG-P3	Plasmiid profaag P3 deleteerimiseks	Martinez-Garcia <i>et al.</i> , 2015
pEMG-P4	Plasmiid profaag P4 deleteerimiseks	Martinez-Garcia <i>et al.</i> , 2015
pSW(I-SceI)	Plasmiid SceI nukleaasi ekspresseerimiseks	Wong ja Mekalanos, 2000

2.2.2 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

PCR-i matriitsina kasutati bakterirakke. Reaktsiooni mahuks oli 20 µl. Reaktsioonisegu sisaldas lisaks matriitsile 1 x Taq puhvrit, 0,2 mM dNTP, 0,5 ühikut Taq DNA polümeraasi ja 10 pmol mõlemat praimerit. Praimeritena kasutatud oligonukleotiidid on toodud Tabelis 2.

PCR-i reaktsioon koosnes 25 tsüklist, mis sisaldas järgnevaid etappe:

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

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

Tabel 2. Töös kasutatud praimerid

Nimetus	Nukleotiidne järjestus (5'-3')	Kus kasutati
graTees	ATGTGACCGGAGCTTGCGA	PCR profaag P4 deletsiooni kontrollimiseks
1530R2	TAACCGAGAACAGGGGCTAC	PCR profaag P4 deletsiooni kontrollimiseks
TAdelBam	TCGGGATCCTTGATGATCGTTTTGCGCT	PCR profaag P4

		deletsiooni kontrollimiseks
5476lopp	ATATCCTTCCCAGGCGTTCT	PCR profaag P4 deletsiooni kontrollimiseks
pp3848	ACACCAGCCAGCACCTTTC	PCR profaag P1 deletsiooni kontrollimiseks
3922-r	ATCGTCAGTGCCCCATTCG	PCR profaag P1 deletsiooni kontrollimiseks
3901del_BamHI	AAGGATCCTTACCTGGCGTTTAACGTAG	PCR profaag P1 deletsiooni kontrollimiseks
3901del	ACGGTGGTAGCGCTCCATTT	PCR profaag P1 deletsiooni kontrollimiseks
3025lopp	CGTGTGGCGAGCAATATCG	PCR profaag P2 deletsiooni kontrollimiseks
3067sees	GCAGCTTTCGCTTGAAGTTC	PCR profaag P2 deletsiooni kontrollimiseks
P2_3062Fw	GAATCGCTCAAGTCGAATATC	PCR profaag P2 deletsiooni kontrollimiseks
P2_3062Rev	CCAATCTTCTCCATCCAGTTC	PCR profaag P2 deletsiooni kontrollimiseks
PP_t39	GGACGTGGTGAAATTGGTAG	PCR profaag P3 deletsiooni kontrollimiseks
2298alg	TGCAATCATCGTGGTGTCTT	PCR profaag P3 deletsiooni kontrollimiseks
P3_2287Fw	GGCTCATCAACAACGTAGAG	PCR profaag P3 deletsiooni kontrollimiseks
P3_2287Rev	GGTTGTATCGGTTTCATCAG	PCR profaag P3 deletsiooni kontrollimiseks

2.2.3 Geelelektroforees

PCR-i produktide analüüsimiseks geelelektroforeesil kanti proovid 1%-lisele etiidiumbromiidi (0,33 µg/ml) sisaldavale agarosgeelile 1 x TAE puhvris (50 mM Tris-atsetaat; 1mM EDTA pH 8,2). DNA fragmentide suuruse hindamiseks kasutati firma *Thermo Scientific* markerit *ZipRuler Express DNA Ladder*.

2.2.4 Bakterite elektroporeerimine

P. putida kompetentsete rakkude saamiseks kasvatati rakke ette üleöö (16-24 h) LB vedelsöötmes temperatuuril 30°C. Bakterid tsentrifuugiti kokku 0,25-st ml üleöö kultuurist (1 min, 14800 x g), rakke pesti 3 korda 300 mM sahharoosiga ning suspendeeriti ~50 µl 300 mM sahharoosis.

Rakkudele lisati 0,1-1 µg vees lahustatud plasmiidset DNA-d ning segu tõsteti elektroporatsiooni küveti. Elektroporatsioon teostati BioRad-i elektroporaatoriga pingel 2500 V. Rakud pesti küvetist välja 1 ml LB vedelsöötmega ning seejärel kasvatati rakke kuni 2,5 tundi temperatuuril 30°C. Pärast seda plaaditi rakud selektiivsöötmele.

2.2.5 Deletsioonmutantide konstrueerimine

Deletsioonmutantide konstrueerimisel kasutati mõnede erinevustega Victor de Lorenzo laboris välja töötatud metoodikat (Martínez-García & de Lorenzo, 2011). Vastavalt sellele viidi profaagi deletsioonfragmente sisaldavad suitsiidplasmiidid *P. putida* ΔP1 ja Δ13TAΔP1 tüvedesse, kus plasmiid ei replitseeru. Deletsioonmutantide konstrueerimiseks kasutatavad plasmiidid on toodud Tabelis 1. Tänu profaagi deletsioonfragmendi ja kromosoomi vahelisele homoloogilisele rekombinatsioonile siseneb plasmiid bakteri kromosoomi. Moodustuvad kanamütsiiniresistentsed kointegraadid, mis sisaldavad nii metsiktüüpi kui ka deletsiooniga lookust. Seejärel viidi kointegraatidesse elektroporatsiooni abil I-SceI nukleaasi kodeeriv plasmiid pSW(I-SceI). I-SceI endonukleas lõikab kromosoomi integreerunud plasmidi I-SceI restriksioonisaitidest kahelt poolt profaagi deletsioonfragmenti. I-SceI nukleaasi indutseerimiseks kasvatati rakke üleöö (~24 h) 3 mM meta-toluaati sisaldavas LB vedelsöötmes. LB agarsöötmele plaaditud bakteritest selekteeriti välja kanamütsiinitundlikud kolooniad. Deletsiooni olemasolu kontrolliti PCR-iga. I-SceI nukleaasi kodeerivast plasmiidist vabanemiseks kasvatati deletsioontüvesid paar päeva mitteselektiivsetes tingimustes ning valiti välja bensüülpenitsiliini suhtes tundlikud kolooniad.

2.2.6 Faagide eraldamine keskkonnaproovidest

2.2.6.1 Keskkonnaproovis leiduvate faagide rikastamine peremeesbakteri kultuuris

Peremeesbakteri kultuuri saamiseks kasvatati *P. putida* $\Delta 13TA\Delta 4\Phi$ tüve rakke ette üleöö (~24 h) LB vedelsöötmes temperatuuril 20°C. Eksponentsiaalse kasvufaasi rakkude saamiseks tehti 12,5 kordse lahjendus värskesse LB vedelsöötmesse ning rakke kasvatati 20°C ~4 tundi ($OD_{580} \sim 0,7-1$).

Vee- ja mullaproovidest faagide vette difundeerumiseks pandi need kolbidesse, kas ~50 g mullaproovi või ~100 ml veeproovi ning seejärel lisati mullaproovile kuni ~200 ml-ni vett. Mullaproovide puhul aereeriti proove enne peremeesbakteri lisamist loksutil (~70 rpm) 4 tundi 20°C juures.

Faagide rikastamiseks peremeesbakteri kultuuris lisati keskkonnaproovidele 5 ml 10 x LB vedelsöödet, 2 ml eksponentsiaalse kasvufaasi bakterirakke ($OD_{580} \sim 0,7-1$) ning 0,01 µg/ml tsiprofloksatsiini. Igast proovist tehti kaks kolbi ning tsiprofloksatsiini lisati ainult ühte. Seejärel aereeriti proove loksutil (~70 rpm) üleöö 20°C juures (~22 h).

2.2.6.2 Rikastuskultuurist faagide eraldamine

Faagifiltraadi saamiseks tsentrifuugiti vee- või/ja mullasodi ja bakterid põhja (5000 rpm, 30 min, Hettich Universal 320R tsentrifuug). 10 ml supernatanti jaotati viide 2 ml Eppendorfi tuubi ja tsentrifuugiti 5 minutit lauatsentrifuugiga täispööretel. Supernatant filtreeriti läbi 0,22 µm süstlafiltrit.

Filtraadist faagide eraldamiseks kasutati iga filtraadi jaoks nii LB agarsöötme tassi kui ka tsiprofloksatsiini (0,03 µg/ml) sisaldavat LB agarsöötme tassi. Ühe tassi kohta segati kokku 1 ml faagifiltraati 200 µl eksponentsiaalse kasvufaasi peremeeskultuuri bakterirakkudega, millele lisati ~5 ml 0,3% LB pehmet-agarit (42°C) ja valati agarsöötme tassile. Tassidel lasti ~5 minutit tahkuda ja inkubeeriti üleöö (~22 h) 20°C juures.

2.2.6.3 Tassilt leitud faagilaikude isoleerimine ja puhastamine

Pipetiotsikuga eemaldati tassilt üksikud lüüsilaigud ja suspendeeriti 100 µl SM puhvril (100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,01 % želatiin), kuhu lisati 4 µl

kloroformi. Eemaldata selgesti eristatavaid lüüsilaike. Seejärel aereeriti ~20-30 minutit toatemperatuuris ning siis tsentrifuugiti 5 minutit lauatsentrifuugiga täispööretel. Selleks, et teist korda lüüsilaiku puhastada, tehti faagifiltraatidest SM puhvrissi $10^{-1} - 10^{-7}$ lahjendused ning pipeteeriti iga lahjendust 5 µl *P. putida* Δ13TAΔ4Φ murule, mis oli valmistatud kas LB agarsöötmele või 0,03 µg/ml tsiprofloksatsiini sisaldavale LB agarsöötmele, olenevalt sellest, kas lüüsilaik oli eraldatud tsiprofloksatsiini sisaldavalt söötmelt või mitte. Bakterimuru ühe tassi kohta sisaldas 200 µl eksponentsiaalse kasvufaasi bakterirakke ($OD_{580} \sim 0,7-1$) ning ~5 ml 0,3% LB pehmet-agarit. Peale 5 min tasside tahenemist inkubeeriti neid 20°C juures üleöö (~22 h). Kogu puhastamise protsessi korrati kaks korda.

2.2.6.4 Faagide paljundamine ja tiitri määramine

Faagide paljundamiseks suuremas koguses tehti lauslüüsi tassid, milleks segati kokku kolmandast lüüsilaigu puhastamisest saadud 100 µl faagifiltraati, 200 µl eksponentsiaalses kasvufaasis peremeesbakterikultuuri ja ~5 ml 0,3% LB pehmet-agarit ning valati see kas LB agarsöötme tassile või tsiprofloksatsiini sisaldavale LB söötmele, olenevalt sellest, milliselt tassilt lüüsilaik on varem võetud. Tehti 4-5 sellist tassi, mida inkubeeriti üleöö (~22 h) 20°C juures.

Üleöö inkubeeritud tassidelt kraabiti lüüsunud bakteritega pehme-agar kokku, viidi tuubi ja lisati 2 ml SM puhvrit ning 100 µl kloroformi iga tassi kohta. Tuube väristati ~20 min IKE MS3 *basic* mikrotiiterplaadi loksutil ja tsentrifuugiti 20 minutit 5000 rpm (Hettich Universal 320R tsentrifuug) ning saadud supernatant filtreeriti läbi 0,22 µm süstlafiltrit.

Tiitri määramiseks tehti faagifiltraadist 10-kordsete lahjenduste rida. Segati kokku 200 µl eksponentsiaalses kasvufaasis peremeesbakterikultuuri, 100 µl sobivat faagifiltraadi lahjendust ja ~5 ml 0,3% LB pehmet-agarit ning see valati kas LB agarsöötme tassile või tsiprofloksatsiini (0,03 µg/ml) sisaldavale LB agarsöötmele. Järgmisel päeval loeti sobiva lahjendusega tassilt faagilaigud kokku ja arvutati faagide arvukus filtraadis (PFU/ml).

Faagifiltraati säilitati 4°C juures.

2.2.7 Faagitolerantsuse testimine agarsöötmel

Faagitolerantsuse testimiseks agarsöötmel kasutasin tüvesid *P. putida* PaW85 ning $\Delta 4\Phi$, $\Delta 13TA$ ja $\Delta 13TA\Delta 4\Phi$ mitmikmutante. Kõiki tüvesid kasvasin ette üleöö (~24 h) LB vedelsöötmes 20°C. Eksponentsiaalse kasvufaasi rakkude saamiseks tegin 12,5 kordse lahjenduse värskesse LB vedelsöötmesse ning kasvasin rakke ~4 tundi ($OD_{580} \sim 0,7-1$) 20°C.

Kõigist tüvedest tegin bakterimuruga tassid, milleks segasin kokku ~5 ml 0,3% LB pehme-agarit (42°C) ning 200 μ l eksponentsiaalse kasvufaasi rakke. Iga tüve kohta kasutasin kahte agarsöötme tassi, nii LB agarsöötmega tassi kui ka tsiprofloksatsiini (0,03 μ g/ml) sisaldavat LB agarsöötmega tassi.

Uuritavatest faagifiltraatidest tegin $10^{-1} - 10^{-6}$ lahjendusread SM puhvrissi ning pipeteerisin iga lahjendust 2 μ l bakterimurule. Tasse inkubeerisin üleöö 20°C.

2.2.8 Faagitolerantsuse testimine vedelsöötmes

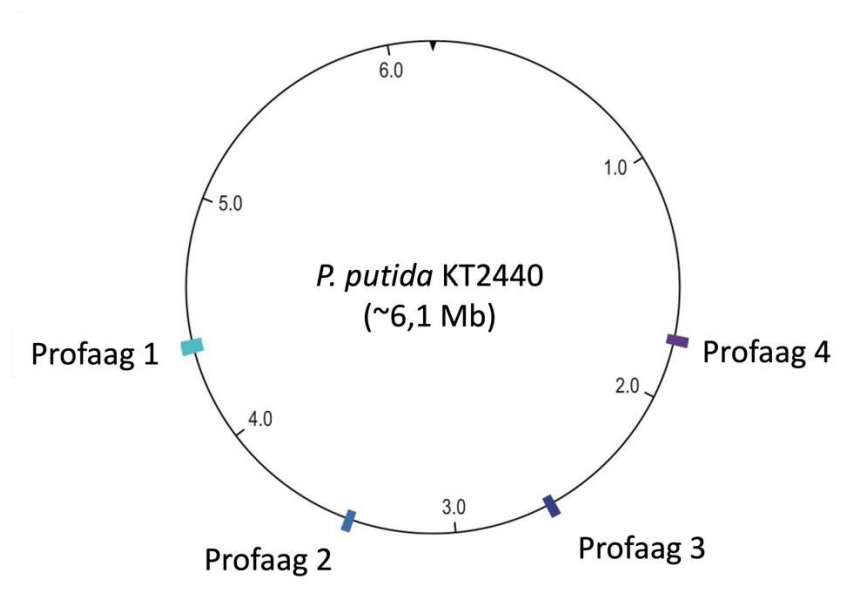
Faagitolerantsuse testimiseks vedelsöötmes kasutasin *P. putida* algset tüve PaW85 ning $\Delta 4\Phi$, $\Delta 13TA$ ja $\Delta 13TA\Delta 4\Phi$ mitmikmutante. Bakterikultuure kasvasin ette üleöö (~24 h) LB vedelsöötmes 20°C. Eksponentsiaalse kasvufaasi rakkude saamiseks tegin 12,5 kordse lahjenduse värskesse LB vedelsöötmesse ning kasvasin rakke ~4-5 tundi ($OD_{580} \sim 0,9-1,2$) 20°C.

Vedelsöötmes kasvatamiseks kasutasin mikrotiiterplaati. Söötmeks kasutasin LB vedelsöödet, kuhu oli lisatud tsiprofloksatsiini (0,03 μ g/ml). Iga kannu kohta segasin kokku 80 μ l vedelsöödet, 10 μ l eksponentsiaalse kasvufaasi rakke ning 10 μ l erineva lahjendusega faagifiltraate (nakatumiskordaja MOI oli $1 - 10^{-5}$). Kontrollsegudesse lisati faagide asemel 10 μ l SM puhvrit. Mikrotiiterplaati inkubeeriti üleöö (~14-18 h) Tecan Infinite 200 PRO masinas, kus mõõdeti proovide optiline tihedus (OD_{580}) iga 7 minuti järel.

2.3 Tulemused

2.3.1 $\Delta 4\Phi$ ja $\Delta 13TA\Delta 4\Phi$ tüvede konstrueerimine

P. putida kromosoomist on leitud 4 profaagi (Joonis 3) (Martínez-García *et al.*, 2015). Selleks, et uurida profaagide mõju *P. putida* faagiresistentsusele, konstrueerisin nelja profaagi suhtes defektse *P. putida* PaW85 tüve. Meie laboris oli *P. putida* $\Delta P1$ spontaanne deletant juba olemas (Tabel 1), millest ma eemaldasin esmalt profaag P4, järgmisena P3 ning viimasena P2. Lisaks sellele eemaldasin kolm profaagi samas järjekorras ka meie laboris juba olemas olnud *P. putida* $\Delta 13TA\Delta P1$ tüvest, mille genoomist on eemaldatud 13 toksiin-antitoksiin süsteemi lookust (Rosendahl *et al.*, 2020) ja profaag P1 on spontaanselt deleteerunud.



Joonis 3. *Pseudomonas putida* KT2440 (PaW85) profaagid ja nende asukohad genoomis. *Pseudomonas putida* KT2440, mis on isogeenne uurimuse praktilises osas kasutatud PaW85 tüvega, genoom on ~6,1 Mb ning sellest on leitud 4 profaagi (Martínez-García *et al.*, 2015, kohandatud).

2.3.2 *P. putida*'t nakatavate faagide eraldamine keskkonnaproovidest

P. putida't nakatavate faagide eraldamiseks kasutasin keskkonnaproove Erra jõest ja jõelähedasest mullast, Vända tehismärgala kraavi mullast ning Väikesest Emajõest. Neljast keskkonnaproovist sain 6 faagi: Vända F1, Vända F2, Erra M1, Erra S1, Erra jõgi ja Emajõgi. Agarsöötmel läbi viidud nakatamiskatsed näitasid, et Vända F1, Vända F2, Erra M1 ja Erra S1 faagid tekitavad peremeeskultuuri ($\Delta 13TA\Delta 4\Phi$) bakterimurul väikseid lüüsilaike (läbimõõduga ~1-1,5 mm) ning faagid Erra jõgi ja Emajõgi teevad suuremaid lüüsilaike (läbimõõduga ~5 mm) (Joonis 4).

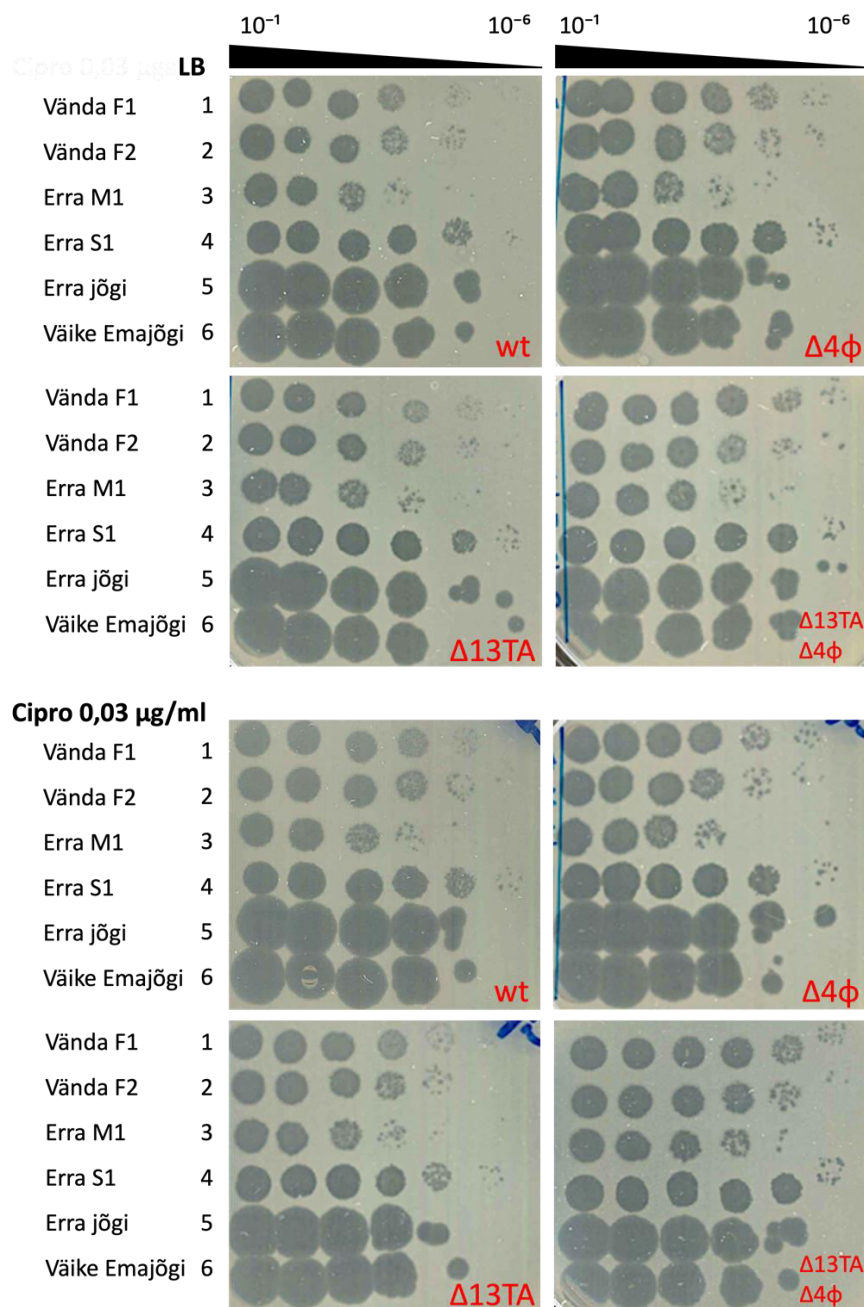
2.3.3 Profraagide ja toksiin-antitoksiin süsteemide puudumise mõju *P. putida*

faagiresistentsusele agarsöötme tassidel

Bakterite faagitolerantsuse testimiseks võrdlesin *P. putida* metsiktüve, $\Delta 4\Phi$, $\Delta 13TA$ ja $\Delta 13TA\Delta 4\Phi$ mitmikmutantide nakatumist agarsöötme tassidel. Kolm sõltumatut katset näitasid, et Vända F1, Vända F2, Erra M1 ja Erra S1 faagide lüüsilaiugud on veidi suuremad *P. putida* $\Delta 4\Phi$ tüve murul võrreldes algse tüve bakterimuruga (Joonis 4). Samuti olid nende faagide lüüsilaiugud suuremad $\Delta 13TA\Delta 4\Phi$ bakterimurul võrreldes $\Delta 13TA$ bakterimuruga (Joonis 4). Samas ei mõjutanud profraagide puudumine Erra jõe ja Emajõe faagide lüüsilaiukude suurust. Need tulemused viitavad, et *P. putida* profaagidel võib olla Vända F1, Vända F2, Erra M1 ja Erra S1 faagide vastu väike kaitsev efekt.

Selleks, et selgitada *P. putida* genoomsete TA süsteemide efekti faagiresistentsusele võrdlesin minu eraldatud faagide tekitatud lüüsilaiuke $\Delta 13TA$ ja algse tüve bakterimuruga tassidel. Kuna lüüsilaiukude hulk ega suurus ei sõltunud ühegi testitud faagi puhul toksiin-antitoksiin süsteemide puudumisest või olemasolust (Joonis 4), siis järelتان, et vähemalt minu testitud kuue faagi virulentsust *P. putida* toksiin-antitoksiin süsteemid ei mõjuta.

Kasutasin bakterite faagitolerantsuse testimiseks nii LB agarsöödet kui ka tsiprofloksatsiini sisaldavat LB agarsöödet. Tsiprofloksatsiini kasutasin, et bakterile DNA stressi tekitamisega vähendada võimalust nakatava faagi minemiseks lüsoogeensesse tsükklisse. Katsed näitasid, et kasutades tsiprofloksatsiini sisaldavat LB agarsöödet on faagide lüüsilaiugud veidi suuremad võrreldes tavalise LB agarsöötmega (Joonis 4).

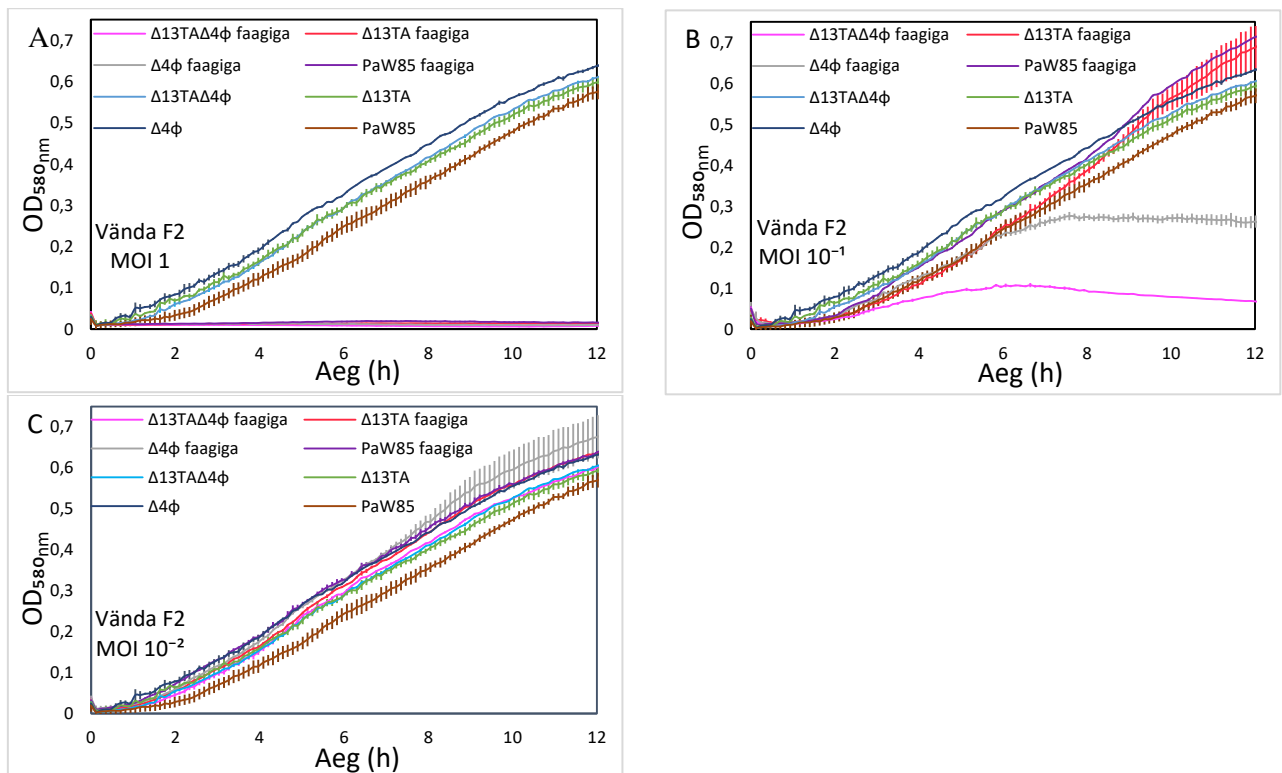


Joonis 4. Faagide lüüsilaidud erinevatel bakterimurudel. Esitatud on Vända F1, Vända F2, Erra M1, Erra S1, Erra jõgi ja Väikse Emajõe faagiproovide erinevate lahjenduste lüüsilaidud *P. putida* algse tüve (wt), Δ4Φ, Δ13TA ja Δ13TAΔ4Φ mitmikmutantide bakterimurudel. Kokku viisin läbi kolm sõltumatut katset, millest on esitatud ühe katse tulemused. Esitatud on nii LB agarsöötmel kui ka tsiprofloksatsiini (0,03 µg/ml) sisaldaval LB agarsöötmel saadud tulemused. Pilt on tehtud peale ~24 h kasvatamist temperatuuril 20°C.

2.3.4 Profraagide ja toksiin-antitoksiin süsteemide puudumise mõju *P. putida*

faagiresistentsusele vedelsöötmes kasvatamisel

Kuna agarsöötmele tehtud katsed viitasid, et *P. putida* genoomis leiduvad profaagid võivad mõjutada osade minu poolt eraldatud faagide virulentsust, siis testisin edasistes katsetes Vända F2 ja Erra M1 faagide virulentsust ka vedelsöötmes kasvavatele bakteritele. Selleks viisin läbi kasvatamiskatsed LB vedelsöötmes, mis sisaldas 0,03 µg/ml tsiprofloksatsiini. Tsiprofloksatsiini kasutasin, kuna katsed agarsöötme tassidel näitasid, et tsiprofloksatsiini juuresolek suurendas faagide tekitatud lüüsilaukude suurust. Kontrollimaks, kas profaagid ja toksiin-antitoksiin süsteemid mõjutavad *P. putida* faagitolerantsust Vända F2 faagiga nakatamisel võrdlesin *P. putida* algse tüve ja $\Delta 4\Phi$, $\Delta 13TA$ ning $\Delta 13TA\Delta 4\Phi$ mitmikmutantide kasvudünaamikat faagiga nakatamisel erinevatel MOI (ingl. k. *multiplicity of infection*) väärtustel (Joonis 5). Kõrge faagitiitriga nakatamisel (MOI 1) oli kõigi nelja bakteritüve kasv täielikult pärsitud (Joonis 5A). Kui nakatava faagi hulk oli 10 korda väiksem (MOI 10^{-1}), siis käitusid tüved erinevalt. Kolmes sõltumatus katses täheldasin profaagide deletsioontüve $\Delta 4\Phi$ kasvu langust MOI 10^{-1} juures, samas kui algse tüve kasvukõver polnud faagi juuresolekust häiritud (Joonis 5B). Sellest saan järeldada, et *P. putida* genoomsed profaagid kaitsevad bakterit Vända F2 nakkuse eest. Ühes katses oli $\Delta 13TA\Delta 4\Phi$ tüvi Vända F2 faagiga nakatamisele selgelt tundlikum kui $\Delta 4\Phi$ tüvi (Joonis 5B), mis justkui viitaks sellele, et *P. putida* kromosomaalsed toksiin-antitoksiin süsteemid kaitsevad bakterit mingil määral Vända F2 faagi eest. Kuna aga korduskatsed $\Delta 13TA\Delta 4\Phi$ tüve suuremat faagitundlikkust võrreldes $\Delta 4\Phi$ tüvega ei näidanud (andmeid pole näidatud), siis ei saa toksiin-antitoksiin süsteemidele Vända F2 faagi nakkuse korral kaitseefekti omistada. Nakatades $\Delta 13TA$ tüve Vända F2 faagiga MOI 10^{-1} juures, kasvavad bakterid sarnaselt *P. putida* algse tüvega (Joonis 5B). Sellest saan järeldada, et *P. putida* kromosomaalsed toksiin-antitoksiin süsteemid ei mõjuta Vända F2 nakkuse korral bakteri faagitolerantsust. MOI 10^{-2} juures polnud ühegi tüve kasv faagi lisamisel häiritud (Joonis 5C).

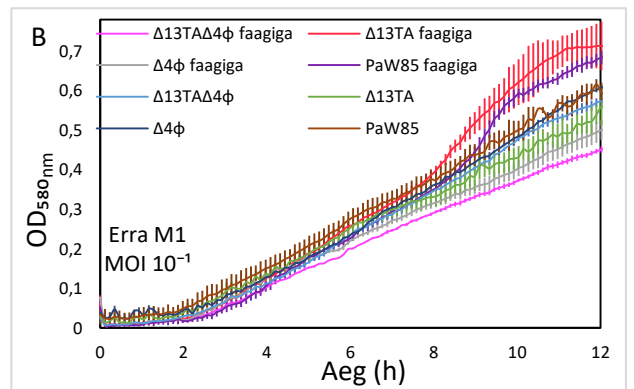
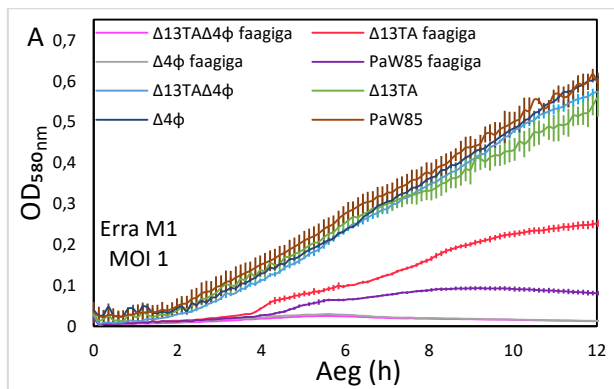


Joonis 5. Profaagid suurendavad *P. putida* faagiresistentsust Vända F2 nakkuse korral. *P. putida* algse tüve (PaW85), $\Delta 4\Phi$, $\Delta 13TA$ ja $\Delta 13TA\Delta 4\Phi$ mitmikmutantide kasvukõverad Vända F2 faagi juuresolekul ja ilma. Bakterid kasvasid LB söötmes, millesse oli lisatud tsiprofloksatsiini ($0,03 \mu\text{g/ml}$). Tehtud on kolm sõltumatut katset. Esitatud on ühes katses mõõdetud kolme tehnilise kontrolli optilistest tihedustest moodustatud kasvukõverad ja standardhälbed.

Bakterite nakatamisel Erra M1 faagiga oli kahes sõltumatus katses näha $\Delta 4\Phi$ ja $\Delta 13TA\Delta 4\Phi$ tüvede kasvu suuremat inhibeerimist MOI 1 juures võrreldes nakatamata bakteritega ja faagiga nakatatud *P. putida* algse tüvega (Joonis 6A). Need tulemused viitavad, et *P. putida* genoomsed profaagid kaitsevad bakterit ka Erra M1 faagi eest.

Võrreldes Erra M1 faagiga nakatatud *P. putida* algset tüve $\Delta 13TA$ tüvega on näha, et algne tüvi on Erra M1 faagile selgelt tundlikum kui $\Delta 13TA$ tüvi (Joonis 6A). Sama tulemus kordus ka teises sõltumatus katses. See viitab, et *P. putida* kromosomaalsed toksiin-antitoksiin süsteemid ei osale faagivastases kaitstes vaid on Erra M1 faagi nakkuse korral bakterile pigem kulukad.

Nakatades baktereid Erra M1 faagiga MOI 10^{-1} juures polnud ühegi tüve kasv faagi lisamisel häiritud (Joonis 6B).



Joonis 6. Profaagid suurendavad ja toksiin-antitoksiin süsteemid vähendavad *P. putida* faagiresistentsust Erra M1 nakkuse korral. *P. putida* algse tüve (PaW85), $\Delta 4\Phi$, $\Delta 13TA$ ja $\Delta 13TA\Delta 4\Phi$ mitmikmutantide kasvukõverad Erra M1 faagi juuresolekul ja ilma. Bakterid kasvasid LB söötmes, mis lisaldas tsiprofloksatsiini ($0,03 \mu\text{g/ml}$). Tehtud on kaks sõltumatut katset. Esitatud on ühes katses mõõdetud kahe tehnilise kontrolli optilistest tihedustest moodustatud kasvukõverad ja standardhälbed.

2.4 Arutelu

2.4.1 Kromosomaalsete profaagide mõju *P. putida* faagiresistentsusele

Profaagid on bakterigenoomides laialt levinud ja nad võivad olla bakterile mitmeti kasulikud. Näiteks võivad profaagid suurendada bakteri stressitaluvust, virulentsust või faagiresistentsust (Owen *et al.*, 2020). Profaagid sisaldavad regulaatorgeene, mis kontrollivad faagi lüütiliste geenide ekspressiooni ning samas võimaldavad profaagil kaitsta peremeesrakku teiste faagide eest (Mavrich & Hatfull, 2019; Owen *et al.*, 2021). Superinfektsioonilise immuunsuse korral tunneb profaag ära supernakatava faagi geneetilised elemendid ning nendega interakteerudes takistab ründavate faagide lüütilist kasvu (Mavrich & Hatfull, 2019). On leitud, et tavaliselt on profaagid võimelised peremeesbakterit kaitsma endasarnaste faagide eest (Canchaya *et al.*, 2003; Mavrich & Hatfull, 2019).

P. putida genoomist on leitud 4 profaagi (Martínez-García *et al.*, 2015) ja nende profaagide puudumise efekti *P. putida* faagiresistentsusele on seni uuritud vaid ühes meie grupis valminud bakalaureusetöös. Liis Kärgerbergi bakalaureusetöö raames läbi viidud katsed keskkonnaproovideist isoleeritud kahe *P. putida*'t nakatava faagiga, Pp_F1 ja Pp_F2, näitasid, et *P. putida* kromosomaalsed profaagid suurendavad bakteri resistentsust nende faagide suhtes (2021). Ka käesolevas töös saadud tulemused viitavad, et profaagidel on faaginakkuse korral kaitsev efekt. Ehkki katsetes tuli välja ka, et profaagide kaitsev efekt sõltub bakterit nakatavast faagist. Agarsöötmel tehtud katsetes oli näha väikest profaagide kaitsvat efekti Erra M1, Erra S1, Vända F1 ja Vända F2 faagide nakkuse korral. Võrreldes omavahel algse tüve ja $\Delta 4\Phi$ tüve bakterimuru lüüsilaike ning võrreldes ka $\Delta 13TA$ ja $\Delta 13TA\Delta 4\Phi$ tüvede bakterimurul olevaid lüüsilaike (Joonis 4), olid lüüsilaiad mõlemal puhul suuremad profaag-deletsioontüve bakterimurul. Erra jõe ja Emajõe faagide puhul profaagide kaitsvat efekti agarsöötmel näha ei olnud. Edasised katsed vedelsöötmes kinnitasid, et profaagid annavad *P. putida*'le osalise kaitse Erra M1 ja Vända F2 faagide vastu (Joonis 5B ja 6A). Kuna üldiselt profaagid kaitsevad peremeesbakterit endale sarnaste faagide eest (Canchaya *et al.*, 2003; Lu & Henning, 1994), siis võib oletada, et katses kasutatud faagid, mille eest profaagid bakterit kaitsesid, on *P. putida* profaagidega sarnased. Selle edaspidiseks uurimiseks oleks vajalik nende faagide genoomide sekveneerimine ja võrdlemine *P. putida*'s leiduvate profaagidega. Kuna tegin katseid ainult $\Delta 4\Phi$ mitmikdeletsioonmutandiga, siis oleks huvitav teada, missugune profaag *P. putida* neljast profaagist konkreetse faagi eest bakterit kaitseb. Selleks võiks sarnaseid katseid korrata *P. putida* profaag-üksikmutantidega.

2.4.2 Kromosomaalsete TA-süsteemide mõju *P. putida* faagiresistentsusele

Kromosomaalsetele TA-süsteemidele on välja pakutud mitmeid funktsioone, millest üheks on bakteri faagiresistentsuse suurendamine (Song & Wood, 2020). Erinevalt profaagide rollist faagiresistentsuses on TA-süsteemide osalust uuritud siiski vaid üksikutes artiklites (Dy *et al.*, 2014; Fineran *et al.*, 2009; Hazan & Engelberg-Kulka, 2004; Pecota & Wood, 1996) ning nende osalust faagivastases kaitses järeldatakse paljuski kaudsete andmete põhjal. Nimelt on TA-süsteeme sageli leitud profaagide koosseisus ning mõned TA-süsteemid on seotud bakterite genoomides leiduvate faagidevastaste kaitsesaartega (ingl. k. *phage defence islands*) ehk geenide klastritega, mis kaitsevad bakterit faagide eest. Lisaks on tähele pandud, et TA-süsteemid kaovad ja omandatakse evolutsiooni käigus kiiresti, mis on omane just bakterite immuunsüsteemidele (LeRoux & Laub, 2022; Makarova *et al.*, 2013).

TA-süsteemide puudumise mõju *P. putida* faagiresistentsusele on seni uuritud vaid ühes meie grupis valminud bakalaureusetöös. Liis Kärgerbergi bakalaureusetöö raames läbi viidud katsed keskkonnaproovidest isoleeritud kahe *P. putida*'t nakatava faagiga, Pp_F1 ja Pp_F2, näitasid, et *P. putida* kromosomaalsed TA-süsteemid ei suurenda bakteri faagiresistentsust, vaid hoopis veidi vähendavad olles seega bakterile selles olukorras kulukad (2021). Meie grupp on varem uurinud TA-süsteemide mõju *P. putida* kohasusele, milleks võrreldi algse ja $\Delta 13TA$ tüve konkurentsivõimekust segakultuurides. Selgus, et heades kasvutingimustes sai konkurentsikatses kasvueelise *P. putida* $\Delta 13TA$ tüvi, seega tuli välja TA-süsteemide kulukus mitte kasu (Rosendahl *et al.*, 2020). Käesolevas töös saadud tulemused viitavad, et TA-süsteemid ei avalda positiivset mõju *P. putida* faagiresistentsusele vaid on bakterile selles olukorras hoopis kulukad ja pigem vähendavad bakteri faagiresistentsust (Joonis 6A). Kui agarsöötmele tehtud katsetes ei olnud minu testitud 6 faagi puhul TA-süsteemide puudumisel faagiresistentsusele mingit mõju (Joonis 4), siis katsed vedelsöötmes näitasid, et TA-süsteemid võivad siiski *P. putida* faagiresistentsusele mõju avaldada ja see oleneb bakterit nakatavast faagist. *P. putida* kromosomaalsed toksiin-antitoksiin süsteemid ei mõjutanud Vända F2 nakkuse korral bakteri faagitolerantsust (Joonis 5). Katsetes Erra M1 faagiga tuli aga välja TA-süsteemide negatiivne mõju, sest võrreldes Erra M1 faagiga nakatatud *P. putida* algset tüve $\Delta 13TA$ tüvega on näha, et algne tüvi on Erra M1 faagile selgelt tundlikum kui $\Delta 13TA$ tüvi (Joonis 6A). Kuigi kirjandusest võib leida hüpoteese selle kohta, et kromosomaalsed TA-süsteemid võiksid bakteri faagiresistentsust suurendada, siis minu tehtud katsed *P. putida*'ga seda ei kinnita. Samamoodi ei tulnud TA-süsteemide kaitsvat efekti välja ka Liis Kärgerbergi uurimistöö praktilisest osast (2021). *P. putida*'l on eeldatavasti kuni 15

kromosomaalset TA-süsteemi ja faage on maailmas see-eest väga palju. Kuna minu saadud tulemused näitavad, et TA-süsteemide mõju (antud juhul siis pigem negatiivne mõju) bakterile oleneb bakterit nakatavast faagist, siis võiks arvata, et me oleme veel liiga vähe *P. putida*'t nakatavaid faage isoleerinud ja testinud, et teha lõplikke järeldusi kromosomaalsete TA-süsteemide võimalikust osalusest *P. putida* faagiresistentsuses. Kui TA-süsteemi oletatav kaitseefekt on faagispetsiifiline siis võiks tulevikus eraldada veel faage ja nendega sarnaseid katseid teha nagu käesolevas töös.

KOKKUVÕTE

Profaagid on bakteri genoomi integreerunud faagid, mis võivad kaitsta bakterit nakatumast endasarnaste faagidega. See saavutatakse näiteks superinfektsioonilise faagi lüütiliste geenide ekspressiooni maha surumisega või kodeerides bakteritele kaitsesüsteeme ründavate faagide vastu. Profaagide rolli bakterite faagiresistentsuses on omajagu uuritud, kuid profaagide rolli *Pseudomonas putida* faagiresistentsuses on uuritud siiani vaid ühes töös (Kärgerberg, 2021). Liis Kärgerbergi bakalaureuse töö praktilises osas leiti kaks *P. putida*'t nakatavat faagi, Pp_F1 ja Pp_F2, ning samuti ka profaagide osaline kaitsev efekt nende suhtes (2021). Plasmiidides leiduvate toksiin-antitoksiin süsteemide funktsiooni teatakse juba üle 40 aasta – plasmidi säilitamine rakus, kuna toksiin inhibeerib plasmidi mittesisaldavate bakterite kasvu ja nad konkureeritakse populatsioonist välja. Kromosomaalsete TA-süsteemide funktsioon bakterites on aga siiani ebaselge. Ühelt poolt on pakutud nende funktsiooniks bakteri stressitaluvuse suurendamist, teiselt poolt on tõendeid sellest, et neil pole bakterile mingit mõju või on nad teatud tingimustes hoopis bakteri kohasust vähendavad (Rosendahl *et al.*, 2020).

Käesoleva töö praktilise osa eesmärgiks oli välja selgitada, kas kromosomaalsetel TA-süsteemidel ja profaagidel on mõju *Pseudomonas putida* faagiresistentsusele. Tehtud katsete tulemusena saab järeldada:

- 1) *P. putida* kromosomaalsete TA-süsteemide ja profaagide puudumise mõju bakterile oleneb nakatavast faagist;
- 2) profaagid suurendavad *P. putida* faagiresistentsust Vända F1, Vända F2, Erra S1 ja Erra M1 faagidega nakatamisel;
- 3) *P. putida* kromosomaalsed TA-süsteemid pole faaginakkuse korral kasulikud, vaid pigem kulukad (Erra M1) või ei avalda faaginakkuse korral mingit mõju (Vända F1, Vända F2, Erra S1, Erra jõgi, Emajõgi).

Seega, antud uuringu tulemused annavad profaagide kohta üheseid tulemusi – need suurendavad *P. putida* faagiresistentsust teatud faagide suhtes. Kromosomaalsete TA-süsteemide kasulikkust *P. putida* faagiresistentsuses töös kasutatud faagide puhul välja ei tulnud. Näha on TA-süsteemide puudumise erinev mõju bakterile erinevate faagide nakkuse korral. Olenevalt faagist oli näha, kas TA-süsteemide kulukust või neutraalset mõju nakatavate faagide suhtes.

The role of chromosomal toxin-antitoxin systems and prophages in phage resistance of *Pseudomonas putida*

Kendra Piirmets

SUMMARY

Prophages are phages that are integrated into genome of bacteria, which protect bacteria from getting infected by similar phages. It is achieved, for example, by suppressing lytic gene expression of superinfecting phages or by encoding various immune systems against phage attack. The role of prophages in phage resistance is well studied, however the role of prophages in phage resistance of *Pseudomonas putida* is investigated only in one study so far (Kärgerberg, 2021). In her bachelor thesis Liis Kärgerberg isolated two *P. putida* phages, Pp_F1 and Pp_F2, and showed that chromosomal prophages have a protective effect against these phages (2021). The function of toxin-antitoxin systems found in plasmids is known for over 40 years – they help to maintain the plasmid by toxin-mediated cell growth suppression which results in death or outcompetition of cells not containing the plasmid. The function of chromosomal toxin-antitoxin systems in bacteria is still unclear. On one side, it has been supposed that their function is to help their host under different stress conditions, on the other hand there is evidence that they do not have any positive impact at all on bacterial fitness or are even costly instead (Rosendahl *et al.*, 2020).

The aim of the experimental part of this thesis was to determine, if chromosomal toxin-antitoxin systems and prophages have an impact on phage resistance of *Pseudomonas putida*. The results obtained indicate:

- 1) the impact of chromosomal prophages and toxin-antitoxin systems on *P. putida* phage resistance is dependent on the specific phage that infects the bacterium;
- 2) prophages increase phage resistance of *P. putida* against phages Erra M1, Erra S1, Vända F1 and Vända F2;
- 3) chromosomal toxin-antitoxin systems are not beneficial for *P. putida* under condition of phage infection, rather they are costly (Erra M1) or do not have any impact on phage resistance (Vända F1, Vända F2, Erra S1, Erra jõgi, Emajõgi).

Therefore, when it comes to prophages the results of this research are in accordance with literature data about prophages – they increase phage resistance of *P. putida*. The benefit of chromosomal toxin-antitoxin systems was not detected in this study. Rather, the impact of

toxin-antitoxin systems on phage resistance of *P. putida* is neutral or negative. The cost of chromosomal toxin-antitoxin systems or neutral impact towards phage infection was depending on the phage.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma juhendajaid Sirlit ja Ritat suurepärase juhendamise eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Ainelo, A., Porosk, R., Kilk, K., Rosendahl, S., Remme, J., & Hõrak, R. (2019). *Pseudomonas putida* Responds to the Toxin GraT by Inducing Ribosome Biogenesis Factors and Repressing TCA Cycle Enzymes. *Toxins*, 11(2), 103.
<https://doi.org/10.3390/toxins11020103>
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., & Horvath, P. (2007). CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- Bertani, G., & Weigle, J. J. (1953). Host controlled variation in bacterial viruses. *Journal of Bacteriology*, 65(2), 113–121.
- Canchaya, C., Proux, C., Fournous, G., Bruttin, A., & Brüssow, H. (2003). Prophage Genomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(2), 238–276.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.67.2.238-276.2003>
- Chinenova, T. A., Mkrtumian, N. M., & Lomovskaia, N. D. (1982). Genetic characteristics of a new phage resistance trait in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Genetika*, 18(12), 1945–1952.
- Cumby, N., Davidson, A. R., & Maxwell, K. L. (2012). The moron comes of age. *Bacteriophage*, 2(4), e23146. <https://doi.org/10.4161/bact.23146>
- Cumby, N., Edwards, A. M., Davidson, A. R., & Maxwell, K. L. (2012). The Bacteriophage HK97 gp15 Moron Element Encodes a Novel Superinfection Exclusion Protein. *Journal of Bacteriology*. <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/JB.00843-12>
- Depardieu, F., Didier, J.-P., Bernheim, A., Sherlock, A., Molina, H., Duclos, B., & Bikard, D. (2016). A Eukaryotic-like Serine/Threonine Kinase Protects *Staphylococci* against Phages. *Cell Host & Microbe*, 20(4), 471–481.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.08.010>

- Dos Santos, V. A. P. M., Heim, S., Moore, E. R. B., Strätz, M., & Timmis, K. N. (2004). Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, 6(12), 1264–1286. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00734.x>
- Dy, R. L., Przybilski, R., Semeijn, K., Salmond, G. P. C., & Fineran, P. C. (2014). A widespread bacteriophage abortive infection system functions through a Type IV toxin-antitoxin mechanism. *Nucleic Acids Research*, 42(7), 4590–4605. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1419>
- Dy, R., Richter, C., Salmond, G., & Fineran, P. (2014). Remarkable Mechanisms in Microbes to Resist Phage Infections. *Annual Review of Virology*, 1, 307–331. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085500>
- Fineran, P. C., Blower, T. R., Foulds, I. J., Humphreys, D. P., Lilley, K. S., & Salmond, G. P. C. (2009). The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein–RNA toxin–antitoxin pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(3), 894–899. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808832106>
- Fortier, L.-C., & Sekulovic, O. (2013). Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence*, 4(5), 354–365. <https://doi.org/10.4161/viru.24498>
- Gerdes, K., Rasmussen, P. B., & Molin, S. (1986). Unique type of plasmid maintenance function: Postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(10), 3116–3120. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.10.3116>
- Goormaghtigh, F., Fraikin, N., Putrinš, M., Hallaert, T., Hauryliuk, V., Garcia-Pino, A., Sjödin, A., Kasvandik, S., Udekwu, K., Tenson, T., Kaldalu, N., & Van Melderen, L. (2018). Reassessing the Role of Type II Toxin-Antitoxin Systems in Formation of *Escherichia coli* Type II Persister Cells. *mBio*, 9(3), e00640-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00640-18>

- Gotfredsen, M., & Gerdes, K. (1998). The *Escherichia coli* relBE genes belong to a new toxin–antitoxin gene family. *Molecular Microbiology*, 29(4), 1065–1076.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00993.x>
- Hallet, B. (2001). Playing Dr Jekyll and Mr Hyde: Combined mechanisms of phase variation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 4(5), 570–581.
[https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00253-8](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00253-8)
- 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. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1894-8>
- Harms, A., Brodersen, D. E., Mitarai, N., & Gerdes, K. (2018). Toxins, Targets, and Triggers: An Overview of Toxin-Antitoxin Biology. *Molecular Cell*, 70(5), 768–784.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.003>
- Hazan, R., & Engelberg-Kulka, H. (2004). *Escherichia coli* mazEF-mediated cell death as a defense mechanism that inhibits the spread of phage P1. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, 272(2), 227–234. <https://doi.org/10.1007/s00438-004-1048-y>
- Hille, F., Richter, H., Wong, S. P., Bratovič, M., Ressel, S., & Charpentier, E. (2018). The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell*, 172(6), 1239–1259.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.032>
- Hoskisson, P. A., Sumby, P., & Smith, M. C. M. (2015). The phage growth limitation system in *Streptomyces coelicolor* A(3)2 is a toxin/antitoxin system, comprising enzymes with DNA methyltransferase, protein kinase and ATPase activity. *Virology*, 477, 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.12.036>
- Hynes, A. P., Villion, M., & Moineau, S. (2014). Adaptation in bacterial CRISPR-Cas immunity can be driven by defective phages. *Nature Communications*, 5(1), 4399.
<https://doi.org/10.1038/ncomms5399>

- Juhala, R. J., Ford, M. E., Duda, R. L., Youlton, A., Hatfull, G. F., & Hendrix, R. W. (2000). Genomic sequences of bacteriophages HK97 and HK022: Pervasive genetic mosaicism in the lambdoid bacteriophages. Edited by M. Gottesman. *Journal of Molecular Biology*, 299(1), 27–51. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3729>
- Jurénas, D., Fraikin, N., Goormaghtigh, F., & Van Melderen, L. (2022). Biology and evolution of bacterial toxin–antitoxin systems. *Nature Reviews Microbiology*, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00661-1>
- Kärgerberg, L. (2021). Kromosomaalsete profaagide ja toksiin-antitoksiin süsteemide roll *Pseudomonas putida* faagiresistentsuses. *Bakalaureusetöö*.
- Labrie, S. J., Samson, J. E., & Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), 317–327. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2315>
- Lehnherr, H., Maguin, E., Jafri, S., & Yarmolinsky, M. B. (1993). Plasmid Addiction Genes of Bacteriophage P1: Doc, which Causes Cell Death on Curing of Prophage, and phd, which Prevents Host Death when Prophage is Retained. *Journal of Molecular Biology*, 233(3), 414–428. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1521>
- LeRoux, M., & Laub, M. T. (2022). Toxin-Antitoxin Systems as Phage Defense Elements. *Annual Review of Microbiology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020722-013730>
- Loenen, W. A. M., Dryden, D. T. F., 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt990>
- Loeschcke, A., & 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>

- Lopatina, A., Tal, N., & Sorek, R. (2020). Abortive Infection: Bacterial Suicide as an Antiviral Immune Strategy. *Annual Review of Virology*, 7(1), 371–384.
<https://doi.org/10.1146/annurev-virology-011620-040628>
- Lu, M.-J., & Henning, U. (1994). Superinfection exclusion by T-even-type coliphages. *Trends in Microbiology*, 2(4), 137–139. [https://doi.org/10.1016/0966-842X\(94\)90601-7](https://doi.org/10.1016/0966-842X(94)90601-7)
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2013). Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. *Nucleic Acids Research*, 41(8), 4360–4377.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt157>
- Manning, A. J., & Kuehn, M. J. (2011). Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiology*, 11(1), 258. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-258>
- Martínez-García, E., & de Lorenzo, V. (2011). Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: Analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, 13(10), 2702–2716.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02538.x>
- Martínez-García, E., & de Lorenzo, V. (2019). *Pseudomonas putida* in the quest of programmable chemistry. *Current Opinion in Biotechnology*, 59, 111–121.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.03.012>
- Martínez-García, E., Jatsenko, T., Kivisaar, M., & de Lorenzo, V. (2015). Freeing *Pseudomonas putida* KT2440 of its proviral load strengthens endurance to environmental stresses. *Environmental Microbiology*, 17(1), 76–90.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.12492>
- Martínez-García, E., Nikel, P. I., Aparicio, T., & de Lorenzo, V. (2014). *Pseudomonas* 2.0: Genetic upgrading of *P. putida* KT2440 as an enhanced host for heterologous gene expression. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 159. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0159-3>

- Mavrich, T. N., & Hatfull, G. F. (2019). Evolution of Superinfection Immunity in Cluster A Mycobacteriophages. *mBio*, *10*(3), e00971-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.00971-19>
- Miyamoto, T., Kato, Y., Sekiguchi, Y., Tsuneda, S., & Noda, N. (2016). Characterization of MazF-Mediated Sequence-Specific RNA Cleavage in *Pseudomonas putida* Using Massive Parallel Sequencing. *PLOS ONE*, *11*(2), e0149494. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149494>
- Nordström, K., & Forsgren, A. (1974). Effect of Protein A on Adsorption of Bacteriophages to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/jvi.14.2.198-202.1974>
- Ogura, T., & Hiraga, S. (1983). Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *80*(15), 4784–4788. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.15.4784>
- Owen, S. V., Canals, R., Wenner, N., Hammarlöf, D. L., Kröger, C., & Hinton, J. C. D. (2020). A window into lysogeny: Revealing temperate phage biology with transcriptomics. *Microbial Genomics*, *6*(2), e000330. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000330>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.09.002>
- Page, R., & Peti, W. (2016). Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nature Chemical Biology*, *12*(4), 208–214. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2044>
- Parma, D. H., Snyder, M., Sobolevski, S., Nawroz, M., Brody, E., & Gold, L. (1992). The Rex system of bacteriophage lambda: Tolerance and altruistic cell death. *Genes & Development*, *6*(3), 497–510. <https://doi.org/10.1101/gad.6.3.497>

- Pecota, D. C., & Wood, T. K. (1996). Exclusion of T4 phage by the *hok/sok* killer locus from plasmid R1. *Journal of Bacteriology*, 178(7), 2044–2050.
- Perry, L. L., SanMiguel, P., Minocha, U., Terekhov, A. I., Shroyer, M. L., Farris, L. A., Bright, N., Reuhs, B. L., & Applegate, B. M. (2009). Sequence analysis of *Escherichia coli* O157:H7 bacteriophage Φ V10 and identification of a phage-encoded immunity protein that modifies the O157 antigen. *FEMS Microbiology Letters*, 292(2), 182–186. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01511.x>
- Pingoud, A., & Jeltsch, A. (2001). Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Research*, 29(18), 3705–3727. <https://doi.org/10.1093/nar/29.18.3705>
- Pingoud, A., Wilson, G. G., & Wende, W. (2014). Type II restriction endonucleases—A historical perspective and more. *Nucleic Acids Research*, 42(12), 7489–7527. <https://doi.org/10.1093/nar/gku447>
- Poblete-Castro, I., Becker, J., Dohnt, K., dos Santos, V. M., & Wittmann, C. (2012). Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* and related species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(6), 2279–2290. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3928-0>
- Puchałka, J., Oberhardt, M. A., Godinho, M., Bielecka, A., Regenhardt, D., Timmis, K. N., Papin, J. A., & Martins dos Santos, V. A. P. (2008). Genome-scale reconstruction and analysis of the *Pseudomonas putida* KT2440 metabolic network facilitates applications in biotechnology. *PLoS Computational Biology*, 4(10), e1000210. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000210>
- 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.

- Rosendahl, S., Tamman, H., Brauer, A., Remm, M., & Hōrak, R. (2020). Chromosomal toxin-antitoxin systems in *Pseudomonas putida* are rather selfish than beneficial. *Scientific Reports*, *10*(1), 9230. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65504-0>
- Seed, K. D., Yen, M., Shapiro, B. J., Hilaire, I. J., Charles, R. C., Teng, J. E., Ivers, L. C., Boncy, J., Harris, J. B., & Camilli, A. (2014). Evolutionary consequences of intra-patient phage predation on microbial populations. *eLife*, *3*, e03497. <https://doi.org/10.7554/eLife.03497>
- Skjerning, R. B., Senissar, M., Winther, K. S., Gerdes, K., & Brodersen, D. E. (2019). The RES domain toxins of RES-Xre toxin-antitoxin modules induce cell stasis by degrading NAD⁺. *Molecular Microbiology*, *111*(1), 221–236. <https://doi.org/10.1111/mmi.14150>
- Song, S., & Wood, T. K. (2020). A Primary Physiological Role of Toxin/Antitoxin Systems Is Phage Inhibition. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.01895>
- Strotskaya, A., Savitskaya, E., Metlitskaya, A., Morozova, N., Datsenko, K. A., Semenova, E., & Severinov, K. (2017). The action of *Escherichia coli* CRISPR–Cas system on lytic bacteriophages with different lifestyles and development strategies. *Nucleic Acids Research*, *45*(4), 1946–1957. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx042>
- Sumby, P., & Smith, M. C. M. (2002). Genetics of the phage growth limitation (Pgl) system of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology*, *44*(2), 489–500. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02896.x>
- Sumby, P., & Smith, M. C. M. (2003). Phase Variation in the Phage Growth Limitation System of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, *185*(15), 4558–4563. <https://doi.org/10.1128/JB.185.15.4558-4563.2003>
- Sun, C., Guo, Y., Tang, K., Wen, Z., Li, B., Zeng, Z., & Wang, X. (2017). MqsR/MqsA Toxin/Antitoxin System Regulates Persistence and Biofilm Formation in

- Pseudomonas putida* KT2440. *Frontiers in Microbiology*, 8.
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00840>
- Tamman, H., Ainelo, A., Ainsaar, K., & Hõrak, R. (2014). A moderate toxin, GraT, modulates growth rate and stress tolerance of *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, 196(1), 157–169. <https://doi.org/10.1128/JB.00851-13>
- Uc-Mass, A., Loeza, E. J., de la Garza, M., Guarneros, G., Hernández-Sánchez, J., & Kameyama, L. (2004). An orthologue of the cor gene is involved in the exclusion of temperate lambdoid phages. Evidence that Cor inactivates FhuA receptor functions. *Virology*, 329(2), 425–433. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.09.005>
- Woude, M. W. van der, & Bäumlér, A. J. (2004). Phase and Antigenic Variation in Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.3.581-611.2004>
- Xie, Y., Wei, Y., Shen, Y., Li, X., Zhou, H., Tai, C., Deng, Z., & Ou, H.-Y. (2018). TADB 2.0: An updated database of bacterial type II toxin-antitoxin loci. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D749–D753. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1033>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kendra Piirmets

(sünnikuupäev: 14.05.2000)

1. Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Kromosomaalsete toksiin-antitoksiin süsteemide ja profaagide roll *Pseudomonas putida* faagiresistentsusele

mille juhendajad on Rita Hõrak ja Sirli Rosendahl,

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

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, 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.

Kendra Piirmets

26.05.2022