

Pro gradu -tutkielma

*Klebsiella pneumoniae* -bakteerilajia infektoivien  
faagien eristys ja faagiresistenssimekanismien  
kartoittaminen

Navjot Thind



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solu- ja molekyylibiologia

04.08.2021

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta  
Bio- ja ympäristötieteiden laitos  
Solu- ja molekyylibiologia

Navjot Thind: *Klebsiella pneumoniae* -bakteerilajia infektoivien faagien  
eristys ja faagiresistenssimekanismien kartoittaminen  
Pro gradu -tutkielma: 71 s., 4 liitettä (6 s.)  
Työn ohjaajat: FT, Dos. Matti Jalasvuori ja FM Katariina Koskinen  
Tarkastajat: FT, Apulaisprofessori Lotta-Riina Sundberg ja Professori  
Jari Ylänne

Elokuu 2021

---

Hakusanat: bakteriofagi, CRISPR, faagiterapia, geenimutaatio, infektiokoe

Antibioottivastustuskykyisten *Klebsiella pneumoniae* -bakteerikantojen aiheuttamat infektiot ovat globaalisti kasvava ongelma, sillä ne saattavat olla resistenttejä kaikille kliinisessä käytössä oleville antibiooteille. Infektioiden hoitoon voidaan vaihtoehtoisesti hyödyntää bakteereja tappavia viruksia, bakteriofageja, joita käytetään infektioiden hoidoissa sellaisenaan tai niiden tuottamien lyyttisten entsyymien kautta. Tämän tutkimuksen tavoitteena on ymmärtää kahden *K. pneumoniae* -kannan (EKP3 ja EKP8) ja Nenäinniemen jätevedenpuhdistamosta eristettyjen faagien välistä vuorovaikutusta, sekä löytää uusia näkökulmia faagiterapian kehittämiseksi. EKP3 ja EKP8 villityyppikantojen lisäksi molemmista kannoista tutkittavana oli kaksi mutanttia isolaattia, jotka olivat kehittyneet resistenteiksi kahdeksalle ennestään eristetyille faageille. Kannat erosivat toisistaan geneettisesti siten, että ainoastaan toisella kannoista (EKP3:lla) on CRISPR-lokuksia. Tutkimuksen aikana suoritettut faagialtistukset paljastivat EKP3-kannan reagoivan faageihin geneettisellä tasolla, toisin kuin EKP8, joka reagoi voimakkaasti muokkaamalla geenisäätelyä. Uusien, faagiterapian kannalta, potentiaalisten faagien eristäminen jätevedestä onnistui hyvin. Erityisen kiinnostavaa on EKP8P6-faagin kyky infektoida EKP3-kantaa vain silloin, kun se ensin oli kehittänyt resistenssin EKP8P3-faagia vastaan. Vastaavia resistenttejä muotoja infektoivia faageja altistukseen lisäämällä voidaan mahdollisesti parantaa faagiterapian onnistumistodennäköisyyttä ja hoidon tehokkuutta tulevaisuudessa. Faagialtistuskokeet eivät laboratorio-oloissa aktivoineet isännän CRISPR-järjestelmää, mitä voidaan pitää myös lupaavana faagiterapian kannalta.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science

Department of Biological and Environmental Science  
Cell and molecular biology

Navjot Thind: Isolation of phages infecting *Klebsiella pneumoniae* and mapping the host phage resistance mechanisms  
MSc thesis: 71 p., 4 appendices (6 p.)  
Supervisors: PhD, Doc. Matti Jalasvuori and MSc Katariina Koskinen  
Inspectors: PhD, Associate professor Lotta-Riina Sundberg and Professor Jari Ylänne

August 2021

Antibiotics have been used for decades to treat bacterial infections, such as ones caused by *Klebsiella pneumoniae*, a well-known multi-drug resistant pathogen. The efficacy of antibiotics in the treatment of bacterial infections has, however, been weakened by the growing prevalence of antibiotic resistance genes in the bacterial population. Bacteriophages, or phages for short, are viruses which specifically infect bacteria and therefore could act as an alternative for antibiotic treatments in the form of phage therapy. The purpose of this study was to examine the responses of two *K. pneumoniae* strains (EKP3 and EKP8) to isolated phages to further improve our knowledge on phage therapy. Both strains had two mutant isolates that were previously treated with eight phages and had developed resistances against them. These strains differed from each other genetically by CRISPR-loci that only EKP3 possessed, though it wasn't activated during any of the experiments. Results showed how EKP3 altered its genome to adapt to environmental changes and phage pressure, unlike EKP8, which altered its gene expression instead. We were able to isolate promising novel phages from sewage water, especially EKP8P6, which was able to infect EKP3 only when the bacterium had developed resistance against another phage isolated from sewage previously. This study shows new insights into how we could insert phages like EKP8P6 that cannot infect wild-type bacteria but rather mutated ones, into phage cocktails to improve phage therapy treatments against pathogenic bacteria like *K. pneumoniae*.

# SISÄLLYSLUETTELO

<b>1</b>	<b>JOHDANTO</b> .....	<b>1</b>
1.1	Antibioottien käyttö ja antibioottiresistenssin yleistyminen .....	1
1.2	<i>K. pneumoniae</i> taudinaiheuttajana .....	3
1.3	Bakteriofagit multiresistenttien bakteerien vastarintana .....	7
1.3.1	Bakteriofagien luokittelu .....	8
1.3.2	Bakteriofagien elinkierto.....	10
1.3.3	Bakteriofagien eristäminen.....	12
1.4	Bakteerien faagiresistenssimekanismit .....	13
1.5	Tutkielman tavoitteet.....	17
<b>2</b>	<b>AINEISTO JA MENETELMÄT</b> .....	<b>18</b>
2.1	Faagiliuosten tuoreistaminen.....	18
2.2	Uusien faagien eristys ja isäntäspesifisyys .....	19
2.2.1	Uusien faagien TEM-kuvantaminen .....	20
2.2.2	EKP8P6-faagin genomien eristys ja sekvensointi .....	20
2.2.3	EKP8P6-faagi faagikoktailissa ja eri olosuhteissa .....	22
2.3	Ravinnepitoisuuden vaikutus resistenssiin, kasvuun ja genomiin .....	22
2.4	EKP3-kannan mutaatioiden tarkastelu faagialistusten seurauksena .....	25
<b>3</b>	<b>TULOKSET</b> .....	<b>25</b>
3.1	Faagilysaattien tiitterit.....	27
3.2	Uusien faagien karakterisointi .....	28
3.2.1	EKP8P6:n genomiset ominaisuudet .....	31
3.3	EKP8P6-faagin infektiokyky faagikoktailissa .....	32
3.4	Faagiresistentin fenotyypin muutokset alhaisessa ravinnepitoisuudessa.	34
3.4.1	Faagiresistenssimuutokset alhaisessa ravinnepitoisuudessa .....	35

3.4.2	Kasvukäyräanalyysit eri ravinnepitoisuuksissa.....	36
3.4.3	Genotyypimuutokset alhaisessa ravinnepitoisuudessa.....	37
3.5	EKP3-kannan faagiresistenssin kartoitus .....	39
<b>4</b>	<b>TULOSTEN TARKASTELU .....</b>	<b>41</b>
4.1	Bakteerikantojen ja isolaattien erot.....	41
4.2	Faagilysaattien infektiokyky.....	43
4.3	EKP8P6-faagin vaikutus faagikoktailissa .....	47
4.4	Bakteerien faagiresistenssin heikentyminen 10 % ravinnepitoisuudessa..	51
4.4.1	Geneettinen sopeutuminen alhaiseen ravinnepitoisuuteen .....	55
4.5	EKP3-kannan faagiresistenssin kehittymisen seuranta.....	57
4.6	Johtopäätökset .....	61
	<b>KIITOKSET.....</b>	<b>63</b>
	<b>KIRJALLISUUS.....</b>	<b>64</b>
	<b>LIITE 1. Alkuperäisten bakteerikantojen ja -isolaattien genomidata.....</b>	<b>72</b>
	<b>LIITE 2. Ravinnepitoisuuden vaikutus koodaavien geenien mutaatioihin.....</b>	<b>74</b>
	<b>LIITE 3. Faagien infektiokyvyn muutokset EKP3-kannassa eri olosuhteissa .....</b>	<b>75</b>
	<b>LIITE 4. EKP3-kannan faagiresistenssin kartoitus geenimutaatioilla .....</b>	<b>77</b>

## SANASTO JA LYHENTEET

### SANASTO

**Faagi** Bakteriofagi, bakteerivirus

*K. pneumoniae* *Klebsiella pneumoniae*

### LYHENTEET

**ABI** Aborttiivinen infektio (*engl.* abortive infection)

**AR** antibioottiresistenssi

**CRISPR-Cas-systeemi** Geneettiseen adaptaatioon perustuva faagiresistenssi (*engl.* Clustered Regularly Interspaces Short Palidromic Repeat, CRISPR; CRISPR-associated, Cas)

**EKP** epideeminen *Klebsiella pneumoniae* (*engl.* Epidemic *Klebsiella pneumoniae*); tutkimuksessa käytettyjen *Klebsiella pneumoniae* -bakteerikantojen lyhenteet

**LB** Luria-Bertani kasvatusliuos

**MNV** useamman nukleotidin muutos (*engl.* Multiple nucleotide variantion)

**MOI** infection moninkerta (*engl.* multiplicity of infectin)

**MR** multiresistentti

**o/n** yön yli (*engl.* overnight)

**p.c** yhdistelmäaltistettu (*engl.* phage cocktail)

**PFU** plakkia muodostava yksikkö (*engl.* plaque froming unit)

**PTA** fosfovolframihappo (*engl.* phosphotungstic acid)

<b>RBP</b>	reseptoriin kiinnittyvä proteiini ( <i>engl.</i> receptor-binding protein)
<b>rpm</b>	kierrosta minuutissa ( <i>engl.</i> rounds per minute)
<b>RT</b>	huoneenlämpö ( <i>engl.</i> room temperature)
<b>s.e</b>	peräkkäisaltistettu ( <i>engl.</i> serial exposed)
<b>SNV</b>	yhden nukleotidin muutos ( <i>engl.</i> Single nucleotide variation)
<b>TEM</b>	läpäisyelektronimikroskooppi ( <i>engl.</i> Transmission Electron Microscope)

# 1 JOHDANTO

Vuodesta 1928 lähtien, Alexander Flemingin penisilliinilöydöksen jälkeen antibiootteja on hyödynnetty muun muassa ihmisten bakteri-infektioiden hoitamiseen, sekä maataloudessa ja kalankasvatuksessa (Fleming 1929, Davies 2006). Tämän liikakäytön tuloksena niiden tehokkuus on laskenut bakteerien antibioottiresistenssimekanismien kehittyessä ja yleistyessä. Monet bakteerilajit ovat kehittyneet mutaatioiden ja geneettisen materiaalin vaihtumisen tuloksena multiresistenteiksi (MR), minkä vuoksi ne sietävät eri antibiootteja ja ovat löytäneet keinoja välttääkseen niiden vaikutuksen (Normark ja Normark 2002). Täten multiresistentit ja patogeeniset bakteerit, kuten *Enterobacteriaceae*-perheeseen kuuluva *Klebsiella pneumoniae*, ovat hengenvaarallisia taudinaiheuttajia. Mahdollisena hoitokeinoina antibioottien sijaan voidaan hyödyntää bakteriofageja, eli faageja, jotka spesifisesti kykenevät infektoimaan isäntäbakteerin ja tuhoamaan sen.

## 1.1 Antibioottien käyttö ja antibioottiresistenssin yleistyminen

Mikroskooppisista pieneliöistä, bakteereista ja sienistä, eristettyjä antibioottimolekyylejä on hyödynnetty vuosikymmeniä lääketeollisuudessa, kuten myös synteettisesti tuotettuja antibiootteja (Clardy ym. 2009). Nämä molekyylit aiheuttavat mikrobeissa fysiologisia tai biokemiallisia muutoksia, jotka heikentävät bakteerien kasvua tai vaurioittavat niiden soluja hajoamispisteeseen asti (Sengupta ym. 2013). Bakteerit syntetisoivat antibiootteja kontrolloidakseen mikrobipopulaatioita kilpaillessaan eliympäristönsä resursseista. Täten antibiooteilla on merkittävä tehtävä luonnossa selviytymisen kannalta. Antibioottien luonnollinen esiintyvyys sekä erityisesti kliinisissä toimenpiteissä hyödynnetyt antibiootit ovat aiheuttaneet antibioottiresistenttien (AR) kantojen kehittymisen. AR kantojen nopea leviäminen puolestaan on aiheuttanut maailmanlaajuisen ongelman (Sengupta ym. 2013). Bakteerien



resistenssimekanismien kehittyminen tapahtuu kromosomaalisessa genomissa tai liikkuvissa DNA-elementeissä, kuten plasmideissa ja transposoneissa, jotka horisontaalisen geeninsiirron välityksellä siirtyvät bakteerista toiseen (Stokes ja Gillings 2011).

Bakteeriyhteisöjä löytyy kaikista ekosysteemeistä niin maaperästä, vedestä, kuin ihmisten kehittämistä urbaaniympäristöistäkin (Davies 2006). Antibiootteja on käytetty herkästi bakteeri-infektioiden hoitamiseen, kuten myös karjan- ja kalanjalostuksessa infektioiden ennaltaehkäisemiseen sekä kasvun nopeuttamiseen (WHO/EMC/ZOO/97.4). Jalostamon pinta-ala ja eläinten määrä vaikuttaa antibioottien käyttömäärään, sillä esimerkiksi suuri karjan koko sekä pieni kasvatustila altistaa eläimet herkemmin infektiolle, jolloin antibiootteja joudutaan usein käyttämään runsaammin (WHO/EMC/ZOO/97.4). Antibioottihoidetun karjan lihan mukana kulkeutuvat bakteerit voivat täten olla AR kantoja, jotka mahdollisesti vaikuttavat ihmisen normaaliflooran muuntumiseen resistentiksi horisontaalisen geeninsiirron kautta. Maa-alueittain antibioottien käyttö vaihtelee, mutta myös ihmisten tietämättömyys tai välinpitämättömyys lisää antibioottien vapautumista luontoon. Erinäisten vaivojen, kuten flunssanoireiden, ilmetessä potilaat saattavat herkästi vaatia lääkäreiltä antibioottikuuria (WHO/EMC/ZOO/97.4). Näin antibiootit saattavat vuorovaikuttaa paikallisten bakteerien kanssa, jotka puolestaan voivat kehittyä antibiooteille vastustuskykyisiksi.

AR bakteerien leviäminen on osittain myös jatkuvan matkustamisen, lähikontaktin ja huonon hygienian summa. Esimerkiksi suolistossa kehittyvät resistentit bakteerit vapautuvat ulosteen mukana, minkä takia jäteveden käsittely ja hyvä hygienia ovat merkittävässä asemassa AR:n leviämisen kannalta (Aslam ym. 2018). Koska antibiootteja käytetään erityisen paljon sairaalaympäristöissä, esiintyy multiresistenttien bakteerikantojen aiheuttamia infektoita huomattavasti enemmän esimerkiksi kirurgisten toimenpiteiden yhteydessä (Dennesen ym. 1998). Tämä on vaikuttanut AR-kantojen runsastumiseen sekä kehittymiseen MR-bakteerikannoiksi, mikä heikentää infektioiden hoitomahdollisuuksia ja aiheuttaa

kuolleisuuden kasvua (Aslam ym. 2018). Maailman terveysjärjestö, WHO (*engl.* World Health Organization), julkaiseman maailmanlaajuisen AR:n valvontaraportin mukaan MR-bakteerien aiheuttamien tautien kuolleisuuden ilmoitettiin olevan Afrikassa ja Kaakkois-Aasiassa 45 % vuonna 2014 (WHO 2014). Esimerkiksi kolmannen sukupolven  $\beta$ -laktaamille, kefalosporiinille, resistentti *K. pneumoniae* on havaittu enimmäkseen Euroopassa (82 %) sekä Kaakkois-Aasiassa (81 %), mutta merkittävästi myös Afrikassa (77 %) ja Amerikassa (71 %) (WHO 2014). Jo näistä lukemista voidaan päätellä, kuinka yhden bakteerilajin AR on maailmanlaajuisesti havaittavissa ja ongelman kasvuun ei ole vielä löytynyt hidastavia tekijöitä (WHO 2017).

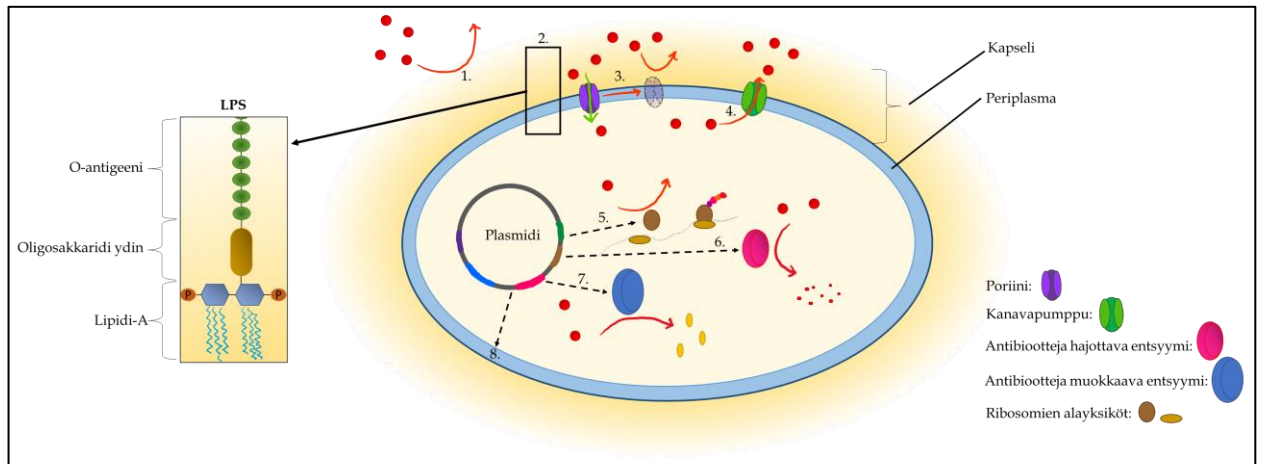
## 1.2 *K. pneumoniae* taudinaiheuttajana

*Klebsiella*-sukuun kuuluva *K. pneumoniae* on gram-negatiivinen, patogeeninen ja MR bakteerilaji, joka aiheuttaa etenkin sairaaloissa esimerkiksi keuhkokuumetta, aivokalvontulehdusta ja virtsatieinfektiota (Tsai ym. 2008, Doorduijn ym. 2016). *K. pneumoniae* eroaa muista enterobakteereista paksun polysakkaridikuoren eli kapselin osalta, joka toimii myös merkittävänä virulenssitekijänä. Kapselin omaava bakteeri välttyy opsonisaatiolta, jossa elimistöön kulkeutuneet vieraat mikrobit tai molekyylit tunnistetaan erilaisten vasta-aineiden sitoutumisen myötä. Syöjäsolut, eli fagosyytit, tunnistavat sitoutuneet vasta-aineet ja voivat fagosytoida tunnistamansa bakteerisolun. *K. pneumoniae* voi kuitenkin paeta fagosytoosilta. Esimerkiksi makrofagien syödyksi jouduttuaan, se kykenee tuhoamaan fagosomin ja vapautumaan siitä (Domenico ym. 1994, Cano ym. 2015). Kapselin luoman fyysisen esteen lisäksi *K. pneumoniae* -bakteerin pintarakenteissa olevat lipopolysakkaridit (LPS) estävät suuren pituutensa vuoksi vasta-ainemolekyylien aikaansaaman immuunipuolustuksen etenemistä (Merino ym. 1992). Myös *K. pneumoniae* -bakteerin solunulkoisten proteiinien on havaittu olevan toksisia (Straus 1987).

*K. pneumoniae* on laajalle levinnyt bakteerilaji. Luonnostaan sitä on havaittu muun muassa maaperässä, vesistöissä, eläimien ja ihmisten limakalvoissa, etenkin

suolistossa, mutta myös iholla (Bagley 1985). Esimerkiksi Podschun ym. (2001) tutkimustulosten mukaan eri vesistötyyppien pintavesikerroksista kerätyt vesinäytteet sisälsivät runsaasti *Klebsiella*-suvun kantoja, joista suurin osa oli *K. pneumoniae* -lajia. Luonnossa esiintyvät *K. pneumoniae* -kannat ovat usein kliinisten kantojen kaltaisia, vaikka niiden virulenssi onkin luonnonpopulaatioissa alhaisempi (Podschun ym. 2001). Tilastojen mukaan noin 75–86 % kliinisistä *Klebsiella* -suvun infektiosta ovat *K. pneumoniae* -bakteerin aiheuttamia (Hansen ym. 2005). Bakteerilajin joutuessa vieraaseen kudostyyppiin, se voi aiheuttaa vaarallisia infektio-oireita, etenkin heikomman immuunipuolustuksen omaavilla vastasyntyneillä sekä ikäihmisillä (Doorduijn ym. 2016).

Useiden tutkimusten mukaan jotkin *K. pneumoniae* -kannat kykenevät puolustautumaan monilta eri antibiooteilta kehittyneiden AR-mekanismien avulla. *K. pneumoniae* -lajilla on todettu useita eri resistenssimekanismia, joista osa perustuu bakteerin solunulkoisiin tekijöihin, kun taas osa solunsisäisiin (Kuva 1).



Kuva 1. *K. pneumoniae* -bakteerin antibioottiresistenssimekanismit. Kuvassa on esitettyinä *K. pneumoniae* -lajin yleisimmät ulkoiset ja sisäiset antibioottiresistenssimekanismit, joista suurin osa on plasmideissa olevien geenien ekspression tulosta. Punaisella esitetty antibiootti ei kulkeudu soluun (1.) polysakkaridisen kapselin vaikutuksesta. (2.) Bakterisolun uloimmalla kalvolla olevien lipopolysakkaridien (LPS) muuntuminen estää antibioottien sitoutumista. (3.) Poriinien tuotussa vähemmän, myös antibioottien sisään kulkeutuminen hidastuu. (4) Solun sisään kulkeutuneet antibiootit kulkeutuvat kanavapumppujen kautta pois solusta. (5.) Antibiootin kohteen, esimerkiksi ribosomin alayksiköiden, muuntuminen voi estää antibiootin aikaansaaman vasteen kehittymistä. Erilaisia entsyymejä, kuten (6.) hajottavia ja (7.) muokkaavia entsyymejä, saavat antibiootit toimintakyvyttömiksi. (8) Periplasmaan kulkeutuneita antibiootteja katalysoidaan myös entsymaattisesti. Kuva on mallinnettu artikkeleista Paczosa ja Meccas 2016 sekä Aslam ym. 2018.

Ulkoisiin resistenssimekanismeihin kuuluu *K. pneumoniae* -bakteerille ominainen solua ympäröivä kapseli, joka koostuu spesifisistä polysakkarideista ja toimii antibioottien vastaisena vahvana fyysisenä esteenä (Schembri ym. 2005). LPS:t ovat ulkoisessa solukalvossa esiintyviä negatiivisesti varautuneita kalvoa stabiloivia rakenteita, joiden uloimmassa päässä on O-antigeeni. Nämä O-antigeenit kiinnittyvät polysakkaridiytimen sekä lipidi-A:n välityksellä solukalvoon (Doorduijn ym. 2016). O-antigeeniä sekä lipidi-A:ta esiintyy erilaisissa konformaatioissa, mikä vaikeuttaa antibioottien, kuten hermosto- ja munuaistoksiini kolistiinin, sitoutumista (Spapen ym. 2011, Llobet ym. 2015, Doorduijn ym. 2016). Solukalvojen proteiinkanavat, kuten porinit ja kanavapumput, tehostavat antibioottien kulkeutumista soluun. Poriinien määrän alentuessa antibioottien pääsy soluun heikentyy (Hawkey ja Finch 2006). Vaihtoehtoisesti kanavapumppujen ekspression koheneminen edesauttaa

antibioottien ulospumppausta, ja toimiikin tehokkaana resistenssiominaisuutena (Pakzad ym. 2013). *K. pneumoniae* muodostaa myös biofilmejä, tiiviitä mikrobipopulaatioita, ulkoisen molekyylivälitteisen kanssakäymisen avulla. Biofilmit tunnetusti toimivat antibioottien sisäänottoa vähentävänä tekijänä (Anderl ym. 2000; Balestrino ym. 2005). Lääkeainemolekyylit eivät pääse diffundoitumaan biofilmin lävitse, minkä vuoksi sisemmät bakteerit suojautuvat niiden vaikutukselta, toisin kuin biofilmin pinnalla olevat bakteerit, jotka altistuvat molekyylielle.

*K. pneumoniae* -lajilla on havaittu myös entsyymeihin perustuvia resistenssimekanismeja sekä sisäistä puolustautumista. Sisäiseen puolustukseen kuuluu muun muassa joidenkin antibioottien, kuten aminoglykosidien, kohteena olevien ribosomien alayksiköiden muuntuminen (Almaghrabi ym. 2014). *K. pneumoniae* -bakteereilla on tehokas entsyymipuolustus, mutta myös solun toiminnan kannalta tärkeisiin synteessireaktioihin, kuten esimerkiksi DNA:n replikaatioon sekä muokkaukseen tarvittavia korjaavia entsyymejä (Chmelnitsky ym. 2012). Ennen kaikkea *K. pneumoniae* tuottaa tehokkaasti useita entsyymejä, kuten antibioottivastustuskykyyn liittyviä  $\beta$ -laktamaaseja. Tämän vuoksi osa kannoista omaa ESBL-ominaisuuden (*engl.* Extended Spectrum Beta-Lactamase, ESBL; Paczosa ja Merccas, 2016). Nämä entsyymit kulkeutuvat sytosolista solukavojen väliseen periplasmaan, jossa ne voivat hydrolysoida sinne kulkeutuneiden  $\beta$ -laktamien rengasrakenteen tehden antibiootin toimimattomaksi (Bush ja Jacoby 2010, Papp-Wallace ym. 2011).  $\beta$ -laktamaasit jaetaan A-D-luokkiin niiden rakenteiden perusteella (Papp-Wallace ym. 2011). A-luokkaan kuuluvat karbapenemaasit, kuten KPC ja GES, ovat yleistä entsyymejä. Metallo- $\beta$ -laktamaasit, kuten VIM, IMP ja NDM puolestaan kuuluvat B-luokkaan. C-luokkaan kuuluvat heikommat karbapenemaasit, kuten CMY-10 ja PDC, jotka toimivat hyvin bakteerisoluiissa, joissa on myös muita resistenssimekanismeja. D-luokan karbapenemaasit, OXA:t, ovat yleistä ja vasta muutamia vuosia sitten havaittuja entsyymejä (Bush ja Jacoby 2010, Papp-Wallace ym. 2011).

*K. pneumoniae* -bakteerilajin geneettiset mutaatiot ja geenien tehokas säätely ovat luoneet voimakkaan vastarinnan antibiootteja vastaan. Osan *K. pneumoniae* -kannoista on havaittu olevan kaikille antibiooteille resistenttejä, minkä vuoksi patogeenisten bakteerien kasvu ja leviäminen on suuri globaali uhka (Elemam ym. 2009). Näiden patogeenisten ja MR:n omaavien *K. pneumoniae* -kantojen torjumiseen tarvitaan vaihtoehtoisia hoitomenetelmiä. WHO:n (2017) julkaiseman tiedotteen mukaan kehotetaan tarkastelemaan AR bakteerien vastaista lääkekehitystä esimerkiksi faagien isäntäspesifisen infektion kautta.

### 1.3 Bakteriofagit multiresistenttien bakteerien vastarintana

Mikrobien ekosysteemin tasapainon säilyttämisen kannalta lajien välinen kilpailu on tärkeässä asemassa. Bakteeripopulaation kasvun rajoittavana tekijänä toimivat faagit ovat vastuussa noin 50 % bakteerisolujen kuolemista (Fuhrman ja Noble 1995). Jo vuonna 1896 Ernest Hankin teki havaintoja suodatetuissa vesinäytteissä olevasta antimikrobisesta aktiivisuudesta, joka toimi kolerabakteerin, *Vibrio cholerae*, kasvua heikentävänä tekijänä. Myöhemmin tehtiin samankaltaisia havaintoja, mutta vuonna 1915 Frederick Twort teki ensimmäiset havainnot bakteerivirusten olemassaolosta, minkä jälkeen vuonna 1917 Felix d'Herelle virallisti niiden esiintymisen ja antoi niille nimeksi "bakteriofagi" (Sulakvelidze ym. 2001). Antibioottien tehokkuus bakteeri-infektioita vastaan loi kuitenkin suuremman kiinnostuskohteen faagien sijaan, mutta Itä-Euroopan maissa, kuten Georgiassa ja Venäjällä faagitutkimukset jatkuivat antibioottien kliinisen käytön yleistymisen rinnalla (Sulakvelidze ym. 2001).

Faagitutkimukset ovat osoittaneet, kuinka faageja esiintyy muihin lajeihin verrattuna runsaimmin koko maailmassa, etenkin vesistöissä ja maaperän pintakerroksessa, mutta myös haastavilla elinalueilla (Ackermann 2011). On arvioitu, että faageja esiintyy luonnossa yli  $10^{30}$  kappaletta, mikä osittain johtuu isäntäbakteerien levinneisyydestä ja jatkuvasta muuntumisesta (Ackermann 2011). Bakteerien ja faagien koevoluution tuloksena bakteerit kehittyvät vastustuskykyisiksi faageja vastaan, jolloin alkuperäisestä bakteerilajista kehitty

uusia isolaatteja eli muuntuneita bakteerikantoja. Vastaavasti faagien mutaatioiden tuloksena niiden infektiokyky voi monipuolistua, jolloin faagit voivat infektoida eri bakteereja kuin aikaisemmin, tai mutatoitunut bakteeri-isolaatti voi sopia isäntäbakteeriksi (Ferris ym. 2007).

### 1.3.1 Bakteriofagien luokittelu

Virustaksonomian järjestö ICTV (*engl.* International Committee on Taxonomy of Viruses) luokittelee löydettyjä viruksia, kuten faageja, taksonomisesti niiden ominaisuuksien pohjalta. Luokittelun kriteereinä käytetään morfologiaa, fysiokemiallisia ominaisuuksia, genomia sekä isäntäsolutyyppejä (Ackermann 2011). Macfarlane Burnet (1933) havaitsi faagien fysiokemiallisissa ominaisuuksissa ja ko'oissa eroja (Karthik ym. 2014). Elektronimikroskooppitekniikoiden kehittymisen myötä virusten luokittelussa keskityttiin morfologisten rakenteiden symmetriaan (Karthik ym. 2014). Virusten negatiiviväriäyksen avulla voitiin visualisoida virusten muoto ja rakenteet tarkemmin, mikä edisti luokittelukriteerien kehittymistä (Almeida 1963). Faagien moniosainen rakenne kiinnitti heti erityisesti huomiota muista viruksista poikkeavan "pää-häntä" rakenteen vuoksi.

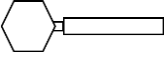
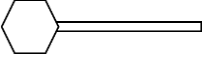








Vuonna 1956 puhdistettujen viruskristallien röntgendiffraktiolla tehtyjen analyysien avulla saatiin selville, kuinka virusten proteiiniuori eli kapsidi ympäröi faagigenomia (Crick ja Watson 1956, Almeida 1963). Kapsidien alayksiköistä, kapsomeereistä, koostuva kuutiorakenne toimii nykyään osana faagien morfologista luokittelua (Almeida 1963). Pienellä osalla faageista ei kapsidia esiinny ollenkaan, vaan se on korvattu lipidirakenteella. Osalla taasen esiintyy kapsidin lisäksi lipidikerros, joka voi olla kapsidin ulko- tai sisäpuolella (Mäntynen ym. 2019). David Bradley loi vuonna 1967 pohjan ICTV:n luokittelujärjestelmälle, jossa faagit jaettiin morfologiansa perusteella kuuteen eri ryhmään. Hän jakoi hännälliset faagit supistuviin ja supistumattomiin, jotka jaettiin vielä lyhyisiin ja pitkiin hännän pituuden mukaan. Hännättömät faagit jaettiin kapsomeerien koon mukaan pieniin ja isoihin, sekä päättömät faagit joustaviin filamenttifaageihin (Bradley 1967).

Hännälliset faagit kuuluvat *Caudovirales*-lahkoon, joille on ominaista kapsidin ja helikaalisen häntärakenteen binäärinen symmetria (Lwoff ym. 1962). Symmetrian perusteella voidaan luokitella faageja myös polyhedraalisiin, helikaalisiin, filamenttisiin sekä pleomorfisiin (Ackermann 2011).

Faageja jaetaan myös nukleiinihappojen perusteella DNA- ja RNA-faageihin. Tarkempi luokittelu sisältää myös jaottelun yksi- ja kaksijuosteisiin (*engl.* single stranded, ss; double stranded, ds) DNA- ja RNA-faageihin (Bradley 1967). Menetelmien kehittymisen myötä myös ICTV:n luokittelukriteerit ovat tarkentuneet, minkä vuoksi suurin osa faageista jää nimeämättä ennen kuin niiden kaikki ominaisuudet on tarkoin määritetty (Rohwer ja Edwards 2002). Näin ollen faageja luokitellaan nykyään geenien samankaltaisuuksien mukaisesti, kuten myös genomien rakenteen mukaan (sirkulaariset ja lineaariset) (Ackermann 2000). Baltimore (1971) kehitti lisäksi genomien tyyppien lähetti-RNA:han (*engl.* messenger RNA, mRNA) perustuvan luokittelun, joka jakaa virukset genomien transkription vaiheiden perusteella ryhmiin I-VII. Virusgenomille ominainen transkriptiomekanismi voi tapahtua dsRNA:n ja dsDNA:n tapauksessa joko suoraan koodaavan juosteen (+) mukaisesti tai mallijuosteen (–) välityksellä. Jälkimmäisessä tapauksessa –-juoste käännetään ensin +-juosteeksi ennen varsinaista transkriptiota. Useat luokittelutavat tekevät faagien lajituksesta monimutkaista: vaikka 96 % faageista ovat hännällisiä ja loput hännättömiä, on näiden asettaminen tietyn lahkon, heimon, suvun tai lajin alle monivaiheinen prosessi (Ackermann 1996). Yleiskuvansa perusteella faagit voidaan jakaa taulukon 1 mukaisesti lahkoihin ja heimoihin.



Taulukko 1. Luokittelujärjestelmän 10 eri bakteriofagiheimoa. Taulukko on mallinnettu Ackermann 2011 julkaisusta.

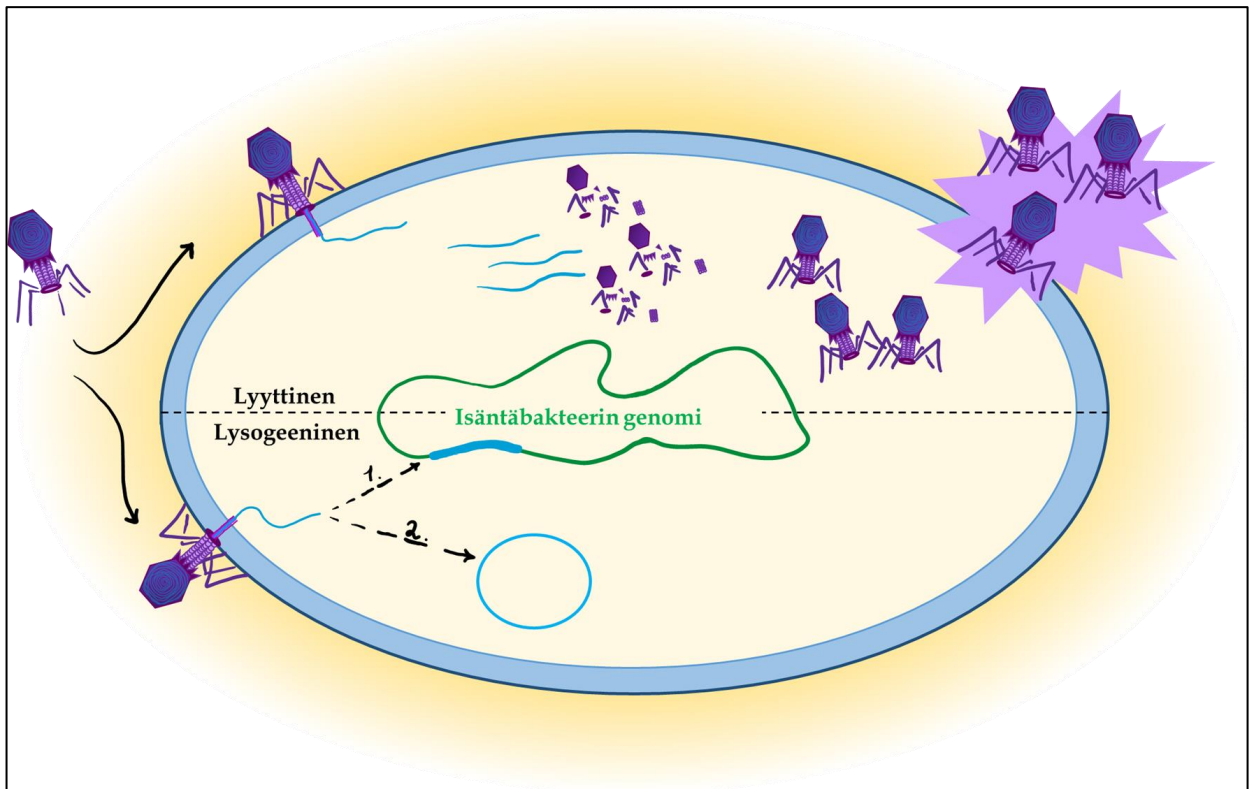
Morfologia	Heimo	Rakenneominaisuus	Genomi
	<i>Myoviridae</i>	Supistuva häntä	dsDNA (L)
	<i>Siphoviridae</i>	Supistumaton pitkä häntä	dsDNA (L)
	<i>Podoviridae</i>	Supistumaton lyhyt häntä	dsDNA (L)
	<i>Microviridae</i>	12 kapsomeeria	ssDNA (S)
	<i>Corticoviridae</i>	Lipidikalvo kompleksisen kapsidin välissä	dsDNA (S)
	<i>Tectiviridae</i>	Kapsidi ja sisäinen lipidikalvo	dsDNA (L)
	<i>Leviviridae</i>	Kapsiditon	ssRNA (L)
	<i>Cystoviridae</i>	Kapsidi ja ulkoinen lipidikalvo	dsRNA (L)
	<i>Inoviridae</i>	Filamenttinen	ssDNA (S)
	<i>Plasmaviridae</i>	Lipidikalvo, ei kapsidia	dsDNA (S)

S=sirkulaarinen, L=lineaarinen

### 1.3.2 Bakteriofagien elinkierto

Bakteerit ja faagit elävät koevoluutiosuhteessa, jossa faagit hyödyntävät bakteerien aineenvaihduntaa luoden uusia faagipartikkeleita, kun taas bakteerit pyrkivät kehittämään puolustusmekanismeja faageja vastaan. Faageilla ei ole omaa aineenvaihduntaa, minkä vuoksi ne tarvitsevat bakteerien metaboliaa monistuaakseen. Täten faagien tulee injektoida oma genominsa isäntäsolun solulimaan, minkä jälkeen faagi muuttaa isäntäbakteerin metaboliaa faagin monistumisen kannalta suotuisaksi (Weinbauer 2004). Faagien ulkorakenteessa eli ”hännässä” esiintyy isäntäsolun reseptoriin kiinnittyviä proteiineja (*engl.* receptor-binding protein, RBP), joiden avulla faagi tunnistaa spesifisesti isäntäsolun ja kykenee injektoidaan genominsa isäntään (Casey ym. 2015). Injektointi isäntäsolun soluseinän lävitse tapahtuu faagin häntärakenteen entsyymien tai sen kapsidin avulla (Weinbauer 2004). Tämän jälkeen faagi siirtyy joko lyyttiseen tai

lysogeeniseen elinkierto, riippuen genomien sijoittumisesta sekä sen aktiivisuudesta isäntäsolussa (Kuva 2; Weinbauer 2004). Lyyttisessä elinkierrossa isäntäsolu muuttuu virustehtaaksi, joka tuottaa faagin genomien mukaisesti uusia viruspartikkeleita, jotka lopulta vapautuvat bakteerisolusta hajottaen sen samalla (Weinbauer 2004). Lysogeenisessä elinkierrossa faagin inaktiivinen genomi integroituu isännän omaan kromosomaaliseen genomiin tai jää erilliseksi plasmidiksi (Weinbauer 2004).



Kuva 2. Bakteriofaagin elinkierto. Bakteriofageilla on kaksi elinkierron vaihetta: lyyttinen ja lysogeeninen. Solun ylempi puolisko kuvastaa lyyttistä elinkiertoa, jossa faagin injektioima genomi valtaa isäntäbakteerin metaboliakoneiston tuottaakseen lisää faagipartikkeleita. Lopputuloksena isäntäbakteeri hajoaa uusien faagien vapautuessa. Solun alempi puolisko kuvastaa lysogeenistä elinkiertoa, jossa faagigenomi (1.) integroituu osaksi isäntäbakteerin genomiin tai (2.) jää itsenäiseksi plasmidiksi sytosoliin. Bakteerisolun replikoituessa myös integroitunut genomi monistuu jakautumisen yhteydessä. Faagi voi siirtyä myös lysogeenisestä vaiheesta aktiiviseen lyyttiseen vaiheeseen olosuhteiden aktivoitessa faagin entsyymien toimintaa. Kuva on mallinnettu Weinbauer 2004 -artikkelista.

Faagiterapialla tarkoitetaan bakteeri-infektioiden hoitoa joko faageilla tai niiden tuottamalla lyyttisillä proteiineilla. Faagiterapian avulla AR bakteerien aiheuttamien infektioiden hoitomahdollisuudet ovat monipuolistuneet

(Lin ym. 2017). Toisin kuin antibiootit, faagit voivat kilpailla mutaatioiden tuloksena bakteerien resistenssimekanismeja, kuten RBP:n muokkautumista sekä adaptiivista puolustusta eli CRISPR-Cas-systeemiä (*engl.* Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR; CRISPR-associated, CAS), vastaan (Abedon 2012, Koskella ja Brockhurst 2014). Täten jatkuvasti erilaistuvat faagit voivat toimia MR:n bakteeri-infektioiden hoitokeinona.

### 1.3.3 Bakteriofagien eristäminen

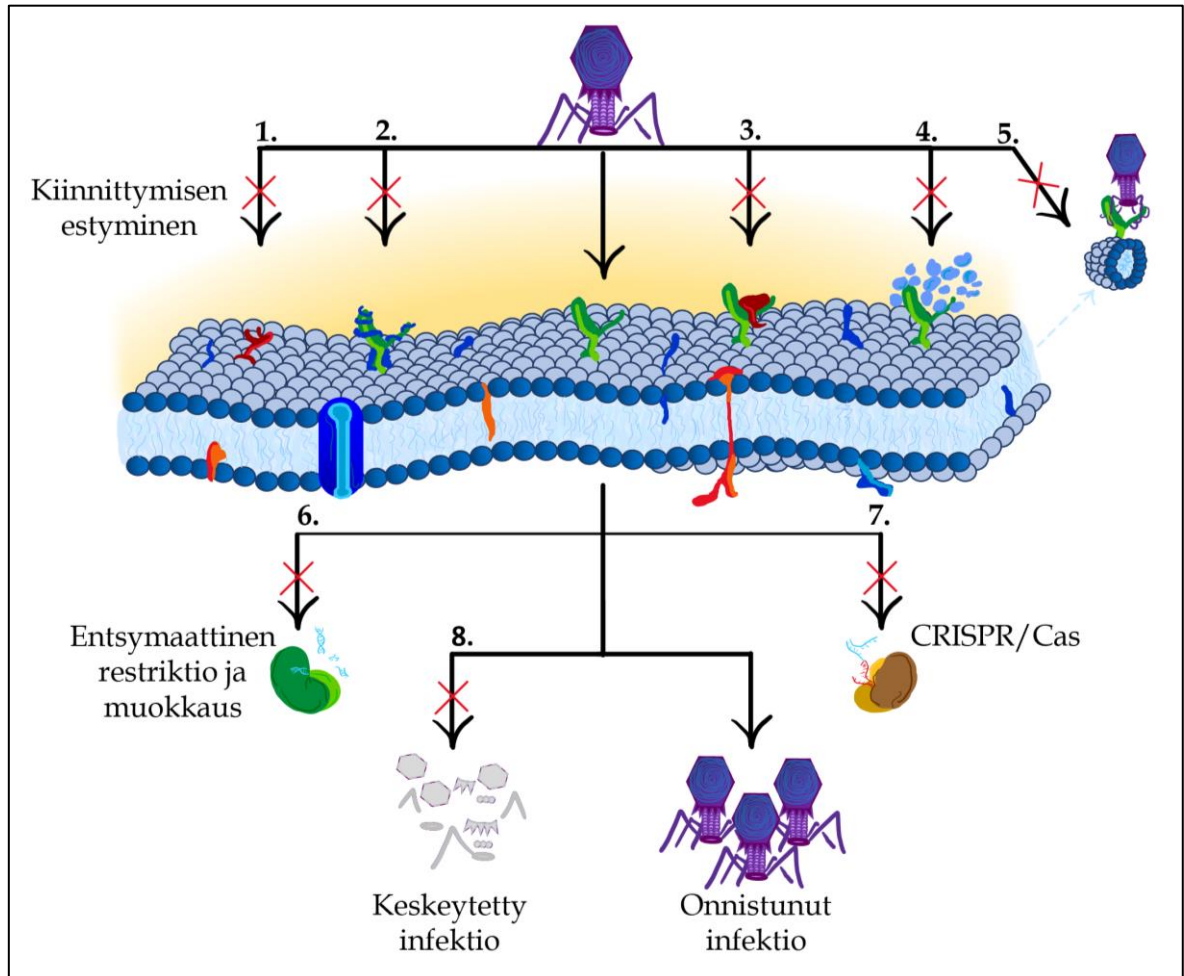
Faagiterapian edellytyksenä on löytää sopivia faageja, joita monistetaan ja eristetään isäntäbakteereista. Faagien runsas esiintyvyys mahdollistaa niiden eristämisen muun muassa maaperästä, erilaisista vesistöistä ja ilmasta (Magare ym. 2017, Hyman 2019). Maaperässä ja vesistöissä esiintyvät faagit ovat yksinkertaisen eristysmenetelmänsä vuoksi olleet suurempana tutkimuskohteena, toisin kuin ilmakehässä kulkevat faagit, joiden eristämisessä käytetään usein vakuumisuodatusmenetelmää (Magare ym. 2017). Taudinaiheuttajabakteerien levinneisyydestä riippuen voidaan niitä infektoivia faageja löytää samaisesta ympäristöstä (Hyman 2019). Täten faagiterapian kannalta hyödyllisiä faageja löydetään usein luonnonvesistöistä, mutta myös jätevesistä ja maaperästä (Hyman 2019, Yerushalmy ym. 2020).

Felix d'Hereller kehitti alkuperäinen faagieristysmenetelmän, joka perustuu faagien rikastamiseen sopivissa isäntäbakteereissa. Tämä toimii yhä perusmenetelmänä nykyisissä faagitutkimuksissa. Vesi- tai maaperänäyte käsitellään isäntäbakteereilla sopivassa kasvatusliuoksessa. Faagien annetaan monistua noin vuorokauden verran, minkä jälkeen seos sentrifugoidaan, jotta kiinteä aines ja suurin osa bakteereista jäävät astian pohjalle (Hyman 2019). Supernatantti suodatetaan sopivaa suodatinta käyttäen, minkä tuloksena faagit saadaan eroteltua bakteereista sekä muista ylimääräisistä hiukkasista. Eristetyn faagin infektiivisyyttä voidaan näin ollen analysoida lisäämällä pisara faagilysaattia eri bakteerimaljoille. Jos faagi infektoi bakteeria, muodostuu lisätyn pisaran kohdalle kirkas alue eli plakki, josta bakteerit ovat kuolleet faagin vaikutuksesta

(Hyman 2019). Infektiokokeiden tuloksena voidaan suunnitella faagiyhdistelmiä, joiden sopivuutta faagiterapiassa tarkastellaan jatkokokeilla. Näiden kokeiden tarkoituksena on selvittää faagiyhdistelmien tehokkuutta spesifisen bakteerikannan eliminoimiseen ja vaikutusta normaaliflooraan. Lopulta sopivien faagiyhdistelmien muodostamisen tuloksena voidaan niitä hyödyntää tarkasti bakteeri-infektioiden hoitamisessa (Hyman 2019). Potentiaalisten faagien löytäminen ja karakterisointi on avain faagiterapian ylläpitämiselle ja kehittämiseksi. Faageista muodostetaan erilaisia kokoelmia, joita voidaan tapauskohtaisesti rikastaa nopeasti (Yerushalmy ym. 2020).

#### **1.4 Bakteerien faagiresistenssimekanismit**

Bakteerien muuntumiskykyinen metabolia voi nopeasti sopeutua ympäristön stressitekijöiden, kuten antibioottien ja faagien, vaikutukseen. Tämä erikoiskyky on aiheuttanut ongelmia bakteeri-infektioiden hoitojen suunnittelussa. Koevoluution tuloksena bakteerit ovat kehittäneet resistenssimekanismeja faageja vastaan, jotka voivat olla antibioottiresistenssimekanismien tapaan solunulkoisia tai -sisäisiä (Kuva 3). Nämä puolustusmekanismit ovat joko kehittyneet geenimutaatioiden kautta tai vaihtoehtoisesti geeniekspression säätelyn aikaansaamia (Maciejewska ym. 2018).



Kuva 3. Bakterin faagiresistenssimekanismit. Kuvassa on esitettyä bakterin mahdolliset faagiresistenssimekanismit, joiden avulla bakteeri suojautuu faagin lyyttiseltä vaikutukselta. Bakterin kapseli voi estää faagia vuorovaikuttamasta solukalvolla olevien reseptorien kanssa. Bakteeri voi (1.) muuttaa reseptorin konformaatiota sopimattomaksi, (2.) peittää reseptorin, (3.) tuottaa reseptoriin kiinnittyvän inhibiittorin tai (4.) rakentaa makromolekyyleistä biofilmin. (5.) Gram-negatiiviset bakteerit voivat muodostaa uloimmasta solukalvosta kuroutuvia vesikkeleitä, joilla kuljetetaan faagin tunnistamat reseptorit pois bakterin lähetyviltä. Infektion edetessä sytosoliin, (6.) bakteeri voi puolustautua restriktio- ja muokkauksineistolla tai (7.) CRISPR-Cas-systemillä. (8.) Bakterien toksinen Abi-systeemi voi kemiallisesti häiritä faagin lyyttistä elinkiertoa. Kuva on mallinnettu Eriksonin 2015 väitöskirjasta.

Bakterien solunulkoisen puolustuksen tarkoituksena on estää faagin kiinnittyminen ja siten infektion eteneminen. Osalla bakteereista, kuten *K. pneumoniae* -lajilla, esiintyy ulkoinen kapseli, joka estää faageja kulkeutumasta lähelle solukalvon reseptoreita (Tomás ym. 1986). Kapselin läpi kulkeutuneiden faagin RBP:n kiinnittyminen voi estyä bakterin reseptorin konformaation

muutoksen tuloksena tai sen peittämisen vaikutuksesta (Koskella ym. 2014). Faagiresistenssi voi vaikuttaa bakteerin ravinteiden saantiin, koska faagit voivat hyödyntää esimerkiksi reseptorivälitteisen endosytoosiin osallistuvia reseptoreita. Täten reseptorien ekspression vähentyessä tai loppuessa, ravinteiden saanti voi heikentyä samalla kun faagi menettää kyvyn tunnistaa isäntäbakteerin pinnan (Weinbauer 2004). Bakteerit kykenevät tuottamaan kilpailevia inhibiittoreita, jotka voivat sitoutua reseptoreihin estäen faagien RBP:n sitoutumisen (Weinbauer 2004). Reseptorit voivat myös peittyä bakteerin erittämien makromolekyylien, kuten esimerkiksi proteiinien, lipidien tai polysakkaridien, avulla. Polysakkaridit muodostavat reseptorin ympärille suojaavan biofilmikoostumuksen (Erikson 2015). Varsinaiset bakteerien biofilmit eivät aina rajoita faagien kulkeutumista bakteerimassan lävitse, koska osalla faageista on havaittu olevan bakteerien polysakkaridikoostumusta hajottavia depolymeraaseja (Hughes ym. 1998). Gram-negatiivisten bakteerien uloin solukalvo voi myös kuroutua ja muodostaa vesikkeleitä, joihin faagien tunnistamat reseptorit eristetään (Manning ja Kuehn 2011). Täten faagit voivat bakteerin sijaan kiinnittyä vesikkelin reseptoriin, jolloin varsinainen bakteeri säästyy infektiolta.

Faagin infektion edetessä bakteerin solunulkoisesta puolustuksesta huolimatta, solunsisäiset mekanismit voivat estää sen lyyttisen vaikutuksen. Vieraan genomin kulkeutuminen bakteerisolun käynnistää restriktio- ja muokkauskoneiston (*engl.* restriction-modification system, RM), joiden avulla genomi hajotetaan ja muokataan vaarattomaksi (Tock ja Dryden 2005). RM-systeemi koostuu restriktioendonukleasista (REaasi) ja metyyli transferaasista (MTaasi). REaasit tunnistavat metyloimattoman faagigenomin ja kykenee pilkkomaan DNA-juosteen palasiksi, kun taas MTAasit metyloivat pilkkoutuneet DNA-juosteet. Bakteeri itse suojautuu RM-systeemiltä metyloituneen genominsa vuoksi (Tock ja Dryden 2005).

Noin 50 % sekvensoiduista bakteereista omaavat CRISPR-Cas-systeemin, joka kykenee adaptoitumaan faagi-infektioihin tallentamalla palan faagigenomia CRISPR-lokukseen (Shariat ja Dudley 2014). Tämä lokus koostuu lyhyistä palindromitoistojaksoista sekä niiden väliin liitetystä lyhyistä faagisekvensseistä

(*engl.* spacer), jotka ovat peräisin bakteeriin elinaikana injektointuneista faageista. Lisäksi erilaiset Cas-proteiinien geenit sijaitsevat CRISPR-lokuksessa, kuten myös muut mekanismin toimintaan vaaditut geenit (Samson ym. 2013). Bakterisoluuun injektointunut faagigenomi hajotetaan ja liitetään osaksi CRISPR-lokusta. Toistojaksot ja liitetty faagisekvenssi muutetaan transkription välityksellä CRISPR-RNA:ksi (crRNA), joka toimii tunnistavan tekijänä uusia faagi-infektioita vastaan (Samson ym. 2013). Yhdessä Cas-nukleaasi ja crRNA muodostavat kompleksin, jossa crRNA tunnistaa sekvenssinsä välityksellä samankaltaisen sekvenssin omaavien faagien genomien, joka kiinnittyy emäspariperiaatteen mukaisesti kompleksiin ja pilkkoutuu Cas-nukleaasin vaikutuksesta palasiksi (Sorek ym. 2008). CRISPR-Cas-systeemi on vasta viime vuosikymmenen aikana havaittu resistenssimekanismi, joka on myös avartanut biolääketiedettä geenien muokkausmenetelmän kannalta (Heidari ym. 2017).

Osa bakteereista voivat käynnistää faagi-infektion tuloksena haitallisen Abi-puolustusmekanismin (*engl.* Abortive infection), joka perustuu toksisten molekyylien vaikutukseen (Chopi ym. 2005). Erilaisia Abi-järjestelmiä on löydetty, jotka voivat estää faagin DNA:n replikoitumista, transkriptiota tai estää faagiproteiinien synteesiä (Emond ym. 1998, Chopi ym. 2005). Tämä mekanismi pohjautuu plasmideissa oleviin Abi-sekvensseihin, jotka aktivoituvat spesifisten faagigenomien läsnä ollessa. Abi-proteiinien ekspressoituminen aiheuttaa toksisia vaikutuksia itse bakteerille, mikä lopulta aiheuttaa solukuoleman (Chopi ym. 2005). Näin bakteeri turvaa populaationsa tuhoutumalla itse, estäen samalla faagien replikaation. Lisäksi bakteereilla on havaittu ”toksiini-antitoksiini” (TA) lokus, joka aktivoituu bakteereille stressaavissa olosuhteissa. Tällöin toksiini muuttaa bakteerin sytosolin olosuhteet sopimattomaksi homeostaasin kannalta, kuten myös faagin lyyttiselle elinkierrolle, jolloin antitoksiini on bakteerin ainoa keino selviytyä (Pandey ja Gerdes 2005). Antitoksiinit ovat usein herkempiä molekyylijä, joiden epästabiloituminen ajaa bakteerin ohjelmoituun solukuolemaan (Pandey ja Gerdes 2005). Bakteerin mahdollisen solukuoleman tuloksena faagin leviäminen bakteeripopulaatiossa estyy.

## 1.5 Tutkielman tavoitteet

Bakteriofageja voidaan käyttää antibioottiresistenttien bakteerien hoitamiseen, mutta ongelmana hoidoissa on osittain bakteereissa nopeasti kehittyvä vastustuskyky faagille. Tässä tutkimuksessa tutkittiin patogeenisen *K. pneumoniae* -lajin faagiresistenssin kehittymismekanismeja, sekä resistenssin mahdollista katoamista alhaisessa ravinnepitoisuudessa, kun faagit eivät enää ole bakteerin kanssa samassa ympäristössä. Tutkimuksessa tarkasteltiin *K. pneumoniae* -bakteerin kahta eri kantaa, EKP3 ja EKP8, sekä niiden faagiresistenttejä fenotyyppiä. Nämä fenotyypit olivat kahdeksan faagin peräkkäisaltistuksen (*engl.* Serial exposed; s.e) tai yhdistelmäaltistuksen (*engl.* Phage cocktail; p.c) tuloksena kehittyneet resistenteiksi kahdeksalle faagille. Nämä aiemmin eristetyt faagit olivat EKP3P1, EKP3P2, EKP3P4, EKP3P5, EKP8P1, EKP8P2, EKP8P3 ja EKP8P4. EKP3-alkuisten faagien isäntäbakteeri oli EKP3-kanta ja EKP8-alkuisten vastaavasti EKP8-kanta. Lisäksi tutkielmassa pyrittiin eristämään uusia faageja käyttäen niin faagiresistenttejä fenotyyppi-isolaatteja kuin villityypin kantoja.

Ravinnepitoisuuden tärkeyttä faagiresistenssin ylläpitämisessä tarkasteltiin laajamittaisella infektiokokeella, kasvukäyräanalyysillä ja mutaatioiden paikantamisen avulla. EKP3 ja EKP8 eroavat toisistaan geneettisesti lähinnä EKP3:ssa olevien CRISPR-lokusten osalta. Tämän CRISPR-alueen muutoksia analysoitiin faagialtistuskokeiden välityksellä. Tutkimuksen tavoitteena oli ymmärtää erilaisten *K. pneumoniae* -kantojen vastetta, kun ne altistetaan samoille faageille ja siten kartoittaa mahdollisuuksia tehostaa faagien käyttämistä bakteeri-infektioiden hoitamisessa.



## 2 AINEISTO JA MENETELMÄT

Tutkimuksessa käytettiin *K. pneumoniae* -bakteerikantoja EKP3 ja EKP8, sekä faagiresistenttejä fenotyyppejä EKP3 s.e, EKP3 p.c, EKP8 s.e ja EKP8 p.c, jotka on alun perin eristetty Yhdysvalloissa sairaalahoidossa olleista potilaista ja saatu Christian Gisken tutkimusryhmältä Ruotsista Karoliinisesta instituutista (Kitchel ym. 2009, Koskinen ym. 2021). EKP3- ja EKP8-kannan sekä niiden faagiresistenttien isolaattien genomit olivat ennestään sekvensoitu, joten tutkimuksen aikana suoritettujen DNA-sekvensointien tuloksia verrattiin alkuperäisiin sekvensseihin (ks. Liite 1). Bakteerit kasvatettiin eri työvaiheissa 100 % Luria-Bertani (LB) kasvatusliuoksessa (Sambrook ym. 1989), ellei toisin mainita. Koemenetelmissä, joissa ravinnepitoisuutta alennettiin 10 %:in, kasvatusliuos valmistettiin laimentamalla 100 % LB-liuosta ionivaihdetulla vedellä. Bakteerien alkukasvatukset tehtiin LB-maljoille, jotka sisälsivät 1 % agaria (Biokar diagnostics) sekä 50 µg/µl kefalotiinia resistenttiplasmidien ylläpitämiseksi. Bakteerien kasvuolosuhteet olivat maljoilla yön yli (*engl.* over night; o/n) +37 °C lämpötilassa. Nestekasvatukset tehtiin o/n +37 °C ravistelussa 210 kierrosta minuutissa (*engl.* rounds per minute, rpm), ellei toisin ole mainittu. Faagialtistuskokeissa käytettiin LB-pehmytagaria, jossa agarin pitoisuus oli 0,7 %.

### 2.1 Faagiliuosten tuoreistaminen

Aiemmin valmistettuja faagiliuoksia, EKP3P1, EKP3P2, EKP3P4, EKP3P5, EKP8P1, EKP8P2, EKP8P3 ja EKP8P4, tuoreistettiin laimentamalla faagilysaattia tiitterin mukaan siten, että saataisiin semikonfluentteja maljoja, joissa noin 50 % petrimaljalla olevasta bakteerimatosta oli faagi-infektion seurauksena kirkasta. Faagilaimennosta ja isäntäbakteeria lisättiin 100 µl yhdessä sulaneen LB-pehmytagarin kanssa LB-maljalle. Vuorokauden kuluttua semikonfluenteilta maljoilta kaavittiin pehmytagarkerros 50 ml:n putkiin lisäten 5 ml LB:tä maljaa kohden. Seosta inkuboitiin ravistelijalla 210 rpm +37 °C neljä tuntia, minkä jälkeen putket sentrifugoitiin 5 000 rpm 10 minuuttia huoneenlämmössä (*engl.* Room

temperature; RT). Supernatantit suodatettiin 0,2 µm suodattimesta (Filtropur S plus 2.0, SARSTEDT, Ref#83.18.26.102) käyttäen 20 ml:n ruiskua (BD Plastipak™, Ref#300629). Tästä suodoksesta tehtiin laimennossarja tiitterin määrittämistä varten (Kaava 1). Tiitterin arvo kertoo liuoksen plakkeja muodostavien virusten määrän (*engl.* plaque forming unit, PFU) ml:ssa.

$$\text{Tiitteri} = \frac{\text{Plakkien määrä}}{\text{Laimennoskerroin} \times \text{Laimennostilavuus}} = \text{PFU/ml} \quad (1.)$$

Tuoreistettujen faagiliuosten infektiokykyä tarkasteltiin maljaamalla bakteerikannat (EKP3 ja EKP8) LB-pehmytagarin kanssa LB-maljoille, minkä jälkeen lisättiin kutakin faagiliuosta tippoina päälle. Maljoja kasvatettiin o/n, jonka jälkeen faagien infektiokykyä arvioitiin silmämääräisesti.

## 2.2 Uusien faagien eristys ja isäntäspesifisyys

Jyväskylän Nenäinniemen jätevedenpuhdistamosta haettiin jätevesinäytteitä, joita rikastettiin EKP3- ja EKP8-kannoilla, sekä niiden faagiresistenteillä mutanteilla (EKP3 s.e, EKP3 p.c, EKP8 s.e ja EKP8 p.c). 30 ml jätevettä sentrifugoitiin 5000 rpm 10 minuutin ajan RT. Supernatantti suodatettiin 0,2 µm ruiskusuodatuksella. 20 ml suodatettua supernatanttia siirrettiin 50 ml:n putkiin lisäten niihin 20 ml LB:tä sekä 100 µl o/n bakteerin nestekasvatusta. Rikastusta kasvatettiin ravistelijalla o/n. 1 ml rikastusta sentrifugoitiin eppendorf-putkissa maksiminopeudella (13 300 rpm) 10 minuuttia RT. Supernatanttia levitettiin silmukkasauvalla LB-maljoille ja isäntäbakteeria lisättiin 100 µl 3 ml:n LB-pehmytagarin kanssa. Maljojen annettiin kasvaa o/n, minkä jälkeen maljalta poimittiin plakkeja eppendorf-putkiin, joissa oli 500 µl LB:tä. Putkia vorteksoitiin ja levitettiin faagiliuosta silmukkasauvalla LB-maljalle, kuten aikaisemmin. Plakit poimittiin maljoilta ja niistä tehtiin laimennossarjat. Kukin faagilaimennos maljattiin isäntäbakteerinsa kanssa maljalle ja semikonfluenteilta maljoilta kerättiin bakteriofagit jatkotutkimuksia varten (ks. 2.1). EKP3- ja EKP8-kannoille sekä niiden mutanteille tehtiin infektiotestit eristettyjen faagien (EKP3P6, EKP3P7, EKP3P8, EKP8P5, EKP8P6 ja EKP8P8)

suodoksilla, kuten aikaisemmin (ks. 2.1). Infektiotestit toistettiin kaksi kertaa tulosten luotettavuuden parantamiseksi.

### 2.2.1 Uusien faagien TEM-kuvantaminen

Uudet faagilysaatit puhdistettiin TEM-kuvausta varten lisäten faagiliuoksia 5 ml 15 ml:n LB:n kanssa pyöreäpohjaisiin putkiin. Putket sentrifugoitiin (RC5C Sorvall Instruments) 25 000 x g (14 940 rpm) +4 °C kaksi tuntia. Supernatantit poistettiin varovasti ja pelletit resuspensoitiin 10 ml:llä 0,2 µm:llä suodatettuun 0,1 M ammoniumasetaattiin (pH 7,08; 11.09.2017 BT). Putket sentrifugoitiin, kuten aikaisemmin. Supernatantit poistettiin, pelletti resuspensoitiin ja lopulta sentrifugoitiin, kuten edellä. Supernatantin poistamisen jälkeen lisättiin 70 µl 0,2 µm suodatettua 0,02 M kaliumfosfaattia. Puhdistetut faagilysaatit siirrettiin eppendorf-putkiin ja niitä säilytettiin +4 °C:ssa TEM-värjäystä varten.

Puhdistettua faagilysaattia lisättiin kuparihilalle (Cu 200 mesh + 0,8 % Butwar) 5 µl, ja annettiin sen kiinnittyä yhden minuutin ajan. Hila kuivattiin suodatinpaperilla ja lisättiin siihen 0,2 µm suodatettua 1 % fosfovolframihappoa (pH 6,5) (*engl.* phosphotungstic acid, PTA) 10 µl 30 sekuntin ajaksi. Hila kuivattiin uudelleen ja asetettiin se hilakotelossa eksikaattoriin. Hilat kuvattiin läpäisyelektronimikroskoopilla (*engl.* Transmission Electron Microscope, TEM; JEOL JEM-1400 Electron Microscope) käyttäen Radius 1.4 -ohjelmaa sekä TEM:n kameraa (Quemesa Olympus Soft Imaging Solution).

### 2.2.2 EKP8P6-faagin genomien eristys ja sekvensointi

EKP8P6-faagin DNA eristettiin eristyskitin (Norgen Biotek corporation, tuote#46800) protokollan mukaisesti. Lysaatin esikäsittelyssä suoritettiin DNAasi-käsittely, jossa 1 yksikköä/µl (*engl.* unit/µl) DNAasi I:stä (Norgen's RNase-Free DNase I) lisättiin protokollan mukaisesti. Lisäyksen jälkeen lysaattia inkuboitiin 30 minuuttia +37 °C:ssa, minkä jälkeen jatkettiin protokollan ohjeiden mukaisesti DNAasin inaktivoinnilla. Lyysauspuskurin B:n jälkeen lisättiin vaihtoehtoisen välivaiheen mukaisesti 20 µg/ml proteinaasi K:ta (Thermo Scientific, Ref#EO0491),

minkä jälkeen inkuboitiin lyaattia poikkeuksellisesti vain 15 minuuttia. Jatkettiin protokollan ohjeiden mukaisesti DNA:n eluutiiovaiheeseen asti, jolloin käytettiin 1,5 ml:n DNA LoBind -putkia ja eluutioliuksena PCR-vettä, jota lisättiin kahdessa osassa 50 µl:n fraktioina. Eristettyjä DNA-fraktioita säilytettiin +4 °C, kunnes niiden pitoisuudet mitattiin fluoresenssiin perustuvalla Qubit-mittauksella (Qubit® 2.0 Fluorometer, Life Technologies) käyttäen valmistajan mittausprotokollaa (Molecular probes, Life technologies, Qubit® dsDNA HS Assay Kits Online Specials). Toinen DNA-näytteistä lähetettiin sekvensoitavaksi sekvensointipalveluun, kuten myös bakteerinäytteet (ks. 2.3 ja 2.4). Näytteistä valmistettiin Nexters Flex -kirjasto ja ne sekvensoitiin Illumina MiSeq PE300 -teknologiaa käyttäen. Sekvenssejä käsiteltiin Qiagenin CLC Genomics Workbench 12 -ohjelmalla. Sekvenssidatojen laatu tarkistettiin QC-työkalulla (*engl.* Quality control). QC:n muodostamasta graafisesta raportista tarkistettiin keskimääräisen PHRED-tuloksen avulla sekvenssin laatu, jonka perusteella sekvenssit trimmattiin. Sekvenssidatojen trimmauksessa käytettiin laadun tarkastelun raja-arvoa 0,005 ja poistettiin DNA-juosteiden 5'-ja 3'-päistä 5 emäsparia (*engl.* base pair, bp), ja alle 50 bp:n sekä yli 1200 bp:n pituiset DNA-juosteet jätettiin pois laadun parantamiseksi. Referenssisekvenssinä käytettiin aikaisempaa EKP8-kannan sekvenssiä, jonka avulla poistettiin isäntäkantaan sopivat sekvenssit ja jäljelle jääneistä sekvensseistä koottiin yhtenäinen EKP8P6-faagigenomi. Microsoft® Excel® -ohjelmalla (versio 2012) tarkasteltiin Excel-tiedostoon koottua sekvenssidataa ja tarkasteltiin faagin genomikoostumusta. Faagisekvenssin Fasta-tiedostoa analysoitiin RAST-palvelimella (Rapid Annotation using Subsystem Technology, versio 2.0), josta genomien samankaltaisuuksia olemassaoleviin sekvensseihin selvitettiin The SEED Viewer -palvelimella (versio 2.0). Lopuksi suoritettiin BLAST-analyysi (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), jossa RAST-tulosten yhtäläisyyttä verrattiin NCBI-geenikirjastoon (*engl.* National Center for Biotechnology Information).

### 2.2.3 EKP8P6-faagi faagikoktailissa ja eri olosuhteissa

EKP3-kanta altistettiin faagikoktailille (EKP3P1, EKP3P2, EKP3P4, EKP3P5, EKP8P1, EKP8P2, EKP8P3, EKP8P4 ja EKP8P6) kolmessa eri olosuhteessa: 1. +37 °C ja 210 rpm, 2. +37 °C ilman ravistelua, ja 3. RT ilman ravistelua. 20 ml:n putkiin siirrettiin 6 ml LB:tä sekä EKP3-nestekasvatusta 1:100-suhteessa, koska sen pesäkkeitä muodostavien yksiköiden määrä (*engl.* Colony Forming Unit, CFU) oli  $10^8$ . Tämä faagialtistuskoe suoritettiin kolmessa osassa siten, että isäntäbakteereiden suhde infektoiviin faageihin (*engl.* Multiplicity of Infection, MOI) oli 1 (0,125/faagi), 10 (1,25/faagi) ja 100 (12,5/faagi). Vertailukohteena toimi faagikoktaili, johon ei lisätty EKP8P6-faagia. Kutakin nestekasvatusta oli kaikissa kolmessa kasvatusolosuhteessa kahdeksan samanlaista, joiden annettiin kasvaa o/n. Kaikki nestekasvatukset tuoreistettiin LB-liuokseen 1:5-suhteessa ja annettiin niiden kasvaa o/n samoissa olosuhteissa. Jokaisesta nestekasvatuksesta tehtiin puhtasviljelmät LB-maljoille, joista lopulta käynnistettiin tuoret nestekasvatukset. Kun nestekasvatukset olivat kasvaneet o/n, suoritettiin infektiotesti käyttäen kaikkia faagikoktailissa olevia faageja erillisinä tippoina, kuten aikaisemmin (ks. 2.1). EKP3-kannan selviytymistä faagikoktailalitsuksesta tarkasteltiin kokeen jälkeen suoritetuista puhtasviljelmistä. Jos maljoilla havaittiin bakteeripesäkkeitä, oli EKP3 selvinnyt faagialtistuskokeesta. Täten voitiin laskea bakteerille selviytymisprosentit eri olosuhteissa ja eri MOI-käsittelyssä.

### 2.3 Ravinnepitoisuuden vaikutus resistenssiin, kasvuun ja genomiin

Tässä kokeessa käsiteltiin EKP3- ja EKP8-kantoja, sekä niiden faagiresistenttien fenotyyppien isolaatteja. Kaikkia kantoja kasvatettiin 10 % LB-liuoksessa kolmen kuukauden ajan siten, että nestekasvatuksia siirrostettiin tuoreeseen LB-liuokseen kolme kertaa viikossa säännöllisin välein. Tuoreistukset tehtiin 10 % LB:seen 1:10-suhteessa. Kerran viikossa suoritettiin myös faagien EKP3P1, EKP3P2, EKP3P4, EKP3P5, EKP8P1, EKP8P2, EKP8P3 ja EKP8P4 infektiotesti maljaamalla bakteerit LB-kasvatusmaljalle ja lisäten jokaista faagiliuosta tippoina päälle, kuten aikaisemmin (ks. 2.1.).

Kokeen aikana säilöttiin näytteet alkukasvatuksista, resistenssimuutosten ilmetessä, sekä kokeen päätepisteistä pakastamalla 1 ml nestekasvatusta, johon sekoitettiin 300 µl glyserolia (99,5 %; Fisher Bioreagents™). Pakkasnäytteet säilytettiin -80 °C:n lämpötilassa. Taulukossa 2 on esitettynä kokeen vaiheet, joista näytteet otettiin.

Taulukko 2. Bakteerikantojen/-isolaattien näytteet.

Bakteerikanta/-isolaatti	Siirrostusvaihe (#)
EKP3	0
EKP3 s.e	0
EKP3 p.c	0
EKP8	0
EKP8 s.e	0
EKP8 p.c	0
EKP8 s.e	8
EKP8 p.c	23
EKP8 s.e	26
EKP8 s.e	29
EKP8 p.c	29
EKP8 s.e	32
EKP8 p.c	32
EKP3	39
EKP3 s.e	39
EKP3 p.c	39
EKP8	39
EKP8 s.e	39
EKP8 p.c	39

Kasvukäyräanalyysiä varten tehtiin taulukon 2 bakteerinäytteistä puhdasviljelmät, joista aloitettiin o/n nestekasvatukset. Nestekasvatukset tuoreistettiin eppendorf-putkiin 1:10-suhteessa 10 % LB-liuokseen. Laimennetut kasvatukset lisättiin 96-

kuoppalevyille (Sarstedt, Ref# 83.3924) siten, että kutakin rinnakkaisnäytteitä oli kolme, kuten myös negatiivikontrollina toimivaa 10 % LB-kasvatusliuosta. Levyn reunimmaisiiin kuoppiin lisättiin vettä näytteiden haihtumisen estämiseksi. Näytteet ajettiin fotometrillä (Thermo Scientific, Multiskan FC) käyttäen ohjelmaa SkanIt RE 4.1 (Thermo Scientific 2015). Näytteiden absorbanssi 595 nm aallonpituudella mitattiin +37 °C:ssa 5 minuutin välein 20 tunnin ajan. Mittaustuloksena saatiin bakteerien optiset tiheydet (*engl.* Optical density, OD), joiden keskiarvot ja keskihajonnat laskettiin tulosten visualisoimiseen. Tulosten käsittelyssä käytettiin Excel-ohjelmaa. Analyysi suoritettiin myös 100 % LB-liuosta käyttäen tuoreistusvaiheesta lähtien.

Taulukossa 2 mainitut bakteerinäytteet, alkukasvatuksia lukuun ottamatta, analysoitiin lisäksi genomitasolla. Bakteerien DNA:n eristämiseen käytettiin DNeasy® Blood & Tissue -eristyskittiä (QIAGEN, Ref#69505) sekä valmistajan eristysprotokollaa (DNeasy Blood & Tissue -käsikirja 07/2006). Protokollan ohjeista poiketen näytteet eluoiitiin käyttäen PCR-vettä. Eristetyn DNA:n pitoisuudet mitattiin aikaisempaan tapaan Qubit -fluorometrillä (ks. 2.2.2). Näytteet sekvensoitiin ja analysoitiin kuten EKP8P6-faagin DNA-näyte (ks. 2.2.2). Sekvanssidatan käsittely aloitettiin aikaisempaan tapaan QC-raportin tarkastelulla. Trimmauksessa käytettiin raja-arvoa 0,01, mutta DNA-juosteiden 5'-päästä poistettiin 5 bp ja 3'-päästä 10 bp. Alle 30:n bp:n pituiset sekvenssit jätettiin pois laadun parantamisen vuoksi. Referenssisekvenssinä käytettiin jälleen olemassa olevaa EKP8-kannan sekvenssiä. InDels and Structural Variants -työkalun avulla selvitettiin geenimutaatioiden tyypit. Tässä P-arvon raja-arvoksi asetettiin 0,001 ja yhteensopimattomien bp:n maksimiarvoksi 3 bp. Näiden mutaatiotyyppien tarkastelusta suodatettiin myös epäspesifiset, alle 20 bp:n pituiset, sekvenssit tarkkuuden parantamiseksi. Qiagenin CLC -ohjelmasta siirrettiin määritetyt mutaatiot Excel-ohjelmaan. Kunkin mutaation mutaatiotyyppi, hetero-/homogeenisyys ja kohdegeeni oli esitettyinä tapauskohtaisesti. Täten voitiin laskea homogeenisten mutaatioiden osuudet vertaamalla niitä mutaatioiden kokonaismäärään.

## 2.4 EKP3-kannan mutaatioiden tarkastelu faagialtistusten seurauksena

EKP3-kanta altistettiin EKP3P5-faagille 10 % LB-kasvatusliuoksessa, ja se tuoreistettiin neljän vuorokauden välein, yhteensä kolme kertaa 12 vuorokauden aikana. Nämä neljän vuorokauden kasvatusjaksot kuvataan jatkossa vaiheina 1-3. Viimeinen tuoreistus (vaihe 3.) tuoreistettiin 10 % LB:n lisäksi myös 100 % LB:ssä. Altistuskokeessa lisättiin 6,5 ml:aan 10 % LB-liuokseen 5 µl EKP3:n o/n kasvatettua nestekasvatusta ja EKP3P5-faagistokkia  $10^2$  PFU/ml. Seoksen annettiin kasvaa ravistelussa neljä vuorokautta, jonka jälkeen suoritettiin DNA:n eristys ja infektio testi aikaisempaan tapaan (ks. 2.1 ja 2.3). Osa kasvatuksesta siirrettiin tuoreeseen LB-liuokseen 1:10-suhteessa lisäten myös EKP3P5-faagia  $10^2$  PFU/ml. Faagi-bakteeri-seosta kasvatettiin jälleen neljä vuorokautta, minkä jälkeen toistettiin DNA:n eristys ja infektio testit. Kasvatusliuos tuoreistettiin kuten aikaisemmin ja toistettiin samat käsittelyvaiheet neljän vuorokauden kuluttua.

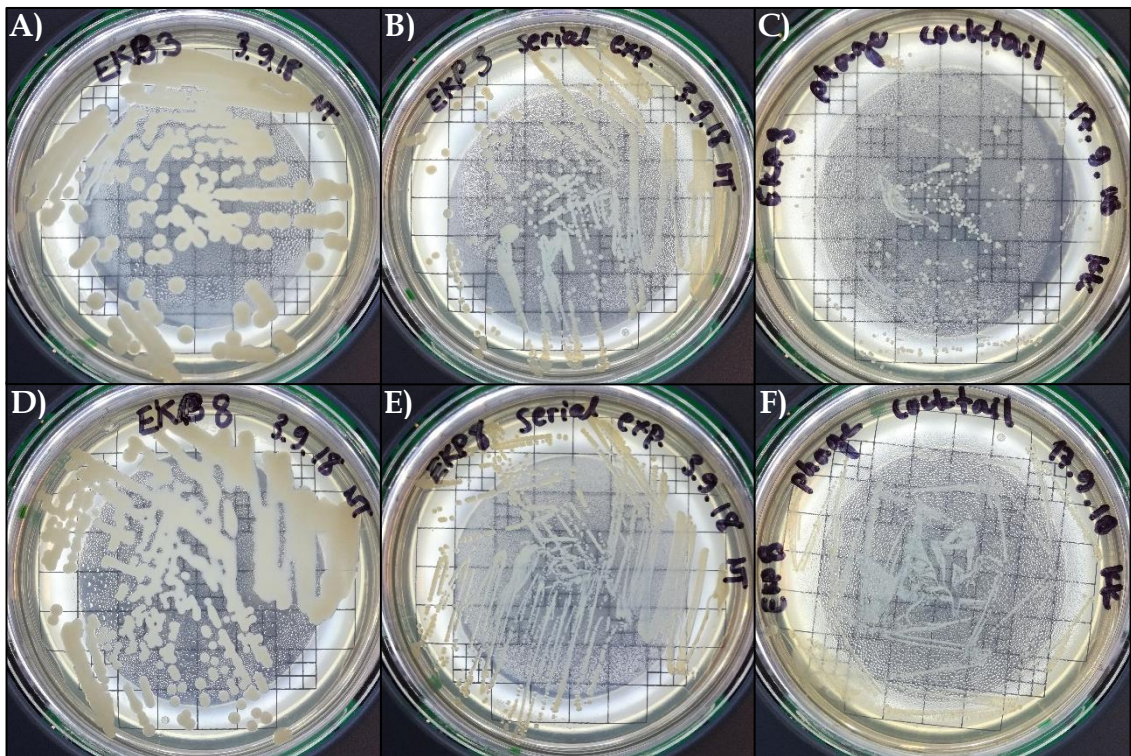
EKP3-kanta altistettiin faagikoktailille (sis. EKP3P1, EKP3P2, EKP3P4, EKP3P5, EKP8P1, EKP8P2, EKP8P3 ja EKP8P4), minkä jälkeen kannan faagiresistenttiyttä tutkittiin infektiokokeiden avulla. 4 ml:n LB-liuokseen lisättiin 1 ml EKP3-kannan o/n kasvanutta nestekasvatusta sekä 5 µl kutakin edellä mainittua faagilistokkia, tiitterien arvoista riippumatta. Kanta kasvatettiin o/n ravistelijalla, minkä jälkeen 100 µl kasvatusta siirrettiin 5 ml:ään tuoretta LB-liuosta. Vuorokauden kuluttua nestekasvatuksista tehtiin puhtasviljelmät, joille tehtiin myöhemmin infektiot, kuten aiemmin.

## 3 TULOKSET

Geneettisesti eroavien EKP3- ja EKP8-kantojen ja niiden faagiresistenttien fenotyyppien, tarkastelun tarkoituksena oli ymmärtää bakteerikantojen ominaisuuksia sekä faagiresistenssin kehittymisen mekanismeja ja vaikutuksia bakteeriin. Aikaisemmassa tutkimuksessa kaksi faagiresistenttiä fenotyyppi-isolaattia oli muodostunut perättäisaltistuksessa (s.e) tai yhdistelmäaltistuksessa



(p.c) kahdeksalle faagille (EKP3P1, EKP3P2, EKP3P4, EKP3P5, EKP8P1, EKP8P2, EKP8P3 ja EKP8P4). Täten faagiresistentin omaavat isolaatit olivat nimetty altistustavan mukaisesti EKP3 s.e, EKP3 p.c, EKP8 s.e ja EKP8 p.c. Käsittelyssä olleiden bakteerien kasvussa havaittiin eroavaisuuksia, sillä alkuperäisten EKP3- ja EKP8-kannan puhtasviljelmässä muodostama pesäkkeet olivat selkeästi suuremmat kuin niiden resistenttien isolaattien (Kuva 4). Bakteerien pesäkekoot erosivat toisistaan resistenssiominaisuuksien mukaisesti, sillä faageille perättäisaltistetut kannat olivat pesäkekooltaan pienempiä kuin yhdistelmäaltistettujen kantojen pesäkkeet (Kuva 4). Myös bakteerien nestekasvatusten liuossameudet erosivat toisistaan, erityisesti 10 % LB-kasvatusliuoksessa. Bakteereja pyrittiin kuitenkin siirrostamaan aina sama määrä.



Kuva 4. Bakteerikantojen puhtasviljelmät. EKP3- ja EKP8-kantojen, sekä niiden mutanttien isolaattien puhtasviljelmät LB-kasvatusmaljoilla eroavat toisistaan pesäkokojen osalta. Maljoilla bakteerikannat seuraavasti: (A) EKP3, (B) EKP3 s.e, (C) EKP3 p.c, (D) EKP8, (E) EKP8 s.e, (F) EKP8 p.c.

Villityypin bakteerikantojen genomit olivat jo ennestään sekvensoitu (Liite 1). Alkuperäisten mutanttien geenimutaatioiden määrät vaihtelivat faagialtistuksista johtuen (Liite 1). EKP3 s.e:n ja EKP3 p.c:n mutaatioita oli huomattavasti enemmän

kuin EKP8:n resistenteillä fenotyypeillä. Mutaatiot olivat yhden nukleotidin muutoksia (*engl.* Single nucleotide variation; SNV) eli pistemutaatioita, ja deleetioita, jotka vaikuttivat etenkin EKP3:n mutanteissa kahden tai kolmen proteiinin aminohappokoostumukseen (Liite 1). Näitä sekvenssejä hyödynnettiin uusien mutaatioiden selvittämisessä (ks. 3.4.3 ja 3.5).

### 3.1 Faagilysaattien tiitterit

Tuoreistettujen faagiliuosten tiitterit laskettiin käyttämällä kaavaa 1. Taulukossa 3 on listattu käytettyjen faagistokkien tiitterit.

Taulukko 3. Faagiliuosten isäntäbakteerit ja tiitterit.

Faagilysaatti	Isäntäbakteeri	Tiitteri (PFU/ml)
EKP3P1	EKP3	$1,9 \times 10^{11}$
EKP3P2	EKP3	$6,1 \times 10^{10}$
EKP3P4	EKP3	$2,6 \times 10^9$
EKP3P5	EKP3	$1,4 \times 10^{10}$
EKP8P1	EKP8	$2,1 \times 10^7$
EKP8P2	EKP8	$1,7 \times 10^7$
EKP8P3	EKP8	$8,5 \times 10^7$
EKP8P4	EKP8	$7,9 \times 10^7$

Faagien infektiokyky tarkistettiin ennen faagialtisuuskokeita, jotta voitiin seurata faagiresistenssissä tapahtuvia muutoksia. Infektiokokeen tuloksista nähdään, kuinka tuoreistetut faagit infektoivat EKP3- ja EKP8-kantoja, mutta faagiresistentin omaavat EKP3 s.e:n ja EKP8 s.e:n olivat alttiita ainoastaan EKP3P1-faagille (Kuva 5). EKP3 p.c ja EKP8 p.c isolaatit olivat yhä näille kahdeksalle faagille resistenttejä (Kuva 5). Testissä havaittuja plakkeja ympäröi noin 4–10 mm leveät renkaat (ns. halot).

Bakteerit	Faagit							
	EKP3P1	EKP3P2	EKP3P4	EKP3P5	EKP8P1	EKP8P2	EKP8P3	EKP8P4
EKP3								
EKP3 s.e								
EKP3 p.c								
EKP8								
EKP8 s.e								
EKP8 p.c								

Kuva 5. Faagien infektiokyky bakteerikannoissa. Kuvassa harmaalla on esitettyä faagi-infektiokyky bakteerikantoja vastaan. Tuoreistettujen faagiliuosten infektiokykyä tarkasteltaessa huomataan, kuinka vain EKP3 p.c ja EKP8 p.c olivat resistenttejä jokaiselle faagille, toisin kuin EKP3 ja EKP8. Ainoastaan EKP3P1-faagikeni infektoimaan EKP3 s.e:n ja EKP8 s.e:n.

### 3.2 Uusien faagien karakterisointi

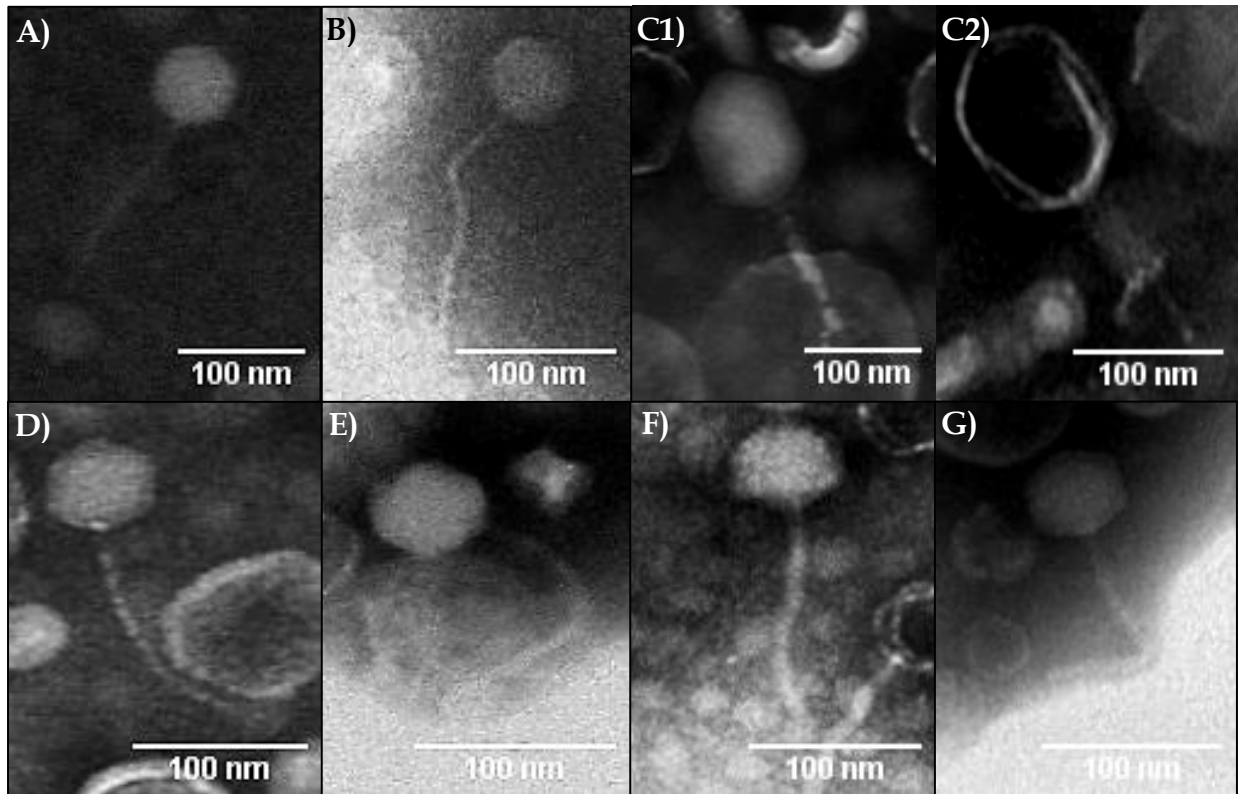
Jokaiselle EKP3- ja EKP8-kannalle eristettiin jätevedestä infektoivia faageja, joiden morfologiaa ja infektiokykyä bakteereissa tutkittiin. Faagien isäntäbakteerit, tiitteri sekä kapsidien koot ovat esitettyinä taulukossa 4. EKP3P8 ja EKP8P8 faagilysaattien TEM-kuvista havaittiin eri kokoisia faageja. Tietyn kokoiset faagit kuvastavat profaageja, jotka ovat monistuneet isäntäbakteereissa jätevedestä eristetyn faagin rikastamisen yhteydessä. Vain yhden kokoiset faagit ovat näin ollen peräisin jätevedestä ja muut poikkeavat faagit ovat isäntäbakteerin omia profaageja. EKP3P8 oli labiili faagi, joka oli herkkä normaalille käsittelylle, ja aiheutti ongelmia tiitterin määrittämisessä. Kun faagistokkia ei sekoitettu vorteksoimalla saatiin lopulta faagilysaatille tiitteri määriteltyä, mikä oli huomattavasti pienempi kuin muiden faagien.

Taulukko 4. Uusien faagien profiili.

Faagilysaatti	Isäntäbakteeri	Tiitteri (PFU/ml)	Kapsidin koko (nm)
EKP3P6	EKP3 p.c	$4,4 \times 10^9$	60,1
EKP3P7	EKP3 s.e	$1,5 \times 10^{10}$	49,3
EKP3P8*	EKP3	$5 \times 10^4$	50,0; 59,1; 80,3
EKP8P6	EKP8 p.c	$5,4 \times 10^{10}$	56,1
EKP8P7	EKP8	$5,1 \times 10^8$	58,1
EKP8P8*	EKP8 s.e	$7,2 \times 10^{10}$	32,6; 52,5

\*Useampi faagi

Faagit värjättiin PTA-negatiiviväriaineella, joka värjäsi faagien taustan tummaksi. TEM-kuvantamisessa elektronien läpivirtaus faaginäytteistä saa aikaan yhdessä PTA:n avulla massatiheyseroja. Tämä nähtiin kontrastieroina, joiden vuoksi faagit erottuivat vaaleina rakenteina (Kuva 6). Kuvien avulla mitattiin faagikapsidien halkaisijat ja tarkasteltiin faagilysaatissa olleiden eri faagien esiintyvyyttä. Faagit osoittautuivat morfologiansa perusteella *Siphoviridae*-heimon kaltaisiksi. EKP3P8:n yhteydessä havaittiin myös morfologisesti eroava mahdollinen *Myoviridae*-heimon kaltainen faagi (Kuva 6C).



Kuva 6. Faagien morfologinen karakterisointi. Uudet eristetyt faagit karakterisoitiin TEM-kuvien perusteella kapsidin koon ja ulkomuodon avulla. (A) EKP3P6, 60 nm; (B) EKP3P7, 49 nm; (C1-2) EKP3P8 profaagi, 80 nm; (D) EKP3P8, 50 nm ja 59 nm; (E) EKP8P6, 56 nm; (F) EKP8P7, 58 nm; (G) EKP8P8, 33 nm ja 53 nm. Eristetyt faagit osoittivat yhtäläisyyttä *Siphoviridae*-heimoon ja C1-C2 kuvien faagit puolestaan *Myoviridae*-heimon kanssa.

Faagien kykyä infektoida eri kantoja tutkittiin maljaamalla faageja yhdessä bakteeri-isolaattien kanssa. Tulokset osoittivat, kuinka eristetyt faagit kykenivät infektoimaan isäntäbakteerinsa lisäksi toista *K. pneumoniae* -kantaa (Kuva 7). Myös EKP3- ja EKP8-kannan faagiresistenttejä isolaatteja infektoivia faageja esiintyi uusien faagien joukossa (Kuva 7). EKP8P6-faagi kykeni infektoimaan kaikkia käsittelyssä olleita bakteereita, paitsi EKP3:a ja EKP3 s.e:tä. Faagin kyky infektoida EKP3 p.c:tä johtuu mahdollisesti bakteerin mutaatioista, joita ei ole villityypin EKP3:ssa tai edes EKP3 s.e mutantissa. EKP8P6-faagia tutkittiin tarkemmin, jotta voitiin ymmärtää, mistä infektoerot voisivat johtua (ks. 3.2.1 ja 3.3).

Bakteerikannat/ isolaatit	Faagit					
	EKP3P6	EKP3P7	EKP3P8	EKP8P6	EKP8P7	EKP8P8
EKP3						
EKP3 s.e						
EKP3 p.c						
EKP8						
EKP8 s.e						
EKP8 p.c						

Kuva 7. Uusien faagien infektiokyvyn määrittäminen. Eristettyjen faagien isäntäkirjo määritettiin tippatestillä. Tuloksista havaittiin, kuinka faagit infektoivat (kuvattu harmaalla) useampaa isäntämuotoa. EKP3P7-faagi erottui muista, sillä se kykenee infektoimaan vain resistenttejä mutanteja (s.e ja p.c).

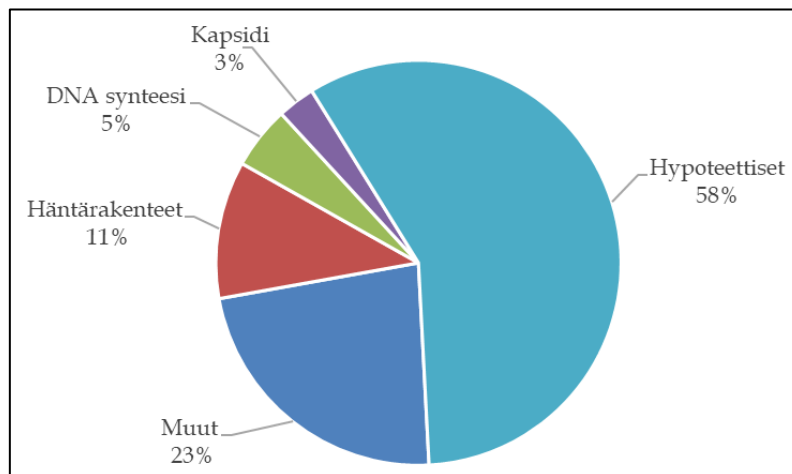
### 3.2.1 EKP8P6:n genomiset ominaisuudet

Erityisen mielenkiintoiseksi osoittautunut EKP8P6-faagi sekvensoitiin, jotta voitiin tarkastella sen geneettistä koostumusta ja samankaltaisuuksia aiemmin sekvensoituihin faageihin. Faagigenomin eristymisen vaatimuksena oli, että eristettävän faagilysaatin tiitteri olisi  $10^6$ – $10^{10}$  PFU/ml, joten EKP8P6:n  $10^{10}$  PFU/ml tiitteri sopi juuri tarkasteluvälille. Eristysprotokollan perusteella genomi oli dsDNA:ta, ja Qubit-mittauksen tuloksena sen pitoisuudeksi saatiin 22,4 ng/ $\mu$ l. Koodaavien geenien osalta EKP8P6 oli 46,6 % samankaltainen enterobakteerifaagin T1 ja sen kaltaisen luokittelemattoman TLS-faagin kanssa. Kolmanneksi samankaltaisin faagi oli myös T1-faagin kaltainen RTP-faagi, joka puolestaan oli geenien perusteella 39,7 % yhtenevä. RAST-analyysin perusteella nämä prosentiosuudet, kuten myös samankaltaisten faagien sekvenssien koko, saatiin määritettyä (Taulukko 5). Vertailun vuoksi suoritettu BLAST-analyysi puolestaan osoitti, kuinka EKP8P6-faagin genomi oli samankaltainen monen muun *Klebsiella*-faagin kanssa. Prosentuaalisesti sekvenssisamankaltaisuudet olivat yli 95 % 17:lla eri *Klebsiella*-faagilla, mikä on selkeästi suurempi kuin RAST-geenikirjaston faageilla.

Taulukko 5. EKP8P6-faagin ja genomiltaan samankaltaisten faagien profiili.

	EKP8P6	T1	Luokittelematon T1:n kaltainen, TLS	Luokittelematon T1:n kaltainen, RTP
<b>Heimo</b>	<i>Siphoviridae</i>	<i>Siphoviridae</i>	<i>Siphoviridae</i>	<i>Siphoviridae</i>
<b>Genomi</b>	dsDNA	dsDNA	dsDNA	dsDNA
<b>Sekvenssin koko (bp)</b>	47 769	48 836	49 902	46 219
<b>GC:n osuus (%)</b>	51,1	-	-	-
<b>Koodaavia geenejä</b>	73	78	87	75

EKP8P6-faagin ennustetuista geeneistä 58 % koodaavat hypoteettisia proteiineja ja 23 % muita faagin proteiineja (Kuva 8).



Kuva 8. EKP8P6-faagin koodaavien geenien osuus ja funktio. Tässä kuvassa on esitetty sektorikaavio, jossa kukin väri kuvastaa faagin koodaavien geenien kategorian. Hypoteettisia proteiineja koodaavia geenejä oli eniten (58 %), toisin kuin muita (23 %), häntärakenteen (11 %), DNA synteessin (5 %) ja kapsidin proteiineja (3 %) koodaavia oli huomattavasti vähemmän.

### 3.3 EKP8P6-faagin infektiokyky faagikoktailissa

EKP3-kanta käsiteltiin kahdella eri faagikoktaililla, jotka sisälsivät faagit EKP3P1, EKP3P2, EKP3P4, EKP3P5, EKP8P1, EKP8P2, EKP8P3 ja EKP8P4. Toiseen koktailiin oli lisätty myös EKP8P6-faagi (+). Kokeessa bakteerit altistettiin faageille eri

olosuhteissa (A=+37 °C, 210 rpm; B= +37 °C ja C=RT). Altistuskokeista maljattiin näytteitä, jotta voitiin replikaattien avulla laskea elävien bakteerien osuudet. Kaikissa olosuhteissa MOI:n kasvaessa bakteerien selviytymisprosentti parani huomattavasti (Taulukko 6). Vain RT:ssä kasvatetut EKP3:n kasvatukset selvisivät MOI:sta riippumatta (Taulukko 6).

Taulukko 6. EKP3:n selviytyminen faagikoktail altistuksessa eri olosuhteissa.

MOI	Selviytymisprosentti (%)					
	A	A+	B	B+	C	C+
1	50	37,5	37,5	37,5	100	100
10	100	62,5	87,5	100	100	100
100	100	100	100	100	100	100

A=faagikoktail, +37 °C, 210 rpm

B= faagikoktail, +37 °C

C= faagikoktail, RT

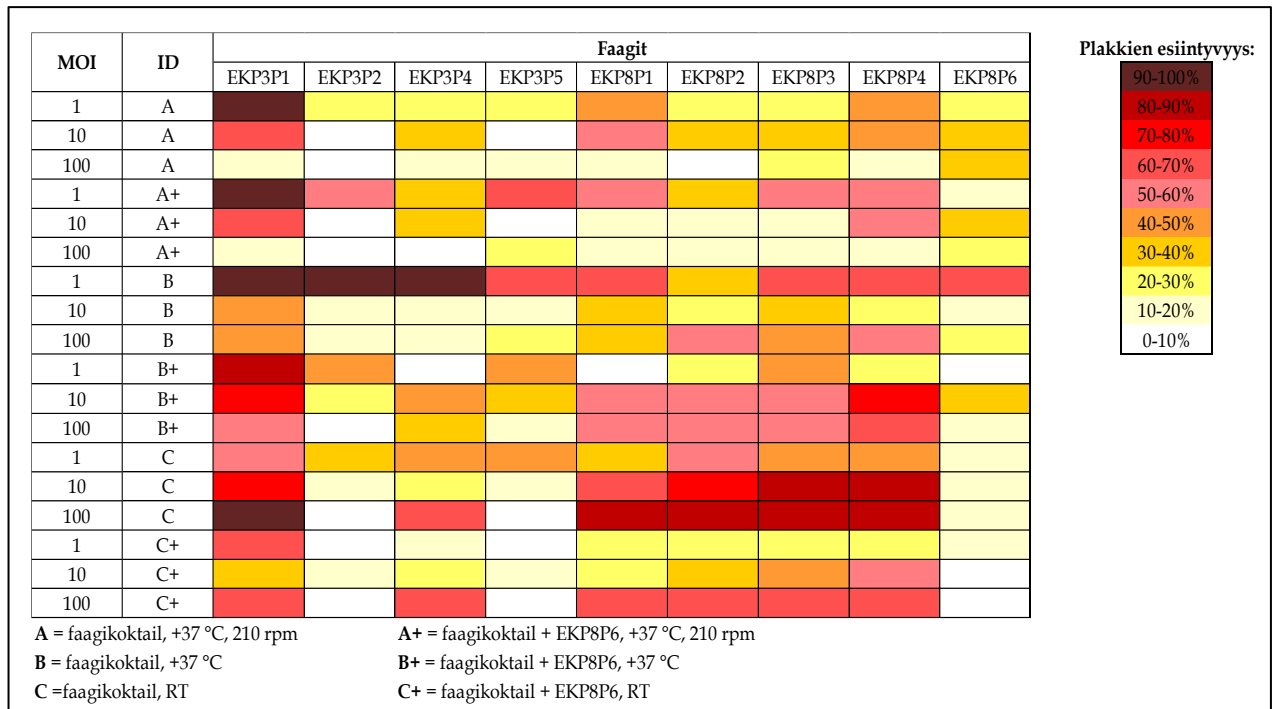
A+= faagikoktail + EKP8P6, +37 °C, 210 rpm

B+= faagikoktail + EKP8P6, +37 °C

C+= faagikoktail + EKP8P6, RT

Faagikoktailikäsitteystä selvinneet bakteerit altistettiin maljalla eri viruksille yksitellen, jotta voitiin tarkastella faagiresistenssien kehittymistä eri olosuhteissa (Kuva 9). Faagien infektiivisyyttä tarkasteltiin muodostuneiden plakkien avulla. Plakkien prosentuaaliset esiintyvyydet A-, B- ja C- olosuhteissa määritettiin kunkin kasvuolosuhteen nähden erikseen laskemalla infektoitujen maljojen osuudet maljojen kokonaismäärästä (Kuva 9). EKP3P1-faagin infektiokyky oli muihin faageihin verrattuna runsaampaa plakkien esiintyvyyksiä vertailtaessa. Olosuhteista ja faagikoktailkoostumuksesta huolimatta EKP3P1 infektoi tehokkaasti. Faagikoktailkäsitteelyn jälkeen EKP3-bakteerit herkistyivät EKP8P6-faagille.





Kuva 9. Infektioestien plakkiesiintymät. Faagikoktailaltistuksen jälkeen suoritetun infektioestien tulokset ovat esitettynä lämpökartan avulla. Kokeen olosuhteet ovat esitettynä kirjaimin A-C ja faagikoktailiin lisätty EKP8P6-faagi +-merkillä. Plakkien prosentuaalinen määrä eri MOI:ssa on kuvattuna väripalkeilla infektioestimaljojen määrän suhteen. Ennen koetta EKP3 oli resistentti vain EKP8P6-faagille, mutta faagien infektiivisyys muuttui faagikoktailin vaikutuksesta.

Faagien infektiivisyydessä tapahtuvia muutoksia tarkasteltiin tarkemmin EKP8P6-faagin kannalta. Yksittäisten faagien altistuskokeen tuloksena selvisi, kuinka EKP8P6 muuttui infektoivaksi faagiksi, kun EKP3 oli kehittynyt resistentiksi EKP8P3:a vastaan (Kuva A, Liite 2). Vastaavasti EKP8P6:n ollessa infektiokyvytön, muut faagikoktailin faagit olivat vaihtelevasti infektoivia, mukaan lukien EKP8P3 (Kuva B, Liite 2).

### 3.4 Faagiresistentin fenotyypin muutokset alhaisessa ravinnepitoisuudessa

Bakteerien sopeutumista alhaisempaan ravinnepitoisuuteen tarkasteltiin koeasetelmalla, jossa bakteerit kasvatettiin 100 % LB:n sijaan 10 % LB:ssä. Tulosten perusteella EKP3- ja EKP8-kannat eroavat toisistaan sopeutumisenopeuden ja faagiresistensseissä tapahtuvien muutosten osalta, kuten myös genomitason mukautumisen suhteen.

### 3.4.1 Faagiresistenssimuutokset alhaisessa ravinnepitoisuudessa

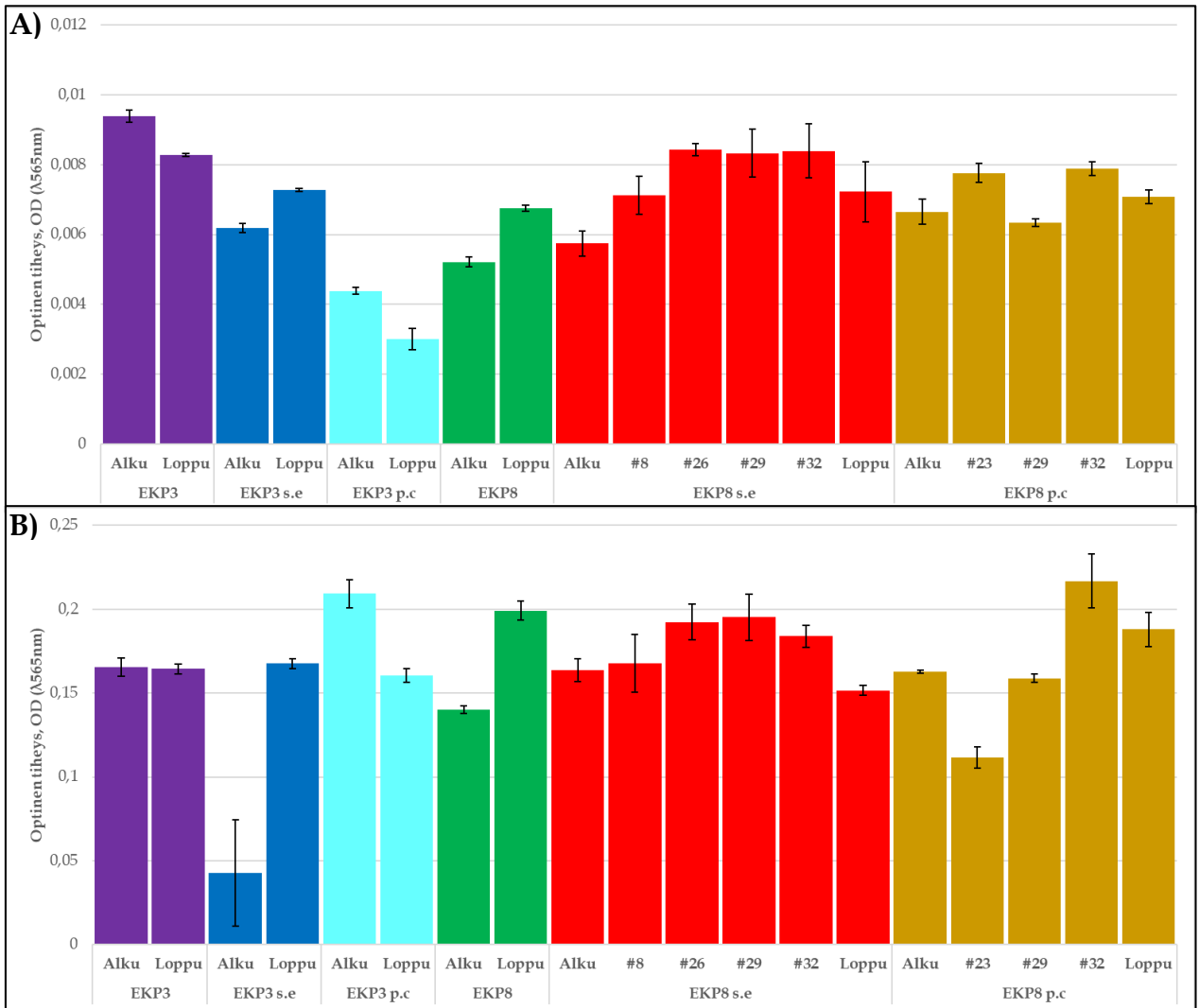
Ravinnepitoisuuden ollessa 10 % huomattiin, kuinka kolmen kuukauden aikana viikoittain suoritetuissa infektiokokeissa bakteerikannat menettivät paikoin resistenssiominaisuuksiaan (Kuva 10). EKP3:n, EKP3 s.e:n ja EKP3 p.c:n resistensseissä ei ilmennyt selkeitä muutoksia, mutta EKP3 s.e:n loppuvaiheessa havaittiin pieniä muutoksia (Kuva 10). Sen sijaan EKP3-bakteerien kasvu heikkeni ajan mittaan huomattavasti. EKP8-kannan resistenteillä fenotyypeillä EKP8 s.e ja EKP8 p.c havaittiin jo kokeen alkuvaiheessa faagiresistentin katoamista tiettyjä faageja vastaan, minkä jälkeen resistenttikyky heikkeni viikoittain lisää (Kuva 10). Näiden kahden mutantin resistensseissä oli myös jatkuvaa vaihtelua, sillä eri aikapisteissä niiden havaittiin joko menettäneen tai saaneen resistenssin tiettyä faagia vastaan (Kuva 10). EKP8 s.e mutantti reagoi #29 siirrostusvaiheen jälkeen EKP3P2-faagiliuokseen muodostaen tiheämmän biofilmin lisätyn faagilysaatin kohdalla.

Bakteerit	Siirrostusvaihe	Faagit							
		EKP3P1	EKP3P2	EKP3P4	EKP3P5	EKP8P1	EKP8P2	EKP8P3	EKP8P4
EKP3	Alkukasvatus								
	Loppukasvatus								
EKP3 s.e	Alkukasvatus								
	Loppukasvatus								
EKP3 p.c	Alkukasvatus								
	Loppukasvatus								
EKP8	Alkukasvatus								
	Loppukasvatus								
EKP8 s.e	Alkukasvatus								
	#8								
	#26								
	#29								
	#32								
	Loppukasvatus								
	Loppukasvatus								
EKP8 p.c	Alkukasvatus								
	#23								
	#29								
	#32								
	Loppukasvatus								

Kuva 10. Faagiresistenssin muuntuminen alhaisessa ravinnepitoisuudessa. Kuvassa on esitetty, kuinka tarkastelussa olevat EKP3- ja EKP8-kannat ja niiden isolaatit menettivät vaihtelevasti faagiresistenssin kolmen kuukauden aikana tietyillä siirrostusvaiheissa. Harmaalla värillä on esitettyä infektiotestissä havaitut kirkkaat plakit, keltaisella värillä haaleat plakit, joissa oli vähäistä bakteerikasvustoa. Sinisellä värillä on kuvattuna bakteerin runsastunut kasvu faagiliuoksen vaikutuksesta.

### 3.4.2 Kasvukäyräanalyysit eri ravinnepitoisuuksissa

Ravinnepitoisuuksien vaikutusta bakteerien kasvutiheyteen tarkasteltiin kolmen kuukauden kestäneen kokeen eri vaiheiden bakteerikasvatuksia 10 % LB-liuoksessa sekä 100 % LB-liuoksessa. Bakteerit kasvavat selvästi hitaammin 10 % LB:ssä kuin 100 % LB:ssä (Kuva 11). Kuvasta 11 nähdään, kuinka EKP3:n ja EKP3 p.c:n kasvu hidastui 10 % LB:ssä, kun taas muut bakteerit sopeutuivat ravinteiden alenemiseen tehokkaasti. EKP8 s.e:n ja EKP8 p.c:n faagiresistenssien menettämisen tuloksena bakteerien kasvussa on havaittavissa pientä vaihtelua, joka nähdään kasvunopeudessa niin 10 % kuin 100 % LB:ssä (Kuva 11).



Kuva 11. Ravinnepitoisuuden vaikutus bakteerikasvuun. Kuvaajat esittävät bakteerien keskimääräistä tiheyttä 10 % ravinnepitoisuuskokeen eri vaiheissa (A) 10 % LB-liuoksessa ja (B) 100 % LB-liuoksessa. A-kuvasta nähdään, kuinka 10 % LB:ssä kasvatettujen bakteerien kasvutiheydet pysyivät erittäin alhaisina 10 % LB-mittauksessa. B-kuvassa ilmenee, kuinka 10 % LB:ssä kasvatetut bakteerit tehostavat biomassan muodostamista ravinnepitoisuuden ollessa 100 %. Kukaan bakteeri on kuvattuna eri värein suhteessa optiseen tiheyteen (OD), joka mitattiin aallonpituudessa 565 nm. Keskihajonnan avulla lasketut virhearvot on asetettu virhepalkkeihin, joiden avulla nähdään kolmen replikaatin välinen vaihtelun suuruus.

### 3.4.3 Genotyypimuutokset alhaisessa ravinnepitoisuudessa

Bakteerien genomien mukautuminen alhaiseen ravinnepitoisuuteen analysoitiin vertailemalla kokeen bakteerikasvatusten DNA-sekvenssejä alkuperäisten EKP3- ja EKP8-kantojen, sekä niiden mutanttien sekvensseihin. Eristetyt DNA-näytteet sekvensoitiin, joiden avulla tarkasteltiin bakteerien genotyypimuutoksia

faagittomassa ja niukkaravinteisessa ympäristössä (Taulukko 7, Liite 3). Alhainen ravinnepitoisuus lisäsi mutaatioiden määrää etenkin EKP3:ssa ja sen mutanteissa verrattuna bakteerien alkuperäisiin sekvensseihin (Taulukko 7). Suurin osa mutaatioista olivat SNV:stä ja useamman nukleotidin muutoksista (*engl.* Multiple nucleotide variation; MNV) johtuvia. Huomiota herättävä muutos kohdistui EKP8 s.e:n, jossa koko bakteeripopulaatiolla ilmenevät eli homogeeniset mutaatiot olivat runsaita kokeen alkuvaiheesta lähtien, mutta loppuvaiheen DNA-sekvenssissä mutaatioita ei ollut havaittavissa (Taulukko 7). Laajemmat mutaatiot, kuten insertiot, deleetiot ja genomien pienalueiden korvautumiset, olivat määrällisesti vähäisempiä, mutta vaikutukseltaan suurempia syntetisoituvan proteiinin koostumuksen kannalta (Taulukko 7). Suurin osa mutaatioista kohdistui rRNA:ta koodaaviin geneihin, mutta myös metaboliaan vaikuttavissa ja stressivasteen geneissä esiintyi lukuisia muutoksia (Liite 3). EKP8 p.c:n loppuvaiheen DNA sekvenssejä ei saatu tarkasteltavaksi liian suuren näytemäärän vuoksi. EKP3:n CRISPR-lokuksissa ei havaittu muutoksia.

Taulukko 7. Bakteerinäytteiden DNA:n pitoisuudet ja mutaatioiden esiintyminen faagittomassa ja niukkaravinteisessa ympäristössä.

Bakteerikanta/ isolaatti	Siirrostusvaihe	DNA- pitoisuus (ng/μl)	Mutaatioiden määrät (homogeeniset)					Homotsygoottien osuus (%)
			Mutaatiotyypit				Korvike	
			SNV	MNV	Insertio	Deleetio		
EKP3	Loppu	28	69 (5)	19 (9)	8 (1)	11 (5)	7 (4)	21
EKP3 s.e	Loppu	31	47 (9)	11 (7)	14 (1)	16 (6)	8 (8)	32
EKP3 p.c	Loppu	18	56 (31)	25 (19)	16 (3)	22 (13)	18 (16)	60
EKP8	Loppu	33,2	6 (0)	6 (2)	2 (0)	6 (2)	1 (0)	19
EKP8 s.e	#8	33,2	4 (4)	4 (4)	5 (2)	3 (3)	5 (4)	81
	#26	25	8 (6)	10 (10)	9 (6)	4 (4)	5 (5)	86
	#29	20,1	7 (4)	8 (7)	9 (4)	4 (3)	5 (5)	70
	#32	21,1	11 (9)	12 (11)	10 (4)	3 (3)	6 (5)	76
	Loppu	15,6	0	0	0	0	0	0
EKP8 p.c	#23	19	6 (1)	4 (4)	3 (0)	2 (1)	0	40
	#29	30,2	7 (2)	5 (3)	5 (2)	1 (1)	1 (0)	42
	#32	25	9 (2)	6 (2)	5 (0)	1 (0)	3 (0)	17
	Loppu*	34,3	-	-	-	-	-	-

SNV: yhden nukleotidin muutos

MNV: useamman nukleotidin muutos

\*: Sekvenssidata puuttuu

### 3.5 EKP3-kannan faagiresistenssin kartoitus

Faagiresistenssin muodostumista EKP3-kannassa analysoitiin kahdella eri koeasetelmalla: EKP3P5-faagialtistuksen ja faagikoktailaltistuksen (EKP3P1, EKP3P2, EKP3P4, EKP3P5, EKP8P1, EKP8P2, EKP8P3 ja EKP8P4) avulla. EKP3P5:n altistuskokeet olivat vaiheittaisia. Kukin vaihe koostui neljän vuorokauden faagialtistusjaksosta, minkä jälkeen osa nestekasvatuksesta siirrettiin tuoreeseen 10 % LB-liuokseen ja altistettiin tuoreelle EKP3P5-faagilysaatille. Faagikoktailaltistuksen tarkoituksena oli kehittää faagiresistentti EKP3 p.c. isolaatti. Faagiresistenssin kehittymistä tarkasteltiin yksittäisten faagien altistuskokeiden ja sekvensoinnin avulla.

EKP3P5-faagin altistuskokeessa ensimmäisen vaiheen kasvatus kehittyi resistentiksi EKP3P2-, EKP3P5- ja EKP8P3-faageille, mikä saattaa johtua näiden faagien samankaltaisuuksista (Kuva 12). Ensimmäisen vaiheen kasvatus sopeutui kasvamaan EKP3P5 ja EKP8P3 lyaattien joukossa kasvaen niissä tehokkaammin, mikä havaittiin runsaampana biomassana (Kuva 12). Ensimmäisen tuoreistuksen jälkeen toisen vaiheen kasvatus oli kehittynyt resistentiksi EKP8P1-faagille ja heikensi EKP3P4:n infektiokykyä (Kuva 12). Kolmannen vaiheen tuoreistukset tehtiin 10 % ja 100 % LB-liuokseen. EKP3 kasvoi kummassakin kasvatusliuoksessa samalla tavalla, mutta EKP3P4:n muodostamia plakkeja ei havaittu ollenkaan 100 % LB-kasvatuksesta. EKP3P5-lysaatti ei myöskään tehostanut bakteerin kasvua 100 % LB:ssä, toisin kuin alhaisessa ravinnepitoisuudessa (Kuva 12). Kolmannen vaiheen muutokset olivat paikoin yhteneviä, sillä EKP3P2-lysaatin kohdalla EKP3 kasvoi runsaammin ja EKP8P2-faagin infektiokyky oli palautunut. (Kuva 12).

EKP3-kannan kehittäminen alkuperäisen EKP3 p.c:n kaltaiseksi ei toteutunut odotusten mukaisesti. Faagikoktailaltistuksen jälkeen suoritetun infektiotestin perusteella mutantti ei kyennyt kehittämään resistenssiä EKP3P1-faagia vastaan (Kuva 12).

Bakteerit	Faagit							
	EKP3P1	EKP3P2	EKP3P4	EKP3P5	EKP8P1	EKP8P2	EKP8P3	EKP8P4
1. vaiheen EKP3								
2. vaiheen EKP3								
3. vaiheen EKP3, 10%								
3. vaiheen EKP3, 100%								
Uusi EKP3 p.c								

Kuva 12. EKP3-kannan faagiresistenssin kehitys faagialtistuskokeiden jälkeen. EKP3-kannan kaksi eri koasetelmaa kuvastavat, kuinka EKP3P5-faagi ja faagikoktaili vaikuttavat bakteerin faagiresistenssin kehittymiseen. Kuvassa harmaat palkit osoittavat faagi-infektioita, keltainen heikkoa infektiota ja sininen runsaampaa bakteerikasvustoa faagilysaatista johtuen. Vaiheittaisen kokeen eri kasvatukset kehittyivät hyvin faagiresistenteiksi EKP3P5 altistuksen tuloksena, paitsi faageille EKP3P1, EKP8P2 ja EKP8P4. Uusi EKP3 p.c mutantti ei kyennyt mukautumaan kaikille faagikoktailin faageille, joten se ei ollut alkuperäisen EKP3 p.c:n kaltainen.

Käsiteltyjä EKP3-kasvatuksia tarkasteltiin myös eristettyjen DNA-näytteiden avulla, jotka sekvensoitiin mutaatioiden selvittämiseksi (Taulukko 8, Liite 4). Vaiheittaisessa kokeessa bakteeripopulaatioissa esiintyvien homogeenisten mutaatioiden osuudet olivat 28 %, kun taas uudessa EKP3 p.c:n mutantissa osuus oli 52 % (Taulukko 8). Molemmissa kokeissa SNV-mutaatioita olivat yleisimmät, kun taas deleetioita ja korvautumisia oli määrällisesti vähiten (Taulukko 8).

Taulukko 8. EKP3-kannan mutaatioiden määrät faagialtistusten tuloksena.

Bakteerinäyte	DNA:n pitoisuus (ng/ul)	Mutaatioiden määrät (homogeeniset)					Homotsygoottien osuus (%)
		Mutaatiotyypit					
		SNV	MNV	Insertio	Deleetio	Korvike	
1. vaiheen EKP3	23,6	68 (15)	6 (3)	8 (2)	7 (4)	3 (2)	28
3. vaiheen EKP3	23,2	11 (2)	3 (1)	5 (0)	1 (1)	5 (3)	28
Uusi EKP3 p.c	24,6	45 (19)	25 (16)	12 (7)	14 (7)	10 (6)	52

SNV: yhden nukleotidin muutos

MNV: useamman nukleotidin muutos

Koodaaviin geeneihin kohdistuneet mutaatiot olivat runsaimmat EKP3:n vaiheen 1. kasvatuksessa ja vähäisimmät vaiheen 3. kasvatuksessa (Liite 4). Uuden EKP3 p.c:n geenimutaatioita ilmeni myös huomattavasti vähemmän, kuin EKP3P5-faagin altistuskokeen 1. vaiheessa, vaikka faagipaine oli runsaampi (Liite 4). Osa mutaatioista sijoittui geeneihin, jotka koodaavat kolaanihapon biosynteesin UDP-glukoosilipidikantajan transferaasia, NAD(P)H-flavinioksidoreduktaasia ja

rRNA:ta (Liite 4). Alkuperäisessä EKP3 s.e mutantissa esiintyi myös samanlaisia mutaatioita kolaanin biosynteesin UDP-glukoosilipidikantajan transferaasin geenissä. Hypoteettisia proteiineja koodaavat geenit mutatoituvat vain vaiheen 1. kasvatuksessa (Liite 4). Faagialtistuskokeilla ei ollut vaikutusta EKP3:n CRISPR-lokuksiin.

## 4 TULOSTEN TARKASTELU

Antibioottiresistenttien bakteri-infektioiden hoitamiseen käytettyjen faagien karakterisointi ja infektiokyvyn määrittäminen eri bakterikannoissa ovat oleellisia osia faagiterapian toimivuuden kannalta. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää käsittelyssä olleiden *K. pneumoniae* -bakteerilajin kahden kannan faagiresistenssin kehittymismekanismia eri olosuhteissa. Kokeiden avulla voitiin muodostaa yleiskuva EKP3- ja EKP8-kannan faagialttiudesta sekä faagiresistenssin kehittymisen tehokkuudesta, että sen menettämisestä. Nenäinniemen jätevesipuhdistamon jätevedestä aikaisemmin eristetyt sekä uudet, vasta rikastetut, faagit muodostavat faagikirjaston näille *K. pneumoniae* -kannoille. Näiden faagien avulla voitiin tarkastella muun muassa uuden faagikoktailseoksen infektiotehokkuutta ja resistenssin muodostumista.

### 4.1 Bakterikantojen ja isolaattien erot

Bakteerien normaalikasvu edellyttää muun muassa sopivien ravinteiden saantia tietyssä pH:ssa ja oikean kasvulämpötilan (Ratkowsky ja Ross 1995). Laboratoriokokeissa kasvuolosuhteita voidaan säädellä sopiviksi bakteerien kasvuvaatimusten mukaisesti ja niiden ääri rajojen selvittämiseksi yhdessä ulkopuolisten häiriötekijöiden, kuten faagien, kanssa. Tarkastelussa olleiden *K. pneumoniae* -bakteerilajin eri kantojen ja niiden resistenttien isolaattien bakterikasvustot erosivat toisistaan morfologisesti sekä genomien perusteella (Kuva 4, Liite 1). Villityypin EKP3- ja EKP8-kantojen pesäkkeet olivat kostean



limaisia ja kooltaan huomattavasti suurempia ja runsaampia, kuin niiden mutantit isolaatit (Kuva 4). Erot ilmenivät faagiresistenssin kehittäneissä mutanteissa, joiden vähäisempi kasvu oli oletettavasti kustannus resistenssiominaisuuksien kehitymisestä. Mutanttien isolaattien pesäkekoot olivat myös erilaiset, sillä faageille perättäisaltistetut isolaatit olivat hiukan suurempia kuin yhdistelmäaltistetut mutantit (Kuva 4, B-C ja E-F). Nämä morfologiset kasvuerot johtunevat resistenssin kehitymisasteesta, joka korreloituu pesäkkeiden kokoon ja koostumukseen (Demerec ja Fano 1944).

Resistenssiominaisuudet ovat kustannukseltaan merkittävät, sillä bakteerien kasvu hidastuu niiden seurauksena, aiheuttaen haasteita esimerkiksi ravinteiden sisäännotossa (Tan ym. 2019). Faagikoktailille resistenteiksi kehittyneet EKP3 p.c ja EKP8 p.c oli altistettu ennestään kahdeksalle faagille samanaikaisesti. Tämä aiheutti suurempia muutoksia bakteerien metaboliaan verrattuna EKP3 s.e -ja EKP8 s.e -bakteereihin. EKP3 s.e ja EKP8 s.e puolestaan olivat faageille peräkkäisaltistettuja, minkä vuoksi metaboliset muutokset eivät olleet yhtä merkittäviä vaiheittaisen faagipaineen vuoksi. Bakteerien erot kasvuominaisuuksissa ilmenivät yhtä lailla nestekasvatuksissa, jotka erosivat liuossamuksien perusteella. 10 % LB-kasvatuksissa käsiteltiin nestekasvatuksia eri tilavuuksina, jotta bakteerien määrät eivät alentuneet liikaa. Näiden erojen selvittämiseksi oli jo ennestään suoritettu bakteerien genomisekvenssien analysointi, joita vertailtiin vielä tarkemmin toisiinsa (Liite 1). EKP3 s.e:n, EKP3 p.c:n, EKP8 s.e:n ja EKP8 p.c:n sekvenssejä verrattiin villityypin EKP3:n tai EKP8:n genomiin. Täten voitiin havainnollistaa tarkemmin faagialtistusten vaikutusta mutanttien genomiin (Liite 1). DNA-sekvenssit osoittivat, kuinka EKP3:n isolaatit eivät hyödyntäneet CRISPR-lokustaan, vaan mutatoituivat pääosin SNV:llä tai deleetioilla (Taulukko B, Liite 1). Homogeenisten mutaatioiden osuus oli EKP3 s.e:ssä suuri (100 %), mikä kuvastaa, kuinka bakteeripopulaation genomissa tapahtuneet mutaatiot esiintyivät jokaisessa näytteen bakteereissa (Taulukko B, Liite 1). EKP3 p.c:ssä esiintyi vain 17 % homogeenisiä mutaatioita, mikä puolestaan kuvastaa mutaatioiden tapahtuvan suurimmaksi osaksi vain tietyissä EKP3 p.c:n bakteereissa (Taulukko B, Liite 1). EKP8:ssa ilmeni mutaatioita vain vähän. EKP8 p.c:ssä havaittiin vain yksi SNV, joka

ei ollut homotsygoottinen mutaatio (Taulukko B, Liite 1). Geneettisten mutaatioiden vähäisyys voi täten johtua EKP8-kannan geeniekspression säätelystä, jonka avulla bakteeri mukautuu vaihteleviin olosuhteisiin. Villityypin bakteereihin verratessa, resistenteissa fenotyypeissa havaittiin enemmän geenimutaatioita koodaavissa geeneissä (Taulukko B, Liite 1). Täten myös ekspressoituvan funktionaalisen proteiinin rakenne tai toiminta voi muuttua. Näitä geenimutaatioita käytettiin vertailukohtena tässä tutkimuksessa, jotta voitiin seurata uusien mutaatioiden muodostumista, kuten myös vanhojen mutaatioiden merkittävyyttä (ks. 4.4 ja 4.5).

## 4.2 Faagilysaattien infektiokyky

Faagiliuksille voidaan laskea faagipartikkelien konsentraatio titrausmenetelmän avulla. Faagitiitterin määrittäminen perustuu isäntäbakteerikasvatukseen ja faagien maljaamiseen pehmytagarin kanssa kasvatusmaljalle (Anderson ym. 2011). Myöhemmin bakteerimassan seasta voidaan havaita yksittäisten lyyttisten faagien tuottamia kirkkaita plakkeja. Näin ollen kvantitatiivisen faagitiitterin avulla voidaan arvioida faagin infektiotehokkuus, joka poikkeaa eri isäntäbakteerien välillä (Anderson ym. 2011). Tässä tutkimuksessa käsiteltiin ennestään eristettyjä faageja ja uusia, jätevedestä vastaeristettyjä faageja, joiden tiitterit erosivat toisistaan huomattavasti (Taulukko 3, Taulukko 4). Aikaisemmin EKP3-kannalla rikastetut faagit olivat tiitterien perusteella tehokkaampia kuin EKP8-kannalla rikastetut (Taulukko 3). Tämä voidaan perustella isäntäbakteerin paremmasta sopivuudesta EKP3P1:n, EKP3P2:n, EKP3P4:n ja EKP3P5:n tapauksessa. Näistä EKP3P1 oli kaikin puolin tehokkain faagi, sillä se kykeni yhä infektoimaan EKP3 s.e ja EKP8 s.e -mutantteja, jotka lähtökohtaisesti olivat resistenttejä kaikille aikaisemmille faageille (Kuva 5). Muut faagit eivät muodostaneet plakkeja mutanteissa isolaateissa. Villityypin bakteerikannat, EKP3 ja EKP8, altistuivat herkästi jokaiselle faagille (Kuva 5). Infektio-testissä havaitut plakit olivat noin 4–10 mm paksuisten halojen ympäröimiä. Osa faageista muodosti suuria, monikerroksisia haloja, osa puolestaan kaksikerroksisia haloja ja osa yhden erittäin ohuen halon. Halot kuvastavat aktiivisten faagientsyymien, kuten polysakkaridien

depolymeraasien, toimintaa, joiden vaikutuksesta bakteerien solunulkoiset polysakkaridit hajoavat ja kasaantuvat solun pinnalle (Hughes ym. 1998). Faagien halot eivät aina olleet samankokoisia, mikä voi johtua eri bakteerien polysakkaridikoostumuksen eroista. Faagiterapian näkökulmasta katsottuna faagientsyymien potentiaalista tehokkuutta patogeenisten bakteerien kukistamiseen tulisi vielä tutkia tarkemmin. Tässä tutkimuksessa faagi-infektioiden yhteydessä havaitut halomuodostelmat voivat kuvastaa faagien monipuolisia ominaisuuksia heikentää bakteerien kasvua myös varsinaisen bakteerisolun faagi-infektion ulkopuolella. Faagien esiintyvyys eri haloissa eroaa toisistaan, sillä halon ollessa kauempana plakista, sitä vähemmän faagia niissä esiintyy (Vukotic ym. 2020). Halokerrokset voivatkin johtua faagientsyymien tehokkuudesta tai entsyymien pienrakenteista, jolloin ne diffuntoituvat tehokkaammin kasvuympäristöönsä.

Uusia faageja saatiin eristettyä käsittelyssä olleille bakteereille heti ensimmäisellä yrityksellä, mikä on lupaava saavutus faagiterapian näkökulmasta katsottuna. Faagien rikastaminen onnistui hyvin ja tuotti korkean tiitterin omaavia lysaatteja (Taulukko 4). Tiitterit olivat väliltä  $10^8$ – $10^{10}$  PFU/ml, pois lukien EKP3P8:n, jonka  $10^4$  PFU/ml:n faagiliuos oli heikoin (Taulukko 4). Alhainen tiitteri johtui todennäköisesti faagin herkkyudesta tärinälle, sillä se ei kestänyt samanlaista käsittelyä kuin muut faagit. EKP3P8-faagia ei sentrifugoitu tai sekoitettu ollenkaan, minkä vuoksi tiitterin määrittäminen epäonnistui useamman kerran, kunnes se saatiin lopulta määriteltyä. Tuoreet faagit kuvattiin TEM:llä, joka mahdollisti niiden morfologisten rakenteiden tarkastelun ja heimojen sekä kapsidien halkaisijoiden määrittämisen (Kuva 6). Faagit erottuivat selkeästi vaaleina rakenteina PTA-väriaineen muodostamasta taustasta. Kuvantamisen yhteydessä faagien koot määritettiin mittaamalla useamman kapsidin halkaisija ja laskemalla niille keskiarvot (Taulukko 4). Faagit olivat kooltaan 32,6–80,3 nm:n väliltä, mutta suurin osa oli noin 50–60 nm kokoisia (Taulukko 4). Mittaamisen yhteydessä huomattiin, kuinka kahdessa faagilysaatissa esiintyi kooltaan ja morfologialtaan eroavia faageja (Taulukko 4, Kuva 6). EKP3P8:n sisälsi kolme eri faagia, jotka olivat kooltaan 50,0 nm, 59,1 nm ja 80,3 nm. Kaksi näistä faageista olivat todennäköisesti profaageja,

jotka ovat aktivoituneet faagien rikastamisvaiheessa. EKP8P8:n yhteydessä havaittiin kaksi eri kokoista faagia (32,6 nm ja 52,5 nm), joista toinen on profaagi. Kaikki uudet faagit olivat morfologialtaan *Siphoviridae*n kaltaisia, paitsi EKP3P8:n yhteydessä havaittu kookas faagi, joka oli *Myoviridae*n kaltainen (Kuva 6). *Siphoviridae* ja *Myoviridae* heimojen faagit ovat osoittautuneet tehokkaiksi *K. pneumoniae* -bakteerin infektiota vastaan *in vivo*- ja *in vitro*-koetulosten perusteella (Wintachai ym. 2020; Shi ym. 2021). Faagiterapia on riippuvainen toimivista faageista, joten uusien faagien löytäminen faagiresistenteillekin bakteereille on olennaista terapialle.

Muista faageista erottuva, *Myoviridae*n kaltainen faagi saatiin kuvattua sekä ennen genomien injektioitumista että sen jälkeen (Kuva 6, C1-C2). Näistä kuvista voidaan selkeästi nähdä, kuinka faagin häntärakenne supistuu injektioon tuloksena. Vaikka kahdessa faagilysaatissa havaittiin erilaisia faageja, ei niitä voida TEM-kuvien perusteella rajata profaageiksi. Faagirikastusten aikana poimittiin yksittäisiä plakkeja tarkasti, minkä takia yksi faagi on peräisin jätevedestä, ja muut poikkeavat faagit ovat profaageja. Jotta profaagit saataisiin määritettyä, faagien genomit tulisi sekvensoida. Nämä sekvenssit tulisi asettaa isäntäbakteerin genomien kanssa rinnakkain, jotta profaagit saataisiin geenipäällekkäisyyksien avulla selvitettyä (Volozhantsev ym. 2017).

Uusien faagien isäntäspesifisyyttä selvitettiin infektiotestien avulla. Tulokset osoittivat, kuinka faagit kykenivät infektoimaan isäntäbakteerinsa lisäksi myös toista *K. pneumoniae* -kantaa ja vaihtelevasti mutantteja isolaatteja (Kuva 7). Faagien laajakirjoisuus isäntäbakteerien suhteen toimii suurena etuna faagiterapian kannalta, sillä faageja voidaan hyödyntää bakteerin eri kantoja ja niiden mutantteja isolaatteja vastaan. Lähes kaikki uudet faagit olivat EKP8-kannan bakteereita ja mutantteja infektoivia (Kuva 7). EKP3P6 oli ainoa faagi, joka ei kyennyt infektoimaan EKP8 s.e:tä tai EKP8 p.c:tä. Villityypin EKP8 kykeni välttymään vain EKP3P7:lta, joka infektoi EKP8 s.e:n ja EKP8 p.c:n lisäksi myös EKP3 s.e:tä. Kuudesta uudesta faagista neljä infektoi EKP3:sta ja EKP3 s.e:tä. EKP3 p.c sen sijaan altistui vain kahdelle faagille (Kuva 7). EKP3P7-faagi infektoi vain mutantteja

isolaatteja, kun taas EKP8P8-faagi infektoi kaikkia käsittelyssä olleita bakteereita, pois lukien EKP3 p.c:tä (Kuva 7). Mielenkiintoiseksi uudeksi faagiksi osoittautui myös EKP8P6, joka ei infektoinut villityypin EKP3:sta eikä EKP3 s.e:tä, mutta infektoi EKP3 p.c:tä (Kuva 7). Bakteereissa tapahtuvien solunulkoisten rakenteiden muutosten tuloksena aikaisemmin infektiokyvyttömät faagit voivat muuttua infektoiviksi, mutta yhtä lailla isäntäbakteeri voi muuttua faagille sopimattomaksi (Bohannan ja Lenski 2000). Täten EKP3-kannasta mutatoitunut EKP3 p.c on faagialtistusten tuloksena muuttunut EKP8P6:lle sopivaksi. Vaikka EKP3 s.e oli kehittynyt samaisesta villityypistä, ei perättäiset faagialtistukset saaneet aikaiseksi faagin kannalta hyödyllisiä muutoksia. Nämä infektiotestin tulokset loivat ymmärrystä bakteerien samankaltaisuuksista ja faagiresistenssin kehittäneiden mutanttien eroavaisuuksista. Eristettyjen faagien lisääminen terapiakoktaileihin voi avata uusia mahdollisuuksia kliinisten hoitojen suunnitteluissa, koska uudet faagit voivat infektoida resistenttejä bakteereita tehokkaasti.

Eristyisen mielenkiintoiseksi osoittautunutta EKP8P6-faagia tutkittiin tarkemmin genomitasolla. Lisäksi faagin käyttäytymistä faagikoktailissa tarkasteltiin EKP3-kannan avulla (ks. 4.3). Käytetty DNA:n eristysprotokolla paljasti faagin genomien olevan dsDNA:ta. EKP8P6-faagista saatua DNA-sekvenssiä rinnastettiin sen isäntäbakteerin genomisekvenssiin, jonka perusteella saatiin profaageihin viittaavia osumia. Sekvenssit osoittivat, kuinka EKP8-kannalla oli ennestään kolmen profaagin genomi integroituneena. Tämä tarkoittaa sitä, että villityypin EKP8 on aikaisemmin altistunut samankaltaisille faageille, joiden genomi on yhä integroituneena bakteerin omaan genomiin. RAST:n avulla voitiin vertailla EKP8P6:n ominaisuuksia ja selvittää, mitkä faageista olivat koodaavien geenien perusteella samankaltaisia (Taulukko 5). Kaikki 73 koodaavaa geeniä käsiteltiin yksitellen, ja niistä voitiin laskea eri faagien prosentuaalinen samankaltaisuus EKP8P6:en nähden. Enterobakteerien T1-faagi ja sen kaltainen luokittelematon TLS-faagi olivat samankaltaisia 46,6 %:sti, kun taas kolmanneksi samankaltaisin faagi oli myös luokittelematon, T1:n kaltainen, RTP-faagi, samankaltaisuudeltaan 39,7 %. Faagien prosentuaaliset samankaltaisuudet ovat suhteellisen pienet, mikä voi osittain johtua faagien eri geenimääristä (Taulukko 5). Näitä faageja vertailemalla

huomattiinkin, kuinka kaikki olivat *Siphoviridae* heimoon kuuluvia ja dsDNA:n omaavia (Taulukko 5). Sekvenssit olivat kooltaan suhteellisen lähellä toisiaan, sillä EKP8P6:n genomi oli 47 769 bp, kun taas samankaltaisten faagien genomit olivat 46 219–49 902 bp (Taulukko 5). EKP8P6:n GC-nukleotidien osuus koko genomista oli 51,1 %, mutta muiden faagien GC-osuudet eivät olleet määriteltynä. T1-faagi ja sen kaltaiset muut faagit (kuten tässä TLS ja RTP) tunnetusti infektoivat *Escherichia coli* bakteereita (Bayer 1968). Näiden kaltaisia faageja on havaittu lukuisia, mutta kaikki faagigenomit eivät esiinny RAST-tietokannassa. EKP8P6:n ollessa *K. pneumoniae* -kannassa rikastettu faagi, olisi sen luontevaa olla samankaltaisen muiden *K. pneumoniae* -faagien kanssa. NCBI:n BLAST-toiminnon avulla saatiin EKP8P6:n DNA-sekvenssin perusteella selville, kuinka monet *K. pneumoniae* -faageista olivat yli 95 %:sti samanlaisia. Täten RAST-tietokannan faagigenomit eivät täysin soveltuneet EKP8P6-faagin samankaltaisuuksien analysoimiseen.

Tarkemmin analysoitaessa EKP8P6-faagin genomia huomattiin, kuinka suurin osa (58 %) geeneistä oli hypoteettisia proteiineja koodaavia. Muita proteiineja koodaavia geenejä oli 23 %, häntärakenteen proteiineja 11 %, DNA-synteesiin osallistuvia proteiineja 5 % ja kapsidin proteiineja 3 % (Kuva 8). Hypoteettisia proteiineja koodaavien geenien suuri määrä ja muiden proteiinien pieni osuus kuvastaa, kuinka faagigeenejä ei tunneta vielä tarpeeksi. Lisäksi proteiinien funktiot ovat heikosti määriteltynä, mikä heikentää faagien kvalitatiivista karakterisointia.

### 4.3 EKP8P6-faagin vaikutus faagikoktailissa

Faagikoktailin aikaansaamia muutoksia villityypin EKP3-kannassa seurattiin kahden eri koktailin altistuksen seurauksena. Toinen faagikoktaileista sisälsi ainoastaan aikaisemmin eristettyjä faageja EKP3P1, EKP3P2, EKP3P4, EKP3P5, EKP8P1, EKP8P2, EKP8P3 ja EKP8P4, kun taas toiseen koekoktailiin lisättiin näiden faagien lisäksi myös EKP8P6-faagia. Faagipaineiden aikaansaamia muutoksia EKP3-kannassa tarkasteltiin aina kokeen loppuvaiheessa faagien yksittäisten altistuskokeiden perusteella. Tavoitteena oli seurata EKP8P6-faagin infektiokyvyssä tapahtuvia muutoksia, sillä lähtökohtaisesti EKP8P6 ei kyennyt

infektoimaan villityypin EKP3:sta, mutta infektoi EKP3 p.c -mutanttia (Kuva 7). Tarkoituksena oli selvittää, mikä tekijä ajaa EKP8P6:n infektiokyvyn kehittymiseen. Koe toteutettiin kolmessa eri olosuhteessa (A: +37 °C, 210 rpm; B: +37 °C ja C: RT) käyttäen eri faagikoktailipitoisuuksia (MOI 1, 10 ja 100). Bakterikasvatuksia käsiteltiin koktaililla vuorokauden ajan, minkä jälkeen 1 ml bakteerisuspensiota siirrettiin sellaisenaan tuoreeseen LB-liuokseen. Näin myös osa faageista siirtyivät tuoreistuksen myötä uuteen kasvatukseen. Tulokset olivat mielenkiintoiset, sillä MOI:n kasvaessa bakteerien selviytymisprosentti kasvoi (Taulukko 6). Kokeiden selviytymisprosentit on laskettu bakterikasvatuksista tehtyjen maljausten mukaan. MOI:n ollessa yksi, EKP3 selviytyi heikosti faagikoktailin aiheuttamasta paineesta, mikä voi selittyä sillä, että isäntien suhde faagiin oli tehokas tuhoamaan bakteeripopulaation. RT:ssä ja ilman ravistelua kasvatetut bakteerit selviytyivät aina elossa faagialtistusten jälkeen, mikä sen sijaan voi johtua faageille ja bakteereille sopimattomasta lämpötilasta tai bakteerien hidastuneesta metaboliasta (Taulukko 6). Eniten bakteerien kuolleisuutta havaittiin +37 °C:n ja ravistelun (210 rpm) yhteisvaikutuksen tuloksena, mikä olikin faagien kannalta sopivin koeolosuhde lämpötilan ja ravistelun luoman liikehännän vuoksi (Taulukko 6). Bakterikasvatukset säilyivät elossa MOI:n kasvaessa, kunnes MOI:ssa 100 selviytymisen todennäköisyys oli kaikissa 100 %. Tämä tulos oli hämmästyttävä, sillä faagien määrän ollessa suurempi, tulisi niiden infektoida bakteereita nopeammin heikentäen samalla niiden kasvua (Ryan ym. 2011). Tulosten luotettavuutta kuitenkin parantaa se, että jokaisessa olosuhteessa kasvatetuista bakteereista oli kahdeksan rinnakkaiskasvatusta. Faagien infektiivisyys voi heikentyä suuresta faagimassasta johtuen, mikä häiritsee faagien RBP:tä tunnistamasta isäntäbakteeria pitkien häntärakenteiden sotkeutuessa toisiinsa. MOI:n 1 ja 10 selviytymisprosentteista voitiin osittain nähdä EKP8P6:n vaikutus EKP3-bakteeriin, kun käsittely toteutettiin +37 °C:ssa ja ravistelussa. EKP3:n selviytyminen oli näissä huomattavan alhainen, toisin kuin muissa (Taulukko 6). Kokonaisuudessa faagikoktailien erot eivät kuitenkaan merkittävästi vaikuttaneet selviytymiseen. Esimerkiksi MOI:n ollessa 10, +37 °C:n kasvuolosuhteessa

bakteerien selviytyminen oli 100 % EKP8P6:n ollessa faagikoktailissa, kun taas ilman kyseistä faagia bakteerikasvatukset selviytyivät 87,5 %:sti (Taulukko 6).

Faagikoktailikäsitellyistä selvinneiden bakteerien pesäkkeitä siirrettiin LB-liuokseen infektio testiä varten. Viljelmissä havaitut pienet ja isot pesäkkeet käsiteltiin pääosin erikseen, jotta voitiin tarkastella homogeenisten bakteeripopulaatioiden faagiresistenssin eroja saman kasvatuksen sisällä. Infektio testien tuloksista laskettiin eri olosuhteissa käsiteltyjen bakteerien infektio maljoilla havaittujen faagiplakkien prosentuaaliset määrät (Kuva 9). Tuloksista voitiin selkeästi nähdä, kuinka EKP3P1 kykeni jopa käsittelyn jälkeen tehokkaasti infektoimaan EKP3:n. Bakteeripopulaatiot eivät siten kerenneet muodostamaan vuorokauden aikana resistenssiä EKP3P1:tä vastaan (Kuva 9). EKP3P1:n plakkeja havaittiin neljässä eri koeasetelmassa 90–100 % maljoista, mikä oli muihin faageihin verrattuna suuri määrä (Kuva 9). Ilmeni kuitenkin tilanteita, joissa plakkien esiintyvyys oli vain 10–20 % tai 30–40 %, mutta näitä tapauksia oli huomattavasti vähemmän kuin muilla faageilla (Kuva 9). EKP8P4 oli myös tehokas infektoimaan EKP3:sta, vaikka plakkiesiintymät olivatkin vaihtelevasti väliltä 10–90 % (Kuva 9). Verratessa faagiplakkien esiintyvyyksiä voidaan havaita, kuinka EKP3P2 oli heikoin infektoimaan EKP3:sta käsittelyn jälkeen. Tämä on pääteltävissä siitä, kuinka heikosti plakkeja esiintyi infektio testeissä kokonaisuudessaan. Vain MOI:n ollessa 1 ja +37 °C:n koeolosuhteen vallitessa, plakkeja esiintyi hyvin (90–100 %), mutta kahdeksassa eri koeasetelmassa ei plakkeja muodostunut lainkaan (Kuva 9). EKP3P1:ä lukuun ottamatta, EKP8-kannassa rikastetut faagit olivat huomattavasti tehokkaampia infektoimaan EKP3:a faagikoktailtistuksen jälkeen, erityisesti +37 °C ja RT koeolosuhteissa (Taulukko 3, Kuva 9). Tämä oli mielenkiintoinen havainto, mikä voi kuvastaa, kuinka EKP3:ssa tapahtuvat mutaatiot muokkaavat bakteeria EKP8:n kaltaiseksi tai EKP3 suojautuu ensisijaisesti vahvemmin infektoivilta faageilta. Jälkimmäisessä tapauksessa EKP3:ssa rikastettuja faageja vastaan kehittyvät resistenssimekanismit ensin, minkä tuloksena EKP8:n faagit voivat vahvemmin infektoida.



Plakkiesiintymisiä tarkasteltaessa havaittiin, kuinka EKP8P6 kykeni faagikoktailaltistuksesta huolimatta infektoimaan EKP3:sta käsittelyn jälkeen (Kuva 9). Kokeen aloitusvaiheessa EKP3 oli resistentti EKP8P6:ta vastaan, mutta käsittelyn aikana se alkoi herkistymään faagin infektiolle. EKP8P6 muodosti heikoimmin plakkeja RT:ssä (0–20 %), mikä voi johtua epäsopivasta lämpötilasta ja jatkuvan ravistelun puutteesta. +37 °C ja ravistelu puolestaan edisti EKP8P6-faagin infektiokykyä MOI:sta huolimatta (10–40 %), kun taas ilman ravistelua +37 °C:ssa infektioidessa esiintyi enemmän vaiheltua (0–70 %; Kuva 9). Tulokset osoittivat, kuinka EKP8P6:n infektoidessa bakteeri oli kehittynyt resistentiksi EKP8P3:a vastaan (Kuva A, Liite 3). Tämä voi johtua EKP8P3:n faagipaineen aikaansaamista mutaatioista, jolloin EKP3:n muutokset tekevät kannasta herkän EKP8P6:n infektiolle. Mutaatiot ovat voineet tapahtua EKP3:n kalvoproteiineissa, jotka EKP8P6:n RBP:t kykenevät tunnistamaan. Muut faagit puolestaan muodostivat plakkeja vaihtelevasti EKP8P6:n infektoidessa (Kuva A, Liite 3). Tästä infektiotestin yhteenvedosta voidaan myös nähdä, kuinka EKP8P1 ja EKP8P2 menettivät infektiokyvyn suurimmassa osassa altistuskokeita, silloin kun EKP8P6 oli osana faagikoktailia (Kuva A, Liite 3). Faagien infektiokyvyt olivat huomattavasti heikompia RT:ssä, toisin kuin +37 °C ja ravistelu, mikä toimi sopivana koeolosuhteena isäntäbakteerin infektoimiseen (Kuva A, Liite 3). Kahdessa eri +37 °C:n koekavatuksessa EKP8P6 ei kyennyt muodostamaan ollenkaan plakkeja syistä, joiden taustaa ei pystytty määrittämään, koska muutokset olivat mahdollisesti satunnaisia (Kuva A, Liite 3). Kun EKP8P6 ei infektoinut isäntää, muut faagit säilyttivät infektiokykynsä paremmin (Kuva B, Liite 3). Erityisesti EKP8-kannassa rikastettujen faagien dominointi infektiotesteissä korostui yhdessä EKP3P1:n kanssa (Taulukko 3; Kuva B, Liite 3). EKP3P2:n ja EKP3P5:n plakkiesiintymät olivat testeissä lähes identtiset toisiinsa nähden, mikä voisi kuvastaa faagien toiminnallista samankaltaisuutta (Liite 3). +37 °C koeolosuhteessa ja MOI:n ollessa 10 kasvatetut bakteerit kehittivät tehokkaimmin faagiresistenssin (Kuva 9, Liite 3). Tämä voi johtua sekoittumisen puutteesta, jolloin faagien on epätodennäköistä löytää soveltuva isäntäbakteeri, ja bakteerit kykenevät sopeutumaan faagipaineeseen nopeammin. Faagi-infektioiden toteutuminen ja

mahdollisten resistenssiin ajavien mutaatiotyyppien ennustaminen on haastavaa näiden tulosten perusteella. Voidaan kuitenkin todeta, että EKP3 kykenee muuntumaan EKP8P3:lle sopimattomaksi ja EKP8P6:lle kelpolliseksi, mutta tietyt mutaatiot voivat aiheuttaa resistenssin molempia faageja vastaan. Tämä oli paikoin havaittavissa tässä koeasetelmassa, kuten myös EKP3 s.e:n faagi-infektiotesteistä (Kuva 5; Kuva 7; Kuva B, Liite 3). Faagiterapiassa kannalta nämä tulokset ovat merkittäviä, sillä faagiyhdistelmän aiheuttama paine muuntaa bakteerin ominaisuuksia, jolloin osa faageista menettää infektiokykynsä mutantin bakteerin kehittyessä. Näin ollen faagiterapiassa tulisi huomioida kohdebakteerin mahdolliset mutaatiot ja sisällyttää mutanteja bakteereita infektoivia faageja faagiyhdistelmähoitoihin. Monipuolisen faagikoktailin avulla varmistetaan kohdebakteerin populaation tuhoutuminen, joten EKP8P6:n kaltaisia potentiaalisia faageja tarvitaan lisää.

#### **4.4 Bakteerien faagiresistenssin heikentyminen 10 % ravinnepitoisuudessa**

Kasvatusolosuhteita muuttamalla voidaan tarkastella bakteerien stressivasteen muodostumista. Niukkaravinteinen ympäristö heikentää tunnetusti bakteerien kasvua, mikä voi vaikuttaa ajan mittaan myös faagiresistenssimekanismien heikentymiseen niin kutsutun fitness-cost periaatteen mukaisesti (Nyström ym. 1992). Esimerkiksi kalvoreseptorien ekspression vähentymiseen tai loppumiseen perustuvan resistenssimekanismien menetys voi perustua siihen, että reseptorien syntetisointi tehostuu alhaisessa ravinnepitoisuudessa ylläpitämään bakteerin omaa metaboliaa (Weinbauer 2004).

Ravinteiden tärkeys tuli vahvasti esille noin kolme kuukautta kestäneessä kokeessa, jossa 10 % LB-liuos rajoitti bakteerien metaboliaa hidastaen niiden jakaantumista, mutta myös herkisti resistentit bakteerit jälleen faageille (Kuva 10). Tämän kokeen aikana tarkistettiin faagiresistenssin säilyvyyttä, bakteerien kasvumuutoksia ja geenimutaatioita. Havaitessa muutoksia infektiotestien tuloksena, otettiin testissä käytettyä bakteerikasvatusta talteen kasvuominaisuuksien analysointia ja DNA:n sekvensointia varten (Taulukko 2, Kuva 10). Villityypin bakteereissa (EKP3 ja EKP8)

ei tapahtunut resistenssin kannalta juurikaan muutoksia, mutta EKP3:n solutiheys oli vähäisempi kokeen edetessä. EKP8:n, kuten myös EKP8 s.e:n ja EKP8 p.c:n tiheys säilyi pitkään suhteellisen samanlaisena nestekasvatuksissa, kunnes loppua kohden solumäärät laskivat huomattavasti. 10 % kasvatusliuos vaikutti EKP3 s.e:n ja EKP3 p.c:n kasvuun samalla tavalla kuin EKP3:n, minkä vuoksi bakteereita lisättiin infektiotesteihin kaksinkertaisesti normaaliin nähden. Alhaisen ravinnepitoisuuden vaikutusta faagiresistenssiin oli nähtävissä pääosin EKP8 s.e- ja EKP8 p.c-mutanteissa, mutta myös EKP3 s.e:n loppuvaiheessa (Kuva 10). EKP8 s.e:ssä ensimmäiset mutaatiot havaittiin jo kahdeksannen siirrostusvaiheen yhteydessä, jolloin EKP3P4, EKP8P1 ja EKP8P4 muodostivat haaleita plakkeja infektiotestin tuloksena (Kuva 10). Seuraavat muutokset EKP8 s.e:ssä ilmenivät siirrostuksessa #26, kun EKP3P1, EKP3P4 ja EKP3P5 havaittiin kirkkaina plakkeina sekä EKP8P1 ja EKP8P4 haaleina plakkeina (Kuva 10.). Seuraavan EKP8 s.e:n muutoksessa, siirrostusvaiheessa #29, EKP3P2-faagilysaatin kohdalla bakterimassa oli runsaampaa, mutta #32 siirrostuksessa faagi muodostikin kirkkaan plakin infektiotestissä. Bakterimassan runsastuminen faagin vaikutuksesta voi johtua infektion yhteydessä vapautuneista polymeerisistä substraateista, kuten solunulkoisesta DNA:sta, proteiineista tai entsyymeistä, jotka tehostavat bakteerien biofilmin muodostumista (Gödeke ym. 2010). EKP8 p.c:ssä faagiresistenssin muutokset ilmenivät vasta siirrostuksesta #23 lähtien, minkä jälkeen faagi-infektioiden esiintyminen voimistui (Kuva 10). Ensimmäiset faagien plakkiesiintymät olivat EKP3P1:n, EKP3P4:n, EKP8P1:n ja EKP8P2:n aikaansaamia, mutta myöhemmin EKP3P5 ja EKP8P4 kykenivät infektoimaan EKP8 p.c:tä (Kuva 10). Tuloksista voidaan kokonaisuudessa havaita, kuinka EKP3P2:n ja EKP8P3:n infektiivisyydessä tapahtui vähiten muutoksia, sillä bakteerit säilyivät niille resistentteinä (Kuva 10). Poikkeuksena oli kuitenkin EKP8 s.e:n siirrostusvaihe #32, jolloin bakteeri herkistyi EKP3P2-faagille, mutta loppukasvatuksessa bakterissa tapahtuneet muutokset olivat jälleen kehittäneet resistenssin faagia vastaan (Kuva 10). Kokeen aikana faagiresistenssin menettäneet EKP8 s.e ja EKP8 p.c altistuivat herkemmin EKP3-kannassa rikastetuille faageille. Tämä voi johtua faagin ja isäntäbakteerin isäntäspesifisyydestä, minkä takia EKP8:n mutanttien on helpompi

säilyttää resistenssiä faageja EKP8P1, EKP8P2, EKP8P3 ja EKP8P4 vastaan yhteisen koevoluution vuoksi. Näissä mutanteissa ilmeni vaihtelevasti faagiresistenssiä ja sen menettämistä, mikä voi johtua alhaisen ravinnepitoisuuden aikaansaamista metaboliamuutoksista. EKP3, EKP3 p.c ja EKP8 eivät muuttuneet faagi-infektioiden näkökulmasta lainkaan (Kuva 10). Erityisesti EKP3 p.c pysyi vahvasti resistenttinä koko tarkastelun aikana. EKP8-kannassa tapahtui pieni yllättävä muutos loppuvaiheessa, kun EKP8P3:n infektiokyky oli syystä tai toisesta heikentynyt.

Kasvukäyräanalyyysien avulla voitiin tarkemmin selvittää, kuinka alhainen ravinnepitoisuus vaikutti bakteerien kasvuun ja faagiresistenssimuutoksiin. Kokeen alkukasvatuksia ja loppukasvatuksia, kuten myös havaittujen resistenssimuutosten nestekasvatuksia analysoitiin sekä 10 % LB:ssä että 100 % LB:ssä kasvuerojen selvittämiseksi (Taulukko 2, Kuva 11). Fotometriset mittaustulokset ovat esitettyinä keskimääräisten OD-arvojen avulla, jotka kuvastavat bakteerikasvatuksen tiheyttä. Sopeutumista alhaisen ravinnepitoisuuden aiheuttamiin paineisiin voitiin tarkastella bakteerien keskimääräisen biomassan vaihtelevuuden avulla. OD-arvot olivat 100 % LB:ssä noin 20-kertaiset verrattuna 10 % LB:ssä suoritettuun mittaukseen (Kuva 11). Mittauksista tehtiin aina kolme rinnakkaisnäytettä, joiden välinen hajonta on esitetty virhepalkkien avulla (Kuva 11). 100 % LB:ssä suoritettun mittauksen avulla seurattiin, kuinka 10 % LB:ssä kasvatetut bakteerit ovat kykeneväisiä sopeutumaan uudelleen optimaaliseen ravinnepitoisuuteen.

10 % kasvatustiliossessa EKP3:n ja EKP3 p.c:n kasvu hidastui kokeen aikana, kun taas EKP3 s.e ja EKP8 sopeutuivat kasvuolosuhteisiin kasvaen paremmin loppuvaiheessa verrattuna alkuvaiheeseen (Kuva 11A). EKP8 s.e:n ja EKP8 p.c:n keskimääräinen kasvu vaihteli kokeen aikana, mikä voi johtua tapahtuneista metabolisista muutoksista, jotka vaikuttivat kasvun lisäksi faagiresistenssin heikkenemiseen (Kuva 10, Kuva 11A). OD-arvojen perusteella EKP8 s.e sopeutui alkuun hyvin 10 % ravinnepitoisuuteen, kunnes loppuvaiheessa kasvu hidastui jälleen (Kuva 11A). Tämän mutantin tuloksissa esiintyi myös eniten vaihtelua, minkä vuoksi se erosi muista bakteereista huomattavasti kasvutiheydensä puolesta

(Kuva 11A). EKP8 p.c:n kasvu hidastui ja kasvoi eri vaiheissa samalla kun faagiresistenssissä esiintyi muutoksia (Kuva 10, Kuva 11A). 100 % LB:ssä bakteerien kasvu määrällisesti runsaampi, mutta muutossuunnaltaan samankaltainen kuin 10 % LB:ssä (Kuva 11). Näistä poiketen, EKP3:n kasvu osoittautui samansuuruiseksi verratessa sen alku- ja loppuvaiheen keskipäiväistä määrää (Kuva 11B). Suurin muutos ilmeni EKP3 s.e:n kasvatuksessa, jossa alkukasvatus oli muihin verrattuna alhaisin, vaikka toistojen välillä olikin huomattavasti vaihtelua. Loppuvaiheen kasvatuksessa EKP3 s.e oli jälleen sopeutunut runsaampaan ravinnepitoisuuteen ja olikin OD-arvoltaan EKP3:n kanssa lähes identtissä lukemissa (Kuva 11B). EKP3 p.c hyödynsi hyvin tarjolla olevia ravinteita heti alkuvaiheesta lähtien, kunnes koeasetelmassa ollut niukkaravinteinen LB-liuos aiheutti metabolisia mutaatioita, joista johtuen loppuvaiheen kasvu oli heikompaa (Kuva 11B, Liite 3). EKP8:n kasvu oli 100 % LB:ssä myös huomattavasti runsaampaa, etenkin loppuvaiheen kasvatuksessa, jossa bakteerin adaptoituminen oli nähtävissä OD-arvon ollessa suurempi kuin sen alkuvaiheen kasvatuksella (Kuva 11). EKP8 s.e:stä ja EKP8 pc:stä oli useampi analysoitava näyte, mikä johtuikin kokeen aikana havaituista faagiresistenssin muutoksista (Kuva 10, Kuva 11). EKP8 s.e:n #8-vaiheen kasvatus oli 10 % LB:ssä suoritettuna mittauksen tapaan OD-arvoltaan hiukan suurempi kuin alkuvaiheessa (Kuva 11B). Tämä voi johtua samaisista metaboliamuutoksista, joiden seurauksena faagiresistenssikyky alkoi heikentymään (Kuva 10, Kuva 11). EKP8 p.c:n #26, #29 ja #32 kasvatusten välillä oli vain pieniä eroja. Näiden kolmen bakteerinäytteen faagiresistenssit olivat lähes samanlaiset, kuten myös niiden perimässä olevien mutaatioiden lukumäärä (Kuva A, Liite 3). EKP8 s.e adaptoitui 10 % LB:seen ja kasvukäyräanalyysissä käytettyyn 100 % LB:seen tehokkaasti (Kuva 11). EKP8 pc:ssä ilmeni puolestaan jatkuvia muutoksia, mikä voidaan myös havaita infektiotestin tuloksista, joissa bakteerin alttius faageille vaihteli (Kuva 10, Kuva 11). EKP8 p.c:n #32-vaiheessa faagien muodostamat plakit olivat täysin kirkkaita, jolloin bakteerin kasvu oli myös runsain OD-arvojen perusteella (Kuva 10, Kuva 11). Tässä mutantissa isolaatissa ilmeni lisäksi 10 % kasvukäyräanalyysiin verratessa selkeä muutos, joka voidaan havaita #23-vaiheen kasvatuksesta (Kuva 11). Tämä näyte sopeutui 10 % LB-kasvatusten

jälkeen heikoiten 100 % LB:en, mikä voi johtua geeniekspression muutoksista, joiden yhteydessä ilmeni faagiresistenssimuutoksia (Kuva 10, Kuva 11). Kasvukäyräanalyysin osalta voidaankin päätellä, kuinka EKP3 ja EKP3 p.c sopeutuvat heikoimmin ravinnepitoisuuden muutoksiin, kun taas EKP3 s.e ja EKP8 adaptoituvat tehokkaasti (Kuva 11). EKP8 s.e ja EKP8 p.c muuttuivat jatkuvan geenisäätelyn seurauksena, minkä vuoksi niiden keskivertaisessa kasvussa sekä faagiresistenssissä oli eniten vaihtelua (Kuva 10, Kuva 11).

#### 4.4.1 Geneettinen sopeutuminen alhaiseen ravinnepitoisuuteen

Alhainen ravinnepitoisuus vaikeuttaa bakteerien kasvua, minkä vuoksi ne kykenevät sopeutumaan haastaviin olosuhteisiin muuttamalla metaboliaa geenimutaatioiden tai geeniekspressiomuutosten avulla (Tollerson ja Ibba 2020, Ochman ja Moran 2001). Käytössä olleiden bakteerien genomit olivat jo ennestään sekvensoitu, ja ne toimivat tämän kokeen alkusekvensseinä (Liite 1). Näitä sekvenssejä hyödynnettiin uusien geenimutaatioiden selvittämisessä. DNA:n eristyksessä heikoimman pitoisuuden (15,6 ng/ $\mu$ l) omaava bakteerinäyte kuului loppuvaiheen EKP8 s.e:lle, jonka DNA-sekvenssit eivät sisältäneet yhtään mutaatiota, kun taas kaikissa muissa esiintyi mutaatioita (Taulukko 7). Tämä tulos on voinut johtua DNA:n pienestä pitoisuudesta, minkä takia sekvensointi ei ole tuottanut tuloksia. EKP8 p.c:n loppuvaiheen sekvenssidata jäi sekvensoimatta suuresta näytemäärästä johtuen.

Mutaatiomääriä vertailemalla huomattiin, kuinka EKP3:n, EKP3 s.e:n ja EKP3 p.c:n loppuvaiheissa esiintyi paljon mutaatioita verrattuna EKP8:n loppuvaiheeseen, sekä EKP8 s.e:n ja EKP8 p.c:n eri vaiheisiin (Taulukko 7). Tämä osoittaa, kuinka villityypin EKP3 sopeutuu alhaisen ravinnepitoisuuden aikaansaamaan stressiin mutaatioilla muokaten sen metaboliaa sopivaksi, toisin kuin EKP8, jossa ei mutaatioita ilmennyt määrällisesti läheskään yhtä paljon (Taulukko 7). Homotsygoottisten mutaatioiden määrä vaihteli eri bakteerien välillä, mutta EKP3 p.c:ssä ja EKP8 s.e:ssä homotsygoottien osuudet olivat 60–86 % (Taulukko 7). EKP3:n loppuvaiheen DNA-sekvenssissä havaittuja homotsygoottisia mutaatioita

oli 21 %, kun taas EKP3 s.e:n 32 % ja EKP8:n 19 % (Taulukko 7). EKP8 p.c:ssä homotsygoottisten mutaatioiden osuus oli 17–42 %, mikä on vähäisten mutaatiomäärien suhteen korkea (Taulukko 7). EKP8 s.e:n ja EKP8 p.c:n eri siirrostusvaiheista voidaan huomata, kuinka homotsygoottisten mutaatioiden osuudet olivat ensimmäisissä analysoiduissa siirrostusvaiheissa korkeat (Taulukko 7). Mutaatiotyypeistä yleisimmät olivat pienmutaatiot eli SNV ja MNV (Taulukko 7). Suuremmat mutaatiot, kuten DNA-sekvenssin deleetioita tai niiden korvautuminen uusilla emäsekvensseillä olivat selkeästi harvinaisempia tässä koeasetelmassa, mikä voi johtua niiden aikaansaamien muutosten laajuudesta (Taulukko 7; Gordo ym. 2011). Kun koodaavan geenin sekvenssi muuttuu useamman nukleotidin osalta, voi syntetisoidun proteiinin aminohappokoostumus poiketa alkuperäisestä proteiinista, minkä vuoksi myös proteiinien toiminnalliset alueet voivat olla erilaiset (Gordo ym. 2011). EKP3 p.c:n loppuvaiheen mutaatioissa insertioita oli määrällisesti vähiten, mikä voi johtua niiden aikaansaamista suurista metaboliamuutoksista (Taulukko 7).

Mutaatioiden määrän lisäksi selvitettiin, mihin geeneihin mutaatiot kohdistuivat (Kuva A, Liite 3). Nämä geenimutaatiot ovat kategorisoitu RAST:n luokittelun mukaisesti. Tuloksista huomattiin, kuinka EKP3:ssa, EKP3 s.e:ssä ja EKP3 p.c:ssä esiintyi useita geenimutaatioita, joiden avulla bakteerit kykenivät muokkaamaan metaboliaansa ja sopeutumaan alhaiseen ravinnepitoisuuteen (Kuva 1, Liite 3). Geenimutaatiot ovat täten muuttaneet ekspressoituvien proteiinien funktiota olosuhteisiin nähden sopivammaksi. EKP8:ssa, EKP8 s.e:ssä ja EKP8 p.c:ssä geenimutaatioiden määrä oli alhainen, verrattuna EKP3 villityypin kantaan tai sen faagiresistentteihin isolaatteihin. Tämä voisi johtua EKP8:n poikkeavasta adaptoitumisesta, joka perustuu geeniekspression säätelyyn. EKP8:n ja sen isolaateissa voitiin nähdä korkeintaan kolme geenimutaatiota, jotka kuuluivat seuraaviin kategorioihin: "faagit, liikkuvat elementit, plasmidit", "proteiinin metabolia" ja "tuntematon" (Kuva A, Liite 3). EKP3:n ja sen mutanttien geenimutaatiot sijoittautuivat 14:aan eri kategoriaan, joten mutaatioita esiintyi laajalti useammassa metaboliareitissä (Kuva A, Liite 3). Suurin osa näistä mutaatioista kohdistuivat EKP8:n ja sen mutanttien isolaattien tavoin samoihin

kategorioihin, mutta lisäksi ”kofaktori ja vitamiinit”, ”metalliyhdisteiden kuljetus ja metabolia” sekä ”RNA:n metabolia” olivat mutaatioille alttiita (Kuva A, Liite 3). Mutaatioita tarkasteltaessa huomattiin, kuinka osa EKP3 s.e:n ja EKP3 p.c:n loppuvaiheen geenimutaatioista esiintyivät myös alkuperäisissä isolaateissa. Nämä mutaatiot olivat säilyneet hyvin kokeen aikana ja voivatkin olla tärkeitä faagiresistenssin kannalta, sillä mutaatiot kuuluivat kategorioihin, joiden tehtävänä on syntetisoida bakteerin ulkoisia rakenteita, tehostaa biofilmin biosynteesiä tai käynnistää stressivaste (Kuva A, Liite 3). Esimerkiksi kolaanin synteisiin osallistuvan transferaasin (WcaJ) on todettu olevan tärkeä tekijä spesifisten faagien infektiokykyyn (Tan ym. 2020). Metalliyhdisteiden kuljetusreitillä esiintyvän reseptorin (FhuA) ja sideroforien sitoutumisproteiinin (TonB) geenimutaatioista toinen havaittiin EKP3 s.e:ssä ja toinen EKP3 p.c:ssä, jotka tunnetusti toimivat faagien reseptoreina (Mangalea ja Duerkop 2020). Proteiinien metaboliaan kohdistuvia geenimutaatioita ilmeni jokaisessa tarkastelun kohteena olleessa bakteerissa runsaasti, erityisesti rRNA:ssa (Kuva A, Liite 3). Mutaatiot rRNA:ssa voivatkin vaikuttaa proteiinisynteesin kulkuun heikentäen tai tehostaen sitä riippuen mutaation sijainnista ja laajuudesta (Qin ym. 2007).

Osa mutaatioista kohdistui hypoteettisiin proteiineihin, joista yksi (FIG00731921) muuntui eri bakteereissa: EKP3 s.e:n ja EKP8 p.c:n loppuvaiheissa, mutta myös EKP8 p.c:n #23 siirroituksen yhteydessä (Kuva A, Liite 3). On mahdollista, että kyseisellä proteiinilla on merkittävä funktio bakteerin sopeutumiseen alhaiseen ravinnepitoisuuteen, vaikka geenimutaatioiden määrä ja sijainnit kyseisessä geenissä poikkesivat bakteerien välillä. Nämä tulokset osoittavat myös, kuinka alhainen ravinnepitoisuus ei vaikuta EKP3:n CRISPR-lokusten geneihin, sillä niissä ei havaittu mutaatioita ollenkaan.

#### **4.5 EKP3-kannan faagiresistenssin kehittymisen seuranta**

Koska EKP3-kannan havaittiin reagoivan EKP8-kantaa voimakkaammin mutatoimalla genomiaan, ilmiötä tarkasteltiin tarkemmin altistamalla EKP3 erilaisille faagiyhdistelmille ja yksittäisille faageille. Geneettisesti sopeutuvan



EKP3-kannan jatkokäsittelyn tarkoituksena oli selvittää, kuinka kyseinen bakterikanta kehittää resistenssimekanisminsa yksittäiselle faagille (EKP3P5), sekä faagikoktailille (EKP3P1, EKP3P2, EKP3P4, EKP3P5, EKP8P1, EKP8P2, EKP8P3 ja EKP8P4). Kahden eri koeasetelman tuloksena tavoiteltiin laajempaa kuvaa faagiresistenssin muodostumisesta sekä CRISPR-lokuksen toiminnasta. Faagikoktailaltistuksen yhteydessä pyrittiin myös kehittämään uusi EKP3 p.c mutantti altistamalla EKP3 samaiselle faagikoktailille.

Vaiheittaisen kokeen aikana suoritettavat infektio-testit epäonnistuivat useamman kerran. Nestekasvatusten joukossa ollut EKP3P5-faagi vaikeutti tasaisen bakterikasvuston muodostumista ja sai aikaan isoja plakkeja tai laikuittaista kasvua hankaloittaen tulosten analysointia. Täten tippatestejä toistettiin puhtasviljelmien avulla, joita tehtiin tuoreistamisen yhteydessä. Tulokset laadittiin selkeimpien infektio-testien perusteella. Vaiheittaisen kokeen ensimmäisessä faagikoktailaltistuksessa EKP3 kykeni kehittämään faagiresistenssin kasvatusliuoksessa olleen EKP3P5:n lisäksi EKP3P2- ja EKP8P2-faageille (Kuva 12). Näiden faagien infektiokyvyissä tapahtuneet muutokset johtuvat todennäköisesti EKP3:n mutaatioista, jotka ovat 10 % ravinnepitoisuuden ja EKP3P5:n aikaansaamia. Havaittujen muutosten lisäksi huomattiin, kuinka EKP3 kasvoi EKP3P5- ja EKP8P3-lysaattien vaikutuksesta jopa paremmin muihin verrattuna (Kuva 12). Vaiheen 2. kasvatuksessa EKP3 oli jälleen mutatoitunut ja muuttunut resistentiksi EKP8P1-faagia, sekä osittain myös EKP3P4-faagia vastaan (Kuva 12). Viimeisessä vaiheessa nestekasvatus tuoreistettiin 10 % ja 100 % LB-liuokseen, jotta voitiin tarkastella ravinnepitoisuuden kasvun vaikutusta resistenssimuutoksiin. Tulokset kuitenkin osoittautuivat lähes samanlaisiksi, mikä voi johtua siitä, että edeltävät kahdeksan vuorokauden käsittelyt olivat muokanneet EKP3-bakteeria jo huomattavasti. Pieniä eroavaisuuksia ilmeni paikoittain mahdollisesti ravinnepitoisuuksien vuoksi: EKP3P4 ei muodostanut plakkeja 100 % LB:ssä kasvaneessa kasvatuksessa, toisin kuin 10 % LB:n kasvatuksessa (Kuva 12). Tämän lisäksi 10 % kasvatuksessa havaittiin EKP3P5-lysaatissa runsaampi bakterikasvusto, jota ei 100 % kasvatuksessa ilmennyt, mutta molemmissa havaittiin runsaampaa kasvua EKP3P2-lysaatin läsnä ollessa (Kuva 12). Bakteri

tavoittelee mahdollista tasapainoa muokkaamalla puolustuskoneistoa ja kasvuaan, vaikka herkistyykin EKP8P1-faagille jälleen 10 % kasvatuksen tapaan (Kuva 12). Tulokset osoittautuivat mielenkiintoisiksi, koska bakteeri kehitti resistenssimekanismeja faageja vastaan, joihin se ei edes ollut kontaktissa vasta kuin infektioestien aikana. Tämä kuvastaa, kuinka faagit hyödyntävät isäntäbakteerin samaisia kohdereseptoreita. Bakteerin kehittämät mutaatiot vaikuttavat suoraan EKP3P5:n lisäksi myös EKP3P2, EKP3P4, EKP8P1 ja EKP8P3 faagien infektiokykyyn. Täten voidaan todeta, kuinka bakteerin muuntuvat resistenssimekanismit toimivat tehokkaasti kohteena olevan faagin lisäksi myös muita faageja vastaan, mikä voi heikentää faagiterapian tehokkuutta hoitonäkökuilmasta katsottuna.

Uuden EKP3 p.c:n kehittäminen villityypin EKP3-kannasta epäonnistui useamman kerran. Kuudesta altistuskokeesta vain puolet selvisivät faagikoktailkäsittelystä. Selvinneistä bakteereista vain yhtä tarkasteltiin vielä tarkemmin. Noin 13 tuntia kestänyt faagikoktailaltistus saa aikaan bakteerissa huomattavia muutoksia. Bakteerikasvatukset tuoreistettiin ennen varsinaista analysointia, jotta mutatoituneiden bakteerien määrä saatiin optimaaliseksi analyysijä varten. Infektioestit osoittivat, kuinka tavoiteltu "uusi" EKP3 p.c mutantti ei ollut täysin resistentti kaikille faageille, sillä EKP3P1 kykeni yhä tehokkaasti infektoimaan sitä (Kuva 12). Faagiterapian näkökuilmasta katsottuna EKP3:n selviytyminen faagikoktailaltituksesta on huolestuttavaa. Bakteeri ei kuitenkaan kyennyt kehittämään resistenssiä EKP3P1-faagia vastaan, joten faagiterapian kannalta tulisi löytää EKP3P1:n kaltaisia, sinnikkäästi infektoivia, faageja.

Faagiresistenssimekanismien kehittymistä tarkasteltiin sekvensoimalla vaiheiden 1. ja 3. kasvatuksia, jotka olivat kasvaneet 10 % LB:ssä kokeen aikana. Lisäksi myös uuden EKP3 p.c mutantin homogeeninen nestekasvatus analysoitiin DNA-sekvensoinnin avulla tarkemmin. Sekvenssejä vertailtiin villityypin EKP3-kannan genomiin, minkä avulla tarkasteltiin faagiekäsittelyjen aikaansaamia mutaatioita (Liite 1, Liite 4). Mutaatioiden määriä tarkasteltaessa voitiin huomata, kuinka SNV:t olivat jokaisessa bakteerinäytteessä yleisimpiä mutaatioita (Taulukko 8).

Vaiheittaisen kokeen ensimmäinen bakterikasvatus sisälsi kvantitatiivisesti enemmän mutaatioita kuin kolmannen vaiheen kasvatus, erityisesti SNV:n suhteen (Taulukko 8). Tämä on voinut johtua EKP3:n stressivasteesta, jonka tuloksena bakteeri on EKP3P5-faagin vaikutuksesta ja alhaisen ravinnepitoisuuden vuoksi joutunut sopeutumaan säätelemällä geeniekspressiota ja tuottamalla genomisia mutaatioita. Suurempien mutaatioiden, kuten UNV:n, insertioiden, deleetioiden sekä korvautumisen, kokonaismäärät olivat huomattavasti pienemmät DNA-sekvenssejä, mutta uuden EKP3 p.c-mutanttiin kehittymisen yhteydessä näiden mutaatioiden esiintyminen oli huomattavasti runsaampaa (Taulukko 8). Vaiheittaisessa kokeessa homotsygoottisten mutaatioiden osuudet (28 %) pysyivät yhtäläisinä, vaikka tarkastelun kohteena olivat toisistaan eroavat heterogeeniset nestekasvatukset (Taulukko 8). Uuden EKP3 p.c-kannan homogeenisestä bakteripopulaatiossa tapahtuneista geneettisistä mutaatioista 52 % ilmeni homotsygoottina, mikä kuvastaa bakteerien suurta vaihtelua yhden bakteripesäkkeen sisällä (Taulukko 8).

Geenimutaatioita tarkasteltaessa voitiin havaita, kuinka EKP3P5-faagi aiheutti vaiheittaisen koeasetelman tuloksena suuria muutoksia 1. vaiheen bakterikasvatuksessa (Liite 4). Tuoreistamisen seurauksena koodaavissa geneeissä tapahtuneita mutaatioita ei ilmennyt läheskään yhtenevästi 3. vaiheen bakterikasvatuksessa, mikä oli yllättävää samaisessa faagipaineessa (Liite 4). Bakteerien kyky palautua faagien vaikutuksesta on tuloksista suoraan nähtävissä. Koodaavissa geneeissä tapahtuneiden mutaatioiden vähäisyys 3. vaiheen bakterikasvustossa tarkoittaaakin sitä, että bakteerit muuntavat aikaisemmin mutatoituneet geenit takaisin villityypin EKP3-bakteerin kaltaisiksi. Faagialtistuskokeiden tulokset erosivat toisistaan funktionaalisten geenimutaatioiden määrän suhteen. EKP3P5-faagilla käsitelty EKP3 mutatoitui runsaammin koodaavista geneistä, mutta palautui käsittelyjen yhteydessä tehokkaasti, toisin kuin faagikoktailaltistuskokeessa, jossa kyseisten geenimutaatioiden määrä oli alhaisempi (Liite 4). Faagikoktailaltistus vaikutti vain viiden eri kohdeproteiinin geenisekvensseihin, mitkä voivatkin olla osallisena faagiresistenssin kehittymiselle (Taulukko 8, Liite 4). EKP3P5-faagi-infektion

tuloksena kehittyneet mutaatiot voivatkin alhaisen homotsygoottisuudensa vuoksi olla useamman bakteerin kehittämiä mutaatioita (Taulukko 8, Liite 4). Erilaisia mutaatioita kehittäneet bakteerit kykenevät omalla tavallaan puolustautumaan faageilta, luoden samalla "faagivapaan" ympäristön mutatoitumattomille bakteereille. Ei voida tarkasti sanoa, millaisia spesifisiä muutoksia EKP3P5 aiheuttaa EKP3-bakteerille vaihtelevien mutaatioiden vuoksi. Homotsygoottisuuden ollessa korkeampi, voidaan muodostaa selkeämpiä johtopäätöksiä. Kun tarkastellaan kategorioita, joihin geenimutaatiot ovat kohdistuneet, huomataan, kuinka suurin osa mutaatioista ilmenevät samoissa kategorioissa tai jopa samoissa geneeissä (Liite 4). Bakterisolun ulkorakenne, kuljetusjärjestelmä, kofaktorit ja proteiinin metabolia muuntuivat faagipaineiden vaikutuksesta runsaiten (Liite 4). Edellä mainitussa koeasetelmassa (ks. 4.4.1) ilmennyt kolaanihapon biosynteesiin osallistuvan WcaJ-transferaasin, NAD(P)H-flavinioksidoreduktaasin ja rRNA:n, geenisekvensseissä ilmeni runsaimmin mutaatioita molemmissa faagialtistuskokeissa (Liite 4). Alkuperäisessä EKP3 s.e-mutantissa esiintynyt WcaJ mutaatio voisi hyvin kuvastaa, kuinka kyseisessä geenissä tapahtuva muutos on yleinen *K. pneumoniae* -bakteerin faagiresistenssin kannalta (Liite 4; Tan ym. 2020). Yllättävintä näissä faagialtistuskokeissa oli EKP3:n muuntumattomat CRISPR-lokukset. EKP3 ei hyödyntänyt CRISPR-mekanismia näissä *in vitro* -kokeissa suojautuakseen faageilta, mikä puolestaan vahvistaa faagiterapian näkökulmasta katsottuna faagihoidojen tehoamista EKP3:n infektioiden hoidossa.

#### 4.6 Johtopäätökset

Tämä tutkimus toi uutta näkemystä EKP3- ja EKP8-bakteerin välisistä eroista sekä parempaa ymmärrystä faagiresistenssin vaikutuksista ja sen muodostumisesta. Villityypin bakteerit kasvoivat mutanteja isolaatteja paremmin nestekasvatuksissa, kuten myös LB-maljoilla, mikä nähtiin bakteeripesäkkeiden kokoeroissa. Faagiresistenssin aiheuttama kustannus kelpoisuuteen voitiin täten havaita, sillä tehokkaamman faagiresistenssin omaavat bakteerit kasvoivat heikoiten. Aikaisemmista resistenssiominaisuuksista huolimatta, jokaiselle käsittelyssä olleille

*K. pneumoniae* bakteereille saatiin jätevedestä eristettyä potentiaalisia faageja, joilla voi olla tärkeä merkitys faagiterapian edistämiseen. Faagien kyky infektoida isäntäbakteerin lisäksi myös muita samankaltaisia bakteereita mahdollistaa faagien monipuolista käyttöä taatusti tulevaisuudessa. Tutkimus osoittikin, kuinka jopa labiilin faagin eristäminen onnistuu, kun käsittelytapaa muutetaan faagille suotuisaksi. Herkkien faagien jatkokäsittely saattaa olla haastavaa, mutta tarkalla työskentelyllä niistäkin voi saada hyödyllisiä tuloksia kerättyä. Uusien faagien menestyksekkään eristämisen vuoksi voidaankin todeta, kuinka faagiterapian kehittäminen kliiniseen käyttöön on hyvinkin mahdollista, kun faagikirjoja saadaan runsaammaksi ja sopivia faagikoktaileja kehitettyä. Faagien karakterisoinnin yhteydessä havaittiin eri kokoisia faageja, joista osa olivat profaageja, mutta niiden tarkempi määrittäminen voidaan suorittaa faagin ja bakteerin genomeja vertailemalla toisiinsa. Jos faagin sekvenssi löytyy bakteerin genomista, on kyse profaagista. Uudet faagit infektoivat tehokkaammin EKP8-kantaa ja sen mutantteja isolaatteja, mikä voi johtua siitä, että kyseinen bakteerikanta puolustautuu faageilta säätelemällä geenien ekspressiota tai sitten yksinkertaisesti jokin bakteerin ulkoisesta rakenteesta soveltuu paremmin faagin infektiotjärjestelmälle. EKP3:n resistenssimekanismi on tehokkaampi faageja vastaan, sillä geenimutaatiot ovat vakaampia vaikeissa olosuhteissa. Geenimutaatioiden kehittyminen ylläpitää myös jo kehittyneitä resistenssimekanismeja paremmin, mikä voitiin todeta kokeessa, jossa ravinnepitoisuus alennettiin 10 %:n. Faagialtistuskokeet osoittivat, kuinka kolmen CRISPR-lokuksen omaava EKP3-kanta ei itse CRISPR-resistenssimekanismia hyödyntänyt vaikeista kasvuolosuhteista riippumatta. CRISPR-systeemillä ei täten näytä olevan suoraa yhteyttä siihen, kuinka bakteeri reagoi faageihin laboratorio-olosuhteissa. Tämä löydös vaikuttaa lupaavalta faagiterapian kannalta, sillä se ei sulje pois sellaisten kantojen hoitoa, joilla on adaptiivinen puolustusmekanismi viruksia vastaan. Jatkotutkimusten avulla tulisi kuitenkin selvittää, kuinka esimerkiksi tässä työssä tutkittu CRISPR-systeemin omaava EKP3-kanta kehittää faagiresistenssinsä luonnollisen mikrobiyhteisön läsnäollessa.

Laajemman faagialtistuskokeen tuloksena voidaan myös osoittaa, kuinka faagikoktailin MOI:n tulee olla tarpeeksi matala, jotta faagit löytävät kohdebakteerin ja kykenevät infektoimaan sen. MOI:n kasvaessa liian suureksi, bakteerien selviytymisprosentti paranee. Faagikoktailkoostumukseen tulee myös kiinnittää huomiota, sillä faagien aiheuttama stressitila saa aikaan spesifisiä muutoksia muun muassa bakteerin ulkoiseen koostumukseen, jolloin aikaisemmin infektoimattomat faagit saattavat muuttua infektoiviksi. Tämä voitiin osoittaa tässä tutkimuksessa, sillä EKP8P3:n muuttuessa infektoimattomaksi, kykeni EKP8P6 infektoimaan muuntunutta EKP3-bakteeria. Vastaavia resistenttejä muotoja infektoivia faageja altistukseen lisäämällä voidaan mahdollisesti parantaa faagiterapian onnistumistodennäköisyyttä ja hoidon tehokkuutta tulevaisuudessa. Tästä syystä onkin erityisen tärkeää tuntea tarkemmin isäntäbakteerien vaste käytössä olevia faageja kohtaan.

## **KIITOKSET**

Suuret kiitokset mielenkiintoisesta tutkimusaiheesta ja ohjauksesta kuuluvat Matti Jalasvuorelle sekä Katariina Koskiselle, jotka auttoivat menetelmien suunnittelussa, näytteiden keruussa ja tulosten läpikäymisessä. Ilman heidän tukeaan, tutkimusaihe ei olisi saavuttanut näin merkittävää näkökulmaa. Kiitokset myös ryhmän muille jäsenille, Reetta Penttiselle ja Pilvi Ruotsalaiselle. Tutkimusryhmältäni sain tarvittavan avun ja neuvoa sitä tarvittaessa. Oli ilo ja kunnia työskennellä teidän kanssanne.

## KIRJALLISUUS

- Abedon S. 2012. Bacterial 'immunity' against bacteriophages. *Bacteriophages* 1: 50–54, doi: 10.4161/bact.18609.
- Ackermann H-W. 1996. Frequency of morphological phage descriptions in 1995. *Arch. Virol.* 141: 209–218, doi: 10.1007/BF01718394.
- Ackermann H-W. 2001. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Arch. Virol.* 146: 843–857, doi: 10.1007/s007050170120.
- Ackermann H-W. 2011. Bacteriophage taxonomy. *Microbiology Australia*. 32: 90–94. Saatavilla: [https://gesundheitswissenschaften.uni-hohenheim.de/fileadmin/einrichtungen/gesundheitswissenschaften/Downloads/Bacteriophages\\_Taxonomy\\_2011-Ackermann.pdf](https://gesundheitswissenschaften.uni-hohenheim.de/fileadmin/einrichtungen/gesundheitswissenschaften/Downloads/Bacteriophages_Taxonomy_2011-Ackermann.pdf).
- Almaghrabi R., Clancy C., Doi Y., Hao B., Chen L., Shields R., Press E., Iovine N., Townsend B., Wagener M., Kreiswirth B. & Nguyen M. 2014. Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains Exhibit Diversity in Aminoglycoside-Modifying Enzymes, Which Expert Differing Effect on Plazomicin and Other Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58: 4443–4451, doi: 10.1128/AAC.00099-14.
- Almeida J. 1963. A Classification of Virus Particles Based on Morphology. *Can. Med. Assoc. J.* 89: 787–798.
- Anderl J., Franklin M. & Stewart P. 2000. Role of Antibiotic Limitation in *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 44: 1818–1824, doi: 10.1128/aac.44.7.1818-1824.2000.
- Anderson B., Rashid M., Carter C., Pasternack G., Rajanna C., Revazishvili T., Dean T., Senecal A. & Sulakvelidze A. 2011. Enumeration of bacteriophage particles. *Bacteriophages*. 1: 86–93, doi: 10.4161/bact.1.2.15456.
- Aslam B., Wang W., Arshad M., Khurshid M., Muzammil S., Rasool M., Nisar M., Alvi R., Aslam M., Qamar M., Salamat M. & Baloch Z. 2018. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect. Drug Resist.* 11: 1645–1658, doi: 10.2147/IDR.S173867.
- Bagley S. 2015. Habitat Association of *Klebsiella* Species. *Infect. Control.* 6: 52–58, doi:10.1017/S0195941700062603.
- Balestrino D., Haagensen J., Rich C. & Forestier C. 2005. Characterization of Type 2 Quorum Sensing in *Klebsiella pneumoniae* and Relationship with Biofilm Formation. *J. Bacteriol.* 187: 2870–2880, doi: 10.1128/JB.187.8.2870-2880.2005.
- Baltimore D. 1971. Expression of Anima Virus Genomes. *Bacteriol. Rev.* 35: 235–241.

- Bassler B. 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 582–587, doi: 10.1016/s1369-5274(99)00025-9.
- Bayer M. 1968. Adsorption of Bacteriophages to Adhesions Between Wall and Membrane of *Escherichia coli*. *J. Virol.* 2: 346–356.
- Bohannon B. & Lenski R. 2000. Linking genetic change to community evolution: insights from studies of bacteria and bacteriophage. *Ecol. Lett.* 3: 362–377, doi: 10.1046/j.1461-0248.2000.00161.x.
- Bush K. & Jacoby G. 2010. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 969–976, doi:10.1128/AAC.01009-09.
- Cano V., March C., Insua J., Aguiló N., Llobet E., Moranta D., Regueiro V., Brennan G., Millán-Lou M., Martín C., Garmendia J. & Bengoechea J. 2015. *Klebsiella pneumoniae* survives within macrophages by avoiding delivery to lysosomes. *Cell. Microbiol.* 17:1537–1560, doi: 10.1111/cmi.12466.
- Casey A., Jordan K., Neve H., Coffey A. & McAuliffe O. 2015. A tail of two phages: genomic and functional analysis of *Listeria monocytogenes* phages vB\_LmoS\_188 and vB\_LmoS\_293 reveal the receptor-binding proteins involved in host specificity. *Front. Microbiol.* 6: 1107, doi: 10.3389/fmicb.2015.01107.
- Chmelnitsky I., Shklyar M., Hermesh O., Navon-Venezia S., Edgar R. & Carmeli Y. 2013. Unique genes identified in the epidemic extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258. *J. Antimicrob. Chemother.* 68:74–83, doi: 10.1093/jac/dks370.
- Chopin M-C., Chopin A. & Bidnenko E. 2005. Phage abortive infection in lactococci: variations on a theme. *Curr. Opin. Microbiol.* 8: 473–479, doi: 10.1016/j.mib.2005.06.006.
- Clardy J., Fischbach M. & Currie C. 2009. The natural history of antibiotics. *Curr. Biol.* 19: R437–R441, doi: 10.1016/j.cub.2009.04.001.
- Crick F. & Watson J. 1956. Structure of Small Viruses. *Nature.* 177: 473–475, doi: 10.1038/177473a0.
- Davies J. 2006. Where have All the Antibiotics Gone? *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 17: 287–290, doi:10.1155/2006/707296.
- Demerec M. & Fano U. 1945. Bacteriophage-Resistant Mutant in *Escherichia Coli*. *Genetics* 30:119–136.
- Dennesen P., Bonten M. & Weinstein R. 1998. Multiresistant bacteria as a hospital epidemic problem. *Ann. Med.* 30: 176–185, doi: 10.3109/07853899808999401.



- Domenico P., Salo R., Cross A. & Cunha B. 1994. Polysaccharide Capsule-Mediated Resistance to Opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 62: 4495–4499, doi: 10.1128/IAI.62.10.4495-4499.1994.
- Doorduyn D., Rooijackers S., Schaik W. & Bardoel B. 2016. Complement resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae*. *Immunobiology.* 221: 1102–1109, doi: 10.1016/j.imbio.2016.06.014.
- Elemam A., Rahimian J. & Mandell W. 2009. Infection with Panresistant *Klebsiella pneumoniae*: A Report of 2 Cases and a Brief Review of the Literature. *Clin. Infect. Dis.* 49: 271–274, doi: 10.1086/600042.
- Emond. E., Dion E., Walker S., Vedamuthu E., Kondo J. & Moineau S. 1998. AbiQ, an Abortive Infection Mechanism from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4748–4756, doi: 10.1128/AEM.64.12.4748-4756.1998.
- Eriksson H. 2015. Bacterial viruses targeting multi-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. Stockholm University. Saatavissa: [https://pdfs.semanticscholar.org/9cee/e3b217796cbe564c33698af17d2c8b2ad0b2.pdf?\\_ga=2.99731358.1083286845.1587835924-1717871661.1580831085](https://pdfs.semanticscholar.org/9cee/e3b217796cbe564c33698af17d2c8b2ad0b2.pdf?_ga=2.99731358.1083286845.1587835924-1717871661.1580831085).
- Ferris M., Joyce P. & Burch C. 2007. High Frequency of Mutations That Expand the Host Range of an RNA Virus. *Genetics.* 176: 1012–1022, doi: 10.1534/genetics.106.064634.
- Fleming A. 1929. On the antibacterial action of culture of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. Influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* 10: 226–236.
- Fuhrman J. & Noble R. 1995. Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. *Limnol. Oceanogr.* 40:1236–1242, doi: 10.4319/lo.1995.40.7.1236.
- Gordo I., Perfeito L & Sousa A. 2011. Fitness Effects of Mutations in Bacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 21: 20–35, doi: 10.1159/000332747.
- Gödeke J., Paul K., Lassak J. ja Thormann K. 2011. Phage-induced lysis enhances biofilm formation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *ISME. J.* 5: 613–626, doi: 10.1038/ismej.2010.153.
- Hansen D., Aucken H., Abiola T. & Podschun R. 2005. Recommended Test Panel for Differentiation of *Klebsiella* Species on the Basis of a Trilateral Interlaboratory Evaluation of 18 Biochemical Tests. *J. Clin. Microbiol.* 42: 3665–3669, doi: 10.1128/JCM.42.8.3665-3669.2004.
- Hawkey P. & Finch R. 2007. Tigecycline: in-vitro performance as a predictor of clinical efficacy. *Clin. Microbiol. Infect.* 13: 354–362, doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01621.x.

- Heidari R., Shaw D. & Elger B. 2017. CRISPR and the Rebirth of Synthetic Biology. *Sci. Eng. Ethics*. 23: 351–363, doi: 10.1007/s11948-016-9768-z.
- Hughes K., Sutherland I., Clark J. & Jones M. 1998. Bacteriophage and associated polysaccharide depolymerases --novel tools for study of bacterial biofilms. *J. Appl. Microbiol.* 85: 583–590, doi: 10.1046/j.1365-2672.1998.853541.x.
- Hyman P. 2019. Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth. *Pharmaceuticals* 12: 35, doi: 10.3390/ph12010035.
- Karthik K., Muneeswaran N., Manjunathachar H., Gopi M., Elamurugan A. & Kalaiyarasu S. 2014. Bacteriophages: Effective Alternative to Antibiotics. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 2:1–7, doi: 10.14737/journal.aavs/2014/2.3s.1.7.
- Kitchel B., Rasheed J., Patel J., Srinivasan A., Navon-Venezia S., Carmeli Y., Brolund A. & Giske C. 2009. Molecular Epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in the United States: Clonal Expansion of Multilocus Sequence Type 258. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 3365–3370, doi: 10.1128/AAC.00126-09.
- Koskella B. & Brockhurst M. 2014. Bacteria-phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities. *FEMS. Microbiol. Rev.* 38: 916–931, doi: 10.1111/1574-6976.12072.
- Koskinen K., Penttinen R., Örmälä-Odegrip A-M., Giske C., Ketola T. & Jalasvuori M. 2021. Systematic Comparison of Epidemic and Non-Epidemic Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11: 599924, doi: 10.3389/fcimb.2021.599924.
- Lin D., Koskella B. & Lin H. 2017. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* 8: 162–173, doi: 10.4292/wjgpt.v8.i3.162.
- Llobet E., Martinez-Moliner V., Moranta D., Dahlström K., Regueiro V., Tomás A., Cano V., Pérez-Gutiérrez C., Frank C., Fernández-Carrasco H., Insua J., Salminen T., Garmendia J. & Bengoechea J. 2015. Deciphering tissue-induced *Klebsiella pneumoniae* lipid A structure. *PNAS*. 112: E6369–E6378, doi: 10.1073/pnas.1508820112.
- Lwoff A., Horne R. & Tournier P. 1962. A system of viruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 27: 51–62, doi:10.1101/SQB.1962.027.001.008.
- Maciejewska B., Olszak T. & Drulis-Kawa Z. 2018. Applications of bacteriophages versus phage enzymes to combat and cure bacterial infections: an ambitious and also a realistic application? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102: 2563–2581, doi: 10.1007/s00253-018-8811-1.

- Magare B., Nair A. & Khairnar K. 2017. Isolation of bacteriophages from air using vacuum filtration technique: an improved and novel method. *J. App. Microbiol.* 123: 896-902, doi: 10.1111/jam.13551.
- Mangalea M. & Duerkop B. 2020. Fitness Trade-Offs Resulting from Bacteriophage Resistance Potentiate Synergistic Antibacterial Strategies. *Infect. Immun.* 88: e00926-19, doi: 10.1128/IAI.00926-19.
- Manning A. & Kuehn M. 2011. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC. Microbiol.* 11:258, doi: 10.1186/1471-2180-11-258.
- Merino S., Camprubi S., Albertí S., Benedí V-J. & Thomás J. 1992. Mechanism of *Klebsiella pneumoniae* Resistance to Complement-Mediated Killing. *Infect. Immun.* 60: 2529-2535.
- Mäntynen S., Sundberg L-R., Oksanen H. & Poranen M. 2019. Half a Century of Research on Membrane-Containing Bacteriophage: Bringing New Concepts to Modern Virology. *Viruses.* 11: 76, doi: 10.3390/v11010076.
- Normark B. & Normark S. 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J. Intern. Med.* 252: 91-106, doi: 10.1046/j.1365-2796.2002.01026.x.
- Nyström T., Olsson R. & Kjelleberg S. 1992. Survival, Stress Resistance, and Alterations in Protein Expression in the Marine *Vibrio* sp. Stain S14 during Starvation for Different Individual Nutrients. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 55-65.
- Ochman H. & Moran N. 2001. Genes Lost and Genes Found: Evolution of Bacterial Pathogenesis and Symbiosis. *Science* 292: 1096-1099, doi: 10.1126/science.1058543.
- Paczosa M. & Mecsas J. 2016. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80: 629-661 doi: 10.1128/MMBR.00078-15.
- Pakzad I., Karin M., Taherikalani M., Boustanshenas M. & Lari A. 2013. Contribution of AcrAB efflux pump to ciprofloxacin resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from burn patients. *GMS. Hyg. Infect. Control.* 8: Doc15, doi: 10.3205/dgkh000215.
- Pandey D. & Gerdes K. 2005. Toxin- antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic. Acids. Res.* 33: 966-976, doi: 10.1093/nar/gki201.
- Papp-Wallace K., Endimiani A., Taracila M. & Bonomo R. 2011. Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrob. Agent. Chemother.* 55: 4943-4960. doi: 10.1128/AAC.00296-11.

- Podschun R., Pietsch S., Höller C. & Ullmann U. 2001. Incidence of *Klebsiella* Species in Surface Waters and Their Expression of Virulence Factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3325–3327, doi:10.1128/AEM.67.7.3325–3327.2001.
- Qin D., Abdi N. & Frederick K. 2007. Characterization of 16S rRNA mutations that decrease the fidelity of translation initiation. *RNA.* 13: 2348–2355, doi: 10.1261/rna.715307.
- Ratkowsky D. & Ross T. 1995. Modelling the bacterial growth/no growth interface. *Lett. Appl. Microbiol.* 20: 29–33, doi: 10.1111/j.1472-765X.1995.tb00400.x.
- Ryan E., Gorman S., Donnelly R. & Gilmore B. 2011. Recent advances in bacteriophage therapy: how delivery routes, formulation, concentration and timing influence the success of phage therapy. *J. Pharm. Pharmacol.* 63: 1253–1264, doi: 10.1111/j.2042-7158.2011.01324.x.
- Sambrook J., Fritsch E. & Maniatis T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2. painos. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.*
- Samson J., Magadán A., Sabri M. & Moineau S. 2013. Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nat. Rev. Microbiol.* 11:675–687, doi: 10.1038/nrmicro3096.
- Schembri M., Blom J., Krogfelt K. & Klemm P. 2005. Capsule and Fimbria Interaction in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 73: 4626–4633, doi:10.1128/IAI.73.8.4626–4633.2005.
- Sengupta S., Chattopadhyay M. ja Grossart H-P. 2013. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front. Microbiol.* 4: 47, doi: 10.3389/fmicb.2013.00047.
- Shi Y., Zhao W., Liu G., Ali T., Chen P., Liu Y., Kastelic J., Han B. & Gao J. 2021. Bacteriophages isolated from dairy farm mitigated *Klebsiella pneumoniae*-induced inflammation in bovine mammary epithelial cells cultured *in vitro*. *BMC. Vet. Res.* 17: 37, doi: 10.1186/s12917-020-02738-0.
- Sorek R., Kunin V. & Hugenholtz P. 2008. CRISPR-a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:181–186, doi.org/10.1038/nrmicro1793.
- Spapen H., Jacobs R., Gorp V., Troubleyn J. & Honore P. 2011. Renal and neurological side effects of colistin in critically ill patients. *Ann. Intensive. Care.* 1: 14, doi: 10.1186/2110-5820-1-14.
- Stokes H. ja Gillings M. 2011. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 35: 790–819, doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00273.x.

- Straus D. 1987. Production of an Extracellular Toxic Complex by Various Strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun.* 55: 44–48.
- Sulakvelidze A., Alavidze Z. & Morris J. Jr. 2001. Bacteriophage Therapy. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 45:649–659, doi: 10.1128/AAC.45.3.649–659.2001.
- Tan D., Zhang Y., Cheng M., Le S., Gu J., Bao J., Qin J., Guo X. & Zhu T. 2019. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* ST11 Isolates and Their Interactions with Lytic Phages. *Viruses.* 11: 1080, doi: 10.3390/v11111080.
- Tan D., Zhang Y., Qin J., Le S., Gu J., Chen L-k., Guo X. & Zhu T. 2020. A Frameshift Mutation in *wcaJ* Associated with Phage Resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Microorganisms.* 8: 378, doi: 10.3390/microorganisms8030378.
- Tock M. & Dryden C. 2005. The biology of restriction and anti-restriction. *Curr. Opin. Microbiol.* 8:466–472, doi: 10.1016/j.mib.2005.06.003.
- Tollerson II R. & Ibba M. 2020. Translational regulation of environmental adaptation in bacteria. *J. Biol. Chem.* 295: 10434–10445, doi: 10.1074/jbc.REV120.012742.
- Tomás J., Benedí V., Ciurana B. & Jofre J. 1986. Role of Capsule and O Antigen in Resistance of *Klebsiella pneumoniae* to Serum Bactericidal Activity. *Infect. Immun.* 54:85–89.
- Tsai F-C., Huang Y-T., Chang L-Y. & Wang J-T. 2008. Pyogenic Liver Abscess as Endemic Disease, Taiwan. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 1592–1600, doi: 10.3201/eid1410.071254.
- Yerushalmy O., Khalifa L., Gold N., Rakov C., Alkalay-Oren S., Adler K., Ben-Porat S., Kraitman R., Gronovich N., Ginat K., Abdalrhman M., Copenhagen-Glazer S., Nir-Paz R. & Hazan R. 2020. The Israeli Phage Bank (IPB). *Antibiotics* 9: 269, doi: 10.3390/antibiotics9050269.
- Volozhantsev N., Kislichkina A., Lev A., Mukhina T., Bogun A., Ershova O., Alexandrova I. & Fursova N. 2017. Genome Sequences of Two NDM-1 Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Multidrug-Resistant Strains of *Klebsiella pneumoniae* with a High Degree of Similarity, One of Which Contains Prophage. *Genome Announc.* 5: e01173–17, doi: 10.1128/genomeA.01173-17.
- Vukotic G., Obradovic M., Novovic K., Di Luca M., Jovcic B., Fira D., Neve H., Kojic M. & McAuliffe O. 2020. Characterization, Antibiofilm, and Depolymerizing Activity of Two Phages Active on Carbapenem- Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Fron. Med.* 7: 426, doi: 10.3389/fmed.2020.00426.
- Weinbauer M. 2004. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 127–181, doi: 10.1016/j.femsre.2003.08.001.

- WHO/EMC/ZOO/97.4. 1997. The Medical Impact of Antimicrobial Use in Food Animals. Maaailman terveystjärjestö (WHO). WHO:n kokousraportti. Berliini, Saksa, 13-17 Lokakuu 1997. Saatavissa: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/64439/WHO\\_EMC\\_ZOO\\_97.4.pdf;jsessionid=BCDABC60429F66579D71C5DCB94C73FF?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/64439/WHO_EMC_ZOO_97.4.pdf;jsessionid=BCDABC60429F66579D71C5DCB94C73FF?sequence=1)
- WHO 2014. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. Geneve, Sveitsi. Saatavissa: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748\\_eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf).
- WHO 2017. Global Priority List of Antibiotic-Resistance Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. Pöytäkirja. Saatavissa: [https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf](https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf).
- Wintachi P., Naknaen A., Thammaphet J., Pomwised R., Phaonakrop N., Roytrakul S. & Smith D. 2020. Characterization of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* phage KP1801 and evaluation of therapeutic efficacy in vitro and *in vivo*. *Sci. Rep.* 10: 11803, doi: 10.1038/s41598-020-68702-y.

## LIITE 1. Alkuperäisten bakteerikantojen ja -isolaattien genomidata

Taulukko A. Bakteerikantojen esitiedot. Taulukko on mallinnettu Koskinen ym. 2021 julkaisusta.

Bakteerikanta	Isolaatti	Eristysmaa	CRISPR-lokusten määrä	Profaagialueiden määrä	Lähde	Virulenssigeeni	Kapsidin tyyppi	$\beta$ -laktamaasi
EKP3	70165	Yhdysvallat	3	10	Kitchel ym. 2009	<i>Irp, fyu, ybt, kfu, mrk</i>	K2	blaTEM-1A, blaSHV-28, blaKPC-3
EKP8	2008025	Yhdysvallat	0	11	Kitchel ym. 2009	<i>Mrk</i>	K13	blaKPC-2, blaSHV-11

Taulukko B. Alkuperäisten bakteeri-isolaattien mutaatioiden määrät.

Bakteerinäyte	Mutaatioiden määrät (homotsygootit)					Homotsygoottien osuus (%)
	Mutaatiotyyppit					
	SNV	MNV	Insertio	Deleetio	Korvike	
EKP3 s.e	2 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100
EKP3 p.c	9 (1)	0 (0)	0 (0)	3 (1)	0 (0)	17
EKP8 s.e	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
EKP8 p.c	1 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0

SNV: yhden nukleotidin mutaatio

MNV: useamman nukleotidin mutaatio

KATEGORIA					FUNKTIO
	EKP3 s.e	EKP3 p.c	EKP8 s.e	EKP8 p.c	
Biofilmin adheesiinin biosynteesi		■			Biofilmin PGA:n ulkokalvon erityis, PgaA
Ekstrasellulaarinen ja kapsidin polysakkaridit	■				Kolaanihapon biosynteesin UDP-glukoosilipidikantaja transferaasi WcaJ
Kofaktorit ja vitamiinit			■		Glutamyyli-Q-tRNA-syntetaasi
		■			Sisäkalvon mangaani ABC:n transportteri
Metalliyhdisteen kuljetus ja metabolia				■	Elohopean transportteri MerE
Stressivaste	■				Korkean affiniteetin koliinin kuljetusproteiini BetT
		■			Ulkokalvon proteiini-C:n esiaste
Tuntematon		■			Hypoteettinen proteiini

Kuva A. Alkuperäisten bakteeri-isolaattien geenimutaatioiden kohdeproteiinit. Isolaattien mutaatiot on selvitetty vertailemalla niitä alkuperäisen kannan (EKP3 tai EKP8) sekvensseihin. Mutaatioiden kohdegeenin kategoria ja funktio osoittaa, mihin toimintaan ekspressoitava geeni osallistuu. Harmaalla värityksellä on kuvattuna bakteeri-isolaatissa esiintyvät mutaatiot.



## LIITE 2. Ravinnepitoisuuden vaikutus koodaavien geenien mutaatioihin

KATEGORIA	EKP3, Loppu	EKP3 s.e., Loppu	EKP3 p.c., Loppu	EKP3, Loppu	EKP3 s.e., #8	EKP3 s.e., #26	EKP3 s.e., #29	EKP3 s.e., #32	EKP3 s.e., Loppu	EKP3 p.c., #23	EKP3 p.c., #29	EKP3 p.c., #32	EKP3 p.c., Loppu	FUNKTIO
Aminohapot ja johdannaiset														Leusiinireaktiivinen säätelyproteiini, haaroittuneen aminohappoketjun korkean affiniteetin kuljetusjärjestelmä
Biofilmin adheesiin biosynteesi														Biofilmin PGA:n ulkokalvon erityis, PgaA**
Ekstrasellulaarinen ja kapsidin polysakkaridit														Kolaanihapon biosynteesin UDP-glukoosilipidikantajatransferaasi WcaI*
Faagit, liikkuvat elementit, plasmidit														Faagin häntäkuituproteiini
														Integronin integraasi IntI/Pac
														Mobilielementti-proteiini
Kofaktorit ja vitamiinit														NAD(P)H-falvinioksidoreduktaasi
Metalliyhdisteiden kuljetus ja metabolia														Rautaa sitovan hydroksamaatin ulkokalvon reseptori PhuA
														Raudan sideroforien kuljetusjärjestelmä, periplasminen sitoutumisproteiini TonB
Proteiinin metabolia														ATP-riippuvainen Clp-proteaasin ATP:tä sitova alayksikkö ClpA
														rRNA Ribosomaaliproteiinin L11 metyyli transferaasi (EC 2.1.1.-)
Rikkimetaobila														Fe(2+)/alfa-ketoglutaattiriippuvainen dioksigenaasi LpxO
RNA:n metabolia														Käänteiskopioijaentsyymi (EC 2.7.7.49)
														RNA-polymeraasin sigmafaktori RpoS
Solun jakautuminen ja solusykli														Kromosomin (plasmidin) jakava proteiini ParB
Stressivaste														Oikean origonin sitova proteiini
														Korkean affiniteetin koliinin kuljetusproteiini BetI*
														Ulkokalvon proteiini-Cn esiaste**
Säätely ja solusignointi														Kaksikomponenttinen vastesäädin CreC
Tuntematon														FIG00621989: hypoteettinen proteiini
														FIG00731921: hypoteettinen proteiini
														FIG00731934: hypoteettinen proteiini
														FIG01049711: hypoteettinen proteiini
Virulenssi ja puolustus														RND-moniläike-effluksitrasporterri, Akriflaviiniresistenssi-proteiini

\*Alkuperäisessä EKP3 s.e:ssä esiintyvä mutaatio

\*\*Alkuperäisessä EKP3 p.c:ssä esiintyvä mutaatio

Kuva A. Ravinnepitoisuuden vaikutus bakteerien geenimutaatioihin. Kuvassa on esitettyä 10 % ravinnepitoisuuden vaikutus bakteerikantojen ja niiden isolaattien genomiin. Sekvensoitujen näytteiden (loppuvaihe ja numeroidut välivaiheet) mutaatioiden kohteina olleiden geenien kategoriat ja funktiot on kirjattuna laidoilla. Harmaalla värjäytyt ruudut kuvastavat bakteerikasvustossa havaitut geenimutaatiot. Yleisin geenimutaatio kohdistui useampaan rRNA-geeniin, mutta myös integroituneiden faagigenomien mutaatiot olivat yleisiä. Alkuperäisessä EKP3 s.e:ssä ja EKP3 p.c:ssä esiintyvät mutaatiot ovat \*-merkeillä kuvattuna (vasen alalaita).

### LIITE 3. Faagien infektiokyvyn muutokset EKP3-kannassa eri olosuhteissa

MOI	ID	Faagit								
		EKP3P1	EKP3P2	EKP3P4	EKP3P5	EKP8P1	EKP8P2	EKP8P3	EKP8P4	EKP8P6
1	A									
10	A									
100	A									
1	A+									
10	A+									
100	A+									
1	B									
10	B									
100	B									
1	B+									
10	B+									
100	B+									
1	C									
10	C									
100	C									
1	C+									
10	C+									
100	C+									

**A** = faagikoktaili, +37 °C, 210 rpm      **A+** = faagikoktaili + EKP8P6, +37 °C, 210 rpm  
**B** = faagikoktaili, +37 °C                      **B+** = faagikoktaili + EKP8P6, +37 °C  
**C** = faagikoktaili, RT                              **C+** = faagikoktaili + EKP8P6, RT

Kuva A. Faagien infektiivisyyden muutokset EKP8P6-faagin infektoimassa. Eri olosuhteissa (A-C) ja eri faagikoktailpitoisuudella (MOI 1, 10 ja 100) käsitellyt EKP3-kannat kehittivät faagiresistenssin useita faageja vastaan. EKP8P6-faagin lisäys faagikoktailiin on kuvattu +-merkillä ja faagin infektiokyky harmaalla värillä. Kuvassa on esitettyä koosteena useiden infektiotestien keskiarvoiset tulokset, kun EKP8P6-faagi kykeni infektoimaan EKP3:n käsittelyn jälkeen. EKP8P6:n infektoimassa bakteeri oli kehittänyt jokaisessa tapauksessa resistenssiä EKP8P3-faagia vastaan. Eri olosuhteita tarkasteltaessa nähdään, kuinka C ja C+-kasvatukset olivat kehittyneet tehokkaimiksi, kun EKP8P6 kykeni infektoimaan. Faagikoktailien erot eivät tuottaneet eroavaisuuksia.

MOI	ID	Faagit								
		EKP3P1	EKP3P2	EKP3P4	EKP3P5	EKP8P1	EKP8P2	EKP8P3	EKP8P4	EKP8P6
1	A									
10	A									
100	A									
1	A+									
10	A+									
100	A+									
1	B									
10	B									
100	B									
1	B+									
10	B+									
100	B+									
1	C									
10	C									
100	C									
1	C+									
10	C+									
100	C+									

**A** = faagikoktaili, +37 °C, 210 rpm      **A+** = faagikoktaili + EKP8P6, +37 °C, 210 rpm  
**B** = faagikoktaili, +37 °C                      **B+** = faagikoktaili + EKP8P6, +37 °C  
**C** = faagikoktaili, RT                              **C+** = faagikoktaili + EKP8P6, RT

Kuva B. Faagien infektiivisyyden muutokset EKP8P6-faagin ollessa infektoimaton. Kuvassa on esitetty, kuinka EKP3-kanta kehittyi eri olosuhteissa (A-C) ja faagikoktailpitoisuudessa (MOI 1, 10 ja 100) resistentiksi faagikoktailin faageille EKP8P6-faagin ollessa infektoimaton. EKP8P6:n lisäys faagikoktailiin on kuvattu +-merkillä ja faagi-infektiot harmailla palkeilla. Faagien infektiotestien keskiarvoisten tulosten perusteella nähdään, kuinka EKP8P6:n ollessa infektoimaton, kykenee EKP8P3 infektoimaan lähes kaikissa olosuhteissa. Faagikoktailien erot ja niiden MOI:t, kuten myös kasvatusolosuhteet, eivät aiheuttaneet merkittäviä poikkeavuuksia faagi-infektioissa.

## LIITE 4. EKP3-kannan faagiresistenssin kartoitus geenimutaatioilla

KATEGORIA	Vaihe 1. EKP3	Vaihe 3. EKP3	Uusi EKP3 p.c	FUNKTIO
Biofilmin adheesiin biosynteesi	■	■	■	Lipopolysakkaridin ytimen biosynteesin glykosyylitransferaasi
Ekstrasellulaarinen ja kapsidin polysakkaridit	■	■	■	Kolaanihapon biosynteesin UDP-glukoosilipidikantajatransferaasi Wca]*
Faagit, liikkuvat elementit, plasmidit	■	■	■	Mobiilielementtiproteiini
Kalvon kuljetusjärjestelmät	■	■	■	Natriumriippuvainen transportteri
	■	■	■	T1SS erittyvä agglutiniinin RTX-proteiini
	■	■	■	Yleisen eritysureitin proteiini B
Kofaktorit ja vitamiinit	■	■	■	Aerobisen kobaltokelataasin CobT:n alayksikkö (EC 6.6.1.2)
	■	■	■	Kobalamiinin biosynteesiproteiini CbiG
	■	■	■	NAD(P)H-falvinioksidoreduktaasi
Metalliyhdisteiden kuljetus ja metabolia	■	■	■	Raudan sideroforien kuljetusjärjestelmä, periplasminen sitoutumisproteiini TonB
	■	■	■	Rautahydroksimaatin ABC-transportteri (TC 3.A.1.14.3), periplasmisen substraatin sitoutumisproteiini FhuD
Proteiinin metabolia	■	■	■	rRNA
	■	■	■	tRNA
Tuntematon	■	■	■	FIG00731921: hypoteettinen proteiini
	■	■	■	FIG01219819: hypoteettinen proteiini
	■	■	■	FIG01220709: hypoteettinen proteiini

\*Alkuperäisessä EKP3 s.e:ssä esiintyvä mutaatio

Kuva A. EKP3-kannan faagikoktailikäsitteilyn aikaansaamat geenimutaatiot. Kuvassa on esitetty kahden eri kokeen tulokset: eri vaiheissa suoritettujen faagikoktailaltistuskokeen ja uuden EKP3 p.c-mutanttien kehityskokeen. Mutatoituneen geenin kategorian ja funktion väliin jäävä alue kuvastaa, missä bakteerikasvatuksessa kyseinen mutaatio on ilmennyt (harmaalla väri). Kuvasta nähdään, kuinka kolme eri geenimutaatiota esiintyi kaikissa bakteerikasvatuksissa. Näistä yksi esiintyi myös alkuperäisessä EKP3 s.e-mutantissa (\*-merkitty).