

**DNA-metylaatioon perustuvat bakteerien puolustusjärjestelmät ja virusten keinot niiden ohittamiseen: BREX ja anti-BREX-strategiat biologisessa kilpavarustelussa**

Eero Savilahti

Fysiologia ja genetiikka

LuK-tutkielma

Laajuus: 6 op

30.3.2026

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

**Pääaine:** Fysiologia ja genetiikka

**Tekijä:** Eero Savilahti

**Otsikko:** DNA-metylaatioon perustuvat bakteerien puolustusjärjestelmät ja virusten keinot niiden ohittamiseen: BREX ja anti-BREX-strategiat biologisessa kilpavarustelussa

**Ohjaaja:** Riitta Nissinen

**Sivumäärä:** 27 sivua

**Päivämäärä:** 30.3.2026

---

Bakteerien ja bakteriofagien eli faagien välillä vallitsee evolutiivinen kilpavarustelu. Faageja vastaan bakteereille on kehittynyt lukuisia erilaisia puolustusjärjestelmiä. Useat järjestelmät sallivat faagien pääsyn bakteerin sisään, jossa ne tunnistetaan tunkeilijoiksi.

Puolustusjärjestelmät tuhoavat faagit bakteerisolussa esimerkiksi katkaisemalla niiden DNA:n. BREX-puolustusjärjestelmä erottelee tunkeutuvan faagin bakteerista metyloituneiden emästen avulla. BREX:n metyyli transferaasi liittää isäntäbakteerin genomien spesifisiin emäksiin metyyli ryhmiä. Faageilla ei ole kyseisiä metyyli merkkejä vastaavissa DNA-jaksoissaan. Kun faagi tunkeutuu bakteeriin, BREX-järjestelmä tunnistaa metyloimattomat tunnistusjaksot ja restriktoi faagin DNA:n toistaiseksi tuntemattomalla mekanismilla. Eri BREX-tyypit jaotellaan geenikoostumuksen ja toimintojen mukaan kuuteen eri luokkaan. Yleisin on tyyppi 1 BREX, joka sisältää kuusi geeniä.

Faageille on vastaavasti kehittynyt keinoja, joilla ne pystyvät ohittamaan bakteerien puolustusjärjestelmät. Faagien koodaama Ocr-proteiini on tyypillinen useiden bakteerien puolustusjärjestelmien, kuten BREX:n, inhiboija. Muita anti-BREX-proteiineja ovat OrbA ja SAMaasi, jotka ovat erikoistuneet BREX-järjestelmän inhibointiin. Anti-BREX-proteiinit toimivat joko inhiboimalla BREX-komponentteja tai BREX-puolustuksessa välttämättömiä kofaktoreita.

---

**Avainsanat:** DNA-metylaatio, metyyli transferaasi, BREX, anti-BREX-strategiat

# SISÄLLYS

1	Johdanto .....	1
2	DNA-metylaatio .....	2
2.1	Metyylitransferaasit .....	2
2.2	Metyyliinsiirtoreaktio .....	4
3	Bakteerien puolustusjärjestelmät .....	5
3.1	Metylaatioon perustuvat puolustusjärjestelmät .....	6
3.1.1	R-M-systeemit .....	6
3.1.2	Pgl-systeemi .....	9
3.1.3	BREX .....	9
3.1.4	DISARM .....	10
3.1.5	MADS .....	10
4	BREX .....	11
4.1	BREX-superperhe .....	13
4.2	BrxX metyylitransferaasi .....	15
4.3	BrxZ .....	17
4.4	BrxA .....	18
4.5	BrxL .....	18
4.6	BrxC .....	19
5	Faagien anti-BREX-strategiat .....	19
5.1	Ocr .....	20
5.2	OrbA .....	21
5.3	SAMaasi .....	21
6	Lähteet .....	22

# 1 JOHDANTO

Lois-isäntä-suhde on yksi tunnetuimmista eliöiden välisistä vuorovaikutussuhteista. Esimerkiksi loispistiäinen munii munansa elävän perhosentoukan sisään ja käyttää isäntänsä kudoksia ravintona toukilleen, kunnes isäntätoukka lopulta kuolee. Myös mikroskooppisen pienillä yksisoluisilla eliöillä, kuten bakteereilla, havaitaan samankaltaisia vuorovaikutussuhteita. Prokaryooteille uhkaavia tekijöitä voivat olla esimerkiksi toiset bakteerit, virukset tai jopa ihminen. Tässä tutkielmassa keskitytään viruksiin, jotka infektoivat bakteereita – eli bakteriofageihin, sekä niitä vastaan kehittyneisiin puolustusmekanismeihin.

Bakteriofagit eli faagit eivät nykyäskäsitksen mukaan kuulu eliöihin, sillä niillä ei ole solurakennetta, eivätkä ne pysty lisääntymään itsenäisesti ilman isäntäsolua. Siten niille on evoluution myötä kehittynyt lukuisia keinoja, joilla ne pystyvät valjastamaan bakteerisolun tuottamaan omia viruspartikkeleitaan. Bakteerit puolestaan vastaavat tähän alituiseen uhkaan toinen toistaan kekseliäimillä puolustusmekanismeilla, joihin faagien täytyy taas kehittää uusia ohitusmekanismeja. Faagien ja niiden isäntäsolujen välillä vallitseekin päättymätön evoluutiivinen kilpavarustelu. Kun toiselle osapuolelle kehittyy uusi puolustuskeino, toisen on sopeuduttava siihen kehittämällä vastamekanismeja. Tämä vuorovaikutteinen sopeutumisprosessi johtaa molempien osapuolten yhteiseen evoluutioon eli koevoluutioon.

Bakteereille on kehittynyt erilaisia keinoja torjua bakteriofageja. Osa puolustusmekanismeista estää kokonaan faagien tunkeutumisen solun sisään, kun taas toiset estävät niiden lisääntymisen isäntäsolun sisällä. Keinoja torjua virusten lisääntyminen ovat muun muassa niiden replikaation häiritseminen, virusproteiinien synteessin estäminen ja erilaiset viruksen perimän katkaisuun perustuvat järjestelmät. Sekä virusten että bakteerien perimä koostuu nukleiinihaposta. Tämän vuoksi keskeinen haaste bakteereilla onkin erottaa viruksen nukleiinihaposta omastaan. Ratkaisuna ongelmaan bakteereille on kehittynyt puolustusjärjestelmiä, jotka erottavat tunkeilijan sen DNA-sekvenssin – tai siihen tehtyjen modifikaatioiden – perusteella. Tutkielmassani keskityn mekanismeihin, jotka erottelevat tunkeilijan DNA:n isännästä metyloituneiden emästen avulla.

## 2 DNA-METYLAATIO

DNA-metylaatio tarkoittaa metyyliryhmän (-CH<sub>3</sub>) liittämistä DNA-emäkseen. Eukaryooteilla DNA-metylaatio tarkoittaa sytosiinin viidennen hiilen (C5) metylaatiota. Prokaryooteilla C5-metylaation lisäksi tunnetaan myös sytosiinin neljännen aseman typen (4N) sekä adeninin kuudennen aseman typen (6N) metylaatiot. Metyyliryhmän liittämistä emäkseen katalysoi DNA-metyylitransferaasi, joka käyttää pääosin S-adenosyyli-L-metioniinia (SAM, AdoMet) kofaktorinaan. SAM luovuttaa reaktiossa metyyliryhmänsä emäkselle ja vapautuu S-adenosyyli L-homokysteiniinä (AdoHcy). DNA-metylaation tärkeydestä kertoo se, että SAM on toiseksi yleisin kofaktori soluissa heti adenosiinitrifosfaatin (ATP) jälkeen (Perlinska ym., 2020). DNA-metylaatiosta tekee erityisen tärkeän se, että se tuottaa DNA-juosteeseen lisäinformaatiota, jota ei pystytä tarjoamaan itse DNA-sekvenssissä. Metylaatio on merkittävässä osassa muun muassa geenien säätelyssä, genomisessa leimautumisessa ja – etenkin prokaryooteilla – genomien eheyden puolustamisessa viruksia vastaan.

### 2.1 Metyylitransferaasit

DNA-metyylitransferaasit ovat joukko entsyymejä, jotka katalysoivat metyyliryhmän siirtämisen SAM:sta DNA:n emäkseen. Metyylitransferaasit voidaan karkeasti jaotella kahteen eri kategoriaan: eksosyklisiin aminometyylitransferaaseihin ja endosyklisiin hiilimetyylitransferaaseihin. Aminometyylitransferaasit vastaavat typpiatomien metylaatiosta, kun taas hiilimetyylitransferaasit metyloivat emäksen viidennen aseman hiilen.

Metyylitransferaasit voidaan myös jaotella niiden toiminnan mukaan eri luokkiin. Toiset tunnistavat vain hemimetyloitunutta DNA:ta ylläpitäen genomien metyloimisastetta replikaation jälkeen. Toiset puolestaan tunnistavat täysin metyloimattomia sekvenssejä ja tekevät *de novo* -metylaatioita. Tällaiset *de novo* -entsyymit voivat metyloidä joko yhden tai kummatkin komplementaarista DNA-juosteista. Suurin osa bakteerien metyylitransferaaseista kuitenkin pystyy metyloimaan sekä hemimetyloitunutta että ei-metyloitua DNA:ta. (Sankpal & Rao, 2002.)

Ennen itse metyyliryhmän siirtoreaktiota entsyymien pitää tunnistaa spesifinen DNA-jakso sekä sitoutua siihen ja SAM-molekyyliin. Vaikka metyylitransferaaseja on erilaisia, niiden DNA:ta tunnistavissa ja sitovissa rakenteissa (engl. motif) on yhteisiä piirteitä. Reaktion olennaisimmat entsyymialueet ovat täysin konservoituneita kaikissa metyylitransferaaseissa. Esimerkiksi entsyymien aktiivisen keskuksen kysteini on hyvin konservoitunut, sillä se on välttämätön metyylinsiirtoreaktion katalysoinnissa. Etenkin C5-sytosiinimetyylitransferaasit ovat rakenteeltaan, toiminnaltaan ja sekvenssispesifisyydeltään hyvin samankaltaisia. (Sankpal & Rao, 2002.)

Metyylitransferaasit ovat globulaarisia proteiineja, jotka koostuvat kahdesta alayksiköstä: suuremmasta ja pienemmästä. Suuremmassa on kofaktori SAM:n tunnistava rakenne sekä metylaatioreaktiosta vastaava katalyyttinen keskus. Pienempi alayksikkö koostuu pääosin alueesta, joka tunnistaa spesifisen DNA-sekvenssin – yleisimmin palindromisen sekvenssin. Alayksiköiden väliin jäävään rakoon puolestaan sitoutuu metyloitava DNA-jakso. DNA sitoutuu rakoon siten, että sen suurempi uurre (engl. major groove) on kohti entsyymien pienempää tunnistusalayksikköä ja pienempi uurre (engl. minor groove) kohti suurempaa katalyysidomeenia.

*M.HhaI* on yksi tutkituimmista metyylitransferaaseista. Se on *Haemophilus haemolyticus* – bakteerin R-M-puolustusjärjestelmään (engl. restriction modification) liittyvä entsyymi, joka metyloi sytosiinin viidennen aseman hiilen. Se tunnistaa kaksijuosteisessa DNA:ssa jakson 5'-GCGC-3' ja metyloi kummastakin juosteesta sisimmäisen sytosiinin. Cheng ym. (1993) onnistuivat selvittämään ensimmäisen metyylitransferaasikompleksin rakenteen, kun he kiteyttivät *M.HhaI*-SAM-kompleksin. Sen avulla selvitettiin hiilimetyylitransferaasien konservoitunut ydinrakenne, joka sisältää kaikki yleiset motiivit, jotka ovat vastuussa SAM:n sitoutumisesta ja metyylitransferaasin toiminnoista. Esimerkkinä eräästä toisesta hiilimetyylitransferaasista on *M.HaeIII*, joka tunnistaa sekvenssin 5'-GGCC-3' metyloiden sisimmäisen sytosiinin (Sankpal & Rao, 2002). *M.HaeIII* on rakenteeltaan hyvin samankaltainen kuin *M.HhaI*-entsyymi, ja ne sisältävät useita konservoituneita tunnistuskohtia.

## 2.2 Metyylinsiirtoreaktio

Metylaatioreaktio voidaan karkeasti jakaa kolmeen eri vaiheeseen: metyyli transferaasin kiinnittyminen substraatteihinsa, itse metyyli ryhmän siirtoreaktio ja tuotteiden vapauttaminen. Kiinnittymisvaiheessa metyyli transferaasi sitoutuu sekä SAM:iin että DNA:han. Gromovan ja Khoroshaevin (2003) katsausartikkelin mukaan se kiinnittyy aluksi epäspesifiseen DNA-sekvenssiin ja vasta sen jälkeen etsii oman tunnistussekvenssinsä. Heidän mukaansa metyyli transferaasi liukuu pitkin DNA:ta, kunnes se löytää oman kohdekvenssinsä. Löydettyään kohdekvenssinsä metyyli transferaasi muodostaa yhdessä DNA:n ja SAM:n kanssa kompleksin, jossa metyyli ryhmän siirtoreaktio voi tapahtua. Sekä SAM että AdoHcy vuorovaikuttavat paljon voimakkaammin entsyymi-DNA-kompleksin kanssa kuin entsyymillä ja metyloituneen DNA:n muodostaman kompleksin kanssa. Tämän vuoksi SAM sitoutuu kompleksiin vasta sen jälkeen, kun entsyymi on ensin kiinnittynyt DNA:han. (Wu & Santi, 1987.)

Sytosiinin viides hiili on normaalisti inertti atomi eli se ei reagoi muiden kemiallisten ryhmien kanssa. Tämän vuoksi ennen sen reaktiota, siitä täytyy tehdä reaktiivisempi. Wu ja Santi (1987) esittivät *M.HhaI* metyyli transferaasin katalysoiman reaktion, joka on jakautunut kahteen osareaktioon. Ensimmäisessä vaiheessa C5 aktivoidaan, ja toisessa vaiheessa siihen liitetään metyyli ryhmä. Sytosiinin viidennen hiilen aktivaatio tapahtuu nukleofiilillä hyökkäyksellä siten, että entsyymillä aktiivisen keskuksen kysteiinitähteen tioliryhmä (-SH) hyökkää sytosiinin kuudenteen hiileen. Välituotteena syntyy kompleksi, jossa entsyymi on tioetterisidoksella kiinni sytosiinin kuudennessa hiilessä muodostaen resonanssin stabiloiman karbanionin. Toisessa vaiheessa aktivoitu korkeaenerginen C5 hyökkää SAM:n metyyli ryhmään, minkä seurauksena metyyli ryhmä liittyy sytosiinin C5-asemaan. Tämän jälkeen entsyymi irtoaa sytosiinista. Tuotteina reaktiosta vapautuvat ensin AdoHcy ja sen jälkeen DNA-juoste, jossa on uusi metyloitu sytosiini. (Wu & Santi, 1987.)

Metyylinsiirtoreaktio vaatii, että kohde-emäs sytosiinin täytyy olla vapaana. Normaalisti sytosiini lokalisoituu kaksijuosteisessa DNA:ssa juosteiden väliin, jolloin steerisyys estää metyyli transferaasin tioliryhmän nukleofiilisen hyökkäyksen. Klimasauskas ym. (1994) esittivät, että *M.HhaI*-metyyli transferaasi pystyy kuitenkin kääntämään (engl. flip) kohdesytosiininsa DNA-juosteiden välistä ulos aktiiviseen keskukseensa siten, että nukleofiilinen hyökkäys pystyy tapahtumaan. Heidän tutkimuksensa mukaan nukleotidin

kääntäminen DNA-juosteiden välistä osoittamaan päinvastaiseen suuntaan luo vääntömomenttia ja huomattavia rakennevääristymiä juosteeseen – erityisesti viereisiin fosfaatteihin, jotka väännön vaikutuksesta liikkuvat pois tavallisilta paikoiltaan. Nämä muutokset kasvattavat eri juosteiden fosfaattiryhmien välimatkaa toisistaan siten, että kohdesytosiini pystyy kääntymään DNA:n pienemmän uurteen läpi ilman kovalenttisten sidosten katkaisemista. Kun aktiivinen entsyymi-substraatti-kompleksi muodostuu, sytosiini siis käännetään pois päin emäsparistaan eli guaniinista. Täten myös vetysidokset kohdesytosiinin ja sen vastinpari guaniinin välillä katkeavat. Käännettyä sytosiinia kuitenkin stabiloidaan vetysidoksilla, jotka muodostuvat sytosiinin ja metyyliitransferaasin aminohappojen Glu-119, Arg-165 ja Phe-79 välille sekä kovalenttisella sidoksella, jonka kohdesytosiini muodostaa entsyymien Cys-81 kanssa. Myös hetkellisesti pariton guaniinimäs muodostaa kolme vetysidosta metyyliitransferaasin Gln-237 kanssa, joka korvaa reaktion aikana sytosiinin paikan. (Klimasauskas ym., 1994.)

### 3 BAKTEERIEN PUOLUSTUSJÄRJESTELMÄT

Bakteerien ja niiden virusten eli bakteriofagien (faagien) välillä vallitsee alituinen kilpavarustelu. Miljardien vuosien koevoluutio on johtanut virusten ja niiden isäntäbakteerien lukuisten eri hyökkäys- ja puolustusstrategioiden kehittymiseen. Kun toiselle kehittyy uusi mekanismi, toisen pitää pystyä vastaamaan siihen. Näin ollen bakteereille on kehittynyt lukuisia erilaisia keinoja torjua bakteriofageja, esimerkiksi estämällä niiden tunkeutuminen tai häiritsemällä niiden lisääntymistä. Samalla faageille on kehittynyt vastakeinoja kiertää näitä bakteerien puolustusjärjestelmiä. Faageilla ei ole omaa aineenvaihduntaa, eivätkä ne pysty lisääntymään itsenäisesti, vaan ne hyödyntävät isäntänsä proteiinisynteesikoneistoa uusien faagipartikkeleiden tuottamiseen. Sen vuoksi bakteerien haasteena onkin estää faagipartikkelien syntetisointi ilman, että niiden oma proteiinisynteesi häiriintyy

Bakteerien genomista jopa 10 % voi koostua geeneistä, jotka liittyvät jollain tavalla faagipuolustukseen (Koonin ym., 2017). Toiminnaltaan kytkeytyneet faagiresistenssiin liittyvät geenit ovat järjestäytyneet yleensä puolustusaarekkeiksi (engl. defense islands) bakteri- ja arkeonigenomeihin (Makarova ym., 2011). Puolustusaarekkeiden geenit ovat klusteroituneet eli ovat lokuksiltaan lähellä toisiaan. Yhdessä genomissa voi olla useita puolustusaarekkeita, mikä tarkoittaa sitä, että useampi puolustusjärjestelmä voi toimia

samanaikaisesti. Bakteereiden yksinkertaisin keino puolustautua on estää faagia tunnistamasta niitä – esimerkiksi vaihtelemalla omia pintaproteiinejaan. Useat puolustusjärjestelmät kuitenkin sallivat faagien tunkeutumisen ja tunnistavat ne tunkeilijoiksi vasta niiden emäsjärjestyksen perusteella. Bakteereille haasteen luo se, että niiden täytyy erottaa vieras DNA jollain keinolla omastaan, jotta ne eivät tuhoa itseänsä.

Bakteerien puolustusstrategiat voidaankin jakaa karkeasti kahteen kategoriaan: synnynnäiseen ja adaptiiviseen (A. B. Isaev ym., 2021). Esimerkiksi CRISPR-Cas-järjestelmä on adaptiivinen, sillä se tallettaa isännän genomiin aikaisemmista tunkeilijoista DNA-fragmentteja, joiden avulla seuraavat samanlaiset faagit saadaan tuhottua. Puolestaan Abi-mekanismi (engl. abortive infection) on esimerkki synnynnäisestä järjestelmästä. Siinä faagi-infektio saa aikaan bakteerisolun ohjelmoidun kuoleman ennen kuin faagi ehtii lisääntyä (Lopatina ym., 2020). Tässä kandidaatintutkielmassani keskityn ainoastaan synnynnäisiin puolustusjärjestelmiin ja niistä tarkemmin sellaisiin, joissa erot isännän ja faagi-DNA:n välillä perustuvat metylaatioon.

### *3.1 Metylaatioon perustuvat puolustusjärjestelmät*

Metylaatioon perustuvat puolustusjärjestelmät sallivat faagin tunkeutumisen bakteerin sisään, mutta estävät sen lisääntymisen. Tällaiset järjestelmät erottavat tunkeutuvan faagin perimän isännän perimästä metyloituneiden emästen avulla. Bakteerien puolustusjärjestelmät metyloivat joko faagin DNA:ta tai isännän DNA:ta. Tässä luvussa esittelen erilaisia metylaatioon pohjautuvia puolustusjärjestelmiä, minkä jälkeen luvussa neljä syvennyn tarkemmin erääseen niistä, BREX:iin.

#### 3.1.1 R-M-systeemit

R-M-systeemit (engl. restriction-modification systems) ovat keskeisimpiä bakteerien puolustusjärjestelmiä, ja niitä on löydetty noin 90 %:lta kaikista sekvensoiduista bakteri- ja arkeonigenomeista. Ne koostuvat kahdesta päätyypin entsyymistä: metyyli transferaasista ja restriktioendonukleasi-entsyymistä. Kuten muutkin tässä luvussa esittelemäni järjestelmät, R-M-systeemit erottelevat vieraan DNA:n ja isäntäbakteerin DNA:n metyloitujen emästen avulla. Järjestelmä tunnistaa ja metyloi isäntäbakteerin genomien R-M-spesifisiä sekvenssejä.

Faagin perimässä on samoja sekvenssejä, mutta metyloimattomia, minkä vuoksi puolustusjärjestelmä tunnistaa ne vieraiksi. Uusia metyloimattomia R-M-sekvenssejä syntyy bakteerin replikaatiossa, joten metyyli transferaasiaktiivisuus on ensiarvoisen tärkeää bakteerin koko elämänsä aikana. Restriktioentsyymi puolestaan tunnistaa samasta sekvenssistä metyloimattoman version faagin genomista ja katkaisee sen. Restriktioendonukleaasi katkaisee vain metyloimatonta DNA:ta, koska sillä on alhainen affiniteetti metyloituneisiin ja hemimetyloituneisiin kohtiin (Kang ym., 2025). Toisin sanoen metyyli transferaasi metyloi isäntäbakteerin genomia peittääkseen restriktioentsyymien tunnistuskohdat ja siten estääkseen isännän DNA:n katkaisun.

R-M-systeemit liittävät metyyli ryhmän joko kumpaankin DNA-juosteeseen tai vain toiseen. Yleisin modifikaatio on N6-metyyliadeniini, jonka lisäksi muita modifikaatioita ovat N4-metyylisytosiini ja C5-metyylisytosiini (Kang ym., 2025). R-M-systeemit jaetaan viiteen eri tyyppiin niiden alayksiköiden koostumuksen, tarvittujen kofaktorien ja toimintatavan mukaan: tyyppi I, II, III, IV ja fosforotioaatti (PT) R-M-systeemeihin. Näistä PT R-M-systeemin toimintatapa ei perustu metylaatioon, vaan fosforotioaatioon (rikin substituutio sokeri-fosfaattirungossa), minkä vuoksi sitä ei käsitellä tutkielmassani enempää. Tyypeissä I, II ja III restriktioentsyymi katkaisee sellaista DNA:ta, jossa ei ole vastaavan metyyli transferaasin tekemää metylaatiomerkkiä. Tyyppi IV puolestaan toimii päinvastaisesti ja katkaisee modifioitua DNA:ta. Seuraavaksi käyn läpi tarkemmin R-M-systeemien tyypit I-IV. (Isaev ym., 2021.)

Tyyppi I R-M-systeemi on pentameerinen proteiini kompleksiksi, joka koostuu kolmesta erillisestä alayksiköstä: HsdS (S), HsdM (M) ja HsdR (R). Aktiivinen tyyppi I metyyli transferaasi koostuu kahdesta M- ja yhdestä S-alayksiköstä sekä kofaktori SAM:sta. Alayksikkö S sisältää kaksi DNA-jaksoa tunnistavaa domeenia. Restriktioaktiivisuus syntyy, kun  $M_2S_1$ -kompleksi liittyy kahteen R alayksikköön muodostaen  $R_2M_2S_1$ -kompleksin. Kompleksin restriktioaktiivisuus vaatii toimiakseen SAM-molekyylin lisäksi myös  $Mg^{2+}$ -kationin sekä ATP-molekyylin, jonka hydrolyysistä reaktio saa tarvitsemansa energian. Tyyppi I R-M-systeemi tunnistaa spesifisesti epäsymmetrisen (ei-palindromisen) DNA-jakson, minkä jälkeen se metyloi kohteen kummatkin juosteet. Tyyppi I R-M-systeemin katalysoima DNA:n katkaisu vaatii kahden restriktiokompleksin samanaikaisen sitoutumisen metyloimattomiin kohtiin. On huomattavaa, että tyyppi I DNA:n restriktio tapahtuu vähintään tuhannen nukleotidin päässä tunnistussekvenssistään. (Kang ym., 2025.)

Tyypin II R-M-systeemit ovat yksinkertaisimpia ja yleisimpiä kaikista R-M-järjestelmistä, sillä ne koostuvat vain kahdesta eri komponentista: restriktioentsyymistä ja metyyli transferaasista. Myös tyyppi III on yksinkertainen, ja koostuu vain kahdesta proteiinista: Mod ja Res, jotka vastaavat toiminnaltaan tyypin II komponentteja. Tyypissä II R-M-komponentit toimivat itsenäisesti, mutta tunnistavat saman DNA-jakson. Puolestaan tyypissä III metylaatiosta vastaa Mod, mutta restriktioaktiivisuuteen tarvitaan kumpaakin proteiinia. Tyypin II R-M-systeemit tunnistavat yleensä 4–8 emäsparia pitkän palindromisen DNA-sekvenssin, kun taas tyyppi III tunnistaa 5–6 emäsparia pitkän ei-palindromisen sekvenssin, josta se metyloi vain toisen juosteista. Kummankin tyypin katkaisutapahtumat ovat riippuvaisia niin ikään aktiivisen keskuksen kofaktorina toimivasta kationista – useimmiten  $Mg^{2+}$ -ionista. Tyyppi II tarvitsee restriktioon SAM:ia (Pingoud ym., 2014), mutta ei ATP:ta. Tyypin III restriktiokompleksi puolestaan tarvitsee ATP:ta, mutta pystyy toimimaan myös ilman erillistä SAM:ia, sillä sen restriktioentsyymi on luonnostaan sitoutuneena SAM:iin (Bist ym., 2001). (Kang ym., 2025.)

Bakteerien ja faagien välillä vallitsee loppumaton kilpavarustelu, missä kumpikin osapuoli pyrkii kehittämään vastakeinon, jolla ohittaa toisen puolustus. Tästä osoituksena faagit ovat muun muassa kehittäneet keinon ohittaa R-M-puolustus muokkaamalla tai lisäämällä modifioituja emäksiä genomiinsa (Weigele & Raleigh, 2016). Tähän vastauksena bakteereille on kehittynyt tyypin IV R-M-systeemi, joka perustuu muokattujen emästen tunnistamiseen. Niistä siis puuttuu kokonaan modifikaatiomodulaari (metyyli transferaasi). Tunnistettuaan modifioitua emäksen tai modifioitua DNA-jakson ne katkaisevat sen. Järjestelmän endonukleaasi tunnistaa metyloituneita, hydroksimetyloituneita ja glukosyylihydroksimetyloituneita emäksiä (Kang ym., 2025). Erona muihin R-M-järjestelmiin on myös se, että tyypin IV toiminta on GTP-riippuvaista, ei ATP-riippuvaista (Kang ym., 2025). (Isaev ym., 2021.)

R-M-puolustuksessa ongelmallista on, jos restriktioentsyymien ja metyyli transferaasin ekspressiotasot ovat epätasapainossa. Jos restriktioendonukleaasia on enemmän, isännän DNA saatetaan replikaation jälkeen katkaista ennen kuin metyyli transferaasi ehtii metyloidaa sen. Puolestaan jos metyyli transferaasia syntetisoidaan suhteessa enemmän, faagi-DNA:ta aletaan mahdollisesti metyloimaan virheellisesti. Tämä johtaa siihen, että puolustusjärjestelmä

ei enää pysty tunnistamaan faagia tunkeilijaksi, mikä puolestaan johtaa faagin lisääntymiseen. Molemmat tilanteista ovat isäntäbakteerille fataaleja, minkä vuoksi R-M-systeemien rinnalla toimii samanaikaisesti muita puolustusjärjestelmiä. (Isaev ym., 2021.)

### 3.1.2 Pgl-systeemi

Pgl-systeemi (engl. phage growth limitation system) toimii käänteisellä tavalla kuin R-M-systeemit. Pgl-järjestelmä perustuu siihen, että se ensin muokkaa tunkeutuvan faagin genomia metyloimalla ja sitten katkaisee sen (Chinenova ym., 1982). Systeemin restriktio DNA on siis metyloitua, kuten tyypin IV R-M-systeemeidenkin. Pgl-systeemin toimintaperiaate on se, että ensimmäisellä infektiokerralla faagijälkeläisten perimään tuotetaan metylaatio, ja vasta toisella infektiokerralla ne restriktoidaan metylaatiokohdistaan (Chinenova ym., 1982). Täten modifioidut faagijälkeläiset pystyvät infektoimaan sellaisia bakteereja, joilla ei ole Pgl-järjestelmää. Jos R-M-systeemeissä faagi-DNA metyloidaan oikeista kohdista, se johtaa R-M-systeemeitä vastaan immuuneihin faagijälkeläisiin, joilla kaikilla on modifioitu perimä. Tällaista ongelmaa ei ole Pgl-systeemissä, sillä vaikka faagijälkeläisten modifiointi epäonnistuisi ensimmäisellä kerralla, ei siitä synny Pgl-systeemille resistenttejä faageja. Pgl:n toimintaperiaate on mahdollisesti kehittynyt, koska se on edullinen kilpailussa toisia bakteereita vastaan – sellaisia, joilla ei ole Pgl-järjestelmää. Tämä perustuu siihen, että Pgl<sup>+</sup> bakteerit (bakteerit, joilla on Pgl-järjestelmä) tuottavat modifioituja faageja, jotka pystyvät infektoimaan kaikkia muita bakteereja paitsi sellaisia, joissa on toimiva Pgl-järjestelmä (A. B. Isaev ym., 2021). Pgl-systeemi koodaa neljää komponenttia: kohdespesifistä PglX adeniinimetyylitransferaasia ja PglW proteiinikinaasia (Sumbly & Smith, 2002) sekä PglY ATPaasia ja PglZ fosfataasia (Bedford ym., 1995).

### 3.1.3 BREX

Pgl-systeemiä on löydetty vain *Actinomyces*-bakteereista (A. B. Isaev ym., 2021). Kuitenkin Makarov ym. (2011) tutkimuksessa havaittiin, että Pgl-systeemin alkalista fosfataasia koodaava geeni *pglZ* oli usein klusteroitunut osaksi Pgl-systeemistä erillistä konservoitunutta geeniryppästä. Neljä vuotta myöhemmin Goldfarb ym. (2015) osoittivat geeniryppään muodostavan uuden, kuusi geeniä sisältävän puolustusjärjestelmän. He nimesivät järjestelmän BREX:ksi (engl. Bacteriophage Exclusion). Samassa tutkimuksessa selvitettiin myös, että noin kymmenellä prosentilla bakteeri- ja arkeonigenomeista on homologeja kyseisestä *pglZ*-geenistä. BREX-systeemien tavallinen toimintaperiaate on samankaltainen kuin R-M-

systemeillä. Järjestelmä metyloi isännän omaa DNA:ta ja siten erottaa sen tunkeilijan metyloimattomasta DNA:sta. R-M-systemeiden tavoin myös BREX-spesifiset modifikaatiot faagin genomissa mahdollistavat BREX-puolustukselle immuunin faagikannan kehittymisen. Luvussa 4 syvennytään tähän puolustusjärjestelmään tarkemmin.

#### 3.1.4 DISARM

BREX:n löytymisen jälkeen puolustussaarekkeiden konservoituneiden geeniklusterien tutkiminen jatkui kiivaasti. Sen seurauksena löydettiin jälleen uusi metylaatioon perustuva bakteerien puolustussysteemi DISARM (engl. defence island system associated with restriction-modification), joka vastaa monella tapaa BREX-järjestelmää. Kumpikaan järjestelmistä ei vaikuta faagin kiinnittymiseen isäntäsoluun, vaan ne estävät faagin lisääntymistä infektion alkuvaiheessa katkaisemalla faagin perimää. Erona BREX- ja R-M-systemeihin on kuitenkin se, että faagit, joilla on genomissaan metyloidut DISARM-sekvenssit eivät pysty infektoimaan bakteereja, joilla on kyseinen puolustusjärjestelmä. Toisin sanoen bakteeri, jolla on DISARM-järjestelmä, pystyy restriktioimaan faagi-DNA:ta, vaikka faagin DISARM-sekvenssit olisivatkin metyloituneita. Tämä viittaa siihen, että DISARM-järjestelmässä metylaatio on välttämätöntä mutta ei yksinään riittävää restriktion välttämiseksi. (Ofir ym., 2017.)

#### 3.1.5 MADS

MADS (engl. methylation-associated defence system) koostuu yhdestä yli 17 kb operonista, joka sisältää kahdeksan geeniä. Myös tämä puolustusjärjestelmä perustuu oman perimän erottamiseen vieraasta merkkäämällä N6-metyyliadenosiini metyyliryhmällä, samalla tavalla kuin muutkin luvussa kolme esittelemäni systeemit. Nykytiedon mukaan se eroaa muista systeemeistä siinä, että sen toiminta ja säätely perustuu lisäproteiineihin, kuten MAD1:een ja MAD6:een. Proteiini-analyysin perusteella ainakin kaksi MADS:n komponenteista voivat olla ATPaasi-kytkettyjä nukleaaseja, jotka pystyvät tunnistamaan muokkaamattoman faagi-DNA:n. MADS esiintyy usein yhdessä CRISPR-Cas puolustuksen kanssa. Tällainen puolustussysteemien yhteisvaikutus on yleistä, sillä se tuottaa kestävämmän suojan nopeasti kehittyviä faageja vastaan. On paljon epätodennäköisempää, että samalle faagipopulaatiolle kehittyä vastamekanismi kahta erillistä puolustusjärjestelmää vastaan kuin vain yhtä vastaan. (Maestri ym., 2024.)

## 4 BREX

Vuonna 2015 Goldfarb ym. löysivät tutkimuksissaan *Bacillus cereus* -bakteerin genomista kuusigeenisen kasetin (engl. gene cassette), BREX:in (engl. Bacteriophage Exclusion). Se antoi resistenssin suurta määrää sekä virulentteja että temperaattisia faageja vastaan, kun se siirrettiin *Bacillus subtilis* -bakteerin genomiin. BREX-geenikasetti löydettiin, kun genomisista puolustusaarekkeista etsittiin geenejä, joissa on *pglZ*-domeeni. Aikaisemmin oli havaittu, että *pglZ* geeni liittyy olennaisesti Pgl-puolustukseen *Streptomyces coelicolor* -bakteerissa (Chinenova ym., 1982). Yli puolessa tapauksista, jossa *pglZ*-geeni löydettiin, se oli osana kuusigeenistä BREX:iä. Goldfarbin ym. (2015) tutkimuksen mukaan tämä BREX-geenikasetti piti sisällään geenit *pglZ*, *pglX*, *brxC*, *brxL*, *brxA* ja *brxB*. BREX-järjestelmästä puhuttaessa käytetään *pglZ* ja *pglX* geeneistä usein myös nimityksiä *brxZ* ja *brxX*, joita käytän selvytyden vuoksi tutkielmassani tästä eteenpäin. (Goldfarb ym., 2015.)

Genomisen analyysin tuloksena BREX-puolustusjärjestelmä on arvioitu olevan noin seitsemällä prosentilla kaikista prokaryooteista (Drobiazko ym., 2025). Esimerkiksi GenBank tietokannassa kaikista täysin sekvensoiduista *E. coli* -kannoista 6,5 prosentilla on genomissaan BREX (Jiang ym., 2024). Puolustusjärjestelmän kyky erottaa faagin DNA perustuu pääosin DNA-metylaatioon. BREX-komponentti BrxX (metyylitransferaasi) metyloi isäntäbakteerin genomien BREX-spesifiset kohdat (engl. BREX sites). Tunkeutuvilla faageilla ei puolestaan ole kyseisiä metylaatiomerkkejä BREX-sekvensseissään, minkä vuoksi BREX tunnistaa ne tunkeilijoiksi. Jotta puolustus olisi tehokasta, BREX-spesifiset kohdat ovat faagien perimässä toistuvia emäsjärjestyksiä. Esimerkiksi *E. colissa* BREX tunnistaa sekvenssin 5'-GGTAAG-3', josta se metyloi toiseksi viimeisen adeniinin (Gordeeva ym., 2019). BREX-systeemin tekemät metylaatiot siis suojaavat isäntäänsä sen omalta puolustukselta. BREX-sekvenssien määrä faagigenomissa ei kuitenkaan korreloi BREX-puolustuksen onnistumisen kanssa (Kelly ym., 2023).

BREX-metylaatio on juostespesifistä, mikä tarkoittaa, että vain toinen juosteista metyloidaan. Tämän lisäksi puolustusjärjestelmän tunnistama BREX-kohta on epäsymmetrinen (ei-palindrominen) sekvenssi. Jos faagin perimään – syystä tai toisesta – tulee metylaatio BREX-spesifiseen sekvenssiin, ei puolustusjärjestelmä pysty tunnistamaan sitä vieraaksi DNA:ksi. Tämä johtaa epäonnistuneeseen BREX-puolustukseen ja faagin lisääntymiseen bakteerisolussa. Jotta BREX-puolustus olisi tehokkaampaa, on se joskus linkitetty toisen

puolustusjärjestelmän kanssa. Picton ym. (2021) löysivät plasmidin, joka koodaa samassa puolustusaarekkeessa tyyppin 1 BREX:n lisäksi myös tyyppin IV R-M-systeemiä. Ne faagit, joilla on BREX-spesifinen metylaatio, ohittavat BREX-puolustuksen, mutta tulevat R-M-systeemin tunnistamiksi (Picton ym., 2021).

BREX toimii faagi-infektion alkuvaiheessa, minkä vuoksi BREX+ soluissa ei havaita faagijälkeläisten akkumulaatiota (A. B. Isaev ym., 2021). BREX siis sallii faagin tunkeutumisen bakteerin sisään, mutta estää faagin DNA:n replikaation, kuten useat muutkin puolustusjärjestelmät. Vaikka BREX-systeemi metyloi R-M-systeemien lailla spesifisiä sekvenssejä, siltä puuttuu kuitenkin selkeä restriktiokomponentti. BREX-systeemi ei siis itse katkaise tai hajota tunkeilijan DNA:ta (Drobiazko ym., 2025). On vielä epäselvää, miten faagin DNA katkaistaan ja tuhotaan BREX-sekvenssin kohdalla. On kuitenkin havaittu, että kaikkien kuuden tavallisen BREX-geenin poistaminen vähentää merkittävästi bakteerien restriktiotehokkuutta faageja vastaan (Luyten ym., 2022). Tämä viittaa siihen, että restriktion tehokkuuteen vaikuttaa useampi eri BREX-komponentti.

Isännän DNA:n replikoituessa uusia metyloimattomia BREX-tunnistuskohtia syntyy koko ajan lisää. Jotta puolustussysteemit eivät hyökkäisi isännän DNA:ta vastaan, niiden täytyy olla tiukasti säädeltyjä. Miten BREX ei kuitenkaan tunnista omaa vastareplikoitunutta DNA:taan vieraaksi, vaikka sen toisesta juosteesta puuttuu BREX-metylaatio? Vastaus oletettavasti piilee siinä, että replikaation jälkeen DNA on hemimetyloitunutta siten, että templaattijuoste on metyloitunut. Täten bakteerin omasta DNA:sta vähintään toinen juoste on aina metyloitu BREX-sekvensseistä, kun taas faagi-DNA on täysin metyloimatonta kummastakin juosteesta. Näin ollen on oletettu, että tunnistukseen tarvitaan myös toinen BrxX-metyylitransferaasi, joka sitoutuu BREX-tunnistuskohdan vastakkaiseen, ei-metyloituneeseen juosteeseen (Wozniak ym., 2023). Tämän lisäksi on oletettu, että BREX-kohdan tunnistus vaatii metyylitransferaasin lisäksi useamman BREX-komponentin liittymisen aktiivisen kompleksin osaksi. Drobiazko ym. (2025) esittivät, että tunnistus vaatisi BrxBCXZ-kompleksin tai useamman tällaisen kompleksin samanaikaisen vuorovaikutuksen ja sitoutumisen kumpaankin juosteeseen. Myös Wentin ym. (2024) tutkimuksessa päädytään samaan lopputulokseen, että suurempi BREX-kompleksien muodostama kokonaisuus todennäköisesti vaaditaan, jotta BrxX voi siirtää metyyliryhmän kohde-emäkseen. Ei kuitenkaan vielä tiedetä varmasti, miten BREX-systeemi varmistaa, ettei tunnista isäntäbakteerinsa vastareplikoitunutta DNA:ta vieraaksi. (Drobiazko ym., 2025.)

## 4.1 BREX-superperhe

BREX-superperhe kattaa kaikki bakteerin puolustusjärjestelmät, jotka sisältävät geenit *brxZ* ja *brxC*. Koodaamiensa proteiinien perusteella BREX-systeemit jaetaan kuuteen eri alaluokkaan: tyypeihin 1–6. Erilaisia BREX-geeniperheitä on puolestaan löydetty yhteensä kolmetoista kappaletta (Goldfarb ym., 2015). Eri BREX-tyypit koodaavat 4–8 geeniä (Taulukko 1). Kaikille BREX-systeemeille yhteisiä komponentteja ovat BrxZ ja BrxC (Readshaw ym., 2025). Näiden lisäksi kaikille muille paitsi tyyppi 4 on yhteistä se, että ne koodaavat BrxX N6-adeniinimetyylitransferaasia (Drobiazko ym., 2025). Seuraavissa kappaleissa esittelen eri BREX-tyypit tarkemmin. Taulukossa 1 on esitetty eri BREX-tyyppien geenikoostumukset. Vertailun vuoksi taulukossa on myös Pgl-systeemin geenikoostumus.

	Pgl	BREX 1	BREX 2	BREX 3	BREX 4	BREX 5	BREX 6
<i>brxZ</i> / <i>pglZ</i>	x	x	x	x	x	x	x
<i>brxC</i> / <i>PglY</i>	x	x	x	x	x	x	x
<i>brxX</i> / <i>pglX</i>	x	x	x	x		x	x
<i>brxA</i>		x		x		x	x
<i>brxB</i>		x		korvattu <i>brxF</i> :llä		x	x
<i>brxL</i>		x	korvattu <i>brxHI</i> :lla	korvattu <i>brxHII</i> :lla	x	korvattu <i>brxHIII</i> :lla	korvattu <i>brxHI</i> :lla
<i>pglW</i>	x		x				
<i>brxD</i>			x				x
<i>brxE</i>							x
<i>brxP</i>					x		

Taulukko 1. Pgl- ja BREX-systeemien geenikoostumukset (muokattu Goldfarb ym., 2015).

BREX-järjestelmistä yleisin on tyyppi 1, ja sitä tavataan noin 55 prosentilla kaikista BREX-positiivisista genomeista (Luyten ym., 2022). Tyypin 1 BREX toimii R-M-systeemien kaltaisesti: se muokkaa isäntäbakteerinsa DNA:ta BREX-spesifisistä kohdista, jotta se pystyy erottamaan metyloimattoman tunkeilijan DNA:n. BREX-systeemin avulla bakteeri pystyy

puolustautumaan faagien lisäksi myös sellaisia plasmideja vastaan, joilla on antibiootteresistenssigeeni (Jiang ym., 2024). Tyypin 1 BREX sisältää kuusi geeniä: *brxA*, *brxB*, *brxC*, *brxX*, *brxZ* ja *brxL* (Taulukko 1). BrxA on DNA:ta sitova proteiini, jonka tarkoitusta BREX:ssä ei vielä tarkemmin tunneta. Myöskään pienen proteiinin BrxB funktiota ei vielä tunneta. Sen on arveltu sisältävän nukleotidejä sitovia domeeneja ja/tai toimivan tukirakenneproteiinina (engl. scaffold protein) yhdistäen useita BREX-komponentteja (Readshaw ym., 2025). Goldfarb ym. (2015) esittivät BrxC:n olevan ATPaasi ja BrxL:n olevan Lon-tyyppinen proteaasi, jonka myöhemmin Shen ym. (2023) tarkensivat olevan myös ATPaasi. BrxX on metyyli transferaasi ja BrxZ:n Goldfarb ym. (2015) olettivat fosfataasiksi. Sekä BrxX että BrxZ jakavat rakenteellista homologisuutta Pgl-systeemeistä löytyvien vastaavien proteiinien kanssa. Geenit *brxA*, *brxB*, *brxC* ja *brxX* transkriptoidaan yhtenä operonina, kun taas *brxZ* ja *brxL* ekspressoitetaan erillisenä transkriptina (Goldfarb ym., 2015).

Akinetobakteereilta (engl. *Acinetobacteria*) on löydetty tavallisen tyypin 1 BREX:n kuuden geenin lisäksi seitsemäs geeni, *brxR*, joka sijaitsee ylävirtaan lähellä BREX-lokusta. Sen on arvioitu koodaavan DNA:han sitoutuvaa BREX-repressoriproteiinia. Kyseisillä bakteereilla se on välttämätön faagiperimän restriktiossa, mutta tarpeeton isäntägenomin metylaatioissa. Luytenin ym. (2022) tutkimuksen mukaan *brxR* geenin poistaminen heikentää restriktiotehokkuutta. Sen sijaan, jos *brxR* geeniin tuotetaan sellainen mutaatio, joka estää sen kyvyn sitoutua DNA:han, sillä on paljon vähäisempi vaikutus restriktiotehokkuuteen. Tutkimuksen tulokset viittaavat siihen, että *brxR:n* koodaava sekvenssi sisältää säätelyalueita, kuten vaihtoehtoisen promoottorin. Kun geeni mutatoitetaan, se ei tuota oikeanlaista proteiinia, mutta sekvenssin säätelyvaikutus säilyy. Kun taas koko geeni poistetaan, myös sen säätelyominaisuudet häviävät. Täten *brxR:n* koodaava sekvenssi ja siitä transloitu proteiini toimivat itsenäisesti omissa toiminnallisissa tehtävissään. Kyseistä geeniä ei ole esitetty taulukossa 1, sillä se ei ole tyypin 1 BREX:n tavallinen komponentti. (Luyten ym., 2022.)

Tyypin 2 BREX-systeemit tunnettiin aikaisemmin *Streptomyces*-bakteerien Pgl-systeemeinä. Kuten taulukossa 1 esitetään, tyypin 2 BREX-systeemeihin kuuluu Pgl-systeemistä löytyvien neljän geenin lisäksi myös kaksi lisägeeniä, *brxD* ja *brxHII*. BrxD on pieni proteiini, joka oletettavasti sitoo ATP:ta, kun taas BrxHII on oletettavasti helikaasientsyymi. Täten BrxHII mahdollisesti korvaa tyypin 1 koodaaman helikaasimaisen BrxL:n. Tyypin 3 BREX:ssä BrxL on puolestaan korvattu toisella oletetulla helikaasilla, BrxHIII:lla. Tyypin 3 BREX on monilta osin samankaltainen kuin tyyppi 1; molemmat esimerkiksi koodaavat lyhyttä BrxA-proteiinia.

Näiden lisäksi tyypissä 3 tuntemattoman toiminnon geeni *brxB* on korvattu toisella geenillä *brxF*, jonka funktio ei myöskään ole tiedossa. Tyypin 4 BREX puolestaan koostuu neljästä geenistä: *brxC*, *brxZ*, *brxL* sekä tyypille 4 spesifisestä *brxP* geenistä, jonka koodaamassa proteiinissa on fosfoadenylyylisulfaattireduktaasi-domeeni. Kyseinen domeeni liittyy myös DND-faagiresistenssisysteemiin, joka tekee rikkisubstituutioita DNA:n tukirankaan. Tyypin 4 BREX ei siis sisällä lainkaan metyyli transferaasia, minkä vuoksi se eroaa merkittävästi muista BREX-järjestelmistä. (Goldfarb ym., 2015.)

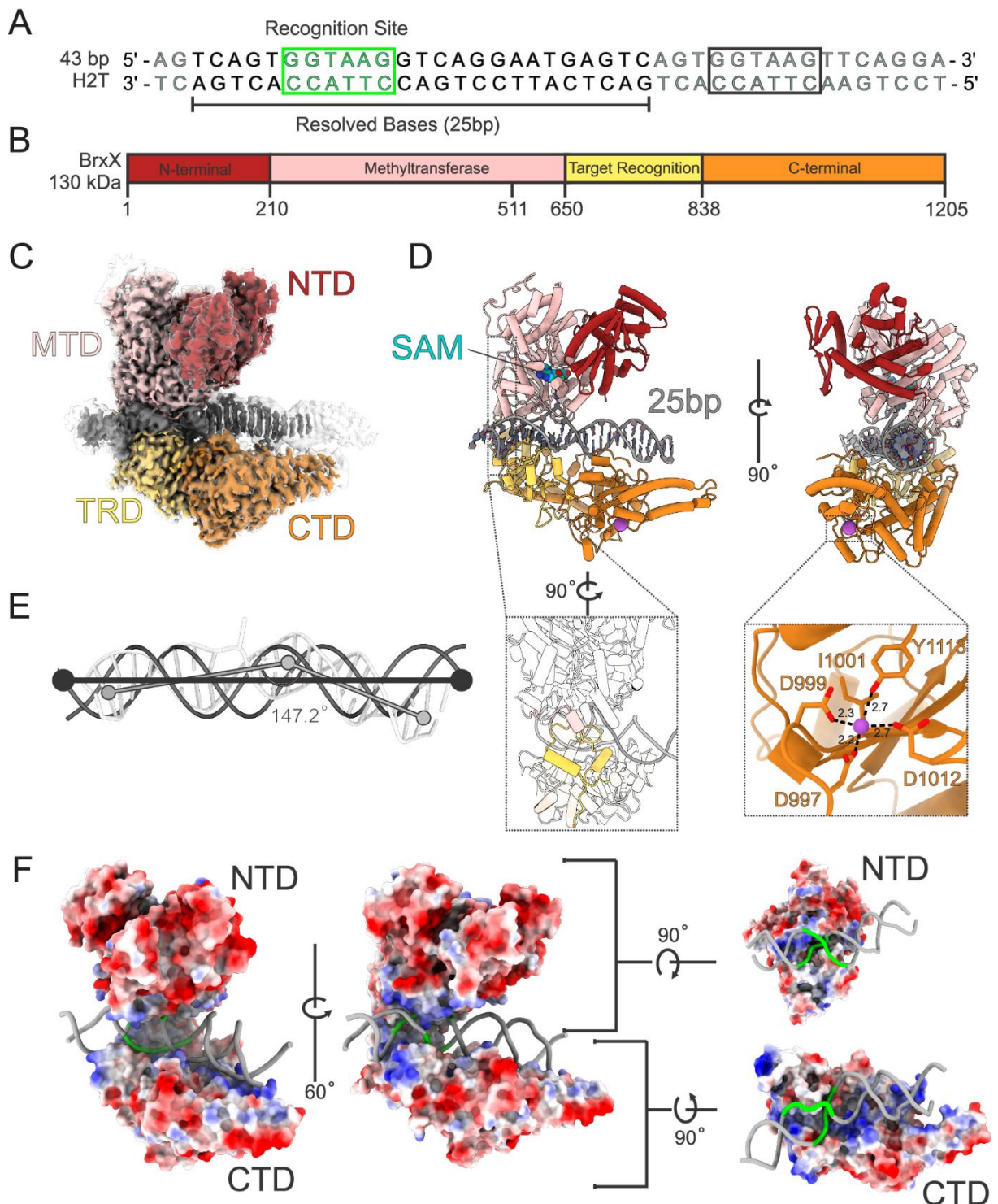
Tyypit 5 ja 6 ovat harvinaisimpia BREX-järjestelmiä. Tyypin 5 BREX:ssä *brxL* geeni on korvattu myös tyypistä 3 löytyvällä *brxHII* helikaasidomeenigeenillä, kun taas Tyypin 6 BREX:ssä se on korvattu tyypin 2 geeniparilla *brxD* ja *brxHI*. Tyypin 5 omaispiirre on duplikaatio *brxC* geenissä. Puolestaan ominaista tyypille 6 on ylimääräinen geeni *brxE*, jonka merkitystä ei vielä tunneta. (Goldfarb ym., 2015.)

BREX-systeemien evoluutiossa keskeisenä tekijänä on horisontaalinen geeninsiirto. BREX-geenikasetti pystyy siirtymään bakteerilajista toiseen, kuten Goldfarbin ym. (2015) tutkimuksessa todettiin. Horisontaalisesta geenisiirrosta huolimatta osa BREX-puolustustyypeistä on keskittynyt vain tiettyihin fylogeneettisiin kehityslinjoin. Esimerkiksi tyypin 2 BREX:iä havaitaan lähes pelkästään Aktinobakteereilla, kun taas tyypin 5 BREX on yksinomaisen arkeoniluokka Halobakteereille (Goldfarb ym., 2015).

## 4.2 *BrxX* metyyli transferaasi

*BrxX* on metyyli transferaasi, joka metyloi ei-palindromisen kuuden nukleotidin mittaisen BREX-sekvenssin viidennen adeniinin N6-asehasta (Kuva 1A). *BrxX*:n ja DNA:n välinen vuorovaikutus on riippuvainen SAM-molekyylistä (Kuva 1D). Kuten luvussa 2 todettiin, SAM on myös metyyli ryhmän luovuttaja *BrxX*:n katalysoimassa metyyli siirtoreaktiossa. Entsyymien aktiiviseen keskukseen käännetty (engl. flipped) adeniini asettuu lähelle SAM-molekyylä, mikä mahdollistaa metyyli ryhmän siirron. Drobiazkon ym. (2025) tutkimuksen mukaan SAM sekä stabiloii metyyli transferaasin domeeneja että parantaa ulospäin käännetyn adeniinin sijoittamista entsyymien aktiiviseen keskukseen. *BrxX*:n N-terminaalinen domeeni vastaa metyyli transferaasiaktiivisuudesta ja C-terminaalinen domeeni DNA:n tunnistuksesta

(Kuva 1B). BrxX on positiivisesti varautunut sekä pinnaltaan että N- ja C-terminaalisen domeenin saranakohdasta (Kuva 1F). (Went ym., 2024.)



Kuva 1. **A:** BREX:in tunnistama DNA-jakso on kuvattu vihreällä ja harmaalla suorakulmiolla. BrxX metyloi tunnistussekvenssin (kuvassa ylemmän juosteen) 3'-päästä toiseksi viimeisen adeniinin **B:** BrxX monomeerin domeenien järjestäytyminen: N-terminaalinen domeeni (NTD) punaisella, metyyli transferaasidomeeni (MTD)

vaaleanpunaisella, kohteen tunnistusdomeeni (engl. target recognition domain, TRD) keltaisella ja C-terminaalinen domeeni (CTD) oranssilla. Nämä värit toistuvat muissakin kuvissa. **C:** CryoEM-kartta BrxX-DNA-kompleksista. **D:** Piirretty esitys BrxX-DNA-kompleksista SAM-molekyylin läsnä ollessa. Myös metalli-ioni  $Mg^{2+}$  on piirretty kuvaan violetillä. **E:** CryoEM-kuva BrxX:n sisällä olevasta DNA:sta (vaaleanharmaalla) verrattuna ideaaliin B-DNA:han (mustalla) **F:** BrxX-DNA-kompleksi, jonka pinta on värjätty elektrostaattisen potentiaalin mukaisesti. Punainen kuvastaa negatiivista, ja sininen positiivista potentiaalia. (Drobiazko ym., 2025.)

Drobiazkon ym. (2025) tutkimuksen mukaan BrxX metyyli transferaasi on ainut BREX-komponentti, joka voi tunnistaa BREX-sekvenssin *in vitro*. Tästä huolimatta metyyli transferaasiaktiivisuuteen tarvitaan itse metyyli transferaasin lisäksi suurempia BREX-komplekseja (Went ym., 2024). Goldfarb ym. tutkimuksessaan (2015) totesivat, ettei *brxX* geenin poistaminen aiheuta isäntäbakteerin kuolemaa. Tuloksesta he päättelivät, ettei BREX-sekvenssin metyloimattomuus suoraan johda DNA:n restriktioon. Myöhemmin havaittiin, että BrxX sitoutuu myös faagi-DNA:ssa ei-metyloituneeseen BREX-kohtaan *in vivo* (Drobiazko ym., 2025). Näin ollen BrxX liittyy myös vieraan DNA:n tunnistamiseen ja BREX-puolustuksen aktivoitumiseen sen lisäksi, että se vastaa isäntäänsä suojelevasta metylaatiosta. Tämä metyyli transferaasin kaksiosainen tehtävä vahvistuu, kun tehdään mutaatio sen aktiiviseen keskukseen. Tällainen mutaatio inaktivoi metylaation lisäksi myös koko BREX-puolustuksen. Mutaatio ei myöskään aiheuta toksisuutta, mikä olisi oletettavaa systeemille, jolla on erillinen modifikaatio- ja restriktiomoduli. Lisäksi sellaiset mutaatiot, jotka estävät BrxX:n sitoutumisen DNA:han lakkauttavat BREX-puolustuksen, kun taas mutaatiot, jotka laajentavat BREX-sekvenssin spesifisyyttä kasvattavat puolustuksen tasoa. (Drobiazko ym., 2025.)

### 4.3 *BrxZ*

Goldfarb ym. (2015) olettivat BrxZ olevan fosfataasi. Myöhemmin Readshaw ym. (2025) julkaisivat artikkelissaan, että BrxZ olisikin metalli-ionista riippuvainen nukleaasi, joka voi katkaista kaksijuosteista DNA:ta. BrxZ nimittäin pystyy katkaisemaan syklistä oligonukleotidejä, lineaarisia oligonukleotidejä, plasmidi-DNA:ta ja sekä ei-modifioitua että modifioitua lineaarista faagigenomia. BrxZ:n nukleaasiaktiivisuudella ei kuitenkaan ole vielä havaittu olevan osuutta BREX:ssä. BrxZ muodostaa myös vakaan alakompleksin toisen BREX-komponentin, BrxB:n kanssa. Readshawin ym. (2025) mukaan vuorovaikutus BrxB:n

kanssa ei saa aikaan BrxZ:n nukleasiaktiivisuutta. Todennäköisesti alakompleksi on oleellisena osana jotain suurempaa BREX-kompleksia, jota ei ole vielä löydetty. (Readshaw ym., 2025.)

#### 4.4 *BrxA*

BrxA on BREX-geenikasetin koodaama kaksijuosteista DNA:ta sitova proteiini. Se on liuoksessa monomeerinen ja koostuu pääosin alfa-kierteistä. BrxA sisältää kaksi helix-turn-helix -motiivia, jotka sijaitsevat rinnakkain ja ovat 180 asteen kulmassa toisiinsa nähden siten, että ne sitovat DNA:n suuremman uurteen eri puolilta. Toinen puoli BrxA:sta on suhteellisen elektronegatiivinen ja ei-konservoitunut, kun taas toinen sisältää hyvin konservoituneen elektropositiivisen loven. Gordeevan ym. (2019) tutkimuksessa *brxA* geeni ei ollut välttämätön faagipuolustuksen toiminnalle. (Beck ym., 2022.)

#### 4.5 *BrxL*

Goldfarb ym. artikkelissaan (2015) olettivat BrxL:n olevan Lon-proteaasin homologi. Myöhemmin Shen ym. artikkelissaan (2023) selvensivät, ettei se sisällä selkeästi konservoitunutta Lon-proteaasin motiivia, vaan se on DNA:ta sitova ATP-riippuvainen multimeerinen proteiini. Sillä on ATPaasi-aktiivisuutta ja ATP:n sitoutuminen siihen edistää sen kiinnittymistä DNA:han. Se on rakenteellisesti homologinen eukaryoottien replikaatiivisen helikaasin, MCM:n kanssa. Tämä viittaa siihen, että BrxL on merkittävässä osassa faagi-DNA:n replikaation estämisessä. BrxL geenin poistaminen ei vähennä isännän genomimetylaatiota, mikä viittaa siihen, että sillä on merkitystä nimenomaan faagin perimän restriktiossa tai sen tunnistuksessa (Luyten ym., 2022). On myös mahdollista, että BrxL on BREX:n säätelijä (Zaworski ym., 2022). BrxL geeniä löydetään vain tyypin 1 ja 4 BREX:eistä, kun muissa neljässä BREX-tyypissä se on korvattu muilla oletetuilla DNA-helikaaseilla. (Shen ym., 2023.)

#### 4.6 *BrxC*

*BrxC*:n N-terminaaliosassa on toiminnallinen ATPaasi-domeeni. *BrxC* vuorovaikuttaa itsensä kanssa muodostaen multimeerin. ATP:n sitoutuminen siihen tuo kahden *BrxC*:n ATPaasi-domeenit yhteen. Tämä johtaa konformaation muutokseen, minkä seurauksena sen N- ja C-terminaaliset päät tuodaan yhteen. Tämän jälkeen ATP:n hydrolysoituminen muuttaa *BrxC*-multimeerin takaisin avonaiseen konformaatioon. Jos ATPaasi-domeeni mutatoituu, sen toiminta estyy ja *BrxC*:n multimerisoituminen muuttuu. Tämän lisäksi anti-BREX-proteiini *OrbA* pystyy sitoutumaan *BrxC*:hen siten, että ATPaasi-domeenit eivät pysty vuorovaikuttamaan keskenään. *OrbA*:sta ja muista anti-BREX-strategioista kerron tarkemmin seuraavassa luvussa. (Oshiro ym., 2024.)

### 5 FAAGIEN ANTI-BREX-STRATEGIAT

Bakteerien ja faagien välinen kilpavarustelu johtaa siihen, että virusten täytyy kehittää puolustussysteemeitä vastaan strategioita, joilla ne pystytään kiertämään. Faageille on edullista, jos niiden genomissa olevat BREX-sekvenssit ovat metyloituja, sillä tällöin bakteerin BREX-puolustus ei pysty tunnistamaan faagia tunkeilijaksi. Näin voi mahdollisesti tapahtua esimerkiksi silloin, jos metyyli transferaasigeeniä yliekspressoitetaan, mikä johtaa faagigenomien metyloimiseen isäntäbakteerin genomien lisäksi. Vastaavanlaista tilannetta käsiteltiin luvussa 3.1.1 R-M-systeemien yhteydessä. Faagit pystyvät myös kiertämään BREX-puolustuksen, jos niiden DNA on glykosyloitua BREX-sekvensseistään (Gordeeva ym., 2019). Tässä luvussa keskityn kuitenkin sellaisiin faagien anti-BREX-strategioihin, joilla ne pystyvät ohittamaan bakteerin BREX-puolustuksen. Tällaisia strategioita ovat *Ocr*, *OrbA* ja *SAMaasi*. BREX on yleinen puolustusjärjestelmä, minkä vuoksi on todennäköistä, että myös erilaisia anti-BREX-strategioita on olemassa runsaasti lisää – niitä vain ei ole vielä löydetty.

## 5.1 *Ocr*

*Ocr* (engl. overcome classical restriction) on faagien eräs inhibiittorimolekyyli, joka suojaa faagia useilta restriktioon perustuvilta puolustusjärjestelmiltä, kuten BREX:ltä. Aikaisemmin *Ocr* tunnettiin tyypin I R-M-systeemin inhiboijana, jossa se vaikuttaa sekä restriktio- että modifikaatioaktiivisuuteen. *Ocr* on T7-bakteriofagista löydetty proteiini, joka matkii DNA:ta. Sen BREX-puolustusta inhiboiva vaikutus perustuu siihen, että se pystyy sitoutumaan BrxX-metyylitransferaasiin DNA:n sijasta ja lukitsemaan BrxX:n inaktiiviseen dimeerimuotoon. Kun *Ocr* on sitoutuneena BrxX:ään, ei metyyliitransferaasi pysty tarttumaan DNA:han; se siis kilpailee DNA:n kanssa sitoutumisesta BrxX:ään. Kuten aikaisemmin luvussa 4.2. totesin, BrxX liittyy olennaisesti myös vieraan DNA:n tunnistamiseen. Täten *Ocr*-molekyylin sitoutuminen metyyliitransferaasiin estää BREX-puolustuksen, kun faagin kohde-DNA:ta ei pystytä tunnistamaan. *Ocr* ja BrxX vuorovaikuttavat siten, että *Ocr* on negatiivisesti varautunut – aivan kuten DNA:kin – ja se hakeutuu BrxX monomeerin alapuoliskon positiivisesti varautuneeseen uurteeseen. Drobiazkon ym. (2025) mukaan *Ocr*:n kaksi paria tyrosiini- ja glutamiinihappotähteitä muodostavat vetysidoksia metyyliitransferaasin aminohappojen Thr821, Asn823, Thr768 ja Gly721 kanssa. Kun *Ocr* ei ole läsnä, nämä aminohapot osallistuvat DNA:n tunnistukseen ja kiinnittymiseen metyyliitransferaasiin. (Drobiazko ym., 2025.)

*Ocr* on 117 aminohapon mittainen proteiini. Se koostuu kahdesta monomeeristä, jotka yhdessä muodostavat dimeerin. Kummatkin monomeerit matkivat kaksijuosteisen B-DNA:n yhtä helikaalista kierrosta (engl. helical turn) niin muodoltaan kuin pinnan varauksiltaankin. BrxX muodostaa heterotetrameerisen kompleksin inhibiittori *Ocr*:n kanssa (Went ym., 2024). Wentin ym. (2024) artikkelissa myös osoitetaan, että kompleksia stabiloivat *Ocr*:n ja BrxX:n C-terminaalisen domeenin välissä olevat vetysidokset. *Ocr*:n pinnan negatiivisten varausten jakautuminen vastaa DNA:n sokeri-fosfaattirunkoa (Walkinshaw ym., 2002). *Ocr*-dimeerin rakenteessa on mutka, jonka avulla se matkii taivutettua B-DNA:ta, ja siten vastaa tyypin I R-M-systeemien indusoimaa mutkaa DNA:ssa (Walkinshaw ym., 2002). Dimeeri vuorovaikuttaa noin 20 emäsparin verran DNA:n kanssa. (Isaev ym., 2020.)

## 5.2 *OrbA*

Ocr:n kanssa vastaavanlaisesti toimiva OrbA (overcome restriction by BREX) on *Vibrio cholerae* –bakteerin lyyttisen faagin (ICP1) koodaama BREX-inhibiittori. Ocr on tunnettu inhibiittori BREX:n lisäksi myös muissa puolustusjärjestelmissä, kun taas OrbA on havaittu inhiboivan nimenomaan BREX:iä. OrbA estää BREX:n toimintaa sitoutumalla BREX-komponentti BrxC:hen. Normaalisti BrxC vuorovaikuttaa itsensä kanssa muodosten suurempia multimeerejä. OrbA:n sitoutuminen muuttaa BrxC:n interaktiota itsenä kanssa ja estää BrxC-BrxC-kompleksin muodostumisen. OrbA estää multimerisoitumisen inhiboimalla BrxC:n vuorovaikutusta ATP:n kanssa. Kun ATP:n hydrolysoitumista ei tapahdu, BrxC lukkiutuu epäaktiiviseen muotoonsa, mikä estää faagipuolustuksen toiminnan. (Oshiro ym., 2024.)

## 5.3 *SAMaasi*

Kuten luvussa 2 totesin, SAM on keskeinen kofaktori BREX-puolustuksessa. Jos solunsisäisen SAM:n pitoisuus ehtyy, samalla estyy myös BREX:n toiminta. Tätä toimintatapaa käyttää T3-faagi, joka koodaa SAM-lyaasia (SAMaasi). SAMaasi on entsyymi, joka pystyy katkaisemaan SAM-molekyylin ja siten estämään SAM-riippuvaisen puolustusjärjestelmän toiminnan. SAM-molekyylin ehtyminen vaikuttaa vain vähän BREX-metylaation määrään, mutta se kuitenkin estää kokonaan BREX:n puolustustoiminnon. Tämä viittaa siihen, että SAM toimii metyyliryhmien luovuttamisen lisäksi myös jollain tavalla restriktiossa, esimerkiksi kofaktorina tai säätelijänä. Esimerkiksi tyypin I R-M-systeemit ovat riippuvaisia SAM:sta myös restriktiokompleksiensa kokoonpanossa ja/tai aktiivisuudessa. Andriianovin ym. (2023) tutkimuksen mukaan T3-faagin SAMaasi on yksinään riittävä alasajamaan BREX-puolustuksen. SAMaasin anti-BREX-aktiivisuus perustuu SAM-molekyylin entsyymaattisen hajotuksen lisäksi myös suoraan isännän SAM-syntaasiin (MetK) inhibitioon. SAMaasi sitoutuu SAM-syntaasiin muodostaen kompleksin, joka on välttämätön anti-BREX-strategian toiminnalle. Sitoutuminen SAM-syntaasiin, estää SAM-molekyylin tuotannon, mikä romahduttaa SAM-molekyylin tason solussa. (Andriianov ym., 2023.)

## 6 LÄHTEET

- Andriianov, A., Trigüis, S., Drobiazko, A., Sierro, N., Ivanov, N. V., Selmer, M., Severinov, K., & Isaev, A. (2023). Phage T3 overcomes the BREX defense through SAM cleavage and inhibition of SAM synthesis by SAM lyase. *Cell Reports*, *42*(8), 112972. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112972>
- Beck, I. N., Picton, D. M., & Blower, T. R. (2022). Crystal structure of the BREX phage defence protein BrxA. *Current Research in Structural Biology*, *4*, 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.crstbi.2022.06.001>
- Bedford, D. J., Laity, C., & Buttner, M. J. (1995). Two genes involved in the phase-variable phi C31 resistance mechanism of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, *177*(16), 4681–4689. <https://doi.org/10.1128/jb.177.16.4681-4689.1995>
- Bist, P., Sistla, S., Krishnamurthy, V., Acharya, A., Chandrakala, B., & Rao, D. N. (2001). S-adenosyl-l-methionine is required for DNA cleavage by type III restriction enzymes. *Journal of Molecular Biology*, *310*(1), 93–109. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4744>
- Cheng, X., Kumar, S., Posfai, J., Pflugrath, J. W., & Roberts, R. J. (1993). Crystal structure of the HhaI DNA methyltransferase complexed with S-adenosyl-l-methionine. *Cell*, *74*(2), 299–307. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90421-L](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90421-L)
- Chinenova, T. A., Mkrtumian, N. M., & Lomovskaia, N. D. (1982). [Genetic characteristics of a new phage resistance trait in *Streptomyces coelicolor* A3(2)]. *Genetika*, *18*(12), 1945–1952.
- Drobiazko, A., Adams, M. C., Skutel, M., Potekhina, K., Kotovskaya, O., Trofimova, A., Matlashov, M., Yatselenko, D., Maxwell, K. L., Blower, T. R., Severinov, K., Ghilarov, D., & Isaev, A. (2025). Molecular basis of foreign DNA recognition by

- BREX anti-phage immunity system. *Nature Communications*, 16(1), 1825.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-025-57006-2>
- Goldfarb, T., Sberro, H., Weinstock, E., Cohen, O., Doron, S., Charpak-Amikam, Y., Afik, S., Ofir, G., & Sorek, R. (2015). BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes. *The EMBO Journal*, 34(2), 169–183.  
<https://doi.org/10.15252/emj.201489455>
- Gordeeva, J., Morozova, N., Sierro, N., Isaev, A., Sinkunas, T., Tsvetkova, K., Matlashov, M., Truncaitè, L., Morgan, R. D., Ivanov, N. V., Siksnys, V., Zeng, L., & Severinov, K. (2019). BREX system of *Escherichia coli* distinguishes self from non-self by methylation of a specific DNA site. *Nucleic Acids Research*, 47(1), 253–265.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gky1125>
- Gromova, E. S., & Khoroshaev, A. V. (2003). Prokaryotic DNA Methyltransferases: The Structure and the Mechanism of Interaction with DNA. *Molecular Biology*, 37(2), 260–272. <https://doi.org/10.1023/A:1023301923025>
- Isaev, A. B., Musharova, O. S., & Severinov, K. V. (2021). Microbial Arsenal of Antiviral Defenses – Part I. *Biochemistry (Moscow)*, 86(3), 319–337.  
<https://doi.org/10.1134/S0006297921030081>
- Isaev, A., Drobiazko, A., Sierro, N., Gordeeva, J., Yosef, I., Qimron, U., Ivanov, N. V., & Severinov, K. (2020). Phage T7 DNA mimic protein Ocr is a potent inhibitor of BREX defence. *Nucleic Acids Research*, 48(10), 5397–5406.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa290>
- Jiang, X., Li, D., Sun, Z., Lu, Y., Li, P., Li, W., Wang, D., Wei, L., Xu, X., Yuan, Y., & Wang, M. (2024). Type I BREX system defends against antibiotic-resistant plasmids in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 68(3), e01128-23.  
<https://doi.org/10.1128/aac.01128-23>

- Kang, H., Gao, A., & Zhu, Y. (2025). Bacterial restriction-modification systems: Mechanisms of defense against phage infection. *Biophysics Reports*, *11*(5), 330.  
<https://doi.org/10.52601/bpr.2025.240070>
- Kelly, A., Went, S. C., Mariano, G., Shaw, L. P., Picton, D. M., Duffner, S. J., Coates, I., Herdman-Grant, R., Gordeeva, J., Drobiazko, A., Isaev, A., Lee, Y.-J., Luyten, Y., Morgan, R. D., Weigele, P., Severinov, K., Wenner, N., Hinton, J. C. D., & Blower, T. R. (2023). Diverse Durham collection phages demonstrate complex BREX defense responses. *Applied and Environmental Microbiology*, *89*(9), e00623-23.  
<https://doi.org/10.1128/aem.00623-23>
- Klimasauskas, S., Kumar, S., Roberts, R. J., & Cheng, X. (1994). HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. *Cell*, *76*(2), 357–369.  
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90342-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90342-5)
- Koonin, E. V., Makarova, K. S., & Wolf, Y. I. (2017). Evolutionary Genomics of Defense Systems in Archaea and Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, *71*(1), 233–261.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093830>
- Lopatina, A., Tal, N., & Sorek, R. (2020). Abortive Infection: Bacterial Suicide as an Antiviral Immune Strategy. *Annual Review of Virology*, *7*(1), 371–384.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-virology-011620-040628>
- Luyten, Y. A., Hausman, D. E., Young, J. C., Doyle, L. A., Higashi, K. M., Ubilla-Rodriguez, N. C., Lambert, A. R., Arroyo, C. S., Forsberg, K. J., Morgan, R. D., Stoddard, B. L., & Kaiser, B. K. (2022). Identification and characterization of the WYL BrxR protein and its gene as separable regulatory elements of a BREX phage restriction system. *Nucleic Acids Research*, *50*(9), 5171–5190. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac311>
- Maestri, A., Pons, B. J., Pursey, E., Chong, C. E., Gandon, S., Custodio, R., Olina, A., Agapov, A., Chisnall, M. A. W., Grasso, A., Paterson, S., Szczelkun, M. D., Baker, K.

- S., Van Houte, S., Chevallereau, A., & Westra, E. R. (2024). The bacterial defense system MADS interacts with CRISPR-Cas to limit phage infection and escape. *Cell Host & Microbe*, 32(8), 1412-1426.e11. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2024.07.005>
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Snir, S., & Koonin, E. V. (2011). Defense Islands in Bacterial and Archaeal Genomes and Prediction of Novel Defense Systems. *Journal of Bacteriology*, 193(21), 6039–6056. <https://doi.org/10.1128/JB.05535-11>
- Ofir, G., Melamed, S., Sberro, H., Mukamel, Z., Silverman, S., Yaakov, G., Doron, S., & Sorek, R. (2017). DISARM is a widespread bacterial defence system with broad anti-phage activities. *Nature Microbiology*, 3(1), 90–98. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0051-0>
- Oshiro, R. T., Dunham, D. T., & Seed, K. D. (2024). The vibriophage-encoded inhibitor OrbA abrogates BREX-mediated defense through the ATPase BrxC. *Journal of Bacteriology*, 206(11), e00206-24. <https://doi.org/10.1128/jb.00206-24>
- Perlinska, A. P., Stasiulewicz, A., Nawrocka, E. K., Kazimierczuk, K., Setny, P., & Sulkowska, J. I. (2020). Restriction of S-adenosylmethionine conformational freedom by knotted protein binding sites. *PLoS Computational Biology*, 16(5), e1007904. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007904>
- Picton, D. M., Luyten, Y. A., Morgan, R. D., Nelson, A., Smith, D. L., Dryden, D. T. F., Hinton, J. C. D., & Blower, T. R. (2021). The phage defence island of a multidrug resistant plasmid uses both BREX and type IV restriction for complementary protection from viruses. *Nucleic Acids Research*, 49(19), 11257–11273. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab906>
- Pingoud, A., Wilson, G. G., & Wende, W. (2014). Type II restriction endonucleases—A historical perspective and more. *Nucleic Acids Research*, 42(12), 7489–7527. <https://doi.org/10.1093/nar/gku447>

- Readshaw, J. J., Doyle, L. A., Puiu, M., Kelly, A., Nelson, A., Kaiser, A. J., McGuire, S. F., Peralta Acosta, J., Smith, D. L., Stoddard, B. L., Kaiser, B. K., & Blower, T. R. (2025). PglZ from Type I BREX phage defence systems is a metal-dependent nuclease that forms a sub-complex with BrxB. *Nucleic Acids Research*, *53*(12), gkaf540. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaf540>
- Sankpal, U. T., & Rao, D. N. (2002). Structure, Function, and Mechanism of *Hha* I DNA Methyltransferases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *37*(3), 167–197. <https://doi.org/10.1080/10409230290771492>
- Shen, B. W., Doyle, L. A., Werther, R., Westburg, A. A., Bies, D. P., Walter, S. I., Luyten, Y. A., Morgan, R. D., Stoddard, B. L., & Kaiser, B. K. (2023). Structure, substrate binding and activity of a unique AAA+ protein: The BrxL phage restriction factor. *Nucleic Acids Research*, *51*(8), 3513–3528. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad083>
- Sumby, P., & Smith, M. C. M. (2002). Genetics of the phage growth limitation (Pgl) system of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology*, *44*(2), 489–500. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02896.x>
- Walkinshaw, M. D., Taylor, P., Sturrock, S. S., Atanasiu, C., Berge, T., Henderson, R. M., Edwardson, J. M., & Dryden, D. T. F. (2002). Structure of Ocr from Bacteriophage T7, a Protein that Mimics B-Form DNA. *Molecular Cell*, *9*(1), 187–194. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00435-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00435-5)
- Weigele, P., & Raleigh, E. A. (2016). Biosynthesis and Function of Modified Bases in Bacteria and Their Viruses. *Chemical Reviews*, *116*(20), 12655–12687. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00114>
- Went, S. C., Picton, D. M., Morgan, R. D., Nelson, A., Brady, A., Mariano, G., Dryden, D. T. F., Smith, D. L., Wenner, N., Hinton, J. C. D., & Blower, T. R. (2024). Structure and rational engineering of the PglX methyltransferase and specificity factor for BREX

phage defence. *Nature Communications*, 15(1), 7236. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-51629-7>

Wozniak, C. E., Hughes, K. T., & Liou, T. G. (2023). Mutations in the C-terminal region of the bacteriophage exclusion protein PglX can selectively inactivate restriction in *Salmonella*. *Journal of Bacteriology*, 205(10), e00207-23. <https://doi.org/10.1128/jb.00207-23>

Wu, J. C., & Santi, D. V. (1987). Kinetic and catalytic mechanism of HhaI methyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(10), 4778–4786.

Zaworski, J., Dagva, O., Brandt, J., Baum, C., Ettwiller, L., Fomenkov, A., & Raleigh, E. A. (2022). Reassembling a cannon in the DNA defense arsenal: Genetics of StySA, a BREX phage exclusion system in *Salmonella* lab strains. *PLOS Genetics*, 18(4), e1009943. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009943>