

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

***Pseudomonas putida* tüüp I restriksioon-modifikatsioon  
süsteem faagivastases kaitses**

Magistritöö (30 EAP)

Kristin Tamm

Juhendaja: PhD Andres Ainelo

Kaasjuhendaja: Kaasprofessor PhD Hedvig Tamman

TARTU 2024

## INFOLEHT

### ***Pseudomonas putida* tüüp I restriksioon-modifikatsioon süsteem faagivastases kaitses**

Faagid on baktereid nakatavad viirused ja nad on kõige arvukamad geneetilised elemendid biosfääris. Bakterid on evolutsiooni käigus omandanud mitmeid faagivastaseid kaitsemehhanisme. Enamus bakterite genoomis leidub restriksioon-modifikatsioon süsteeme, mis on võimelised eristama võõr-DNA-d peremeesraku DNA-st ja neil on seega oluline roll faagivastases kaitses. Kuna *Pseudomonas putida* faagivastast kaitses on väga vähe uuritud siis käesoleva töö eesmärk oli uurida, kas *P. putida* tüüp I restriksioon-modifikatsioon (RM-I) süsteemil on roll faagivastases kaitses või mitte. Testiti RM-I süsteemi valkude (HsdR, HsdM, HsdS) aktiivsust *in vitro* lõikusreaktsioonides genoomse DNA-ga ning konstrueerides RM-I deletsioonitüve, mille mõju faagivastasele kaitses testiti tilkkülvides. Töö tulemustele põhinedes on on RM-I süsteemi roll faagivastases kaitses testitud tingimustes kaheldav.

Märksõnad: *Pseudomonas putida*, tüüp I restriksioon modifikatsioon süsteem, faagivastane kaitse

CERCS: B230 - mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

### **The type I restriction-modification system as an antiviral defence mechanism in *Pseudomonas putida*.**

Bacteriophages are the most abundant genetic elements in the biosphere. During the evolution bacteria have gained numerous antiviral mechanisms. Most bacterial genomes contain restriction-modification systems, which differentiate self-DNA from foreign DNA and as such defend bacteria against exogenous forms of DNA like phages. Currently, not much published experimental data exists about the antiphage defence mechanisms in *Pseudomonas putida*. Therefore, the aim of this project was to establish whether the type I restriction-modification (RM-I) system found in *P. putida* has a role in defending the bacteria against phages. The activity of the proteins (HsdR, HsdM, HsdS) encoded by the *P. putida*'s RM-I system was tested in restriction assays *in vitro* with genomic DNA. Phage dilution assays were carried out with the constructed RM-I deletion strain. It was discovered that under the experimental conditions set up during this project, the effect of the type I restriction-modification system as an antiviral mechanism in *P. putida* is debatable.

Keywords: *Pseudomonas putida*, type I restriction-modification system, phage defence

CERCS: B230 – microbiology, bacteriology, virology, mycology

## SISUKORD

INFOLEHT .....	2
SISUKORD .....	3
KASUTATUD LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	7
1.1 Bakteriofaagid.....	7
1.2 Bakterite kaitsesüsteemid .....	8
1.2.1 CRISPR-Cas süsteemid – bakterite adaptiivne immuunsus .....	8
1.2.2 Abi süsteemid – populatsiooni päästmine üksikraku hinnaga .....	9
1.2.3 Uued kaitsesüsteemid .....	9
1.3 Restriksioon-modifikatsioon süsteemid – kaitse võõr-DNA vastu.....	10
1.3.1 Tüüp II restriksioon-modifikatsioon süsteem.....	10
1.3.2 Tüüp III restriksioon-modifikatsioon süsteem.....	11
1.3.3 Tüüp IV restriksioon-modifikatsioon süsteem .....	12
1.4 Tüüp I Restriksioon-modifikatsioon süsteem (RM-I) .....	12
1.4.1 HsdS – spetsiifika subühik.....	14
1.4.2 HsdM – metülatsiooni subühik.....	14
1.4.3 HsdR – restriksiooni subühik .....	14
1.5 <i>Pseudomonas putida</i> kaitsesüsteemid.....	15
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	16
2.1 Töö eesmärgid.....	16
2.2 Materjalid ja meetodika.....	17
2.2.1 Kasutatud söötmed, bakteritüved, plasmiidid ja puhvrid .....	17
2.2.2 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) .....	19
2.2.3 Geelelektroforees .....	20
2.2.4 Bakterite elektroporatsioon.....	20
2.2.5 Kloneerimine .....	21
2.2.6 Plasmiidse DNA eraldamine ja sekveneerimine.....	22
2.2.7 Deletsioontüve konstrueerimine .....	22
2.2.8 Bakterimuruga tasside valamine.....	23
2.2.9 10x faagilahjenduste tilkkülv bakterimurule .....	24
2.2.10 Gibson Assembly - <i>hsdR/M/S</i> järjestuste viimine pET11c_His_TEV plasmidi. ....	24
2.2.11 HsdR/M/S valkude ekspressioon <i>E. coli</i> BL21(D3) rakkudes.....	25
2.2.12 HsdRMS valkude puhastamine.....	25
2.2.13 SDS-poliakrüülamiidgeelelektroforees (SDS-PAGE) .....	26
2.2.14 Lõikusreaktsioonid .....	26
2.2.15 Bioinformaatiline analüüs.....	27

2.3 Tulemused.....	28
2.3.1 <i>Pseudomonas putida</i> PaW85 RM-I süsteem kuulub IB alarühma .....	28
2.3.2 <i>P. putida</i> HsdR subühiku katalüütilise saidi tuvastamine .....	29
2.3.3 PaW85 genoomis olev RM-I ei kaitse CEPEST faagide vastu .....	30
2.3.4 RM I valkude puhastamisel moodustub RMS kompleks .....	31
2.3.5 HsdR <sub>2</sub> M <sub>2</sub> S <sub>1</sub> kompleks seob, kuid ei lõika DNA-d.....	34
2.4 Arutelu .....	38
2.4.1 ΔRM-I ei mõjuta faagikaitset.....	38
2.4.2 <i>P. putida</i> HsdRMS süsteemi valgud moodustavad R <sub>2</sub> M <sub>2</sub> S <sub>1</sub> kompleksi .....	39
2.4.3 R <sub>2</sub> M <sub>2</sub> S <sub>1</sub> kompleks seondub aga ei lõika DNA-d.....	39
KOKKUVÕTE .....	42
SUMMARY .....	43
TÄNUSÕNAD .....	44
KASUTATUD KIRJANDUS .....	45
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	51
LISAD.....	52
LIHTLITSENTS.....	53

## KASUTATUD LÜHENDID

Abi – (ingl *abortive infection*)

Amp – ampitsiliin

CEPEST – Collection of Environmental Pseudomonas putida Phages from Estonia

CRISPR-Cas – (ingl Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats- CRISPR associated)

crRNA – CRISPR-RNA

dsDNA – kaheahealine DNA (ingl *double stranded DNA*)

dsRNA – kaheahealine RNA (ingl *double stranded RNA*)

DpnI – restriktas *Diplococcus pneumoniae* bakteritüvest

DTT – 1,4-ditiotreitool

*hsd* – RM-I süsteemi geen (ingl. *host specificity determinant*)

IPTG - isopropüül  $\beta$ -D-1-tiogalaktopüranosiid

LB – lüsoogene sööde (ingl *lysogeny broth*)

RM-I – tüüp I restriksioon modifikatsioon süsteem

SAM - S-adenosüülmetioniin

SDS-PAGE – naatriumdodetsüülsulfaat polüakrüülamiidgeel

ssDNA – üheahealine DNA (ingl *single stranded DNA*)

ssRNA – üheahealine RNA (ingl *single stranded RNA*)

TEV – Tobacco Etch Virus

TRD – (ingl *target recognition domain*)

wt – metsiktüvi (ingl *wild-type*)

X-gal - 5-bromo-4-kloro-3-indolüül-D-galaktopüranosiid

## SISSEJUHATUS

Kõik eluvormid on viiruserünnakute suhtes haavatavad ja bakterid pole erandiks. Seetõttu pole üllatav, et bakterite genoomid sisaldavad arvukalt süsteeme viiruste (bakteriofaagide e faagide) ja muude parasiit-DNA vormide vastu võitlemiseks. Bakterid ja nende faagid on pidevas võidurelvastumises (Stern & Sorek, 2011).

Faagid on parasiidid ja nad vajavad ellujäämiseks ja paljunemiseks bakteritest peremeesrakke. Faagid võivad suurendada peremeesrakkude ellujäämisvõimekust, olles kas resistentsusgeenide ülekandjad või kaitstes bakterit teiste faagide eest, olles bakterite genoomis profaagina. Samas on bakterite kaitsesüsteemid pidevas muutumises ning süsteeme lisandub ja kaotatakse genoomist vastavalt vajadusele kuna bakterite jaoks on need süsteemid energia ja ressursside osas üsna kulukad. Nii nagu bakteriaalsed viirusevastased mehhanismid on pidevas muutuses, muutuvad ka faagide genoomid pidevalt, et saada jagu bakterite viirusevastastest süsteemidest (Samson *et al.*, 2013).

Kõige arvukamalt on bakterite genoomides restriksioon-modifikatsioon (RM) süsteeme, mis on jaotatud 4 alarühma. Käesolev töö keskendub tüüp I restriksioon-modifikatsioon süsteemile (RM-I) keskkonnabakteri *Pseudomonas putida* laboritüves PaW85. Töö eesmärk oli uurida süsteemi valkude aktiivsust ja selle süsteemi funktsionaalsust faagivastases kaitses.

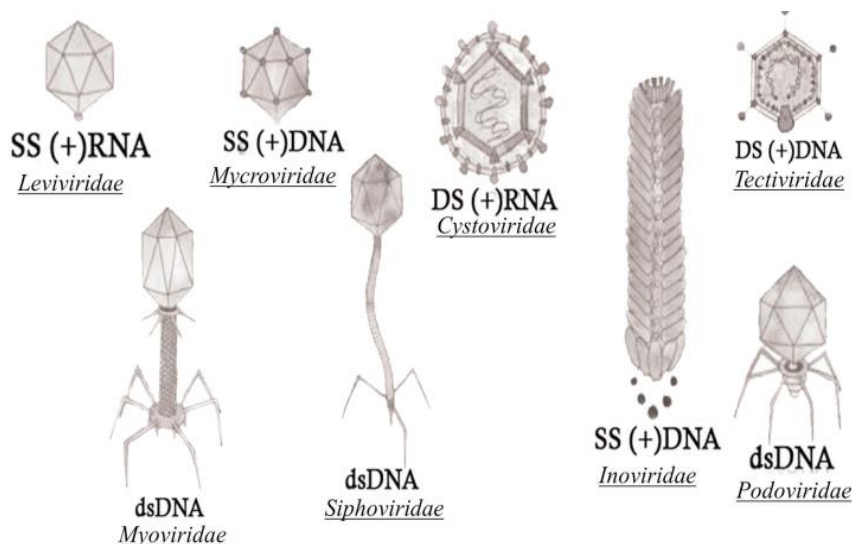
# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Bakteriofaagid

Bakteriofaagid on baktereid nakatavad viirused ja need avastati esmakordselt umbes 100 aastat tagasi. Esmalt, aastal 1915, kirjeldas Briti patoloog Frederick Twort faagide replikatsiooni tõttu lüüsi läinud bakterite kolooniate muutumist klaasjaks ning aastal 1917 leiutas Prantsuse-Kanada mikrobioloog Félix d'Hérelle sõna bakteriofaag, mis tähendab bakterite sööja (Salmond & Fineran, 2015). On teada, et faagid on biosfääris kõige levinumad geneetilised elemendid. Nende arv on hinnanguliselt  $10^{31}$ , ületades enda bakteritest peremeesorganisme kümnekordselt. Samal ajal on faagidel oluline roll bakterite evolutsioonis, kaitsesüsteemide valikus ja patogeensuse faktorite kujunemisel (Mäntynen *et al.*, 2021; Ongenae *et al.*, 2021).

Faagide morfoloogia on väga mitmekesine (Joonis 1). Eristatakse filamentseid, sabadega, ikosaeedrilisi ja polümorfseid faage (Ackermann, 2012). Suurem osa faagidest on kaksikahelalise DNA genoomiga (dsDNA) faagid, kuid teada on ka ühe- või kaheahelalise RNA (ssRNA ja dsRNA, vastavalt) ja üheaahelalise DNA genoomiga (ssDNA) faage (Naureen *et al.*, 2020).

Faagid on väga liigi- ja tüvespetsiifilised. Faagi ja tema peremeesorganismi interaktsioon algab bakteriraku pinnal, kus faagid on võimelised suure spetsiifilisusega seonduma raku pinnal olevate retseptoritega – erinevate suhkrute, valkude ja rakuväliste struktuuridega (Ongenae *et al.*, 2021; Orzechowska & Mohammed, 2019). Faagide puhul kirjeldatakse tavaliselt kahte peamist infektsioonitsükli tüüpi. Lüütiline tsükkel (sel viisil paljunevad faagid on lüütilised faagid), mil faagid modifitseerivad bakterite valgusünteesi masinavärki ja seda ära kasutades, hakkavad tootma uusi virione, mis väljuvad peremeesrakust lüüsi tagajärjel. Teine võimalus on lüsogeenne tsükkel, mil faagide genoom siseneb profaagina bakterikromosoomi. Profaagid võivad hilisemas staadiumis muutuda lüütiliseks, kuid võivad jääda ka lüsogeenseks ja paljuneda peremeesraku jagunemisel ilma seda tapmata (Golais *et al.*, 2013; Moura De Sousa *et al.*, 2021). Selliseid faage nimetatakse lüsogeenseteks või mõõdukateks faagideks.



**Joonis 1. Bakteriofaagide mitmekesisus.** Bakteriofaagid erinevad nii genoomi olemuse kui morfoloogia poolest. Enamus bakteriofaagide sugukondi on ikosaeedrilise kapsiidiga (välja arvatud filamentne (*Inoviridae*), kas membraaniga (*Cystoviridae*) või membraanita ning sabaga (*Myo-*, *Sipho-* ja *Podoviridae*) või sabata morfoloogiaga (Naureen *et al.*, 2020).

## 1.2 Bakterite kaitsesüsteemid

Bakterite genoomides on eksogeensete DNA vormidega nagu faagid, toimetulemiseks arvukalt erinevaid kaitsesüsteeme. Uurimused on näidanud, et erinevate kaitsesüsteemide geenid asuvad nn kaitsesaartel (Makarova *et al.*, 2011). Need on bakterite kromosoomides mobiilsed piirkonnad, mis viitab, et kaitsesüsteemid võivad bakterite vahel lihtsalt liikuda (Hacker & Carniel, 2001; Hussain *et al.*, 2021). Arvatakse, et geenide lähedus üksteisele viitab sellele, et erinevad kaitsesüsteemid võivad võõr-DNA tõrjumisel toimida sünergias (Oliveira *et al.*, 2014; Tesson & Bernheim, 2023). Kuna kaitsesüsteemid on bakterite genoomides lähestikku, on seda teadmist ära kasutades viimastel aastatel avastatud palju uusi kaitsesüsteeme (Bernheim & Sorek, 2020). Samas on täheldatud, et suur osa viirusevastastest süsteemidest on liigispetsiifilised (Rocha & Bikard, 2022) ning väiksema genoomiga bakterid kodeerivad vähem süsteeme ja suurema genoomiga bakteritel on mitmekesisem kaitsesüsteemide arsenal (Tesson *et al.*, 2022).

### 1.2.1 CRISPR-Cas süsteemid – bakterite adaptiivne immuunsus

CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - CRISPR associated) süsteemi on nimetatud bakterite adaptiivseks immuunsüsteemiks, kuna see suudab säilitada bakterirakku sisenenud võõr-DNA järjestusi ja lisada need järjestused bakteri genoomi (Hampton *et al.*, 2020). CRISPR-Cas on üks levinumatest kaitsesüsteemidest ja seda on leitud ligikaudu 50% bakterite genoomidest (Jackson *et al.*, 2017). CRISPR-süsteemid on jagatud 2 klassi, kus omakorda eristatakse 6 alatüüpi. Esimeses klassis on I, III ja IV alatüüpi

süsteemid ning teises klassis III, V ja VI alatüüpi süsteemid (Dimitriu *et al.*, 2020; Isaev *et al.*, 2021).

Süsteem koosneb CRISPR lookusest bakteri genoomis, mis sisaldab lühikesi kordusjärjestusi, mille vahele on sisestatud eksogeenselt DNA-st välja lõigatud järjestused. Süsteem töötab kolmes etapis. Esiteks, kohanemisetapp, kus CRISPR-Cas süsteem, kasutades Cas1 ja Cas2 endonukleaase, lõikab faagi DNA-st järjestuse ja järjestus liidetakse vahetükina CRISPR-i lookusesse bakteri genoomis. Teine etapp hõlmab ekspressiooni, kus transkribeeritakse *cas* ja *CRISPR* järjestusi, mis viib CRISPR RNA (crRNA) moodustumiseni. Viimane etapp on interferents, mille käigus Cas ja crRNA-kompleksid tunnevad ära rakku sisenenud faagides bakteri mällu talletatud järjestused ja lagundavad selle. (Dimitriu *et al.*, 2020; Orzechowska & Mohammed, 2019; Salmond & Fineran, 2015)

### **1.2.2 Abi süsteemid – populatsiooni päästmine üksikraku hinnaga**

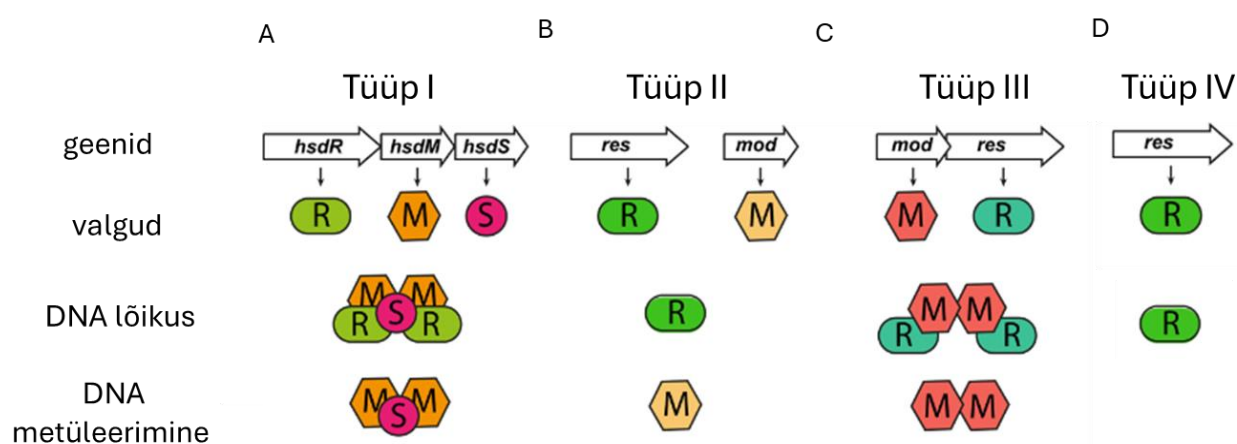
Abi (ingl *abortive infection*) süsteemid töötavad populatsiooni, mitte üksikraku tasemel. Nende süsteemide töö põhineb sellel, et viirusega nakatunud raku elutegevust pärsitakse või rakk sureb, nii et uued viirusosakesed ei saa valmida (Hampton *et al.*, 2020; Kelly *et al.*, 2023). Abi-süsteemid on sageli justkui programmeeritud rakusurm aga on teada ka mõned Abi-süsteemid, mis kutsuvad esile nn puhkeseisundi ja on pöörduvad (Aframian & Eldar, 2023). Abi süsteeme aktiveerivad näiteks viiruse replikatsioonitsükli vaheproduktid või struktuursed valgud (Lopatina *et al.*, 2020). Aktiveeritud Abi rajad võivad seejärel viia näiteks sisemembraani depolarisatsioonini, faagi ja peremeesorganismi tRNA-de ning mRNA-de või DNA lagundamiseni (Lopatina *et al.*, 2020).

### **1.2.3 Uued kaitsesüsteemid**

“Kaitsesaarte” analüüs ja täiustatud sekveneerimismetoodikad on viinud mitmete uute süsteemide avastamisele. Näiteks uued metüleerimisel põhinevad süsteemid, nagu BREX (bakteriofaagide välistamine) ja DISARM (restriktioon-modifikatsioon süsteemiga seotud kaitsesaarte süsteem). On avastatud uusi endonukleaase nagu näiteks Gabija, Shedy ja Zorya (Bernheim & Sorek, 2020).

### 1.3 Restriksioon-modifikatsioon süsteemid – kaitse võõr-DNA vastu

Restriksioon-modifikatsioon (RM) süsteemid on bakterites kõige levinumad kaitsesüsteemid ja neid leidub ligikaudu 96% bakterite genoomides (Bower *et al.*, 2018). Kõige elementaarsemal tasemel koosnevad need süsteemid kahest ensüümist. Metüültransferaasid metüleerivad peremeesorganismi genoomis äratundmisjärjestusi, kaitstes enda genoomi endonukleaaaside eest. Teine RM süsteemi ensüüm on endonukleaaas, mis lõikab rakku sisenenud eksogeense DNA metüleerimata äratundmisjärjestusi kas järjestuse sees või selle läheduses (Blakely & Murray, 2006). RM süsteemid jaotakse nelja alarühma geneetilise organisatsiooni ja biokeemiliste omaduste põhjal (Janscak, 1998) (Joonis 2).



**Joonis 2. RM süsteemide alajaotus.** R – restriктаas, M - metüültransferaas, S - spetsiifika A) RM-I süsteemi kodeerivad geenid *hsdR*, *hsdM* ja *hsdS* asuvad ühes lookuses. Sünteesitud R, M ja S valgud moodustavad pentameerse endonukleaaasi või trimeerse metüültransferaasi. B) RM-II süsteemi geenid *res* ja *mod* võivad asuda kromosoomis eri piirkondades ja vastavad valgud funktsioneerivad iseseisvate ensüümidena. C) RM-III süsteemi geenid asuvad ühes lookuses. Kaks R valku ja kaks M valku moodustavad endonukleaaasi. D) RM süsteemide tüüp IV alarühma kuuluvad iseseisvalt funktsioneerivad endonukleaaasid (muudetud Tan *et al.*, 2016).

#### 1.3.1 Tüüp II restriksioon-modifikatsioon süsteem

RM süsteemi tüüp II ensüüme on tuvastatud kõige rohkem ja teada on üle 4000 ensüümi. Seda peamiselt ühe RM II süsteemi alatüübi tõttu, mis on võimelised lõikama DNA-d väga spetsiifilistes järjestustes (Stern & Sorek, 2011). Selle omaduse tõttu kasutatakse neid ensüüme laialdaselt rekombinantsetes geenitehnoloogias.

RM tüüp II süsteemid sisaldavad nii endonukleaaasi kui ka metüültransferaasi, kuid mõlemad ensüümid funktsioneerivad eraldi (Joonis 2B) ja ei pea DNA lõikamiseks moodustama koos ensüümikompleksi (Dimitriu *et al.*, 2020).

Tüüp II endonukleaasid on oma struktuurilt homodimeersed või homotetrameersed ning tunnevad ära 4-8 aluspaari pikkuseid palindroomseid või asümmeetrilisi järjestusi. Nad lõikavad DNA mõlemat ahelat kas saidi sees või mõne aluspaari kaugusel saidist. Lõikus jätab DNA nn "kleepuvate" või "tõmpide" otstega (olenevalt, kas ensüüm lõikab DNAd kahe sama aluspaari vahel või on lõiked kahel ahelal omavahel nihkes), paljastades 3' hüdroksüül- ja 5' fosfaatrühmad (Pingoud *et al.*, 2005).

RM tüüp II ensüümid kasutavad oma tegevuseks  $Mg^{2+}$  kofaktorit ning endonukleaasi katalüütiline sait sisaldab tavaliselt glutamaadi, aspartaadi ja lüsiini aminohappeid (Loenen, Dryden, Raleigh, & Wilson, 2014). II tüüpi RM ensüümid jagatakse nende restriktasiomaduste alusel alarühmadesse. Näiteks alarühma II P (palindroomsed) ensüümid lõikavad äratundmissaidis väga spetsiifilistes kohtades. Asümmeetrilisi järjestusi tunnevad ära tüüp II S ensüümid ja lõikus toimub mõne aluspaari kaugusel äratundmissaidist. Tüüp II F vajab restriktasiomiks kahte äratundmissaiti ja DNA-d lõikab tetrameerne ensüümikompleks (Loenen *et al.*, 2014; Pingoud *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2012).

### **1.3.2 Tüüp III restriktasioon-modifikatsioon süsteem**

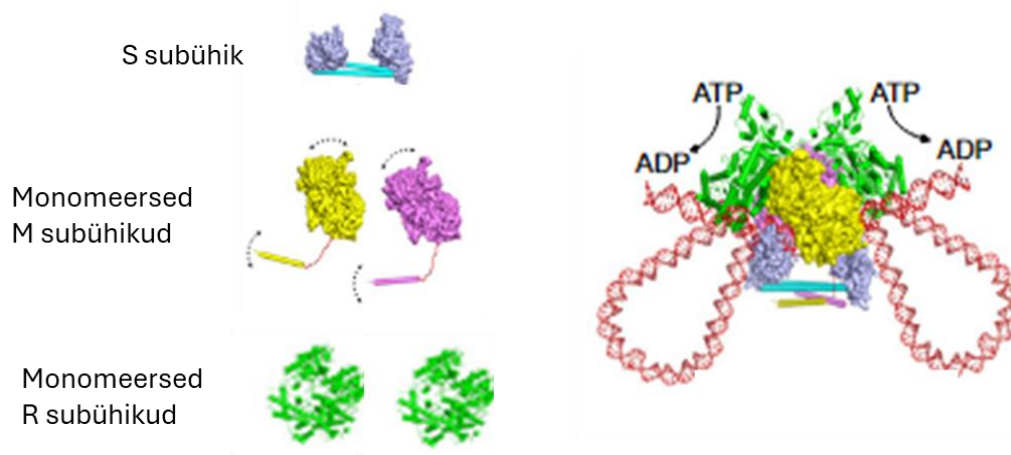
Aktiivne RM süsteem tüüp III ensüümikompleks koosneb kahest metüültransferaasi (Mod) subühikust ja kahest endonukleaasi subühikust (Res) (Joonis 2C). Modifikatsiooni subühik sisaldab sihtmärgi äratundmisdomeeni, TRD-d (TRD – target recognition domain), mis seostub äratundmisjärjestusega (Dryden *et al.*, 2011). Peremeesgenoomis metüleerib Mod subühik äratundmisjärjestuses adeniini nukleotiide. Äratundmisjärjestus ise on 5–6 aluspaari pikkune, mittepallindroomne, asümmeetriline ja lõikuse toimumiseks peavad kaks äratundmissaiti olema pöördorienteeritud üksteise suhtes (Dryden *et al.*, 2011). Kaks äratundmissaidiga seotud ensüümikompleksi translokeerivad ehk tõmbavad DNA-d läbi ensüümikompleksi lingudesse, kasutades selleks ATP-d. DNA lõikus toimub siis, kui ensüümikompleksid on üksteise vahetus läheduses, kuid lõikuse koht on tavaliselt ühele äratundmissaidile lähemal, tavaliselt 25–27 nukleotiidi kaugusel. Lõikuse ajal on ensüümikompleksis nii Mod kui ka Res subühik (Pingoud *et al.*, 2005).

### 1.3.3 Tüüp IV restriksioon-modifikatsioon süsteem

IV tüüpi ensüümid ei ole iseenesest RM süsteemid, vaid on iseseisvad endonukleaasid (Joonis 2D), mis on võimelised ära tundma ja lõikama metüleeritud nukleotiide, nagu 5-metüültsütosiin (m5C), 5-hüdrosümetüültsütosiin (hm5C), N4-metüültsütosiin (m4C), N6-metüültsütosiin (m6A). Tuntuim endonukleaas selles rühmas on *E.coli* McrBC, kus McrB domeen tunneb ära modifitseeritud nukleotiidi ja McrC domeen lõikab DNA-d, kasutades kofaktorina Mg<sup>2+</sup> ja GTP-d. Lõikus toimub siis, kui kaks modifitseeritud äratundmissaiti on üksteisest ligikaudu 40-3000 aluspaari kaugusel ning lõikus toimub ühele saidile lähemal. (Dryden, 2001; Loenen & Raleigh, 2014; Pingoud *et al.*, 2005)

### 1.4 Tüüp I Restriksioon-modifikatsioon süsteem (RM-I)

Noreen Murray nimetab RM tüüp I süsteemi ensüüme väljapeetud molekulaarseteks masinateks, mida need ensüümikompleksid tõesti on (Murray, 2000). Youell ja Firman aga nimetavad RM-I ensüümide uurimist aga esoteeriliseks ülesandeks, sest vaatamata oma kompleksusele ja spetsiifilisele DNA-ga seondumisele ei ole need ensüümikompleksid leidnud kohta teadlaste tööriistakastis (Youell & Firman, 2012). Esimene RM-I süsteem avastati *E. coli* tüves K12 1960.-tel ja sai nimeks EcoKI (Loenen, 2003). Võrreldes RM tüüp II süsteemidega ei ole tüüp I ensüüme väga palju tuvastatud ja iseloomustatud. Põhjuseks võib olla, et RM tüüp I süsteemi ensüümid on oma struktuurilt ja funktsioonilt palju keerulisemad kui RM tüüp II ja tüüp III ensüümid. Sarnaselt RM tüüp III ensüümidega, tõmbavad ka RM-I ensüümid DNA-d läbi ensüümikompleksi lingudesse (Joonis 3), kuid DNA-d lõigatakse sadade ja isegi tuhandete aluspaaride kaugusel äratundmissaidist (Bianco *et al.*, 2009; Kennaway *et al.*, 2012).



**Joonis 3. Viiest subühikust koosneva RM-I ensüümikompleksi struktuurimudel.** On kujutatud endonukleasina funktsioneerivat ensüümikompleks, mis on seondunud metüleerimata äratundmisjärjestusega ning translokeerib DNA-d läbi ensüümikompleksi lingudesse, kasutades selleks ATP-d (muudetud Liu *et al.*, 2017)

Struktuurilt on RM tüüp I süsteem oligomeerne holoensüüm (Joonis 3), mis koosneb restriksiooni (R), modifikatsiooni (M) ja spetsiifilisuse (S) subühikutest. R subühik on endonukleaaas, M subühik on metüültransferaas ja S subühik seondub äratundmissaidiga. Klassikaliselt eksisteerib RM-I süsteem kahes stöhhiomeetrias. Metüültransferaasina on ensüümikompleks  $M_2S_1$  stöhhiomeetrias. Endonukleasina funktsioneerib ensüümikompleks stöhhiomeetrias  $R_2M_2S_1$ . (Bower *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2005). On täheldatud ka  $R_1M_2S_1$  stöhhiomeetriaga kompleksi, mis suudab ATP-d kasutades DNA-d translokeerida kuid DNA-d ei lõika (Janscak, 1998) R subühiku transkriptsioon on eraldi promotori kontrolli all, samas kui M ja S subühikute transkriptsioon algab ühelt promotoriga (Youell & Firman, 2012). Sekveerimine on näidanud, et RM-I *hsdM* (M subühikut kodeeriv geen) ots kattub *hsdS* (S subühikut kodeeriva) geeni algusega mõne aluspaari võrra. (Bower *et al.*, 2018)

RM-I süsteemid jagunevad viieks alarühmaks ehk perekonnaks – IA, IB, IC, ID ja IE. Alarühma jaotus baseerub valgujärjestuste sarnasuse ja subühikute komplementaarsuse alusel. On leitud, et alarühmade vahel on aminohappete järjestustes sarnasust ainult 20 – 30% (Titheradge *et al.*, 2001). Tüüp IA sisaldab kõige esimesena avastatud RM-I süsteeme nagu EcoKI ja EcoBI. Tüüp IB alarühma kuhu kuuluvad EcoAI ja EcoEI süsteemid. Tüüp IC, hõlmab plasmiidipõhiseid süsteeme nagu EcoR124I ja EcoR124II ning kromosomaalseid süsteeme nagu Ecoprri. Tüüp ID alarühma esindajateks on StySBLI ja KpnAI. Tüüpi IE kuulub KpnBI (Youell & Firman, 2012).

### 1.4.1 HsdS – spetsiifika subühik

S subühik HsdS tunneb ära kahest osast koosnevat DNA järjestust ja on HsdRMS kompleksis nn keskne subühik, millega seonduvad M ja R subühikud. HsdS sisaldab kahte varieeruva järjestusega sihtmärgi domeeni ehk TRD-d (ingl *target recognition domain*), mis on üksteisest eraldatud konserveerunud järjestustega. Subühiku N terminuse TRD seondub DNA kahepoolse äratundmisjärjestuse 5' osaga ja C terminuse TRD seondub äratundmisjärjestuse 3' osaga (Abadjieva *et al.*, 2003). Äratundmisjärjestus ise koosneb 3-4 teadaolevast aluspaarist 5' osas ja 4-5 aluspaarist 3' osas. Nende aluspaaride vahele jääb umbes 6-8 mittespetsiifilist aluspaari. (Dryden, 2001). Näiteks, IB alarühma kuuluva EcoAI äratundmisjärjestuseks on GAGNNNNNNNNGTCA. Allajoonitud nukleotiidid näitavad, kus toimub metüleerimine M subühiku poolt (Suri *et al.*, 1984). S subühikutes esineb kõige rohkem varieeruvust TRD domeenides, et tagada erinevate süsteemide spetsiifilisust (Atack *et al.*, 2020).

### 1.4.2 HsdM – metülatsiooni subühik

HsdM subühik sisaldab metüültransferaasi aktiivtsentrit ning seob ensüümikompleksi kofaktorit ja metüülgrupi doonorit S-adenosüülmetioniini (SAM). Enamik tüüp I RM süsteemide M subühikuid metüleerib äratundmissaidis olevad adeniinid N6-metüüladeniinideks (m6A). Metüültransferaas subühik tuvastab äratundmisjärjestuse metüleerituse astet. Kui äratundmisjärjestus on ühel ahelal metüleeritud siis M subühik metüleerib vastasahela äratundmisjärjestuse (Obarska-Kosinska *et al.*, 2008).

### 1.4.3 HsdR – restriksiooni subühik

Kui M subühik on tuvastanud metüleerimata äratundmisjärjestusega DNA, siis seondub kompleksiga R subühik HsdR, mis sisaldab katalüütilist keskust DNA lõikuseks. Katalüütilise keskuse moodustavad 3 aminohapet – aspargiinhape, glutamiinhape ja lüsiin (Janscak *et al.*, 1999). HsdR subühik seob ATP-d ja ning restriksiooni kofaktoriteks on SAM ja Mg<sup>2+</sup> (Janscak *et al.*, 1996). HsdR subühik sisaldab motoorseid domeene (Seidel *et al.*, 2005), mis on võimelised tõmbama DNA-d ATP hüdrolyüüsi kaudu lingudesse, kasutades 1 molekuli ATP-d ühe aluspaari kohta (Dryden *et al.*, 2011). Arvatakse, et lõikus toimub siis, kui translokatsioon on takistatud, sageli näiteks teise RM-I ensüümikompleksi või DNA struktuuri tõttu (Obarska-Kosinska *et al.*, 2008).

### 1.5 *Pseudomonas putida* kaitsesüsteemid

*P. putida* on gramnegatiivne, kepikesekujuline, mittepatogeenne keskkonnabakter. *P. putida* laboritüve PaW85 (KT2440) genoomi suurus on 6,2 Mbp (Rosendahl *et al.*, 2020; Volke *et al.*, 2020). Tegemist on erinevates keskkonningimustes vastupidava bakteriga, millel on väga mitmekesine ainevahetus, tänu millele on *P. putida* leidnud kasutust erinevates biotehnoloogilistes protsessides (Weimer *et al.*, 2020). *P. putida*'t on leitud saastunud muldades. Kuna ta on võimeline metaboliseerima toksilisi ühendeid, omab ta olulist rolli bioremediatsioonis (Martínez-García *et al.*, 2014). Vaatamata asjaolust, et *P. putida* on laialdaselt kasutatav bakter nii laborites ja ka mujal, on *P. putida* viirusevastaste mehhanismide kohta vähe teada, sest esimesed *P. putida* laboritüve KT2440 (PaW85) nakatavad bakteriofaagid on isoleeritud alles üsna hiljuti (Brauer *et al.*, 2024; Jaryenneh *et al.*, 2023; Ngiam *et al.*, 2022). Kuna potentsiaal *P. putida* kasutamiseks erinevates suuremahulistes biotehnoloogilistes protsessides on suur, siis oleks kasulik *P. putida* viirusevastaste kaitsesüsteemide kohta rohkem teada saada. *P. putida* genoomis on neli krüptilist profaagi ((Martínez-García *et al.*, 2015). Uurimistööd meie laboris on näidanud, et need neli profaagi kaitsevad bakterit faagide vastu (Brauer *et al.*, 2024).

Peale profaagide on *P. putida*-s ennustatud 15 oletatava faagikaitsesüsteemi olemasolu. Nende seas ka käesolevas töös uuritav RM tüüp I süsteem, aga lisaks ka üks RM tüüp II süsteem (Andres Aínelo, avaldamata andmed)

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Kuigi *Pseudomonas putida* PaW85 (KT2440) on mikrobioloogias laialdaselt kasutusel olev mudelorganism, siis selle bakteritüve faagivastast kaitset on seni väga vähe uuritud.

Bioinformaatilise ennustuse põhjal (A. Aínelo), kodeerivad PaW85 geenid *hsdR*, *hsdM* ja *hsdS* I tüüpi RM süsteemi. Katseliselt pole selle süsteemi funktsiooni aga tõestatud ning sellega seoses on uurimistöö eesmärgid järgmised.

Uurimistöö eesmärgid:

1. Konstrueerida *Pseudomonas putida* tüvi, milles puudub restriksioon-modifikatsioon tüüp I süsteem (RM-I).
2. Testida RM-I deletsioontüve faagitundlikkust võrreldes PaW85 metsiktüvega
3. Sünteesida Gibson Assembly meetodiga plasmiidid, mis sisaldavad *hsdR*, *hsdM* ja *hsdS* geeni järjestust ja ekspresseerida need rakukultuuris.
4. Puhastada ekspresseerunud valgud afiinsus- ja suuruslahutus-kromatograafiaga ja valmistada HsdRMS ensüümikompleks.
5. Testida HsdRMS kompleksi aktiivsust.

## 2.2 Materjalid ja metoodika

### 2.2.1 Kasutatud söötmed, bakteritüved, plasmiidid ja puhvrid

Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid on toodud tabelis 1 ning puhvrid tabelis 2.

Söötmena kasutati LB vedelsöödet (1% trüpton, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl).

Plasmiidide ja rakkude selektsiooniks kasutati kas ampitsilliini (Amp)

lõppkontsentratsiooniga 100 µg/mL, kanamütsiini (Km) lõppkontsentratsiooniga 50 µg/mL, ,

tsiprofloksatsiini (Cip) lõppkontsentratsiooniga 0.03 µg/mL ja bensüülpenitsilliini (Bp)

lõppkontsentratsiooniga 1500 µg/mL. *Escherichia coli* rakke kasvatati temperatuuril 37 °C ja

*P. putida* rakke 30 °C, kui pole mainitud teisiti. Vedelsöötmes kasvatamisel aereeriti kultuure

loksutil.

**Tabel 1. Töös kasutatud plasmiidid ja bakteritüved**

Plasmiid	Iseloomustus	Viide
pEMG	Suitsiidplasmiid deletsioontüvede tegemiseks, sisaldab I-SceI endonukleaasi lõikesaite (Km <sup>R</sup> )	(Martinez-Garcia ja de Lorenzo, 2011)
pEMG_ΔRM-I	Suitsiidplasmiid, mis sisaldab I-SceI endonukleaasi lõikesaite ja ΔRM-I deletsioontüve lookust (Km <sup>R</sup> )	käesolev töö
pSWI_Sce-I	I-SceI endonukleaasi kodeeriv plasmiid deletsioontüvede tegemiseks	(Wong ja Mekalanos, 2000)
pET11c_His6_TEV_GraTA	N-terminaalse His6-märke ja TEV proteaasi lõikekohaga GraT ja märketa GraA ekspressiooniplasmiid (Amp <sup>R</sup> )	Hedvig Tamman
pET11c_His6_TEV_hsdR	N-terminaalse His6-märkega üleekspressiooniplasmiid (Amp <sup>R</sup> ) hsdR järjestusega	käesolev töö
pET11c_His6_TEV_hsdM	N-terminaalse His6-märkega üleekspressiooniplasmiid (Amp <sup>R</sup> ) hsdM järjestusega	käesolev töö
pET11c_His6_TEV_hsdS	N-terminaalse His6-märkega üleekspressiooniplasmiid (Amp <sup>R</sup> ) hsdS järjestusega	käesolev töö
<b>Bakteritüvi</b>		
<i>P. putida</i> PaW85	Algne tüvi, isogeenne täielikult sekveneeritud <i>P. putida</i> KT2440 tüvega	(Bayley et al.,1977) (Rosendahl et al., 2020)
<i>P. putida</i> ΔRM-I	PaW85, millest on RMS tüüp I eemaldatud	käesolev töö
<i>E. coli</i> DH5α λpir	<i>supE44</i> , <i>ΔlacU169</i> (Φ80 <i>lacZΔM15</i> ), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , λpir faagi lüsogeen	(Martinez-Garcia & de Lorenzo, 2011)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>hsd gal</i> (λ <i>cIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 geen1</i> )	(Studier ja Moffat, 1986)

**Tabel 2. Töös kasutatud puhvrid**

<b>PUHVER</b>	<b>Kemikaal</b>	<b>Kontsentratsioon</b>
<b>1x Anoodipuhver</b>	Tris, pH 8,9	100 mM
	HCl	22,5 mM
<b>1x Katoodipuhver</b>	Tris, pH 8,25	100 mM
	Tritsiin	100 mM
	SDS	1%
<b>5x Laemmlipuhver</b>	Tris HCl, pH 6,8	0,125 mM
	SDS	4%
	glütserool	20%
	2- mekaptoetanol	10%
	bromofenoolsinine	0,004%
<b>SM puhver</b>	Tris-HCl, pH 7,5	50 mM
	NaCl	100 mM
	MgSO <sub>4</sub>	8 mM
<b>1x TAE puhver</b>	Trisatsetaat, pH 8,2	50 mM
	EDTA	1 mM
<b>10x T4 ligaasipuhver</b>	Tris-HCl, pH 7,6	500 mM
	MgCl <sub>2</sub>	100 mM
	ATP	10 mM
	DTT	10 mM
<b>Re-suspensiooni puhver A</b>	Tris pH 8,5	50 mM
	NaCl	300 mM
	KCl	300 mM
	glütserool	5%
<b>Re-suspensiooni puhver B</b>	Tris pH 8,5	50 mM
	NaCl	300 mM
	KCl	300 mM
	imidasool	500 mM
	glütserool	5%
<b>1x lõikupuhver</b>	Tris, pH 8	50 mM
	DTT	1 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM

### 2.2.2 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

PCR-i reaktsioonidel kasutati matriitsina puhastatud plasmiidset DNA-d või bakterirakke. Reaktsiooni maht oli 20 µL, mis sisaldas 1x Dream Taq Green puhvrit (Thermo Scientific), 0,2 mM dNTPd, kumbagi praimerit 0,5 µM, 1 U DreamTaq polümeraasi (Thermo Scientific) ja vett. Praimeritena kasutatud oligonukleotiidid on toodud tabelis 3.

Reaktsioon koosnes 25 tsüklilist järgmistel tingimustel: DNA denaturatsioon (30 sek 96 °C), praimerite seondumine matriitsile (30 sek 55 °C) ja DNA süntees 72 °C juures. DNA sünteesi aeg 72 °C juures sõltus amplifitseeritava fragmendi pikkusest, võttes arvesse, et Taq polümeraas sünteesib umbes 1000 nt minutis.

Ühe Q5 PCR maht oli 50 µL, mis sisaldas 1x Q5 puhver (New England Biolabs), 0,2 mM dNTPd, 0,5 µM mõlemat praimerit, 1 U Q5 polümeraas (New England Biolabs), vett, matriits DNA-d 1 µL. Praimeritena kasutatud oligonukleotiidid on toodud tabelis 3.

Q5 PCR reaktsioon koosnes 32 tsüklilist järgmisel tingimustel: DNA denaturatsioon, 98° C – 10 sekundit, praimerite seondumine, 63/65/66° C – 15 sekundit, DNA süntees, 72° C. DNA sünteesi aeg 72 °C juures sõltus amplifitseeritava fragmenti pikkusest, võttes arvesse, et Q5 polümeraas sünteesib umbes 2000 nt minutis.

**Tabel 3. Töös kasutatud oligonukleotiidid**

Oligonukleotii di nimi	Nukleotiidne järjestus 5'->3'	Kasutamine
delRM-I_BamHI	TTGGAT-CCTTAATCGCCTGATCAACT	PCR I ja PCR II ΔRM-I tüve konstrueerimine
delRM-I	GTCCATTGCTGGCTATGTCC	PCR I ΔRM-I tüve konstrueerimine
delRM-I_EcoRI	AAGAATT-CGTTGGAAGAGTCTTTGATG	PCR I ja PCR II ΔRM-I tüve konstrueerimine; wt lookuste kontroll PCR
delRM-I_pikk	GGACATAGCCAGCAATGGAC-TCAAAATGCTAGACGCAGAC	PCR I ΔRM-I tüve konstrueerimine
Fw	GTAAAACGACGGCCAGT	pEMG + PCR I fragmendi kontroll PCR
Rev	AACAGCTATGACCATG	pEMG + PCR I fragmendi kontroll PCR
4743 lopp	CAGTGGTTCCAGAAGAAAGC	wt lookuste kontroll PCR kointegraatides

Oligonukleotii di nimi	Nukleotiidne järjestus 5'→3'	Kasutamine
21 hsdR to TEV Fw	AGAACCTGTATTTCCAAGGCGACAAGAAA TCACTTTCCGAG	Q5 PCR <i>hsdR</i> geenil amplifitseerimine
22 hsdR to pET11c Rev	GGCTTTGTTAGCAGCCGGATTAACTGGC GTACAGCGC	Q5 PCR <i>hsdR</i> geeni amplifitseerimine
23 hsdM to TEV Fw	AGAACCTGTATTTCCAAGGCTCCATCAGCT CCACCATC	Q5 PCR <i>hsdM</i> geeni amplifitseerimine
24 hsdM to pET11c Rev	GGCTTTGTTAGCAGCCGGATTCATACCTTG CGCCTCAG	Q5 PCR <i>hsdM</i> geeni amplifitseerimine
25 hsdS to TEV Fw	AGAACCTGTATTTCCAAGGCACGGCGCTA CTCATCGAC	Q5 PCR <i>hsdS</i> geeni amplifitseerimine
26 hsdS to pET11c Rev	GGCTTTGTTAGCCGGATCTACACCTGAGCC ATAAGGG	Q5 PCR <i>hsdS</i> geeni amplifitseerimine
19 TEV Rev	GCCTTGAAATACAGGTTCTC	pET11c_His_TEV lineariseerimine
20 pET11c rear Fw	GCTAGTTATTGCTCAGCGGT	pET11c_His_TEV lineariseerimine
lac operator	AATTGTGAGCGGATAACAAT	Gibson Assembly plasmiidide kontroll PCR ja sekveneerimine
pET11c lopp	GCTAGTTATTGCTCAGCGGT	Gibson Assembly plasmiidide kontroll PCR ja sekveneerimine
pBRERI	ACGAGGCCCTTTCGTCTTC	Gibson Assembly plasmiidide sekveneerimine

### 2.2.3 Geelelektroforees

PCR produktid lahutati 1% agarosgeelis 1x TAE puhvis (Tabel 2.). Geelile kanti 5 – 9 µL proovi. Agarosgeel sisaldas etiidumbromiidi (0,33 µg/mL). Vajadusel lisati PCR segudele 2 µL foresivärvi. Fragmentide suurust võrreldi Thermo Scientific ZipRuler Ladder 1 või Ladder 2-ga. Elektroforees teostati pingel 135 V 12-14 minutit. Peale elektroforeesi visualiseeriti DNA geelis UV valgusega (UVIDOC HD6, Uvitec, Cambridge).

### 2.2.4 Bakterite elektroporatsioon

*E. coli* kompetentsete rakkude ettevalmistamine

Elektroporatsioonikompetentide tegemiseks võeti üleöö 5 mL-s LB vedelsöötmes kasvanud rakke, tehti 35-kordne lahjendus värskesse LB vedelsöötmesse ja kasvatati 2 tundi. Kõik rakud tsentrifuugiti kokku, 1 minut, 13400 rpm (Eppendorf minispinn) ja pesti 3 korda 1 mL 10% glütserooliga. Rakke ja töölahuseid hoiti jääl. Peale viimast pesu suspenderiti rakud umbes 50 µL 10% glütseroolis.

*P. putida* kompetentsete rakkude ettevalmistamine

Vastavalt plasmiidile, mille poreerimiseks rakke oli vaja, võeti kas 1 mL (pEMG plasmiidid) või 250 µL (kõik teised plasmiidid) üleöö kasvanud PaW85 rakke. Rakud tsentrifugeeriti 1 minut, 13400 rpm (Eppendorf minispin) ja pesti 3 korda 800 µL 300 mM sahharoosiga toatemperatuuril.

Rakkudele lisati plasmiidset DNA-d lisati kas 5 µL (*P. putida* jaoks pEMG plasmiidid) või 1 µL. Nii *E. coli* kui ka *P. putida* rakkudesse poreeriti DNA BioRad elektroporaatoriga pingel 2,5 kV. Rakud pesti poreerimisküvettidest välja 500 µL LB-ga ja inkubeeriti temperatuuril 37 °C, 1 tund (*E. coli*) või 30 °C (*P. putida*), pEMG plasmiidid (Tabel 1) 3,5 tundi, pSWI\_SceI plasmiid 1 tund. Seejärel tsentrifugeeriti rakud põhja (1 min, 13400 rpm, Eppendorf minispin) ja plaaditi selektiivtassidele.

### 2.2.5 Kloneerimine

RM-I deletsioonlookuse kontrueerimiseks viidi läbi PCR I ja PCR II, kus PCR I matriitsiks kasutati *P. putida* metsiktüve ja PCR II matriitsiks PCR I fragmente. Enne PCR II läbiviimist töödeldi PCR I fragmentide reaktsioonisegusid ExoI (2,5 U) ja DpnI (4 U) ensüümidega (Thermo Scientific), et vabaneda praimeritest ja genoomsest DNA-st. Töötlust viidi läbi 15 minutit temperatuuril 37 °C ja ensüümid inaktiveeriti temperatuuril 80 °C. PCR II fragmenti töödeldi EcoRI (5 U) ja BamHI (5 U) restriктаasidega (Thermo Scientific) ning reaktsioonisegud mahuga 20 µL sisaldasid 1x Fast Digest puhvrit, restriктаase EcoRI ja BamHI, PCR II produkte (4 µL) või pEMG Km<sup>R</sup> plasmidi (2 µL konstrukti kohta) ja vett. Segusid inkubeeriti 30 minutit temperatuuril 37 °C. pEMG plasmiidiga segu töödeldi eraldi 1 U aluselise fosfataasiga FastAP (Thermo Scientific) 30 minutit temperatuuril 37 °C. Seejärel inkubeeriti kõiki segusid 15 minutit temperatuuril 80 °C ensüümide deaktiveerimiseks. DNA sadestamiseks lisati 1/10 mahtu 5 M NaCl ja 2,5 mahtu 96% etanooli ja inkubeeriti 10 minutit -20 °C. Seejärel tsentrifugeeriti 8 minutit 13400 rpm ja pesti 2x 100 µL 80% etanooliga. Segu tsentrifugeeriti 3 minutit 13400 rpm (Eppendorf minispin). Peale teist pesu kuivatati DNA sade temperatuuril 37 °C. Sadestatud pEMG plasmiid võeti üles 11,6 µL vees ja lisati sadestatud PCR II fragmendile. Ligaasisegu oli lõppmahuga 15 µL, mis sisaldas 10x T4 ligaasipuhvrit (Tabel 2), 0,4 U T4 ligaasi (Thermo Scientific), 1 mM ATP ja vett. Ligeerimine toimus üleöö toatemperatuuril. Järgmisel päeval sadestati ligaasisegu 1/10 mahu 5 M NaCl ja 2 mahu 96% etanooliga. Segu hoiti 10 minutit -20 °C ja tsentrifugeeriti seejärel 8 minutit, 13400 rpm (Eppendorf minispin). Sadet pesti 2 korda 100 µL 80% etanooliga ja tsentrifugeeriti 4 minutit 13400 rpm ja pandi kuivama 37 °C. Sadestatud ja puhastatud ligeerunud plasmiid võeti üles 5 µL veega. 2,5 µL ligeeritud pEMG\_ΔRM-I plasmidi elektroporeeriti *E. coli* rakkudesse ja

plaaditi Km tassidele, mis sisaldasid 0,5 mM IPTG (isopropüül  $\beta$ -D-1-tiogalaktopüranosiid) ja 0,06 mg X-gal-i (5-bromo-4-kloro-3-indolüül-D-galaktopüranosiid). Plaadid pandi 37° C termostaati.

### 2.2.6 Plasmiidse DNA eraldamine ja sekveneerimine

Plasmiidse DNA eraldamiseks kasutati Favorgen FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit vastavalt tootja protokollile. DNA säilitati -20° C. Puhastatud plasmiidsele DNA-le tehti kontroll PCR Fw ja Rev praimeritega (Tabel 3). Saadud segusid töödeldi ExoI (2,5 U) ja aluselise fosfataasiga FastAP (1 U), 15 min 37 °C kraadi ja siis inaktiveeriti ensüümid 80 °C 15 minuti jooksul.

Sekveneerimisreaktsiooni proovi lõppmaht oli 10  $\mu$ L, mis sisaldas 1  $\mu$ L PCR-i produkti, 0,7  $\mu$ L Big Dye premix (Big Dye PR-100 *mix* v3.1, Fischer Scientific), 2  $\mu$ L 5x lahjenduspuhvrit (200 mM Tris pH 9,0; 6 mM MgCl<sub>2</sub>), 1,6 pmol praimerit ja vett. Sekveneerimisreaktsioonide paljundamiseks viidi läbi 30 tsüklit järgmisi etappe:

- 1) 95 °C, 15 sekundit
- 2) 50 °C, 10 sekundit
- 3) 60 °C, 45 sekundit

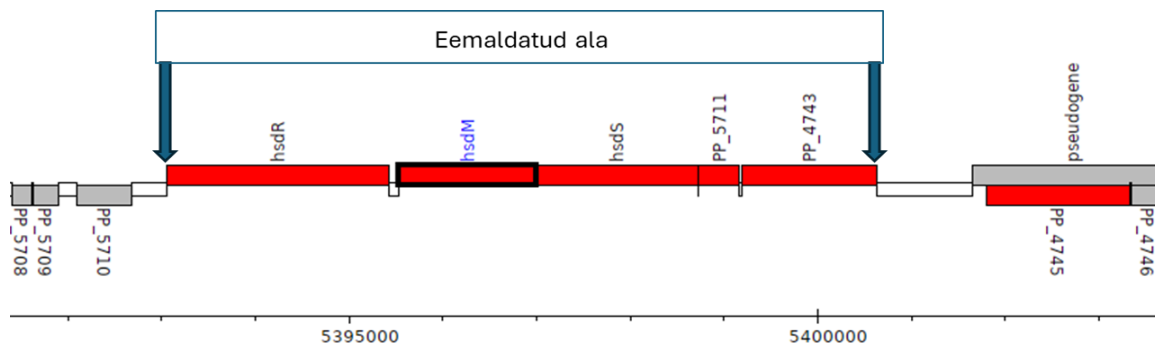
DNA sadestamiseks lisati reaktsioonisegudesse 2  $\mu$ L dekstraani ja 30  $\mu$ L 96% etanooliga. Segusid hoiti 10 minutit temperatuuril -20 °C. Seejärel segusid tentrifuugiti 5 minutit 13400 rpm (Eppendorf minispinn). Sadet pesti kaks korda 100  $\mu$ L 80% etanooliga, kuivatati temperatuuril 37 °C ning võeti üles 10  $\mu$ L-s 70% formamiidis. DNA saadeti Tartu Ülikooli Genoomika tuumiklaborisse sekveneerimisele.

### 2.2.7 Deletsioontüve konstrueerimine

Deletsioontüvi valmis koostöös Rita Hõrakuga.

Deletsioontüve (Joonis 4) konstrueerimiseks kasutati Martínez-García & De Lorenzo, 2011 artiklis väljatoodud meetodit, mis põhineb homoloogilisel rekombinatsioonil (Martínez-García & De Lorenzo, 2011). Esmalt elektroporeeriti PaW85 rakkudesse pEMG\_ $\Delta$ RM-I plasmiid ning homoloogilise rekombinatsiooni teel integreerub deletsiooni fragment PaW85 kromosoomi. pEMG plasmidi Km-resistentsust tagavast geenist tulenevalt tekivad Km-resistentsed kointegraadid. Nendesse kointegraatidesse elektroporeeriti pSW-SceI plasmiid, mis kodeerib I-SceI nukleaasi. Nukleaasi indutseerimiseks kasvatati rakke üleöö LB vedelsöötmes, kuhu lisati 3 mM meta-toluati. Kromosoomi integreerunud pEMG plasmiid

sisaldab I-SceI restriktsoonisaite ja indutseeritud nukleaaas lõikab deletsioonifragmenti. Rakud plaaditi LB tassidele Km-tundlike kolooniate selekteerimiseks (toimunud on kointegraadi lahendamise). Deletsioonifragmenti tuvastamiseks tehti kolooniatele kontroll PCR lookusspetsiifiliste praimeritega (Tabel 3). pSWI-SceI-st vabanemiseks kasvatati rakke antibiootikumivabas LB vedelsöötmes paar päeva, värskendades iga päeva järel kultuuri uude LB vedelsöötmesse ja plaaditi üksikkolooniateks Bp-tundlike kolooniate tuvastamiseks. Tuvastatud Bp-tundlikest kloonidest tehti säilituskultuurid. Selleks segati 1 mL üleöö kasvanud rakud 30-40% glütserooliga (lõppkontentratsioon) ja säilitati temperatuuril -80 °C.



**Joonis 4. RM tüüp I süsteemi lookus *Pseudomonas putida* KT2440 (PaW85) genoomis.** *P. putida* genoomis on üks RM-I süsteem ja selle geenid asuvad ühes lookuses. Deletsioontüves puuduvad *hsdR* (PP\_4740), *hsdM* (PP\_4741), *hsdS* (PP\_4742), PP\_5711 ja PP\_4743 geenid. Geen PP\_5711 kodeerib hüpoteetiliselt hüdrolaasi ja geen PP\_4743 kodeerib hüpoteetiliselt ATPaasi ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)).

### 2.2.8 Bakterimuruga tasside valamine

Bakterite nakatamine faagidega toimub bakterimurul. Bakterimuru valamiseks on vaja värsked eksponentsiaalses kasvufaasis olevaid rakke ( $OD_{580} \sim 1$ ). Selleks värskendati üleöö temperatuuril 20 °C, LB vedelsöötmes (aeratsiooniga) kasvanud rakkudest 350 µL värskesse 5 mL LB-sse ligikaudu 4 tunniks temperatuurile 20 °C.

Bakterimuru koosneb

1. 5 mL 0.3% soft agar
2. 200 µL eksponentsiaalse kasvufaasi ( $OD_{580}=1$ ) rakud.
3. 50 µL 1 M  $CaCl_2$

Bakterimuru valati cip-i sisaldavale LB tardsöötmele (20 mL). Valatud bakterimurul lasti umbes 15 – 20 minutit tarduda.

Tsiprofloktsatsiini sisaldavaid selektiivtasse kasutati, et aktiveerida testitavate faagide lüütilist tsükli ning  $CaCl_2$  kasutati bakterimurul kuna see ühend aitab faagidel paremini

bakteritele seonduda. Kuna Grupp 2 ja 4 faagid nakatavad baktereid väga hästi siis nende puhul kasutati LB tasse ja bakterimurule ei lisatud CaCl<sub>2</sub>.

### 2.2.9 10x faagilahjenduste tilkkülv bakterimurule

Faagide lahjendusterida tehti 96 kausiga mikrotiiterplaati, mis steriliseeriti enne lahjenduste tegemist UV-ga. Lahjendusread tehti faagidest tiitriga 10<sup>8</sup> PFU 10<sup>-1</sup> kuni 10<sup>-6</sup>.

Faagilahjendused tehti SM puhvris (Tabel 2). Tardunud bakterimuru tassile pipeteeriti 1,5 µL iga faagilahjendust. Tilkkülvi plaate inkubeeriti üleöö 20 °C.

**Tabel 4. Töös tilkkülvi tulemuste esiletoomiseks kasutatud faagid (Joonis 7)**

G1	Nõo 2
G2	Nõuni 2
G3	Lauda oja
G4	Luke 1
G5	Savi Peeda tee 1
G6	IPA 2
G7	Kallioja
G8	Kurepalu 1
G9	Kurepalu 2

### 2.2.10 Gibson Assembly - *hsdR/M/S* järjestuste viimine pET11c\_His\_TEV plasmidi.

Ekspressioonikonstruktide tegemiseks amplifitseeriti Q5 PCR-ga *P. putida* genoomist *hsdR/M/S* järjestused ja lineariseeriti Q5 PCR-ga pET11c\_His\_TEV, plasmidist pET11c\_His6\_TEV\_GraTA (tabel 1) jättes välja GraTA järjestuse. Selleks, et eemaldada matriits-DNA, töödeldi PCR segu 10 U DpnI ensüümiga, 10 min 37 °C ja 15 min 80 °C. PCR fragmendid puhastati Omega BioTek MicroElute PCR Cycle Pure komplektiga vastavalt tootja juhendile.

Gibsoni segu jaoks oli vaja arvutada PCR fragmentide molaarsed kontsentratsioonid, kasutades fragmentide suurust (bp) ja DNA kontsentratsiooni (ng/µL) valemis

$$nM = \frac{[DNA] \left( \frac{ng}{\mu L} \right)}{\text{Fragmendi suurus (bp)} \times 0,66}$$

Ühe Gibson'i segu maht on 20 µL ja sisaldas 10 µL Gibson Assembly HiFi Master Mix (Thermo Scientific), 0,08 pmol vektorit, 0,08 pmol sisestatavat fragmenti, MQ vett. Segud valmistati jääl, seejärel inkubeeriti 15 minutit 50 °C juures. Peale inkubeerimist lahjendati 2 µL igat segu 5x.

Iga konstrukti jaoks elektroporeeriti 1  $\mu\text{L}$  5x lahjendatud Gibson'i segu *E. coli* DH5 $\alpha$  rakkudesse ja selektsiooniks kasutati ampitsilliini (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sisaldavaid tasse. Järgmisel päeval teostati kasvanud kolooniatele kontroll PCR. Praimeritena kasutatud oligonukleotiidid on toodud tabelis 3. Samad kolooniad külvati edasi uutele Amp-i sisaldavatele LB tassidele. Nendel tassidel edasi kasvanud kolooniad pandi üleöö 37 °C loksutisse 5 mL LB-s, kuhu lisati ampitsilliin. Üleöö kasvanud rakkudest puhastati plasmiidne DNA, kasutades Favorgen FavorPrep Plasmid extraction mini kit komplekti vastavalt tootja protokollile. Nanodropiga (Nanodrop One, Thermo Scientific) mõõdeti puhastatud plasmiidide kontsentratsioon ja hinnati puhtust. Puhastatud plasmiidne DNA saadeti sekveneerimisele Tartu Ülikooli Genoomika tuumiklaborisse. Sekveneerimiseks kasutatud praimerid on toodud tabelis 3.

### **2.2.11 HsdR/M/S valkude ekspressioon *E. coli* BL21(D3) rakkudes**

HsdRMS valkude ekspresseerimiseks kasvatati vastavaid pET11c\_His\_TEV ekspressioonikonstrukte sisaldavaid *E. coli* BL21(DE3) rakke Amp-i sisaldavas LB vedelsöötmes üleöö temperatuuril 30 °C aereerides kultuure loksustil, Seejärel tehti üleöö kultuuridest 100-kordne lahjendus värskesse Amp-i sisaldavasse LB vedelsöötmesse (vastavalt 500 mL HsdM ja HsdS ja 1 L HsdR valge ekspressiooniks). Rakukultuurid pandi kasvama loksutisse 180 rpm (Infors HT Multitron Standard) temperatuuril 30 °C kuni kultuuri OD<sub>580</sub> oli 0,4 – 0,6, mil loksuti temperatuur alandati 18 °C-ni. Oodati ca 15 minutit, kultuuridest võeti 1 mL null-ajapunkti proovid. Rakukultuuri lisati IPTG lõppkontsentratsiooniga 0,05 mM. 4 tundi peale indutseerimist võeti kultuuridest 4 tunni ajapunkti proovid. Selleks tehti 10x lahjendused 1 mL-s LB-s, mõõdeti OD<sub>580</sub> (Biochrom Libro S35) ja arvutati kui suur kogus proovi võtta rakukultuurist tsentrifuugimiseks. 0 ja 4 H ajapunkti proovid tsentrifuugiti kohe peale võtmist 1 minut, 13400 rpm (Eppendorf minispin). Pipetiga eemaldati nii palju vedelikku kui võimalik ja proovid pandi -20 °C.

Rakukultuurid tsentrifuugiti (Sorvall RC5C Plus, Du Pont; GS-3 rootor, 4900 rpm, 12 minutit, +4° C). Valati ära vedelik ja rakkudele lisati 10 mL re-suspensioonipuhvrit A ja suspendeeriti (Tabel 2). Pool igast rakususpensioonist segati koheselt omavahel HsdRMS kompleksi segu valmistamiseks. Nii segatud kui eraldijäetud rakususpensioonid säilitati temperatuuril -80° C.

### **2.2.12 HsdRMS valkude puhastamine**

Valkude puhastamine viidi läbi nii afiinsus- kui ka suuruslahutava kromatograafiaga. Rakususpensioon sulatati üles leiges vees ja sulanud segule pipeteeriti 50  $\mu\text{L}$  20 mg/mL

lüsotsüümi. Rakud lõhuti sonikeerides (Ultrasonic homogenizer 4710 Series, Cole & Parmer) 15x 5 sekundit korraga iga 10 sekundi järel, segu hoiti sonikeerimise ajal jääl. Sonikeeritud rakususpensioon tsentrifugeeriti (Sorvall RC5C Plus, Du Pont; HS-4 rootor, 7000 rpm, 25 minutit, +4 °C). Vedelik filtreeriti (Sartorius Minisart 0,45 µm), hoides proovi jääl ja lisati 10 µL DNAasi. Afiinsuskromatograafia viidi läbi HisTrap HP 1 ml kolonniga (Cytiva Life Sciences) ÄKTA Go kromatograafil (Cytiva Life Sciences) kogu filtreeritud vedelikule, kasutades re-suspensiooni puhvreid A ja B (Tabel 2). Valkude lahutamiseks suuruse järgi kontsentreeriti afiinsuskromatograafiaga puhastatud valgufraktsioonid kuni 1 mL-ni kasutades Centrifugal filter Ultracell tube Molecular Weight Cut Off (MW CO) 30 K membraani. Kontsentreerimiseks tsentrifugeeriti segu 5 minutit, 15° C, 5000 rpm (Hettich Zentrifugen Universal 320R). Suuruslahutav kromatograafia viidi läbi Superdex 200 Increase 10/300 GL kolonniga (Cytiva Life Sciences). Kromatograafia spektrite ja fraktsioonide geelanalüüsi põhjal otsustati, millised fraktsioonid võtta edasiseks tööks.

### **2.2.13 SDS-polüakrüülamiidgeelelektroforees (SDS-PAGE)**

Puhastatud valgud lahutati 10% SDS-polüakrüülamiidgeelil (Schägger, 2006). Valguga fraktsioonidest võeti 12 µL ja segati 4 µL 5x Laemmli puhvriga (Tabel 2). Segusid kuumutati 10 minutit temperatuuril 97 °C. Geelektroforees viidi läbi BioRad Protean Tetra Cell süsteemiga, kasutades 1x katoodi- ja anoodipuhvreid (Tabel 2). Elektroforees toimus pingel 160 V ja 30 minutit. Geel värviti Coomassie sinisega (50% metanool, 10% äädikhape, 100 mM ammoniumatsetaat, Coomassie sinine G250). Geelil kasutati markerina PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Geelil nähtud valgukoguste põhjal otsustati ka, millistes valgufraktsioonides mõõta valgu kontsentratsiooni.

### **2.2.14 Lõikusreaktsioonid**

Ühe lõikusreaktsioonisegu maht oli 30 µL, mis sisaldas 1x lõikuspuhvrit (Tabel 2), DNA restriksiooni kofaktorit S-adenosüül metioniini (SAM, 0,2 mM, välja arvatud juhul, kui testiti SAM-i olulisust), 2 mM ATP-d ja DNA-d (substraadina kasutati genoomset DNA-d erinevates kogustes 300 ng, 80 ng või 16 ng). Genoomset DNA-d eraldati PaW85 metsiktüvest ja ΔRM-I tüvest kasutades GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) vastavalt tootja protokollile. Eraldatud DNA puhtus ja kontsentratsiooni mõõdeti Nanodropiga. Reaktsioonsegusid inkubeeriti 3 H temperatuuril 30 °C. Pool segudest (15 µL) visualiseeriti geelektroforeesiga. Ülejäänud segu jäeti üleöö (30 °C) inkubeerima ja kanti geelile järgmisel päeval.

Osad lõikusreaktsioonid tehti *P. putida* rakulüsaadiga, mis valmistati järgnevalt. Üleöö 5 mL-s LB vedelsöötmes temperatuuril 30 °C kasvanud *P. putida* rakud tsentrifuugiti kokku, 1 minut, 13400 rpm (Eppendorf minispin). Rakud võeti üles 300 µL re-suspensioonpuhvriga A ja sonikeeriti jääs 4 x 5 sekundit korraga. Rakulüsaat tsentrifuugiti 10 minutit, 4 °C, 15000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5424R). Supernatant eraldati lõikusreaktsioonide jaoks.

### **2.2.15 Bioinformaatiline analüüs**

Kirjanduses kirjeldatud RM-I süsteemide esindajate HsdR, HsdM ja HsdS ja *P. putida* RM-I süsteemi valkude järjestusi otsiti ja laaditi alla UniProt andmebaasist. *P. putida* HsdR subühiku võrdlemiseks teiste RM-I esindajate subühikute järjestustega teostati joondamist, kasutades Emboss Needle platvormi. Kasutades UniProt-s tuvastatud järjestusi, koostati Clustal Omega programmiga fülogeneetilised puud.

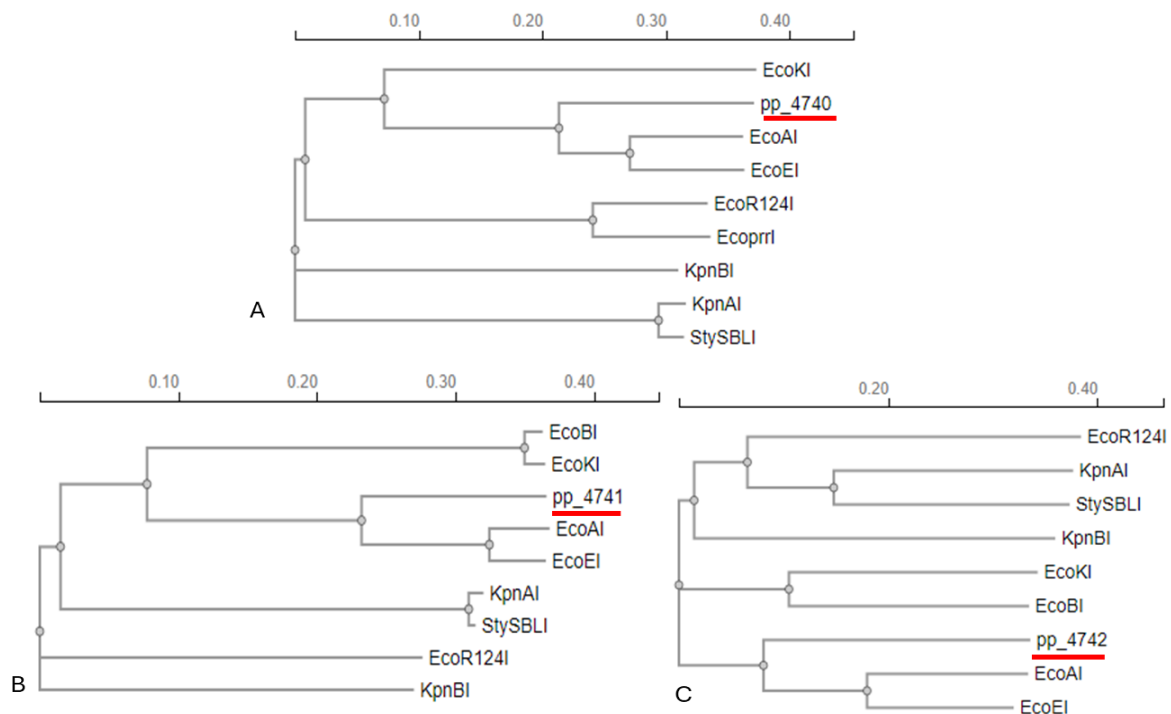
## 2.3 Tulemused

### 2.3.1 *Pseudomonas putida* PaW85 RM-I süsteem kuulub IB alarühma

*P. putida* geenid PP\_4740-4742 kodeerivad ennustatavalt RM tüüp I süsteemi, mille alarühma kuuluvuse kohta infot ei ole. RM-I süsteemid jaotatakse viide alarühma (Tabel 5). Alarühma kuuluvus põhineb aminohapete järjestusel ja subühikute komplementaarsusel alarühmas. Eco lühendiga ensüümikompleksid on eraldatud erinevatest *E. coli* tüvedest. KpnAI ja KpnBI on eraldatud *Klebsiella pneumoniae* tüvedest ja StySBLI on eraldatud *Salmonella enterica* tüvest (Titheradge *et al*, 2001). Kuna kirjandusest on teada, et HsdR ja HsdM järjestused on igas alarühmas konserveerunud (Janscak ja Bickle, 1998), siis seda teadmist kasutades on võimalik tuvastada, mis alarühma kuulub *P. putida* RM-I süsteem. UniProt-is tuvastatud järjestustega tekitasin Clustal Omega programmis fülogeneetilised puud HsdR, HsdM ja HsdS subühikute järjestustele. Kõik *P. putida* RM-I süsteemi valgud klasterdusid alati kokku *E. coli* EcoAI ja EcoEI süsteemide valkudega (Joonis 5 A-C). Need süsteemid kuuluvad RM tüüp I süsteemi IB alatüüpi, seega on selge, et *P. putida* RM-I süsteem kuulub IB alarühma.

**Tabel 5. RM-I süsteemid jagunevad viieks alarühmaks**

Alarühm	Esindaja
IA	EcoBI, EcoKI
IB	EcoAI, EcoEI
IC	EcoR124I, EcoprrI
ID	KpnAI, StySBLI
IE	KpnBI



**Joonis 5. Fülogneetilised puud erinevatele HsdR/M/S valkudele.** A) *P. putida* HsdR subühiku järjestus on tähistatud *hsdR* geeninumbriga pp\_4740. B) *P. putida* HsdM subühiku järjestus on tähistatud *hsdM* geeninumbriga pp\_4741. C) *P. putida* HsdS subühiku järjestus on tähistatud *hsdS* geeninumbriga pp\_4742. Kõikidel puudel on näha, et *P. putida* RM-I valgud hargenevad ühest harust koos EcoAI ja EcoEI-ga, mis kuuluvad IB alarühma.

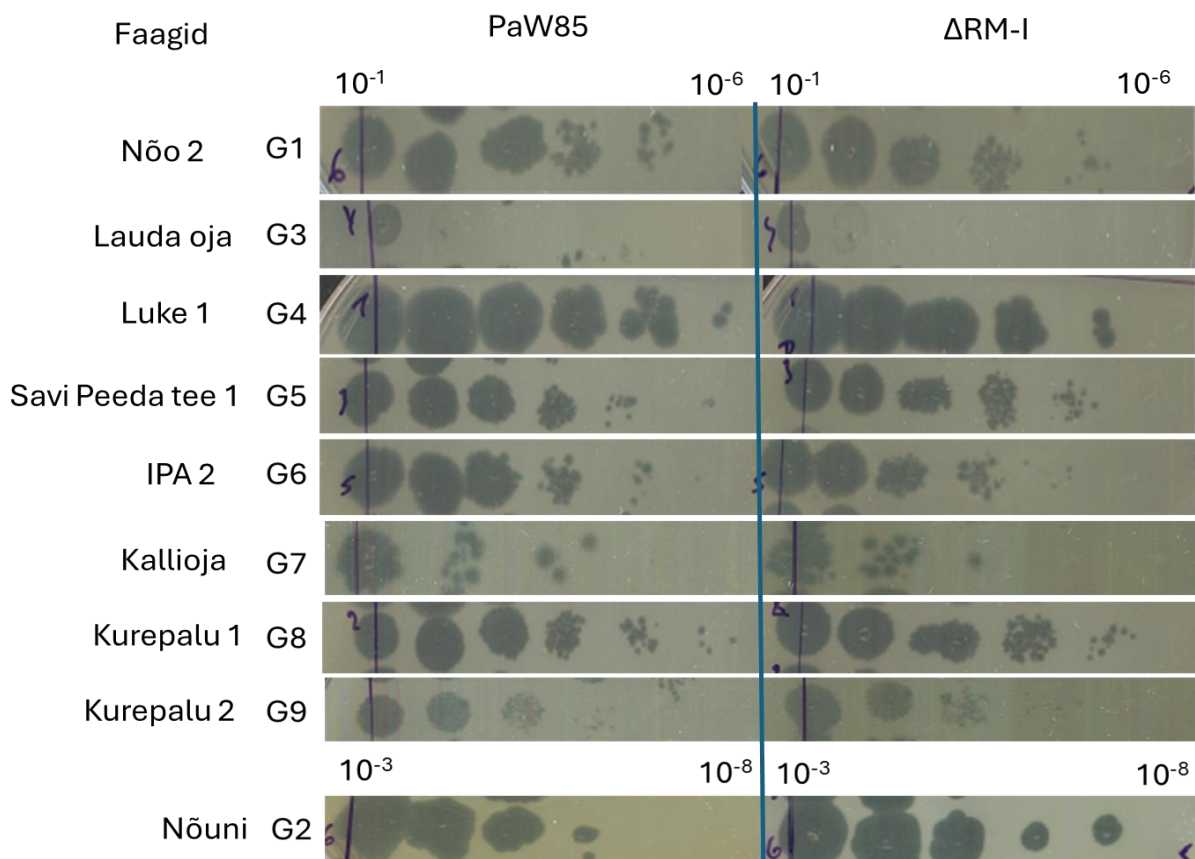
### 2.3.2 *P. putida* HsdR subühiku katalüütilise saidi tuvastamine

Kuna HsdR järjestused on alarühmas konserveerunud, siis peaks IB alarühmas olevate ensüümide järjestuste joondamine näitama, kas *P. putida* HsdR järjestuses on olemas samad aminohapped, mis moodustaksid HsdR subühiku katalüütilise saidi. Uurimistööd on näidanud, et RM-I katalüütiline sait sisaldab 3 aminohapet – aspargiinhapet (D), glutamiinhapet (E) ja lüsiini (K) (Janscak *et al.*, 1999).

*P. putida* HsdR valgu joondamine EcoAI süsteemi HsdR valguga näitas, et need 2 valku on 60,8% identsed (Joonis 6A). Valkude omavahelisel joondusel selgus, et kõik kolm EcoAI katalüütilise tsentri aminohapet on konserveerunud ka *P. putida* HsdR valgus (Joonis 6B). Veel enam, vaadeldes AlphaFold 2 ennustatud *P. putida* HsdR valgu struktuuri mudelit, paigutuvad kolm kirjeldatud katalüütilist aminohapet selgelt üksteise lähedusse, viidates katalüütilise tsentri moodustumisele (Joonis 6C). Kõike seda arvesse võttes võib eeldada, et *P. putida* HsdR valk võib olla aktiivne endonukleas nagu EcoAI.



Enamus faagidega tegin tilkkülvi ühe kuni kolm korda, kuid sama perekonna ja sama faagiliigi erinevate esindajatega katsete arv on märkimisväärselt suurem. Tilkkülve kordasin ka juhul, kui lüüsilahjused valgusid kokku ja tulemust ei saanud korralikult vaadelda. Mitte ühegi faagiga ei suutnud tuvastada korduvaid erinevusi (Joonis 7, toodud üks näide iga faagiperekonna esindajast). Seega näitasid tilkkülvi tulemused, et *P. putida* RM-I süsteem ei kaitse bakterit CEPEST kollektiooni faagide vastu ja süsteemi osalus faagivastases kaitstes on kaheldav.

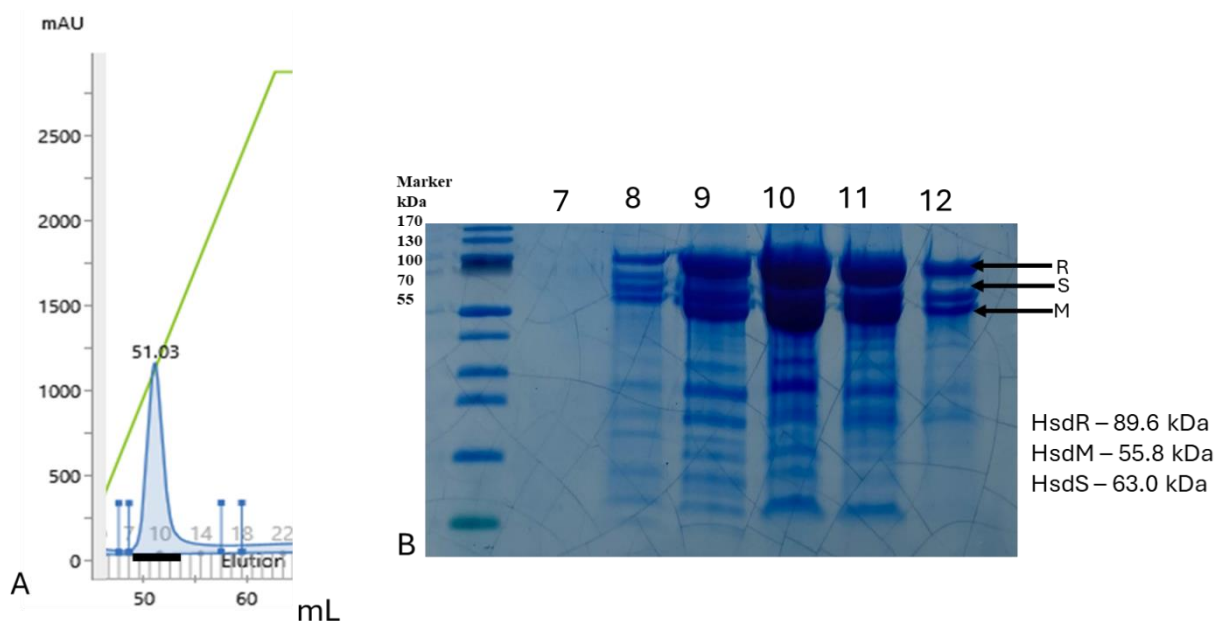


**Joonis 7. 10-kordsete lahjenduste tilkkülvid CEPEST raamatukogu igast faagiperekonnast ühe faagiga PaW85 ja  $\Delta$ RM-I tüve bakterimuru tassidel.** Bakterimurule kanti 1,5  $\mu$ L faagilahjendust. Tasse inkubeeriti 24 tundi temperatuuril 20 °C.

### 2.3.4 RM I valkude puhastamisel moodustub RMS kompleks

Üllatavalt ei suutnud ma tuvastada CEPEST kollektioonist ühtegi faagi, mille vastu RM-I süsteem kaitseks. Et uurida, kas *P. putida* PaW85 HsdRMS süsteemi valgud ikka on aktiivsed (nagu viitas *in silico* analüüs (Joonis 6)), otsustasime puhastada *P. putida* HsdRMS kompleksi ja uurida selle DNA lõikamise aktiivsust *in vitro*. Valkude puhastamiseks märgiti nad His<sub>6</sub>-

afiinsusmärgisega, kloneeriti ekspressioonivektorisse ja ekspresseeriti *E. coli* rakkudes. Pärast ekspressiooni segati HsdR, HsdM ja HsdS valku ekspresseerinud rakud omavahel koheselt kokku, et tagada aktiivse kompleksi moodustumine ja vältida üksikute valkude sadenemist rakkude lõhkumisel rakuvälisesse keskkonda sattudes. Valkude puhastamiseks afiinsuskromatograafiaga kasutati Ni-ga laetud HisTrap kolonni. Graafik, mis jälgib valkude elueerimist imidasoolist sõltuvalt näitab, et valgukompleks eraldus kolonnilt imidasooli kontsentratsiooni tõstmisel (ligikaudu 200 mM imidasooliga, Joonis 8A). Valku sisaldavaid fraktsioone testisin SDS geelil, mis tõestas, et kolonnist puhastusid HsdRMS valgud. Geelil on näha, et valgud olid väga hästi ekspresseerunud ja valgusaagis fraktsioonides on väga kõrge (Joonis 8B).

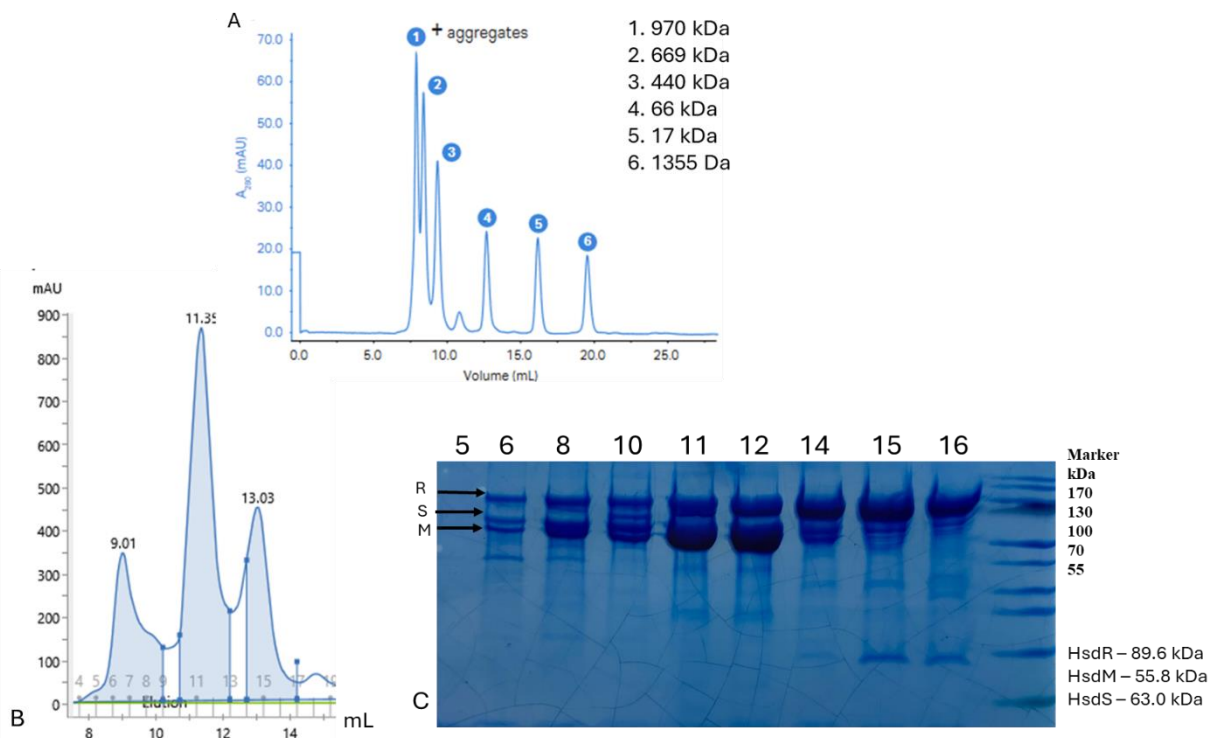


### Joonis 8 *P. putida* PaW85 HsdRMS kompleksi puhastamine afiinsuskromatograafiaga

A) Afiinsuskromatograafia HisTrap HP 1 ml kolonniga. Rohelise joonega on tähistatud imidasooli kontsentratsiooni tõus 0-500 mM, sinise joonega UV-neelduvus lainepikkusel 280 nm. Valguproovi läbivoolukiirus oli 0,5 mL/min. Kromatogrammil oli näha ainult üks piik ja eraldus RMS kompleks. Geelile kantud fraktsioonid 7-12 on tähistatud musta joonega. B) 10% SDS-PAGE afiinsuskromatograafia fraktsioonidele nr. 7-12. HsdR, HsdM ja HsdS asukoht geelil on märgitud paremal vastava geelikoha kõrval, paremal all on HsdRMS valkude suurused, vasakul on toodud suurusmarker.

Et kõik ekspresseeritavad valgud olid märgistatud afiinsuskolonnile seonduva His-märgisega, oli edasi vaja lahutada monomeersed valgud aktiivse stöhhiomeetriaga ( $\text{HsdR}_2\text{M}_2\text{S}_1$ ) ensüümkompleksist. Seetõttu viidi valku sisaldavate fraktsioonidega läbi suuruslahutuskromatograafia.

Suuruslahutuskromatograafiat kasutati, et eraldada valguproovis olevad valgukompleksid vastavalt suurusele. Kõige suuremad valgud läbivad suuruslahutuskolonnist kõige kiiremini, seega väljuvad kolonnist kõige esimesena. Kasutati Superdex 200 Increase 10/300 GL kolonnist, mis on optimeeritud 10-600 kDa komplekside eristamiseks (Joonis 9A). *P. putida* RM-I ensüümikompleksi (HsdR<sub>2</sub>M<sub>2</sub>S<sub>1</sub>) suurus on arvutuslikult ~350 kDa. Suuruslahutuskolonnist peaks eeldatult 350 kDa valk eralduma pärast 10 mL läbivoolu (Joonis 9A), väga varakult kolonnist väljuvad valgud võivad olla agregeerunud.



**Joonis 9. Valkude lahutamine suuruse järgi.** A) Kolonnist Superdex 200 Increase 10/300 GL tootja poolt toodud kaliibergraafik (Cytiva Life Sciences). Sinise joonega on tähistatud UV-neelduvus lainepikkusel 280 nm, numbritega on tähistatud erinevate valkude (suurus märgitud kõrval) eeldatud kolonnist väljumiseks läbijooksutatud puhvri maht (mL). B) Superdex 200 Increase 10/300 GL suuruslahutavkromatograafia HsdRMS kompleksile. Sinise joonega on tähistatud UV-neelduvus lainepikkusel 280 nm. C) 10% SDS-PAGE suuruslahutatud fraktsioonidele. Geelile kanti fraktsioonid 5, 6, 8, 10-12, 14-16 HsdR, HsdM ja HsdS asukoht geelil on märgitud vasakul vastava geelikoha kõrval, paremal on toodud suurusmarker ja HsdRMS valkude suurus.

Suuruslahutuskromatograafia käigus eraldus kolonnist valku kolme erineva lainena (Joonis 9B). Neist esimene eraldus väga varakult, mis viitab, et valgumolekulid võivad olla liitunud oodatumast suuremateks agregaatideks. Kõige rohkem valku eraldus ligikaudu 11 mL läbivoolus, mis vastab kõige enam oodatud elueerumisajale, kuigi ilmus oodatust veidi

hiljem. Viimasena eraldunud valk on arvatavasti mõne valgu monomeer, kuna molekuli suurus on väike, eelduslikult ligikaudu 60 kDa (Joonis 9A ja B)

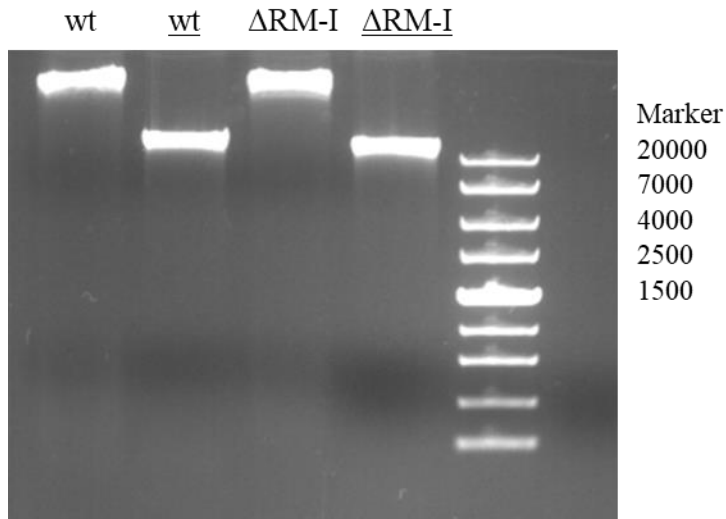
Et tuvastada, millal HsdRMS kompleks eraldus, kanti igast mainitud lainest mõni fraktsioon SDS geelile (Joonis 9C). Õige stöhhiomeetriaga  $R_2M_2S_1$  kompleks on näha fraktsioonis nr 6 (esimene laine) ja arvatavasti ka 11 ja 12, kus suure RMS kompleksi sisalduse tõttu on täpset stöhhiomeetriat keeruline hinnata (Joonis 9C). Geeli analüüsil selgus, et viimasena eraldunud valk oli monomeerne HsdR valk (Joonis 9C), kuigi ennustuslikult oleks oodanud selle valgu eraldumist veidi varem. Seega näib, et läbiviidud suuruslahutuschromatograafia elueerumisvahemikud on tootja poolt toodud teoreetilise graafikuga võrdluses veidi nihkes ja kõik puhastatavad valgud väljuvad kolonnist veidi hiljem (Võrdle joonis 9A ja B).

Valgu kontsentratsiooni mõõdeti fraktsioonides 6, 11 ja 12 ning tulemused olid vastavalt 0,2 mg/mL, 2,4 mg/mL ja 2,6 mg/mL. Et fraktsioon number 6 võib arvatavasti sisaldada agregeerinud valku (väljus kolonnist liiga varakult), kasutati edasises töös fraktsiooni nr. 11.

### **2.3.5 HsdR<sub>2</sub>M<sub>2</sub>S<sub>1</sub> kompleks seob, kuid ei lõika DNA-d**

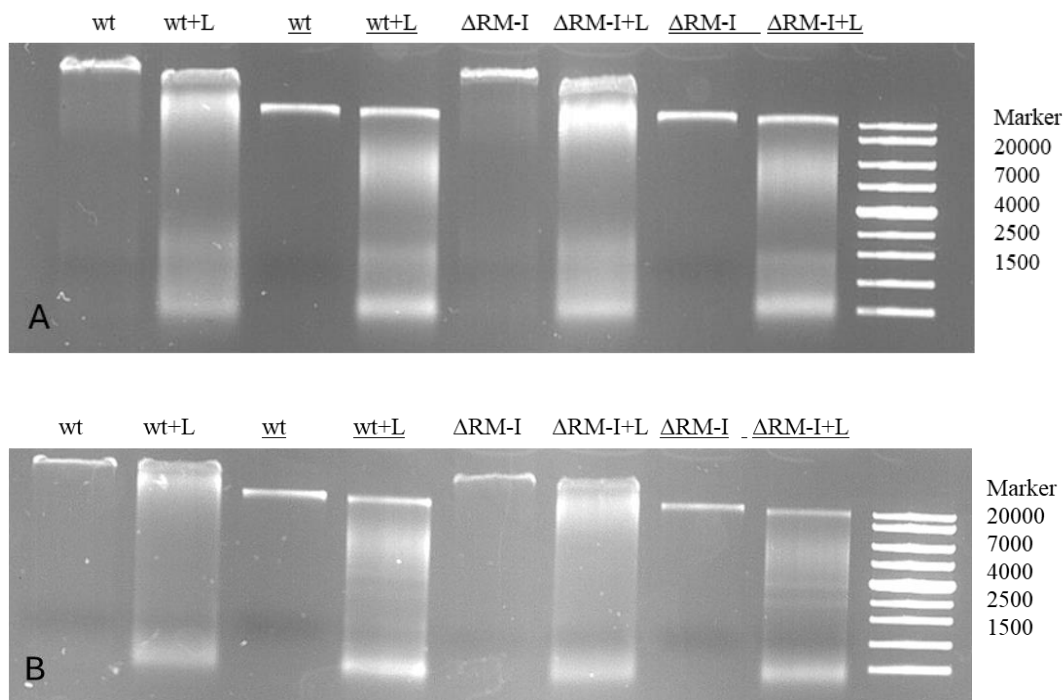
Puhastatud valguga viidi läbi lõikusreaktsioonid, et testida formeerunud RM-I ensüümikompleksi aktiivsust. Et puuduvad andmed HsdS valgu äratundmisjärjestusest, püüti lõikuseks valida potentsiaalselt võimalikult palju äratundmisjärjestusi sisaldav DNA. Seetõttu eraldati lõikusreaktsioonide jaoks PaW85 ja  $\Delta$ RM-I genoomne DNA eeldades, et PaW85 genoom on äratundmissaitide kohtades metüleeritud, samal ajal kui  $\Delta$ RM-I tüve genoom ei ole. Esmastesse reaktsioonidesse lisati 300 ng genoomset DNA-d ning samuti lisati reaktsioonidesse SAM-i, mille kohta on näidatud, et see käitub lõikusreaktsioonis kofaktorina.

Läbiviidud lõikusreaktsioonide analüüsil geelis on näha, et kõikides RMS kompleksiga reaktsioonides liigub DNA geelis aeglasemalt, kui ilma valguta kontrollproovides. See viitab, et RMS kompleks on DNA-le seondunud. DNA koguse vähenemist või väiksemate DNA fragmentide teket aga näha ei ole, mis viitab, et HsdRMS kompleks ei ole suutnud selles katses DNAd lõigata (Joonis 10).



**Joonis 10. Lõikusreaktsioonid S-adenosüülmetsiooni juuresolekul.** HsdRMS kompleksi DNA lõikamist testiti SAM-i juuresolekul (lõppkontsentratsioon 0,2 mM). Lõikusreaktsioonid teostati metsiktüüpi (wt),  $\Delta$ RM-I genoomse DNA-ga (negatiivsete kontrollide proovid on allajoonitud). Negatiivsete kontrollide reaktsioonides kasutati RMS kompleksi asemel valgupuhvrit (re-suspensioon puhver A). Lõikusreaktsioonides kasutati keskmiselt 300 ng genoomset DNA-d. Lõikus toimus temperatuuril 30 °C 3 tundi.

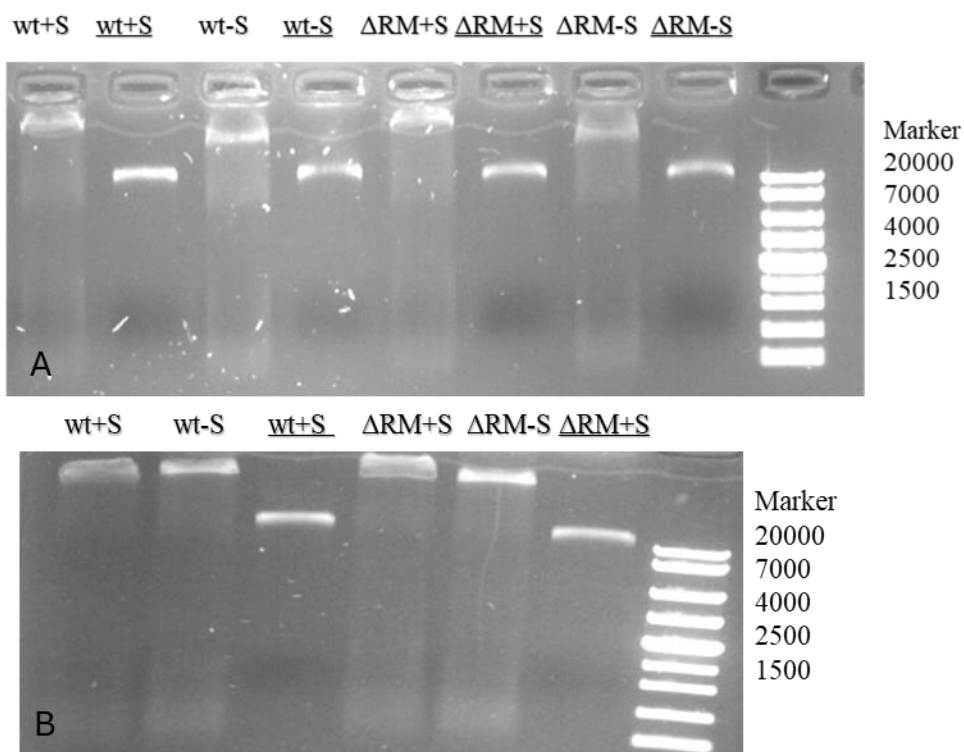
Kuna eelnevas katses HsdRMS valguga aktiivsust ei tuvastatud, siis arvati, et reaktsioonisegust võisid puududa mingid ühendid. Eeldati, et rakulüsaadis võib esineda ühendeid, mida RM-I süsteem oma funktsioneerimiseks vajab. Seetõttu lisasin reaktsioonisegudesse *P. putida* rakulüsaati (5  $\mu$ L). Samuti vähendasin lõikussegudes genoomse DNA kogust (~80 ng). Lõikus viidi läbi üleöö, et välistada DNA lõikuse tuvastamata jätmine liiga lühikese lõikuse reaktsiooniaja tõttu. Lõikuse toimumist analüüsiti nii 3 tunni möödudes (Joonis 11A) kui üleöö (Joonis 11B). Lõikusreaktsioonide analüüs geelil näitab taas valkude seondumist – valku sisaldavad proovid liikusid geelil palju aeglasemalt kui ilma valguta proovid, aga DNA kogus ei vähenenud ka sel korral, seega lõikust ei tuvastatud.



**Joonis 11. HsdRSM kompleksi lõikuse sõltuvus *P. putida* rakulüsaadist.** wt ja  $\Delta$ RM-I genoomse DNA lõikussegudele lisati *P. putida* rakulüsaati (L) (5  $\mu$ L). Negatiivsete kontrollide proovid on allajoonitud. Lõikusreaktsioon toimus temperatuuril A) 3 tundi. B) Üleöö (ligikaudu 18 tundi).

Eelmistes lõikesegudes oli alati reaktsioonisegusse lisatud SAM-i. Kuid see ei pruugi olla mitte ainult HsdR kofaktor vaid ka metüülrühma doonor (Dryden *et al.*, 2001). Välistamaks, et lõikust takistab HsdM metülaasi aktiivsus, mis enne lõikust jõuab DNA metüleerida, testiti, kas SAM-i juuresolek mõjutab HsdRMS kompleksi aktiivsust DNA lagundamisel. Eelnevate katsete põhjal otsustati DNA hulka veelgi vähendada, et välistada võimalus, kus DNA hulk proovides küll aja jooksul väheneb, kuid see jääb märkamata suure koguse lõikamata DNA tõttu. Seekord oli DNA kogus reaktsioonisegudes vaid 16 ng. Ka seekord kontrolliti lõikussegusid nii 3 tunni möödudes (Joonis 12A) kui pärast üleöö inkubatsiooni (Joonis 12B).

Tulemustest on jälle näha valgu seondumist DNA-le. Näib, et HsdRMS kompleks seondub SAM-i juuresolekul paremini nii metsiktüve kui  $\Delta$ RM-I tüve genoomsele DNA-le, kuna SAM-i ja valkudega proovides liigub DNA geelis aeglasemalt kui ilma SAM-ta proovid (Joonis 12A), mis siiski liiguvad aeglasemalt kui vaid valgupuhvriga proovide DNA. Siiski, selgus, et ka sellistes tingimustes ei lagunenu DNA isegi pärast üleöö inkubeerimist (Joonis 12B), ehk SAM ei olnud lõikuse puudumise põhjuseks.



**Joonis 12. HsdRMS kompleksi lõikuse sõltuvus SAMist.** Reaktsioonisegud SAM-ga (+S) ja SAM-ta (-S), metsiktüve (wt) ja  $\Delta$ RM-I tüve ( $\Delta$ RM) genoomsele DNA-le. Negatiivsete kontrollide proovid on allajoonitud. Proove inkubeeriti temperatuuril 3 h (A) või üleöö (B).

Vaatamata erinevate lõikusreaktsiooni tingimuste testimisele ja optimeerimisele ei näinud ma kordagi, et *P. putida* HsdRMS kompleks oleks DNA-d lõiganud. Nendele tulemustele tuginedes võib väita, et puhastatud HsdRMS süsteemi kompleks küll seondub DNA-ga, kuid ei suuda DNA-d lõigata.

## 2.4 Arutelu

Käesoleva töö eesmärk oli uurida, kas *P. putida* RM-I osaleb faagivastases kaitses. *P. putida* geenid *PP\_4740-4742* kodeerivad annotatsiooni kohaselt RM tüüp I süsteemi valke HsdR, HsdM ja HsdS (Joonis 4) ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)).

Selleks, et olla kindel annotatsiooni täpsuses, võrreldi *P. putida* RM-I süsteemi varemkirjeldatud RM-I süsteemidega (Dryden *et al.*, 1997; Janscak *et al.*, 1999; Janscak & Bickle, 1998; Studier & Bandyopadhyay, 1988; Suri *et al.*, 1984). Koostatud fülogeneesipuude alusel selgus, et *P. putida* HsdRMS süsteem kuulub RM-I süsteemide IB alarühma, klasterdudes kokku EcoAI ja EcoEI süsteemidega (Joonis 5).

Vastavalt EcoAI ja *P. putida* RM-I süsteemi HsdR subühikute bioinformaatilisele analüüsile ei näi olevat mingit põhjust arvata, et *P. putida* süsteem ei peaks olema toimiv RM-I süsteem (Joonis 6A). EcoAI ja *P. putida* HsdR subühikute joondamine näitas, et järjestused sisaldavad 60% identseid aminohappeid (Joonis 6B) ning konserveerunud katalüütilised aminohapped EcoAI järjestuses kattuvad *P. putida* HsdR subühiku järjestuses samade aminohapetega ja nende katalüütiliste aminohapete paigutus *P. putida* HsdR subühiku struktuurimudelil jätab mulje funktsionaalsest aktiivtsentrist (Joonis 6C).

### 2.4.1 $\Delta$ RM-I ei mõjuta faagikaitset

Tilkkülvidega testiti läbi suur arv CEPEST kollektiooni *P. putida*'t nakatavaid faage. Võrreldes RM-I deletsioontüve metsiktüüp PaW85 tüvega siis ei õnnestunud tilkkülvides tuvastada märkimisväärsed erinevusi faagikaitsetes (Joonis 7).

See tulemus võib olla tingitud mitmest faktorist. CEPEST kollektiooni faagid on isoleeritud kasutades *P. putida* PaW85 derivaattüve, millel puuduvad 13 toksiin-antitoksiin süsteemi ja neli krüptilist profaagi (Brauer *et al.*, 2024). Selles tüves on aga olemas uuritav RM-I süsteem. Seega ei saa välistada, et RM-I süsteemi suhtes tundlikud faagid on jäänud eraldamata. Nimelt on teada, et mõnede faagide genoomist sünteesitakse antirestriksioonivalke, mis imiteerivad DNA-d ja takistavad HsdRMS kompleksi seondumist faagi äratundmisjärjestusega (Kudryavtseva *et al.*, 2023; Tock & Dryden, 2005).

Varemkirjeldatud RM-I süsteemide tekitatav kaitse on väga tugev (Webb *et al.*, 1996; Loenen *et al.*, 2014), mistõttu tõepoolest võivad olla kollektioonist varasemalt RM-I tundlikud faagid välja jäänud. Tulevikus peaks faage isoleerima RM-I deletsioontüvega ja siis testima CEPEST faage uuesti, et näha, kas see annab uut informatsiooni *P. putida* RM-I süsteemi kohta. Vasu ja Nagaraja arutlevad oma artiklis aga, et kuna RM-I süsteemid on bakterites

väga levinud siis kas nendel süsteemidel on ka mõni muu veel avastamata funktsioon, mis seletaks nende erakordset spetsiifilist seondumist ja varieeruvust. (Vasu & Nagaraja, 2013)

#### **2.4.2 *P. putida* HsdRMS süsteemi valgud moodustavad R<sub>2</sub>M<sub>2</sub>S<sub>1</sub> kompleksi**

Vaatamata *in silico* analüüsi tulemusele (Joonis 6A-C) on võimalik, et kuigi RM-I lookus on *P. putida* genoomis olemas siis rakus ei teki aktiivset endonukleaasina käituvat HsdRMS kompleksi. *P. putida* HsdRMS valkude aktiivsuse testimiseks segati rakukultuuride mahavõtmise etapis valke ekspresseerinud bakterid juba enne rakkude lõhkumist kokku, et minimeerida võimalust, et valgud kompleksiväliselt aktiivsust kaotavad. Seejärel puhastati valgud afiinsuskromatograafiaga ja eraldati vastavalt suurusele suuruslahutavkromatograafiaga. Valgupuhastuse protsessi lõpptulemusena eraldus kolonnist kompleks oodatavast elueerimisajast natuke hiljem kuid, mis vastab enam-vähem oodatud valgu kompleksi suurusele (350 kDa (Joonis 9B) ja stöhhiomeetriale R<sub>2</sub>M<sub>2</sub>S<sub>1</sub> (Joonis 9C).

Samas oli uurimistöid, kus kõigepealt valmistati puhastatud valkudest M<sub>2</sub>S<sub>1</sub> stöhhiomeetriaga kompleks ja siis alles lisati HsdR valku erinevates kontsentratsioonides (Simons & Szczelkun, 2011). Janscak *et al.* eksperimentides oli HsdRMS kompleks stöhhiomeetria 6:2:1 (Janscak *et al.*, 1999). On märkimisväärne, et HsdR valku lisati sellises ülekaalus. On ka teada, et esimene HsdR subühik seondub kompleksiga tugevalt, kuid teine HsdR mitte nii tugevalt, mis viitab kompleksi ebastabiilsusele või see on lihtalt rakusisene kontroll endonukleaasi aktiivse vormi üle (Obarska-Kosinska *et al.*, 2008). Lisaks on näidatud, et *in vivo* on rakkudes alati HsdM valku rohkem kui HsdR valku (Simons & Szczelkun, 2011), kuna enne kui HsdRMS kompleks saab funktsioneerida endonukleaasina, peab metüültransferaas metüleerima peremeesrakus olevad äratundmisjärjestused (Dryden *et al.*, 2001).

#### **2.4.3 R<sub>2</sub>M<sub>2</sub>S<sub>1</sub> kompleks seondub aga ei lõika DNA-d**

Pärast edukat valgupuhastust viidi läbi lõikusreaktsioonid PaW85 ja ΔRM-I genoomse DNA-ga. Geelil oli selgelt näha HsdRMS kompleksi seondumist DNA-ga, sest võrreldes valgupuhvriga DNA proovidega liikusid ensüümikompleksiga DNA proovid tunduvalt aeglasemalt. (Joonis 10, 11 ja 12). Lõikusreaktsioonides testiti *P. putida* rakulüsaadi mõju, vähendati DNA kogust ning teostati lõikusreaktsioone SAM-ga ja ilma SAM-ta. Vaatamata reaktsioonitingimuste optimeerimisele, käesolevas töös tekitatud HsdRMS kompleksiga DNA lõikust ei tuvastatud. Kuid valgukompleksi ja monomeere eraldus suuruslahutuskromatograafias mitmes laines. Käesolevas töös kasutati ainult ühte fraktsiooni

eraldunud kompleksi. Aktiivseid valke ja valgukomplekse võis siiski olla ka teistes fraktsioonides.

Lõikuse puudumisel võib olla erinevaid põhjuseid,

### 1. Teistsugune HsdRMS kompleksi stöhhiomeetria

Tuginedes kirjandusele, oli põhjust eeldada, et ka *P. putida* RM-I süsteemil esineb endonukleas  $R_2M_2S_1$  stöhhiomeetriaga nagu klassikalistel RM-I süsteemidel. Kuid on ka teada, et HsdRMS esineb stöhhiomeetrias  $R_1M_2S_1$ , mis seondub DNA-ga ja translokeerib kuid ei lõika (Janscak *et al.*, 1998; Obarska-Kosinska *et al.*, 2008).

Sarnane tundub olevat efekt ka minu testitud valgukompleksil, kuid valkude stöhhiomeetria ei vasta kindlasti  $R_1M_2S_1$  suhtele, sest nagu on näha SDS-geelile kantud suuruslahutuschromatograafia pildist, on ensüümreaktsioonideks kasutatud fraktsioonis nr. 11 HsdR ja HsdM valku pigem võrdses koguses ja selgelt vähem on HsdS valku.

### 2. HsdS äratundmisjärjestuse puudumine uuritavas DNAs

Äratundmisjärjestuse teadmine aitab kindlasti aru saada, kas lõikus toimus või mitte. (Dreier *et al.*, 1996; Dryden *et al.*, 1997; Janscak *et al.*, 1999). Seega, *P. putida* RM-I HsdS valgu äratundmissaitide tuvastamine aitaks kinnitada lõikusel kasutatud *P. putida* genoomse DNA sobivust restriksioonianalüüsis ning ka võimalikku restriksioonimustrit geelil.

Kuigi tundub, et teostatud lõikusreaktsioonides HsdRMS valgu seondumine DNA-ga võiks viidata HsdS valgu äratundmissaidi olemasolule, on näidatud, et valk seondub DNA-ga ka vastava saidi puudumisel (Powell *et al.*, 1998). Seega ainult seetõttu, et suutsin näha DNA liikuvuse muutust valgugeelil, ei saa veel olla kindel äratundmisjärjestuse olemasolus. Siiski *P. putida* KT2440 (PaW85) genoom on 6,2 Mbp suurune (Nelson *et al.*, 2002; Rosendahl *et al.*, 2020), mis on piisavalt suur, et mõni äratundmisjärjestus võiks olla. Kuna lõikusreaktsioonides kasutati  $\Delta$ RM-I genoomset DNA-d ning kui PaW85 genoomis on äratundmisjärjestused, oleks need  $\Delta$ RM-I genoomis metüleerimata ja eelduste kohaselt peaks HsdRMS kompleks seonduma ning DNA-d ka lõikama.

### 3. DNA lõikus *P. putida* HsdRMS kompleksiga ei toimu temperatuuril 30 °C

Kuna *P. putida*'t kasvatakse laboris üldjuhul temperatuuril 30 °C siis valiti see temperatuur ka lõikusreaktsioonide inkubeerimiseks kuid sellel temperatuuril lõikust ei tuvastatud. Kirjandusest oli võimalik leida, et *E. coli* RM-I ensüümikompleksidega inkubeeriti lõikussegusid temperatuuril 37 °C (Dreier *et al.*, 1996), temperatuuril 25 °C (Dryden *et al.*,

1997) ja toatemperatuuril (Zinkevich *et al.*, 1997). Seega oleks mõtet testida erinevaid temperatuure. Samas võiks arvesse võtta teadmist, et *P. putida* on keskkonnabakter ja on suuteline eksisteerima erinevates keskkonnatingimustel, kaasa arvatud madalamatel temperatuuridel. Sellest võib eeldada, et *P. putida* valgud on võimelised funktsioneerima nii temperatuuril 30 °C kui ka madalamatel temperatuuridel.

## KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eemärk oli uurida, kas *P. putida* RM-I süsteemil on roll faagivastases kaitses, testides konstrueeritud PaW85  $\Delta$ RM-I tüve mõju faagikaitsele. Afiinsus- ja suuruslahutuschromatograafiaga puhastati HsdRMS ensüümikompleksi valgud ja nende valkude aktiivsust testiti *in vitro* lõikusreaktsioonides.

Eksperimentaalse töö tulemusena selgus, et

1. PaW85  $\Delta$ RM-I tüve konstrueerimine õnnestus kuid tilkkülvides  $\Delta$ RM-I tüvega ei täheldatud märkimisväärseid erinevusi võrreldes PaW85 metsiktüvega.
2. HsdRMS süsteemi valkude ekspressioon rakukultuuris andis väga hea saagise ja valgud puhastusid hästi.
3. Suuruslahutuschromatograafiaga lahutati valguproovides õige molekulaarse suurusega ja stöhhioomeetriaga valgukompleks.
4. Lõikusreaktsioonid teostati genoomse DNA-ga ja reaktsioonisegudesse lisati restriksiooniks vajaminevaid kofaktoreid ja ATP-d. Vaatamata lõikusreaktsioonide tingimuste optimeerimisele, DNA lõikust ei tuvastatud.

Saadud tilkkülvi tulemustest võib järeldada, et testitud tingimustes RM-I roll *P. putida* faagivastases kaitses puudub. Lõikusreaktsioonide tulemused olid natuke paremad kuna võrreldes negatiivsete kontrollidega oli näha formeerunud kompleksi seondumist ehk mingi aktiivsus HsdRMS valkudel oli. Selle teadmisega saab juba edasi minna ja võib-olla optimeerida valkude puhastamisprotsessi ja lõikusreaktsioone uute kofaktoritega ning testida kõiki valgukomplekse sisaldanud fraktsioone.

## SUMMARY

Type I restriction-modification systems are complex enzymes and their structures and unique DNA cleavage characteristics have been intensively studied. Despite their complexity and specific DNA binding properties, these enzyme complexes have not found a place in scientists' toolbox. As these systems are found in most bacterial genomes, it may well be that these sophisticated enzyme complexes carry out yet undiscovered functions in bacteria.

The aim of the project was to test whether the type I restriction-modification system in *P. putida* has a role in defending the bacteria against the phages. To test this hypothesis, the PaW85 RM-I deletion strain was constructed and the effect of that deletion strain was tested in phage dilution assays. To test the activity of the HsdRMS proteins, the proteins were purified using the affinity and size exclusion chromatography. The formed protein complex was used in restriction assays.

The results of the project were as follows:

1. The RM-I deletion strain was constructed successfully but no significant differences in phage infectivity were observed in phage dilution assays when comparing the wild-type and the deletion strain.
2. The HsdRMS proteins expressed well and in good quantity in cell culture.
3. The HsdRMS complex of the correct molecular weight and stoichiometry was purified using the affinity and size exclusion chromatography.
4. The restriction assays were conducted using genomic DNA and by adding the ATP and other necessary cofactors required for the restriction activity but DNA cleavage was not observed.

In conclusion, based on the results of the phage dilution assays, the RM-I system does not function as an antiviral defence mechanism in *Pseudomonas putida*. In restriction assays, DNA binding was observed but without knowing the specific recognition sequence it cannot be confirmed whether the binding was specific or non-specific. Further work on this subject could include optimising the protein purification protocol. In restriction assays, using the other eluted fractions containing the protein complexes of interest could be considered.

## **TÄNUSÕNAD**

Soovin tänada oma juhendajaid Andrest ja Hedvigit suurepärase juhendamise ja bakterite hingeelu tutvustamise eest. Tänuõnnad ka Rita Hõrakule, kes nõu ja jõuga aitas, et see töö ikka valmis saaks.

## KASUTATUD KIRJANDUS

Abadjieva, A., Scarlett, G., Janšćák, P., Dutta, C. F., & Firman, K. (2003). Characterization of an EcoR 124I restriction-modification enzyme produced from a deleted form of the DNA-binding subunit, which results in a novel DNA specificity. *Folia Microbiologica*, *48*(3), 319–328. <https://doi.org/10.1007/BF02931361>

Ackermann, H.-W. (2012). Bacteriophage Electron Microscopy. In *Advances in Virus Research* (Vol. 82, pp. 1–32). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394621-8.00017-0>

Aframian, N., & Eldar, A. (2023). Abortive infection antiphage defense systems: Separating mechanism and phenotype. *Trends in Microbiology*, *31*(10), 1003–1012. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2023.05.002>

Atack, J. M., Guo, C., Yang, L., Zhou, Y., & Jennings, M. P. (2020). DNA sequence repeats identify numerous Type I restriction-modification systems that are potential epigenetic regulators controlling phase-variable regulons; phasevarions. *The FASEB Journal*, *34*(1), 1038–1051. <https://doi.org/10.1096/fj.201901536RR>

Bayley, S. A., Duggleby, C. J., Worsey, M. J., Williams, P. A., Hardy, K. G., & Broda, P. (1977). Two modes of loss of the tol function from *Pseudomonas putida* mt-2. *Molecular and General Genetics MGG*, *154*(2), 203–204. <https://doi.org/10.1007/BF00330838>

Bernheim, A., & Sorek, R. (2020). The pan-immune system of bacteria: Antiviral defence as a community resource. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(2), 113–119. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0278-2>

Bianco, P. R., Xu, C., & Chi, M. (2009). Type I restriction endonucleases are true catalytic enzymes. *Nucleic Acids Research*, *37*(10), 3377–3390. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp195>

Blakely, G. W., & Murray, N. E. (2006). Control of the endonuclease activity of type I restriction-modification systems is required to maintain chromosome integrity following homologous recombination. *Molecular Microbiology*, *60*(4), 883–893. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05144.x>

Bower, E. K. M., Cooper, L. P., Roberts, G. A., White, J. H., Luyten, Y., Morgan, R. D., & Dryden, D. T. F. (2018). A model for the evolution of prokaryotic DNA restriction-modification systems based upon the structural malleability of Type I restriction-modification enzymes. *Nucleic Acids Research*, *46*(17), 9067–9080. <https://doi.org/10.1093/nar/gky760>

Brauer, A., Rosendahl, S., Kängsep, A., Lewańczyk, A. C., Rikberg, R., Hõrak, R., & Tamman, H. (2024). *Isolation and characterization of a phage collection against Pseudomonas putida*. <https://doi.org/10.1101/2024.03.26.586772>

Dimitriu, T., Szczelkun, M. D., & Westra, E. R. (2020). Evolutionary Ecology and Interplay of Prokaryotic Innate and Adaptive Immune Systems. *Current Biology*, *30*(19), R1189–R1202. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.08.028>

Dreier, J., MacWilliams, M. P., & Bickle, T. A. (1996). DNA Cleavage by the Type IC Restriction-Modification Enzyme EcoR124II. *Journal of Molecular Biology*, *264*(4), 722–733. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0672>

Dryden, D. T. F., Cooper, L. P., Thorpe, P. H., & Byron, O. (1997). The in Vitro Assembly of the EcoKI Type I DNA Restriction/Modification Enzyme and Its in Vivo Implications. *Biochemistry*, *36*(5), 1065–1076. <https://doi.org/10.1021/bi9619435>

Dryden, D. T. F., Edwardson, J. M., & Henderson, R. M. (2011). DNA translocation by type III restriction enzymes: A comparison of current models of their operation derived from ensemble and single-molecule measurements. *Nucleic Acids Research*, *39*(11), 4525–4531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1285>

Dryden, D. T. F., Noreen E. Murray, D. N. Rao (2001). Nucleoside triphosphate-dependent restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, *29*(18), 3728–3741. <https://doi.org/10.1093/nar/29.18.3728>

Golais, F., Hollý, J., & Vítkovská, J. (2013). Coevolution of bacteria and their viruses. *Folia Microbiologica*, *58*(3), 177–186. <https://doi.org/10.1007/s12223-012-0195-5>

Hacker, J., & Carniel, E. (2001). Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity: A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Reports*, *2*(5), 376–381. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve097>

Hampton, H. G., Watson, B. N. J., & Fineran, P. C. (2020). The arms race between bacteria and their phage foes. *Nature*, *577*(7790), 327–336. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1894-8>

Hanahan, D., & Meselson, M. (1983). [24] Plasmid screening at high colony density. In *Methods in Enzymology* (Vol. 100, pp. 333–342). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(83\)00066-X](https://doi.org/10.1016/0076-6879(83)00066-X)

Hussain, F. A., Dubert, J., Elsherbini, J., Murphy, M., VanInsberghe, D., Arevalo, P., Kauffman, K., Rodino-Janeiro, B. K., Gavin, H., Gomez, A., Lopatina, A., Le Roux, F., & Polz, M. F. (2021). Rapid evolutionary turnover of mobile genetic elements drives bacterial resistance to phages. *Science*, *374*(6566), 488–492. <https://doi.org/10.1126/science.abb1083>

Isaev, A. B., Musharova, O. S., & Severinov, K. V. (2021). Microbial Arsenal of Antiviral Defenses. Part II. *Biochemistry (Moscow)*, *86*(4), 449–470. <https://doi.org/10.1134/S0006297921040064>

Jackson, S. A., McKenzie, R. E., Fagerlund, R. D., Kieper, S. N., Fineran, P. C., & Brouns, S. J. J. (2017). CRISPR-Cas: Adapting to change. *Science*, *356*(6333), eaal5056. <https://doi.org/10.1126/science.aal5056>

Janscak, P., Abadjieva, A., & Firman, K. (1996). The Type I Restriction Endonuclease R.EcoR124I: Over-production and Biochemical Properties. *Journal of Molecular Biology*, *257*(5), 977–991. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0217>

Janscak, P., Dryden, D., Firman, K., (1998). Analysis of the subunit assembly of the typeIC restriction-modification enzyme EcoR124I. *Nucleic Acids Research*, *26*(19), 4439–4445. <https://doi.org/10.1093/nar/26.19.4439>

Janscak, P., Sandmeier, U., & Bickle, T. A. (1999). Single amino acid substitutions in the HsdR subunit of the type IB restriction enzyme EcoAI uncouple the DNA translocation and DNA cleavage activities of the enzyme. *Nucleic Acids Research*, *27*(13), 2638–2643. <https://doi.org/10.1093/nar/27.13.2638>

Janscak, P., & Bickle, T. A. (1998). The DNA recognition subunit of the type IB restriction-modification enzyme EcoAI tolerates circular permutations of its polypeptide chain. *Journal of Molecular Biology*, *284*(4), 937–948. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2250>

Janscak, P., MacWilliams, M. P., Sandmeier, U., Nagaraja, V., & Bickle, T. A. (1999). DNA translocation blockage, a general mechanism of cleavage site selection by type I restriction enzymes. *The EMBO Journal*, *18*(9), 2638–2647. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.9.2638>

Jaryenneh, J., Schoeniger, J. S., & Mageeney, C. M. (2023). Genome sequence and characterization of a novel *Pseudomonas putida* phage, MiCath. *Scientific Reports*, *13*(1), 21834. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48634-z>

Kelly, A., Arrowsmith, T. J., Went, S. C., & Blower, T. R. (2023). Toxin–antitoxin systems as mediators of phage defence and the implications for abortive infection. *Current Opinion in Microbiology*, *73*, 102293. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102293>

Kennaway, C. K., Taylor, J. E. N., Song, ... Dryden, D. T. F. (2012). Structure and operation of the DNA-translocating type I DNA restriction enzymes. *Genes & Development*, *26*(1), 92–104. <https://doi.org/10.1101/gad.179085.111>

Kim, J.-S., DeGiovanni, A., Jancarik, J., Adams, P. D., Yokota, H., Kim, R., & Kim, S.-H. (2005). Crystal structure of DNA sequence specificity subunit of a type I restriction-modification enzyme and its functional implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(9), 3248–3253. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409851102>

Kudryavtseva, A. A., Cséfalvay, E., Gnuchikh, E. Y., Yanovskaya, D. D., Skutel, M. A., Isaev, A. B., Bazhenov, S. V., Utkina, A. A., & Manukhov, I. V. (2023). Broadness and specificity: ArdB, ArdA, and Ocr against various restriction-modification systems. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1133144. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1133144>

Liu, Y.-P., Tang, Q., Zhang, J.-Z., Tian, L.-F., Gao, P., & Yan, X.-X. (2017). Structural basis underlying complex assembly and conformational transition of the type I R-M system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(42), 11151–11156. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711754114>

Loenen, W. A. M. (2003). Tracking EcoKI and DNA fifty years on: A golden story full of surprises. *Nucleic Acids Research*, *31*(24), 7059–7069. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg944>

Loenen, W. A. M., Dryden, D. T. F., Raleigh, E. A., & Wilson, G. G. (2014). Type I restriction enzymes and their relatives. *Nucleic Acids Research*, *42*(1), 20–44. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt847>

- Loenen, W. A. M., Dryden, D. T. F., Raleigh, E. A., Wilson, G. G., & Murray, N. E. (2014). Highlights of the DNA cutters: A short history of the restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, *42*(1), 3–19. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt990>
- Loenen, W. A. M., & Raleigh, E. A. (2014). The other face of restriction: Modification-dependent enzymes. *Nucleic Acids Research*, *42*(1), 56–69. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt747>
- 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>
- 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>
- Martínez-García, E., & De Lorenzo, V. (2011). Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: Analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, *13*(10), 2702–2716. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02538.x>
- Martínez-García, E., Jatsenko, T., Kivisaar, M., & De Lorenzo, V. (2015). Freeing *Pseudomonas putida* KT 2440 of its proviral load strengthens endurance to environmental stresses. *Environmental Microbiology*, *17*(1), 76–90. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12492>
- Martínez-García, E., Nikel, P. I., Aparicio, T., & De Lorenzo, V. (2014). *Pseudomonas* 2.0: Genetic upgrading of *P. putida* KT2440 as an enhanced host for heterologous gene expression. *Microbial Cell Factories*, *13*(1), 159. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0159-3>
- Moura De Sousa, J. A., Pfeifer, E., Touchon, M., & Rocha, E. P. C. (2021). Causes and Consequences of Bacteriophage Diversification via Genetic Exchanges across Lifestyles and Bacterial Taxa. *Molecular Biology and Evolution*, *38*(6), 2497–2512. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab044>
- Murray, N. E. (2000). Type I Restriction Systems: Sophisticated Molecular Machines (a Legacy of Bertani and Weigle). *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *64*(2), 412–434. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.2.412-434.2000>
- Mäntynen, S., Laanto, E., Oksanen, H. M., Poranen, M. M., & Díaz-Muñoz, S. L. (2021). Black box of phage–bacterium interactions: Exploring alternative phage infection strategies. *Open Biology*, *11*(9), 210188. <https://doi.org/10.1098/rsob.210188>
- Naureen, Z., Dautaj, A., Anpilogov, K., Camilleri, G., Dhuli, K., Tanzi, B., Maltese, P. E., Cristofoli, F., De Antoni, L., Beccari, T., Dundar, M., & Bertelli, M. (2020). Bacteriophages presence in nature and their role in the natural selection of bacterial populations. *Acta Bio Medica Atenei Parmensis*, *91*(13-S), e2020024. <https://doi.org/10.23750/abm.v91i13-S.10819>
- Nelson, K. E., Weinl, C., Paulsen, I. T., Dodson, ... Fraser, C. M. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida*

KT2440. *Environmental Microbiology*, 4(12), 799–808. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00366.x>

Ngiam, L., Weynberg, K. D., & Guo, J. (2022). The presence of plasmids in bacterial hosts alters phage isolation and infectivity. *ISME Communications*, 2(1), 75. <https://doi.org/10.1038/s43705-022-00158-9>

Obarska-Kosinska, A., Taylor, J. E. N., Callow, P., Orlowski, J., Bujnicki, J. M., & Kneale, G. G. (2008). HsdR Subunit of the Type I Restriction-Modification Enzyme EcoR124I: Biophysical Characterisation and Structural Modelling. *Journal of Molecular Biology*, 376(2), 438–452. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.11.024>

Oliveira, P. H., Touchon, M., & Rocha, E. P. C. (2014). The interplay of restriction-modification systems with mobile genetic elements and their prokaryotic hosts. *Nucleic Acids Research*, 42(16), 10618–10631. <https://doi.org/10.1093/nar/gku734>

Ongena, V., Briegel, A., & Claessen, D. (2021). Cell wall deficiency as an escape mechanism from phage infection. *Open Biology*, 11(9), 210199. <https://doi.org/10.1098/rsob.210199>

Orzechowska, B., & Mohammed, M. (2019). The War between Bacteria and Bacteriophages. In M. Mishra (Ed.), *Growing and Handling of Bacterial Cultures*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.87247>

Pingoud, A., Fuxreiter, M., Pingoud, V., & Wende, W. (2005). Type II restriction endonucleases: Structure and mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(6), 685–707. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4513-1>

Powell, L. M., Dryden, D. T. F., & Murray, N. E. (1998). Sequence-specific DNA binding by EcoKI, a type IA DNA restriction enzyme. *Journal of Molecular Biology*, 283(5), 963–976. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2143>

Roberts, G. A., Chen, K., Cooper, L. P., White, J. H., Blakely, G. W., & Dryden, D. T. F. (2012). Removal of a frameshift between the hsdM and hsdS genes of the EcoKI Type IA DNA restriction and modification system produces a new type of system and links the different families of Type I systems. *Nucleic Acids Research*, 40(21), 10916–10924. <https://doi.org/10.1093/nar/gks876>

Rocha, E. P. C., & Bikard, D. (2022). Microbial defenses against mobile genetic elements and viruses: Who defends whom from what? *PLOS Biology*, 20(1), e3001514. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001514>

Rosendahl, S., Tamman, H., Brauer, A., Remm, M., & Hörak, R. (2020). Chromosomal toxin-antitoxin systems in *Pseudomonas putida* are rather selfish than beneficial. *Scientific Reports*, 10(1), 9230. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65504-0>

Salmond, G. P. C., & Fineran, P. C. (2015). A century of the phage: Past, present and future. *Nature Reviews Microbiology*, 13(12), 777–786. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3564>

Schägger, H. (2006). Tricine–SDS–PAGE. *Nature Protocols*, 1(1), 16–22. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>

Seidel, R., Bloom, J. G., Van Noort, J., Dutta, C. F., Dekker, N. H., Firman, K., Szczelkun, M. D., & Dekker, C. (2005). Dynamics of initiation, termination and reinitiation of DNA translocation by the motor protein EcoR124I: Reinitiation of DNA translocation by EcoR124I. *The EMBO Journal*, *24*(23), 4188–4197. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600881>

Simons, M., & Szczelkun, M. D. (2011). Recycling of protein subunits during DNA translocation and cleavage by Type I restriction-modification enzymes. *Nucleic Acids Research*, *39*(17), 7656–7666. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr479>

Stern, A., & Sorek, R. (2011). The phage-host arms race: Shaping the evolution of microbes. *BioEssays*, *33*(1), 43–51. <https://doi.org/10.1002/bies.201000071>

Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, *189*(1), 113–130. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2)

Studier, F. W., & Bandyopadhyay, P. K. (1988). Model for how type I restriction enzymes select cleavage sites in DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *85*(13), 4677–4681. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.13.4677>

Suri, B., Shepherd, J. C., & Bickle, T. A. (1984). The EcoA restriction and modification system of *Escherichia coli* 15T-: Enzyme structure and DNA recognition sequence. *The EMBO Journal*, *3*(3), 575–579. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1984.tb01850.x>

Tan, A., Atack, J. M., Jennings, M. P., & Seib, K. L. (2016). The Capricious Nature of Bacterial Pathogens: Phasevarions and Vaccine Development. *Frontiers in Immunology*, *7*.

Tesson, F., & Bernheim, A. (2023). Synergy and regulation of antiphage systems: Toward the existence of a bacterial immune system? *Current Opinion in Microbiology*, *71*, 102238. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102238>

Tesson, F., Hervé, A., Mordret, E., Touchon, M., d'Humières, C., Cury, J., & Bernheim, A. (2022). Systematic and quantitative view of the antiviral arsenal of prokaryotes. *Nature Communications*, *13*(1), 2561. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30269-9>

Titheradge, A. J. B., King, J., Ryu, J., Murray, N. E., (2001). Families of restriction enzymes: An analysis prompted by molecular and genetic data for type I restriction and modification systems. *Nucleic Acids Research*, *29*(20), 4195–4205. <https://doi.org/10.1093/nar/29.20.4195>

Tock, M. R., & Dryden, D. T. (2005). The biology of restriction and anti-restriction. *Current Opinion in Microbiology*, *8*(4), 466–472. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.06.003>

Vasu, K., & Nagaraja, V. (2013). Diverse Functions of Restriction-Modification Systems in Addition to Cellular Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *77*(1), 53–72. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00044-12>

Volke, D. C., Calero, P., & Nikel, P. I. (2020). *Pseudomonas putida*. *Trends in Microbiology*, *28*(6), 512–513. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.02.015>

Webb, J. L., King, G., Ternent, D., Titheradge, A. J., & Murray, N. E. (1996). Restriction by EcoKI is enhanced by co-operative interactions between target sequences and is dependent on DEAD box motifs. *The EMBO Journal*, *15*(8), 2003–2009.

Weimer, A., Kohlstedt, M., Volke, D. C., Nickel, P. I., & Wittmann, C. (2020). Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida*: Advances and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(18), 7745–7766. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10811-9>

Wong, S. M., & Mekalanos, J. J. (2000). Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(18), 10191–10196. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.18.10191>

Youell, J., Firman, K., (2012). Mechanistic insight into Type I restriction endonucleases. *Frontiers in Bioscience*, *17*(7), 2122. <https://doi.org/10.2741/4041>

Zhu, J., Gao, Y., Wang, Y., Zhan, Q., Feng, H., Luo, X., Li, P., Liu, S., Hou, H., & Gao, P. (2022). Molecular insights into DNA recognition and methylation by non-canonical type I restriction-modification systems. *Nature Communications*, *13*(1), 6391. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34085-z>

Zinkevich, V. (1997). The HsdR subunit of R.EcoR124II: Cloning and over-expression of the gene and unexpected properties of the subunit. *Nucleic Acids Research*, *25*(3), 503–511. <https://doi.org/10.1093/nar/25.3.503>

## **KASUTATUD VEEBIAADDRESSID**

*Pseudomonas putida* database, [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)

Clustal Omega, <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>

UniProt, <https://www.uniprot.org/>

Emboss Needle, [https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/psa/emboss\\_needle](https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/psa/emboss_needle)

## LISAD

### LISA 1. Töös testitud faagid

<b>Grupp 1</b>	<b>Grupp 2</b>	<b>Grupp 3</b>	<b>Grupp 4</b>	<b>Grupp 5</b>	<b>Grupp 5</b>
Amme 3	Käpa 1	Aura	Emajõgi	Savi Peedu tee 1	Hammaste 2
Käpa 4	Vasula oja	Laeva 1	Luke 2	Erra M1	Bot aed
Nõo 2	Tõrve	Amme 1	Luke 1	Erra S1	Kompost 1
Kassivere 1	Rõõmu 1	Lauda oja		Vända F2	Suur Kambja 3
Rõõmu 2	Haage	Kakumetsa 1		Kaagvere	Viia 1
	Keeri	Suur Kambja 4		Pori 2	
	Eino 1			Päidla	
	Känksi			Mõra jõgi	
	Kriimani			Konnatiik	
	Issaku			Ihaste	
	IPA 1			Laguja oja 5	
	Nõuni			Villemi	
	Keila jõgi			Luutsna jõgi 6	
	Vasula järv			Kakumetsa 2	
<b>Grupp 6</b>	<b>Grupp 7</b>	<b>Grupp 8</b>	<b>Grupp 9</b>		
Luke 3	Kompost 2	Kurepalu 1	Kurepalu 2		
IPA 2	Kallioja		Pori 3		
Luke sopp 3			Mudajõgi		

## LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kristin Tamm

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) minu loodud teose „Pseudomonas putida tüüp I restriksioon-modifikatsioon süsteemi eksperimentaalne valideerimine faagivastases kaitstes“, mille juhendajaks on Andres Ainelo ja kaasjuhendajaks Hedvig Tamman, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Kristin Tamm

30.05.2024