

7. Závěr

1. Vytvořili jsme podmínky pro dělení a identifikaci všech tří podjednotek Hsd R-M enzymů Typu I EcoKI a EcoR124I na dvourozměrném gelu. Optimalizovali jsme podmínky dělení těchto enzymů v nerovnovážném gradientu pH (NEPHGE) v prvním rozměru 2D-PAGE na pozadí celkových proteinů buněčného extraktu. Tento systém nám v budoucnu umožní provést detailnější studie exprese a postranlační modifikace R-M enzymů Typu I v závislosti na různých fyziologických podmínkách a v souvislosti celkové buněčné proteinové exprese.
2. Využití tohoto systému v primárních pokusech odhalilo existenci dvou isoform podjednotky HsdR systému EcoKI lišících se velikostí náboje. Usoudili jsme, že jedna z těchto isoform by mohla být posttranslačně modifikována.
3. Sledování fosforylace zástupců tří skupin R-M enzymů Typu I EcoKI (skupina IA), EcoAI (skupina IB) a EcoR124I (skupina IC), na základě imunoprecipitačních analys kmenů *E. coli* produkujících tyto enzymy, prokázalo fosforylaci enzymu EcoKI na podjednotce HsdR. Podjednotky HsdM ani HsdS enzymu EcoKI fosforylovány nejsou. Žádná z podjednotek Hsd systémů EcoAI a EcoR124I také fosforylována nebyla.
4. Podjednotka HsdR enzymu EcoKI je fosforylována *in vivo* pokud je součástí komplexní REasy EcoKI. Samotná HsdR, bez současné exprese HsdM a HsdS, kdy se netvoří funkční enzym, fosforylována *in vivo* není. Za stejných podmínek dochází také k regulaci restriční aktivity EcoKI proteolysou HsdR (Makovets et al. 1999). Domníváme se, že fosforylace-defosforylace podjednotky HsdR, která je součástí funkční REasy EcoKI, může ovlivňovat citlivost této podjednotky k proteolyse proteasou ClpXP. Studium fosforylace REas EcoKI, jejichž podjednotky HsdR budou obsahovat mutace zabraňující enzymu translokovat, štěpit nebo methylovat DNA, by nám mělo pomoci lépe porozumět regulaci restriční aktivity R-M enzymů Typu I a spojitosti fosforylace a proteolysy HsdR, která se této regulace účastní.
5. Lokalizovali jsme proteinkinasu specifickou vůči HsdR EcoKI v cytoplasmatické frakci *E. coli*. To je opět ve shodě s regulací restriční aktivity EcoKI na základě proteolysy podjednotek HsdR, které jsou proteolysovány proteasou ClpXP za podmínek RA přednostně v cytoplasmatické frakci, zatímco HsdR membránové frakce proteolysovány nejsou (Doronina a Murray 2001). Vytvořili jsme podmínky pro monitorování této proteinkinasové aktivity, což nám do budoucna pomůže purifikovat a studovat

příslušnou proteinkinasu. Tento přístup nám umožní lépe porozumět fosforylaci REasy EcoKI v buňce.

6. Fosforylace podjednotky HsdR enzymu EcoKI je omezena výhradně na aminokyselinu threonin. Kombinace 2D-NEPHGE a hmotnostní spektroskopie by nám měla v budoucnu umožnit identifikaci a lokalizaci fosforylovaného threoninu v molekule podjednotky HsdR.