

# 1. Úvod

Fenomén restrikce a modifikace byl poprvé popsán v 50. letech minulého století. Studium restrikčních enzymů umožňujících manipulaci s molekulami DNA a konstrukci rekombinantních molekul dalo vznik novému směru molekulární biologie - genovému inženýrství.

Právě intenzivní studium restrikčních enzymů označovaných dnes jako Typ I umožnilo objev restrikčních endonukleas, které jsou označovány jako Typ II a v současné době běžně používané v praxi.

V nedávné době došlo v souvislosti s postupujícím sekvenováním bakteriálních genomů, které odhalilo široké rozšíření těchto restrikčních enzymů mezi mikroorganismy v přírodě, k oživení zájmu o restrikční enzymy Typu I.

Restrikčně modifikační (R-M) enzymy mají důležitou funkci při ochraně bakteriálních buněk před vstupem cizorodé DNA v procesech konjugace, transfekce a transformace. Proto má studium těchto enzymů i značný praktický význam pro techniky genového inženýrství, neboť efektivnost těchto procesů může být výrazně snížena, jestliže použitá DNA není vhodně modifikována. Tato vlastnost vedoucí k zabránění vstupu cizí nemodifikované DNA do buňky může být naopak využita v boji s fágovou lyzí kmenů producentů.

Dále se tyto enzymy zřejmě účastní široké škály molekulárních procesů probíhajících v buňce jako je replikace, genetická rekombinace a reparace DNA.

R-M enzymy Typu I jsou multifunkční multipodjednotkové komplexy tvořené třemi různými podjednotkami, HsdS (podjednotka zodpovědná za vazbu DNA), HsdM (methylační podjednotka) a HsdR (podjednotka zodpovědná za restrikci DNA), v poměru R2:M2:S1. Tento heteromerní komplex funguje jako methyltransferasa (MTasa), DNA-dependentní ATPasa, translokasa a restrikční endonukleasa (REasa). Samotné podjednotky HsdM a HsdS mohou v poměru M2:S1 tvořit nezávislou MTasu.

Tyto enzymy musí mít regulační mechanismus, který po zavedení genů *hsd* do nového hostitele umožní metylaci chromosomální DNA ještě před ustavením restrikční aktivity enzymu a zabráni tak její restrikci. Ačkoli gen pro podjednotku HsdR (*hsdR*) je přepisován z jiného promotoru než geny pro podjednotky HsdM a HsdS (*hsdM*, *hsdS*), bylo prokázáno, že k regulaci restrikční a modifikační aktivity těchto enzymů nedochází na úrovni transkripce. Tato dočasná kontrola se uskutečňuje na posttranslační úrovni prostřednictvím kontroly

sestavování podjednotek do funkčního enzymu nebo proteolysou enzymu již sestaveného, přičemž významnou úlohu při této regulaci restriktivně modifikačních aktivit hraje pravděpodobně také buněčná lokalizace R-M enzymů Typu I a rozdíly v jejich membránové topologii. Bylo prokázáno, že tyto kontrolní mechanismy se uplatňují u zástupců jednotlivých podskupin R-M enzymů Typu I v různé míře a zároveň nelze vyloučit jejich kombinaci a kooperaci nebo dokonce existenci dalších regulačních mechanismů.

Také tato disertační práce se zabývá studiem regulace aktivity restriktivně modifikačních enzymů Typu I v bakteriální buňce, přičemž využívá metody dvourozměrné elektroforesy, která vedle možnosti studia exprese R-M enzymů Typu I v celé jejich komplexitě, umožňuje také detekci posttranslačních modifikací, jež se regulace restriktivní aktivity R-M enzymů Typu I mohou účastnit. Na základě výsledků analýs R-M enzymů Typu I pomocí dvourozměrné elektroforesy byla dále u zástupců tří různých podskupin R-M enzymů Typu I studována fosforylace, která je významnou posttranslační modifikací účastnící se regulace proteinů jak eukaryontních tak i prokaryontních organismů.