

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie

**Studium mutací v rozpoznávací podjednotce HsdS
restrikčně-modifikačního systému EcoR124I**

Alena Guzanová

Praha, 2007

„Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli.“

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Marie Weiserová CSc.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce, a uvedla všechnu použitou literaturu.

Ráda bych touto cestou poděkovala RNDr. Marii Weiserové CSc. za odborné vedení a čas, který mi věnovala při vypracování této diplomové práce. Zároveň bych chtěla poděkovat Ing. Evě Šišákové za cenné rady a pomoc při práci, a také celému kolektivu Laboratoře molekulární genetiky bakterií MBÚ.

Diplomová práce vznikla v letech 2005/2007 za finanční podpory grantů: GAČR č. 204/07/0325. a č.204/03/1011.

Analysis of the mutations in the HsdS recognition subunit of the R-M system EcoR124I

Type I restriction-modification (R-M) systems are hetero-oligomeric enzyme complexes, consisted of three subunits: HsdR (restriction), HsdM (modification) and HsdS (specificity). The HsdS subunit recognizes specific target sequences on the DNA and is responsible for specificity of the enzyme complex. HsdS and HsdM together form a methylase (MTase) and are necessary for methyltransferase activity and the third subunit, HsdR, is required for DNA restriction. The HsdS subunit comprises three conserved domains and two target recognition domains (TRD). The conserved domains are probably responsible for binding with other subunits (HsdM, HsdR).

The aim of this work was to analyse the effect of the point mutations in the central and C-terminal conserved regions of HsdS on restriction and modification phenotypes of EcoR124I enzyme *in vivo* and *in vitro*. The mutants were analysed for restriction and modification phenotypes. Classically, mutations within the *hsdS* gene of a Type I R-M enzyme produce an $r^- m^-$ phenotype due to the loss of DNA-binding properties. The substitutions Lys¹⁸⁴Asn and Lys³⁸⁴Asn mutations analysed here were identified as “non-classical” because they expressed an $r^- m^+$ phenotype, which is thought to be due to alterations to protein-protein interactions.

Mutant MTase (K384N) was purified and mixed with wt HsdR to reconstitute the EcoR124I endonuclease *in vitro*. Cleavage assay proved an $r^- m^+$ phenotype in agreement with the *in vivo* test. These results implicate that the point mutations in the central and C-terminal conserved regions of the HsdS subunit can alter ability of HsdS or MTase to bind to HsdR subunit, which shows the importance of the conserved regions for intersubunit interactions. This work is a useful background for further mutagenic analysis in an attempt to identify specific residues that are involved in HsdS-HsdM and MTase-HsdR interactions.

Klíčová slova: Restrikčně-modifikační enzymy, rozpoznávací podjednotka HsdS, bodová mutace, methylasa, interakce protein-protein

Keywords: Restriction-modifikacion enzymes, HsdS – the recognition subunit, point mutation, methylase, protein-protein interactions

1. ÚVOD	1
2.PŘEHLED LITERATURY	2
2.1. Historie	2
2.2. Restrikčně-modifikační enzymy	3
2.2.1. Restrikčně-modifikační systémy Typu I	5
2.2.1.1. Skupina IA	6
2.2.1.2. Skupina IB	7
2.2.1.3. Skupina IC	7
2.2.1.4. Skupina ID	7
2.2.1.5. Skupina IE	8
2.2.2. Restrikčně-modifikační systémy Typu II	8
2.2.3. Restrikčně-modifikační systémy Typu III.....	9
2.2.4. Restrikčně-modifikační systémy Typu IV	9
2.3. Restrikčně-modifikační systémy Typu I	10
2.3.1. Mechanismus restrikčně-modifikační reakce enzymů Typu I	10
2.3.2. Translokace a štěpení DNA R-M enzymy Typu I	11
2.3.3. Struktura rozpoznávacího místa.....	13
2.4. Regulace funkce R-M enzymů Typu I.....	14
2.4.1. Regulace neprobíhá na úrovni transkripce a translace	14
2.4.2. Vliv koncentrace podjednotek na funkci komplexního enzymu	15
2.4.3. Lokalizace restrikčně-modifikačních enzymů v bakteriální buňce ..	16
2.4.4. Regulace proteolysou podjednotky HsdR	17
2.5. Popis podjednotek R-M enzymů Typu I	17
2.5.1. Podjednotka HsdM a methyltransferasa.....	17
2.5.2. Podjednotka HsdR	18
2.5.3. Podjednotka HsdS	18
3. MATERIÁL A METODY	21
3.1. Bakteriální kmeny, plasmidy a bakteriofágy.....	21
3.1.1. Bakteriální kmeny a plasmidy.....	21
3.1.2. Bakteriofágy	22
3.2. Kultivační půdy	23
3.3. Antibiotika.....	23

3.4. Pufry, roztoky a gely	24
3.5. Chemikálie	28
3.6. Přístroje a pomůcky	29
3.6.1. Přístroje.....	29
3.6.2. Pomůcky.....	29
3.7. Metody	30
3.7.1. Kultivace bakterií.....	30
3.7.2. Transformace.....	30
3.7.2.1. Příprava kompetentních buněk.....	30
3.7.2.2. Transformace.....	31
3.7.3. Metody použité při práci s fágy.....	31
3.7.3.1. Příprava fágových lyzátů.....	31
3.7.3.2. Stanovení titru fága.....	31
3.7.4. Testování restrikčně-modifikačního(R-M) fenotypu.....	32
3.7.4.1. Stanovení restrikčního fenotypu	32
3.7.4.2. Stanovení modifikačního fenotypu.....	32
3.7.5. Práce s plasmidovou DNA.....	34
3.7.5.1. Isolace plasmidové DNA z <i>E. coli</i>	34
3.7.5.2 Elektroforesa plasmidové DNA v agarosovém gelu.....	34
3.7.6. Elektroforesa proteinů v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE)	35
3.7.7. Expres podjednotek HsdR, HsdM a HsdS.....	35
3.7.8. Purifikace proteinů.....	36
3.7.8.1. Příprava buněčného extraktu.....	36
3.7.8.2. Purifikace methylas	36
3.7.8.3. Purifikace podjednotky HsdR	38
3.7.9. Biochemická charakterizace purifikovaných enzymů	39
3.7.9.1. Restrikční aktivita <i>in vitro</i> sestavených endonukleas.....	39
3.7.9.2. DNA methylace <i>in vitro</i>	39
4. VÝSLEDKY	40
4.1. Příprava analyzovaných klonů	40
4.1.1. Transformace mutantních plasmidů do JM109(DE3)/pKF650	40
4.2. Testování restrikčního a modifikačního fenotypu	40
4.3. Příprava mutantních methylas	44

4.3.1. Transformace mutantních plasmidů do JM109(DE3)/pAC15M	44
4.3.2. Kontrola R-M fenotypu u transformantů	44
4.4. Kontrola indukované exprese genů <i>hsdS</i> a <i>hdsM</i>	45
4.5. Purifikace methylas	46
4.6. Purifikace podjednotky HsdR	48
4.7. Biochemická charakterizace mutantní formy MTasy	48
4.7.1. Methylační aktivita <i>in vitro</i>	48
4.7.2. Restrikce <i>in vitro</i>	49
5. DISKUSE	51
6. SOUHRN	56
7. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	57

Seznam zkratek :

AdoMet	S-adenosylmethionin
Ap	ampicilin
Ap ^r	resistentní k ampicilinu
Asn	asparagin
ATP	adenosintrifosfát
BFM	bromfenolová modř
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiotreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EtBr	ethydium bromid
IPTG	isopropyl- β - D- thiogalaktosid
kb	kilobáse
kDa	kilodalton
LB médium	Luria-Bertani médium
Lys	lysin
ocDNA	open circle DNA
OD ₆₀₀	optická hustota při vlnové délce 600nm
PAGE	polyakrylamidový gel
pb	pár basí
PMSF	fenylmethansulfonyl fluorid
PFU	jednotka tvořící plak
RE	restrikční endonukleasa
R-M	restrikčně-modifikační
rpm	počet otáček za minutu
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza s dodecylsulfátem sodným
TAE	tris-acetátový elektroforetický pufr
TBE	tris-borátový elektroforetický pufr
Tc ^r	resistentní k tetracyklinu
TE	tris-EDTA pufr
TEMED	N, N, N', N' - tetramethylendiamin
Tris	tris (hydroxymethyl) aminoethan
Tris-HCl	tris (hydroxymethyl) aminoethan hydrochlorid
wt	standardní genotyp

1. ÚVOD

K rozvoji molekulární biologie významně přispěly poznatky z padesátých let minulého století týkající se restrikce a modifikace. Objevem restrikčních enzymů, které napomohly ke genové manipulaci, byl nastartován vývoj genového inženýrství. Musíme si uvědomit, že právě díky restrikčním enzymům Typu I došlo k objevu, dnes běžně v praxi používaných, restrikčních enzymů Typu II. I když je jim věnována velká pozornost, studie se nadále intenzivně věnují restrikčním enzymům Typu I. Tyto enzymy se zřejmě účastní široké škály molekulárních procesů probíhajících v buňce jako je replikace, genetická rekombinace, reparace DNA při jejich poškozeních, i když jejich účast v uváděných procesech nebyla přímo prokázána.

Restrikčně modifikační systémy 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 modifikovaná.

Nemalý význam také spočívá v tom, že restrikční enzymy Typu I patří ke skupině enzymů rozpoznávající DNA, a proto jsou vhodným modelem ke studiu vzájemných interakci protein-DNA a protein-protein, čímž se zabývá i tato práce.

Cílem této diplomové práce je :

- Testování restrikčně-modifikačního fenotypu mutací v rozpoznávací podjednotce HsdS komplementační analýzou
- Příprava vybraných mutantních enzymů a jejich funkční analýza
- Srovnáním fenotypového projevu s výsledky biochemické analýzy *in vitro* identifikovat významné aminokyselinové zbytky zapojené v interakci podjednotek

2. PŘEHLED LITERATURY

2.1. Historie

První zmínky o změně hostitelského spektra fága v závislosti na hostiteli spadají do počátku padesátých let minulého století. Vědci pozorovali jev, kdy fágy pomnožené na jednom kmeni jsou schopny jej infikovat, ale na jiném kmeni se úspěšnost infekce výrazně snižuje. Fágy tedy nesou určitou nedědičnou značku, kterou získaly od kmene, na kterém byly pomnožené a mohou ji ztrácet nebo získávat novou na jiném kmeni téhož druhu. Tento jev byl nazván jako hostitelem indukovaná modifikace (Luria, 1953).

Bertani a Weigle sledovali růst fágů (P2 a λ) na různých hostitelích a zjistili, že fág λ , jehož přirozeným hostitelem je *E.coli* se s různou schopností rozmnožuje na kmenech blízce si příbuzných. Schopnost fága růst na *E.coli* C po růstu na *E.coli* K-12 byla mnohem menší, asi 2×10^{-4} . Fág pomnožený na *E.coli* K-12 roste na *E.coli* K-12 se stejnou efektivitou, než na jiných kmenech. Tyto vlastnosti nebyly dědičné a ztrácely se po pomnožení na jiném hostiteli. Znamenalo to, že nedocházelo ke genetické změně bakteriofága, ale tuto změnu vyvolala hostitelská buňka (Bertani a Weigle, 1953).

Podobné pokusy byly prováděny i na kmenech *Shigella dysenteriae* (Luria, 1953) a vedly ke stejným závěrům jako předchozí pokusy.

Teprve v šedesátých letech minulého století se pomocí molekulárních experimentů podařilo objasnit základy vzájemného působení bakteriální buňky a fága. Byly položeny základy restrikce, modifikace a prokázáno, že probíhá na úrovni DNA. Je to právě DNA bakteriofága, která je kmenově specificky značena hostitelskou buňkou. Dojde-li k replikaci v novém hostiteli tuto modifikaci ztrácí (Arber a Dussoix, 1962).

Modifikace tedy chrání vlastní DNA proti endonukleaze (restrikčnímu enzymu), který štěpí vstupující cizí DNA do buňky. Restrikce a modifikace představují obranný systém bakteriální buňky (Arber, 1969).

V sedmdesátých letech pak bylo prokázáno, že methylační enzym je DNA methyltransferasa, která methyluje adenin nebo cytosin v rámci rozpoznávacího úseku DNA (Smith et al., 1972). Jestliže není úsek methylován, dochází ke štěpení

DNA endonukleasou. Je to důmyslný systém chránící vlastní hostitelskou DNA před restrikcí pomocí methylace adeninových a cytosinových zbytků a zároveň ochrana před vstupem cizorodé DNA.

2.2 Restrikčně- modifikační enzymy

Restrikční endonukleasy jsou kmenově specifické enzymy, které štěpí cizí DNA po vstupu do bakteriální buňky. Nachází se v řadě bakteriálních kmenech jak ve formě produktů genů chromosomální, tak i plasmidové DNA.

Restrikčnímu enzymu odpovídá DNA methylasa, která modifikuje buněčnou DNA tím, že přenáší methyl z S-adenosylmethioninu (Burckhardt et al.) na adenin nebo cytosin v místech cílové rozpoznávací sekvence. Takto je chráněna DNA buňky proti vlastní endonuklease.

R-M systémy se původně dělily do dvou systémů podle složitosti struktury a požadavku kofaktorů k reakci (Boyer, 1971). V současnosti se dělí na čtyři základní typy: I, II, III, IV podle enzymové struktury, symetrie rozpoznávacího místa, místa štěpení, reakčního mechanismu a kofaktorů požadovaného v reakci (Tab.1) (Roberts et al., 2003).

Pro značení různých R-M systémů byla navržena následující nomenklatura. První písmeno R nebo M označuje typ enzymu – endonukleasu (REasa) nebo methylasu (MTasa). Druhé písmeno rod mikroorganismu, dvě následující druh a poslední písmeno pak označuje kmen. V roce 2003 prošla nomenklatura úpravou (Roberts et al., 2003).

Tab. 1: Základní charakteristiky R-M enzymů (Sistla a Rao, 2004)

	Typ I	Typ II	Typ III	Typ IV
Struktura proteinu	tři různé podjednotky	jednoduchá-dva samostatné proteiny	dvě rozdílné podjednotky	dvě rozdílné podjednotky
Enzymová aktivita	endonukleasová methyltransferasová ATPasová	endonukleasová nebo methyltransferasová	endonukleasová methyltransferasová ATPasová	endonukleasová GTPasová
Kofaktory pro restrikci	AdoMet, ATP, Mg ²⁺	Mg ²⁺	ATP, Mg ²⁺ (AdoMet)	GTP, Mg ²⁺
Kofaktory pro metylaci	AdoMet, Mg ²⁺	AdoMet	AdoMet, Mg ²⁺	_____
Rozpoznávací místo	asymetrické, dvě části	dvojnásobná symetrie	asymetrické	dvě části, methylované
Místo štěpení	až 1000pb od rozpoznávacího místa	v rozpoznávacím místě	25-27pb od rozpoznávacího místa	30pb od rozpoznávacího místa
DNA translokace	Ano	Ne	Ano	Ano

2.2.1. Restričně-modifikační systémy Typu I

Typ I R-M systém se skládá ze tří podjednotek, které tvoří složitý enzymový komplex mající tyto funkce: endonukleasovou, methylasovou, ATPasovou a topoisomerasovou (Murray, 2000). Pro methyltransferasovou aktivitu je nutný kofaktor AdoMet jako methylový donor, endonukleasová aktivita vyžaduje ATP, AdoMet a Mg^{2+} ionty.

Pro buňku mající R-M systémy Typu I je charakteristická vlastnost, že při hladovění na methionin nedegradují svojí vlastní DNA. Tato vlastnost je dána tím, že restriční aktivita těchto enzymů je striktně závislá na přítomnosti AdoMet. Za stejných podmínek buňka nesoucí enzymy Typu II nebo III nepřežije, neboť tyto enzymy začnou štěpit DNA hostitele. Je to způsobeno tím, že tyto enzymy nevyžadují k restrikci přítomnost AdoMet (Lark a Arber, 1970).

Enzymy Typu I rozeznávají asymetrickou sekvenci složenou ze dvou úseků. První je tvořen 3-4 páry bází, druhý 4-5 páry bází a jsou odděleny nespécifickým mezerníkem tvořeným z 6-8 páry bází. V této sekvenci je DNA methylována v pozici N-6 na adenosylovém zbytku v obou částech rozpoznávané sekvence (Nagaraja et al., 1985b). Restrikce DNA probíhá mimo rozpoznávací sekvenci náhodně v místech vzdálených až 4000 pb (Seidel et al., 2004). Štěpení DNA je doprovázeno hydrolyzou ATP, která však probíhá i po ukončení štěpení (Yuan et al., 1972). Molekula enzymu se účastní štěpení pouze jedenkrát.

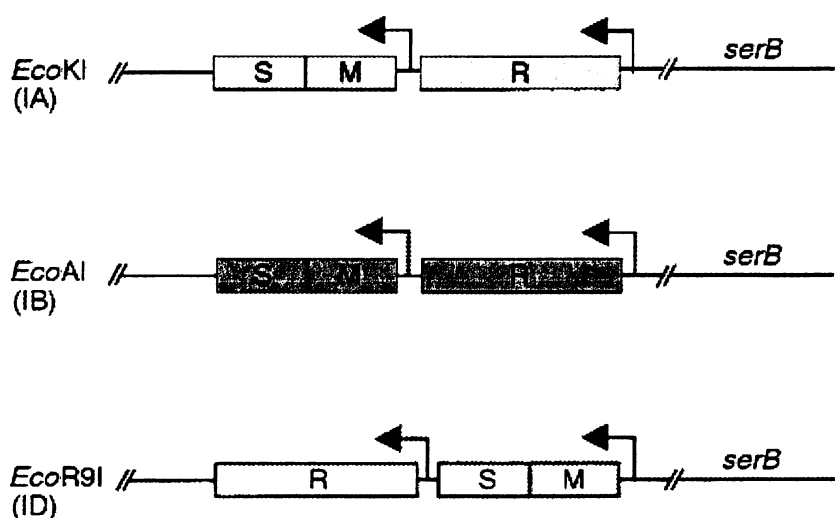
Enzym Typu I je složen ze tří podjednotek HsdR, HsdM a HsdS, které jsou kódované geny *hsdR*, *hsdM* a *hsdS* (Arber, 1969) (Bickle a Krüger, 1993). Symbol *hsd* (*h*ost *s*pecificity for *D*N*A*) používáme obecně pro geny, které kódují restriční a modifikační funkce (Linn a Arber, 1968). Bylo prokázáno, že produkty všech tří genů jsou nezbytné pro restrikci, zatímco pro modifikaci (methylaci) jsou nutné pouze produkty genů *hsdS* a *hsdM* (Hubacek a Glover, 1970).

Gen *hsdR* má svůj vlastní promotor (P_{Res}) a geny *hsdM* a *hsdS* mají společný promotor (P_{Mod}) (Loenen et al., 1987). U podskupin IA a IB je pořadí *hsd* genů: *R, M, S* (Suri a Bickle, 1985), u podskupin IC a ID je pořadí následující: *M, S, R* (Sharp et al., 1992) (Obr.1).

Podjednotka HsdS rozpoznává specifické vazebné místo na DNA, HsdM podjednotka je zodpovědná za methylaci a HsdR za endonukleasovou, ATPasovou a DNA translokační aktivitu (Murray, 2000). Tyto podjednotky mohou tvořit dva typy

komplexů. Komplex, jehož stechiometrie je M_2S_1 , je tvořen dvěma podjednotkami HsdM a jednou HsdS má pouze methylační funkci, komplex $R_2M_2S_1$ má jak methylační tak i endonukleasovou aktivitu (Dryden et al., 1997).

Dělení R-M systémů Typu I na základě komplementačních testů, hybridizace genů *hsd*, sérologických testů a porovnáním aminokyselinových sekvencí poskytlo pět skupin: IA, IB, IC (Price et al., 1987), ID (Titheradge et al., 1996) a IE (Chin et al., 2004). Zástupci jednotlivých skupin se obecně značně shodují v sekvenci HsdR a HsdM podjednotek, ale liší se v HsdS podjednotce (Wilson a Murray, 1991).



Obr.1: Genetická charakteristika zástupců Typu I R-M enzymů (Murray, 2000)

2.2.1.1. Skupina IA

Do této skupiny patří R-M systémy kmenů *E.coli* K, B, D (EcoKI, EcoBI, EcoDI) a systémy StySBI a SPI (Fuller-Pace et al., 1984). Na základě podobnosti restriktivně-modifikačních systémů *Salmonely* a *Escherichia coli* by se dalo předpokládat, že mají společného předchůdce, z něhož se rekombinací mezi geny *hsdS* vyvinuly R-M systémy, které se vyznačují odlišnou specifitou (Gough a Murray, 1983). Nejintenzivněji prostudované jsou restriktivní enzymy EcoKI a EcoBI.

2.2.1.2. Skupina IB

Hlavními zástupci skupiny IB jsou enzymy EcoAI a EcoEI. Systém EcoAI byl nalezen u kmene *E. coli* 15 T⁻. Na základě homologie s geny *hsdA* byly v kmenu *E. coli* nalezeny geny příbuzné, které byly pojmenovány *hsdE* (Fuller-Pace et al., 1985). Organizace těchto systémů je velmi podobná EcoKI. Rozdíly se projevily hlavně ve velikosti podjednotek. Produkt genu *hsdR* je u obou skupin největší. Naproti tomu u EcoKI (skupina IA) je nejmenší produkt genu *hsdS* a u EcoAI (IB) je to produkt genu *hsdM*. Rozdíly jsou i v mechanismu modifikace DNA. Enzym EcoAI na rozdíl od EcoKI je schopen účinně methylovat nemodifikovanou DNA na obou vláknech. Tato reakce vyžaduje ATP, zatímco méně účinná methylace EcoKI je přítomností ATP inhibována (Suri a Bickle, 1985).

Třetím zástupcem skupiny IB je R-M systém nalezený u kmene *Citrobacter freundii* a označený CfrI (Daniel et al., 1988) a StySKI v *Salmonella enterica* serovar *kaduna* (Thorpe et al., 1997).

2.2.1.3. Skupina IC

Do skupiny IC jsou zařazeny systémy EcoR124I a EcoR124II (Firman et al., 1983), které byly nalezeny na plasmidech R124 a R124/3, EcoDXX1 na pDXX a EcoprrI, který je kódován chromosomálními geny.

Rozpoznávací sekvence systémů EcoR124I a EcoR124II je totožná, liší se však délkou mezerníku. U EcoR124I je mezerník složen ze šesti nukleotidů u EcoR124II ze sedmi nukleotidů (Price et al., 1987). Při porovnání primární struktury genu *hsdS* bylo zjištěno, že 12 pb dlouhý úsek ve středu genu *hsdS* má systém EcoR124I dvakrát a u systému EcoR124II je třikrát. To způsobuje v primární struktuře produktu genu *hsdS* navíc 4 aminokyseliny, což představuje v α -helikální konfiguraci rozsah 0,6 nm, který zřejmě zodpovídá za 1pb v mezerníku rozpoznávací sekvence (Price et al., 1989).

2.2.1.4. Skupina ID

K této skupině patří poměrně nedávno nalezené systémy StySBLI u rodu *Salmonella enterica* serovar *blegdam*, KpnAI u rodu *Klebsiella pneumoniae* a EcoR9I

nalezený u *Escherichia coli* (Titheradge et al., 1996). Skupina ID je velmi podobná systému EcoR124I a EcoDXXI Typu IC .

Hlavní rozdíl mezi skupinami IC a ID je v délce mezerníku rozpoznávací sekvence. U enzymů Typu IC jsou adenosylové zbytky, které jsou substrátem pro metylaci, odděleny 7-8 nukleotidy, u enzymů skupiny ID jen 6 nukleotidy (Titheradge et al., 2001)

2.2.1.5. Skupina IE

Skupina IE zatím zahrnuje jen systém KpnBI z rodu *Klebsiella pneumoniae* (Chin et al., 2004)

2.2.2. Restriktivně-modifikační systémy Typu II

Mezi tyto systémy patří velké množství dobře známých enzymů, které se běžně využívají v molekulární biologii při genovém klonování. Jejich výhoda spočívá ve struktuře enzymu, kdy endonukleasa a methylasa jsou kódované oddělenými geny řízenými vlastními promotory a tedy působí nezávisle na sobě. Restriktivní enzym potřebuje ke své činnosti kofaktor Mg^{2+} a je funkční ve formě homodimeru . U podskupin IIB a IIG restriktasa vyžaduje i AdoMet (Roberts et al., 2003). K štěpení DNA nepotřebují ATP a dochází k němu v rozpoznávací sekvenci. Methylasa rozpoznává stejnou sekvenci bází jako restriktasa. Funkční formou methylasy je monomer. V prostředí s Mg^{2+} a AdoMet methyluje adeniny (N6) a cytosiny (na C5 nebo N4) přítomné v rozpoznávací sekvenci (Bickle a Krüger, 1993). Methylace je středově symetrická. Na každém vlákně nemodifikované rozpoznávací sekvence je methylována vždy jedna báze.

Restriktivně- modifikační systémy Typu II se člení podle typu štěpené sekvence nebo struktuře vlastního enzymu do 11 podskupin (Roberts et al., 2003).

2.2.3. Restričně-modifikační systémy Typu III

EcoP1 a EcoP15 nalezené v *E. coli* (Hadi et al.1983), HinfIII v *Haemophilus influenzae* (Arber and Dussoix, 1962; Su et al., 1999), StyLTI v *Salmonella enteritica* serovar *typhimurium* (Dartois et al., 1993) a zástupce popsány u gram-pozitivních bakterií LlaFI v *Lactococcus lactis* (Su et al., 1999) jsou řazeny do systému R-M III.

Enzymy Typu III jsou složeny ze dvou podjednotek, které jsou produkty genů *res* a *mod* mající jeden promotor stojící před genem *mod*. Podjednotka Mod je zodpovědná za rozpoznání specifické sekvence a za metylaci jednoho vlákna DNA na N6 adeninu. Aktivní methylasa je ve formě dimeru (Bourniquel a Bickle, 2002). Mod podjednotka pracuje nezávisle na Res podjednotce. Zatímco štěpení DNA vyžaduje spolupráci Res a Mod podjednotky (Bourniquel a Bickle, 2002; Colson et al., 1965). Model štěpení DNA enzymy Typu III je podobný jako u enzymů Typu I (Bourniquel a Bickle, 2002). Štěpení DNA vyžaduje spolupráci dvou opačně orientovaných molekul enzymů (Res)₂(Mod)₂, z nichž každý se naváže na jedno rozpoznávací místo na DNA. Poté dochází k protahování DNA skrze svoji strukturu a vzniku smyček až do okamžiku, kdy se enzymy setkají (Janscak et al., 2001). V místě kolize dojde ke štěpení, jehož produktem jsou dvě molekuly DNA, z nichž každá obsahuje jedno rozpoznávací místo. Restrikce probíhá 25-27 basí za rozpoznávacím místem (Wilson a Murray, 1991). Restriční enzym vyžaduje pro svoji aktivní funkci kofaktory ATP a Mg²⁺, methylační enzym jen AdoMet (Meisel et al., 1995).

2.2.4. Restričně-modifikační systémy Typu IV

Mezi nejznámější patří tyto enzymy EcoKMcrBC, EcoKMcrA, EcoKMrr nalezené v *Escherichia coli* K12. Jedná se systémy neklasické, na metylaci závislé restriční systémy. Systém EcoKMcrBC byl velmi dobře prostudován. Tento systém štěpí pouze methylované, hydroxymethylované a glukosyl-methylované báse (Roberts et al., 2003). Nacházíme zde dva typy genů *mcrC* a *mcrB*. Produktem genu *mcrC* je protein McrC, zodpovědný za restriční funkci (Pieper et al., 1999). Genu *mcrB* to jsou produkty McrB_L (53kDa) a McrB_S (34kDa) obsahují doménu pro vazbu GTP. Aktivní enzym obsahuje všechny tři proteiny. Enzym EcoKMcrBC rozpoznává dva dinukleotidy v podobě RmC (R je purin a C je methylovaný cytosin - m4C nebo

m5C), které jsou oddělené mezeríkem o délce 40 - 3000 basí. Na každý z obou dinukleotidů se naváže jeden enzym EcoKMcrBC, který za současné hydrolysy GTP translokují DNA. Ke štěpení dochází po srážce dvou enzymů, přibližně 30 pb od jednoho z rozpoznávaných dinukleotidů (Dryden et al., 2001).

2.3. Restričně-modifikační systémy Typu I

2.3.1. Mechanismus restričně-modifikační reakce enzymů Typu I

Mechanismus účinku R-M systému Typu I byl nejvíce sledován *in vitro* u systémů EcoKI a EcoR124I.

Mechanismus restriční aktivity je rozdělen do několika dílčích kroků. Tento proces vyžaduje ATP pro vazbu enzymu na DNA, hydrolyzu ATP pro translokaci DNA enzymem a Mg^{2+} pro štěpení DNA. AdoMet je potřebný v počátečním stádiu reakce jako allosterický efektor, přeměňující enzym na aktivní formu schopnou vazby na jakoukoliv DNA (modifikovaná, nemodifikovaná nebo heteroduplexní) dokonce bez ohledu na přítomnost rozpoznávacího místa. (Hadi a Yuan, 1974) Pokud je rozpoznávací místo přítomné na DNA, jeho stav rozhodne o tom jaká enzymatická aktivita se bude exprimovat. Tyto první kroky reakce jsou společné pro restriční i modifikační aktivitu. Restriční enzym štěpí nemodifikovanou dvouvláknovou DNA.

Pro methylační funkci je nezbytně nutná jen přítomnost AdoMet, Mg^{2+} , ATP pouze stimuluje účinek enzymu. V přítomnosti těchto kofaktorů působí tento třípodjednotkový enzym jako modifikační methylasa, která methyloje jeden adenin na každém vlákně nemodifikované rozpoznávací sekvence. Pokud je rozpoznávací místo hemimethylované uplatňuje se MTasa i v prostředí s ATP a k restrikci nedochází (Burckhardt et al., 1981a; Suri a Bickle, 1985).

2.3.2. Translokace a štěpení DNA R-M enzymy Typu I

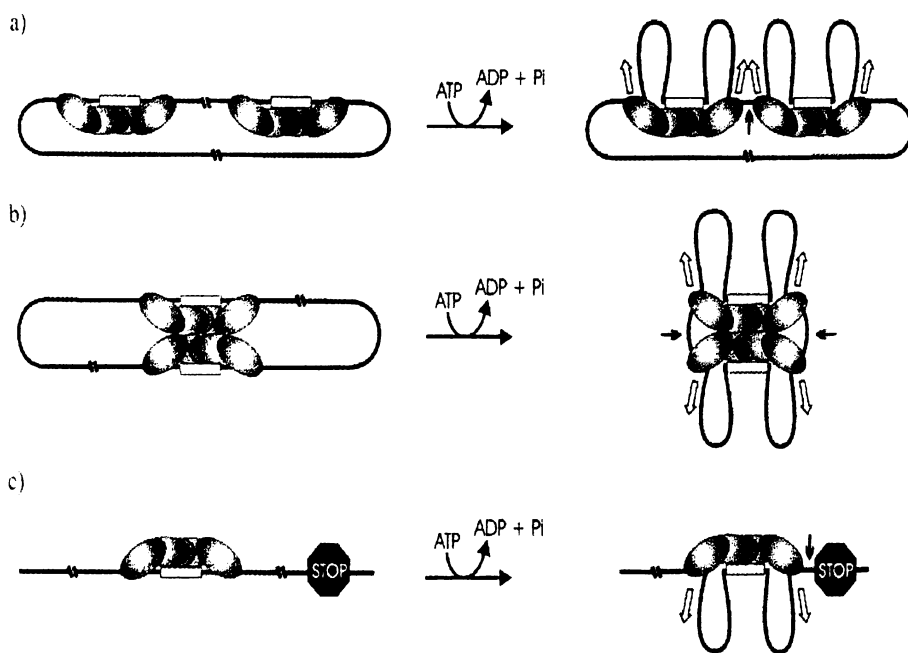
Jeden z prvních mechanismů translokace DNA byl navržen Yuanem (Yuan et al., 1980). Tento mechanismus předpokládá dvě vazebná místa na DNA a jeho podstata je založena na tom, že v přítomnosti ATP po předchozím navázání aktivovaného enzymového komplexu na nemodifikované místo sK, dojde ke konformační změně enzymu. DNA je protahována skrze enzym za současné hydrolýzy ATP. Vznikající smyčky DNA byly pozorovány v elektronovém mikroskopu (Yuan, 1981).

Kompletní enzym EcoR124I se stechiometrií $R_2M_2S_1$ translokují DNA rychlostí 1000 pb/sec, enzym s pouze jednou podjednotkou HsdR ($R_1M_2S_1$) rychlostí 550 pb/sec, což značí, že obě podjednotky HsdR translokují DNA nezávisle na sobě (Dryden, 2004; Seidel et al., 2004). Každá podjednotka HsdR protahuje DNA z jiné strany (Firman a Szczelkun, 2000).

Ke štěpení DNA dochází na základě (i) kolize dvou translokujících enzymů (Studier a Bandyopadhyay, 1988), přičemž nezáleží na vzájemné orientaci rozpoznávacích míst, na něž se enzymy váží (Dreier et al., 1996, b), (i) stérické zábrany na DNA např. „Holliday junction“, která zastaví translokaci (Janscak et al., 1999).

Kolizní mechanismus (Obr.2.a) předpokládá, že na DNA jsou navázány dva enzymy k rozdílným nemethylovaným místům. Enzymy na těchto místech zůstávají navázány za současného protahování molekuly DNA enzymem a hydrolýzy ATP. To způsobuje vznik vysoce stočených smyček DNA. Vlivem protahování DNA se molekuly enzymu přibližují k sobě a v místě kontaktu dojde ke štěpení.

Pomocí mikroskopické metody AFM („atomic force microscopy“) bylo pozorováno že v nepřítomnosti ATP dochází k navázání dvou molekul enzymu EcoKI k nemethylované DNA a molekula tak vytváří dimer (Obr. 2.b). Tento model je srovnatelný s „kolizním“ modelem, ale nevysvětluje jak dochází ke štěpení DNA pouze s jedním rozpoznávacím místem. To vysvětluje až další model, kdy ke štěpení dochází je-li translokace zastavena (blokována) stérickou zábranou např. „Holliday junction“ (Obr. 2 c). Tento model je v současné době nejpravděpodobnější (Janscak et al., 1999).



Obr.2: Schematické znázornění restriční reakce enzymy Typu I (komplex pěti podjednotek- R₂M₂S₁) (Dryden et al., 2001).

Směr translokace DNA je znázorněn pomocí šipek, místo štěpení je značeno větší šipkou, vazebná místa na DNA jsou znázorněny pomocí bílých obdélníků.

2.3.3. Struktura rozpoznávacího místa

Rozpoznávací místo(sK) R-M enzymů Typu I (Tab.2) má asymetrickou strukturu na rozdíl od rotačně symetrických rozpoznávacích míst u enzymů Typu II. Je složeno ze dvou krátkých 3-4 a 4-5 pb specifických sekvencí, které jsou odděleny nespecifickou sekvencí dlouhou 6-8 nukleotidů. Přítomnost mezerníku způsobuje, že obě specifické sekvence jsou na stejné straně dvouvláknové DNA (Ravetch et al., 1978) a to ve dvou po sobě jdoucích žlábkách. Je velmi pravděpodobné, že enzym se váže na DNA na jedné straně dvouvláknové struktury a ke kontaktu DNA-enzym dochází ve dvou sousedních větších žlábkách (Nagaraja et al., 1985a). Podél menšího (vnitřního) žlábků v DNA struktuře na dvě konstantní domény sekvence sK se váže podjednotka HsdS. Tato vazba je nestabilní a nezávisí na methylovaném stavu místa. Po navázání AdoMet na HsdM podjednotku dojde ke konformační změně enzymu a podjednotka HsdM použije methylové skupiny na AdoMet jako sondu ke zjištění přítomnosti methylovaných bazí ve vnějším žlábků DNA. Pokud je dané místo sK modifikované (oba řetězce methylované) podjednotky HsdM nevstoupí do vnějšího žlábků z důvodu sterické zábrany, která je dána dvěma methylovanými adeniny. Enzym tak zůstane v tak zvané otevřené konformaci a disociuje z rozpoznávacího místa. V případě heteroduplexní DNA (jedno vlákno je methylováno) se podjednotka HsdM váže do vnějšího žlábků s nemodifikovanou doménou místa sK. Enzym zaujme částečně otevřenou konformaci a po interakci s ATP dojde k methylaci. Pokud je rozpoznávací místo nemodifikované, dojde k navázání obou podjednotek HsdM do vnějšího žlábků nemethylovaných doménách. Enzym je v uzavřené konformaci, tím se navzájem přiblíží podjednotky HsdR a dojde k vytvoření funkčního restričního místa, které je schopné translokovat DNA. Předpokládá se, že v této konfiguraci podjednotka HsdR brání podjednotce HsdM katalyzovat methylaci.

Tab. 2: Sekvence rozpoznávacích míst R-M enzymů Typu I (Titheradge et al., 2001)

IA

EcoKI	5' AAG N ₆ GTGC 3'
Eco	5' TGA N ₈ TGCT 3'
StySPI	5' AAC N ₆ GTRC 3'
StyLTIII	5' GAG N ₆ RTAYG 3'
EcoDI	5' TTA N ₇ GTCY 3'

IB

EcoAI	5' GAG N ₇ GTCA 3'
EcoEI	5' GAG N ₇ ATGC 3'
CfrAI	5' GCA N ₈ GTGG 3'

IC

EcoR124I	5' GAA N ₆ RTCG 3'
EcoR124II	5' GAA N ₇ RTCG 3'
EcoDXXI	5' TCA N ₇ RTTC 3'
EcoprrI	5' CCA N ₇ RTGC 3'

ID

StySBLI	5' CGA N ₆ TACC 3'
---------	-------------------------------

IE

KpnBI	5' CAAA N ₆ RTCA 3'
-------	--------------------------------

Y-pyrimidin, R-purin, N-libovolná báze

2.4. Regulace funkce R-M enzymů Typu I

2.4.1. Regulace neprobíhá na úrovni transkripce a translace

Restrikční versus modifikační funkce R-M systémů Typu I není regulována na úrovni transkripce ani translace, ačkoli jsou geny pro podjednotky HsdM a HsdS, tvořící funkční methyltransferasu, přepisovány z jiného promotoru než gen pro podjednotku HsdR, zodpovídající za restrikci (Kulik a Bickle, 1996; Loenen et al., 1987; Prakash-Cheng et al., 1993).

Restrikční aktivita ale regulována je, neboť po vnesení genů *hsd* systému EcoKI do nové buňky dochází k opoždění restriční funkce za modifikační o několik generací, což je pravděpodobně doba potřebná k tomu, aby byla veškerá rozpoznávací místa na bakteriálním chromosomu methylována (Prakash-Cheng a Ryu, 1993).

2.4. 2. Vliv koncentrace podjednotek na funkci komplexního enzymu

Výsledky biochemické analýzy R-M enzymů Typu I ukázaly, že tyto enzymy mohou mít za různých podmínek různé poměry podjednotek : $R_1M_1S_1$; $R_1M_2S_1$ nebo $R_2M_4S_2$ u endonukleasy EcoBI (Eskin a Linn, 1972) a $R_2M_2S_1$ u endonukleasy EcoKI (Meselson et al., 1972). Methylasa EcoKI byla purifikována ve složení M_2S_1 nebo M_1S_1 (Dryden et al., 1993), zatímco methylasa EcoR124I jen ve stabilní stechiometrii M_2S_1 . Tyto výsledky naznačují, že aktivita enzymu by mohla být dána stupněm multimerizace komplexu. Práce s teplotně-senzitivními mutacemi v genu *hsdS* systému EcoKI také demonstrovaly vztah mezi restriční aktivitou a hladinou podjednotek v buňce (Weiserova et al., 1993; Weiserova et al., 1994) .

Ukazuje se, že právě způsob sestavování podjednotek do funkčního enzymu může kontrolovat aktivitu restriční endonukleasy Typu I *in vivo* (Dryden et al., 1997). Endonucleasa EcoKI tvoří stabilní komplex $R_2M_2S_1$, zatímco nezávislá methylasa M_2S_1 je komplex relativně slabý, který snadno disociuje na neaktivní komplex M_1S_1 a volnou podjednotku HsdM . Komplex může vázat podjednotku HsdR a vytvořit neaktivní komplex $R_1M_1S_1$. Předpokládá se, že většina HsdR podjednotek může být vázána v nefunkčním komplexu a tím ochrání chromosom buňky při genetickém přenosu tohoto systému do nového hostitele (Dryden et al., 1993).

Purifikovaná endonucleasa EcoR124I byla detekována jako směs dvou forem - $R_2M_2S_1$ a $R_1M_2S_1$. Jedině komplex $R_2M_2S_1$ je funkční, avšak je relativně slabý a při koncentracích předpokládaných *in vivo* snadno disociuje na neaktivní formu $R_1M_2S_1$ a volnou podjednotku HsdR (Janscak et al., 1998). Sestavování methylasy a endonukleasy může podobně jako u EcoKI představovat mechanismus jak regulovat obě funkce, aby methylace vždy předcházela restrikci. Jako první se v buňce sestavuje MTasa (M_2S_1), nebo se může vytvářet komplex $R_1M_2S_1$, který je schopen methylovat, ale není schopen štěpit DNA. Tvorba těchto komplexů je závislá na koncentraci podjednotky HsdR v buňce. Všechny podjednotky HsdR budou v prvních stádiích vázány do tohoto komplexu. Komplex $R_2M_2S_1$ se bude vytvářet

pouze při vyšší koncentraci HsdR, což není možné v prvních stádiích tvorby R-M systému v recipientní buňce.

2.4.3. Lokalizace restrikčně-modifikačních enzymů v bakteriální buňce

První studie o lokalizaci restrikčně-modifikačních enzymů byly provedeny u enzymu EcoRI (Typ II) (Tanaka a Weisblum, 1975) a ukázaly, že restrikční endonuleasa se nachází v cytoplasmatické frakci.

Analýza subcelulárních frakcí *E. coli* transformované plasmidy s jednotlivými geny *hsd* prokázala rozdílné umístění jednotlivých podjednotek, které byly detekovány jak v cytoplasmě tak v membránové frakci. Podjednotky HsdR i HsdM se nacházely rozpustné v cytoplasmě a pouze podjednotka HsdS byla detekována v membránové frakci. Podjednotky HsdR a HsdM byly nalezeny v membránové frakci jen tehdy, když došlo s podjednotkou HsdS k vytvoření methylasy nebo endonukleasy.

V dalších studiích došlo k upřesnění lokalizace polypeptidů R-M enzymu EcoKI, kdy intaktní sféroplasty byly vystaveny účinku enzymu trypsinu. Trypsin patří mezi proteolytické enzymy a je využíván ke studiu topologie membránových proteinů vzhledem k tomu, že neproniká membránou a štěpí pouze proteiny exponované na jejím vnějším povrchu (Minsky, 1986). Bylo prokázáno, že účinkem trypsinu dochází k výrazné degradaci polypeptidu HsdR v membránové frakci, kde se nachází pouze jako součást komplexní endonukleasy. Methylasa byla před účinkem trypsinu chráněna v cytoplasmě (Holubova et al., 2000).

Sféroplasty připravené z buněk v nichž se exprimovala buď endonukleasa nebo methylasa byly v průběhu osmotické lyze vystaveny účinku benzonasy. Benzoasa je extracelulární endonukleasa, která štěpí DNA na krátké oligonukleotidy (Nestle a Roberts, 1969). V přítomnosti benzonasy došlo k uvolnění endonukleasy i methylasy z membránové frakce do cytoplazmy, což naznačuje roli DNA ve vazbě EcoKI na membránu (Holubova et al., 2000).

Následná analýza lokalizace u EcoR124I byla téměř shodná s výsledky u EcoKI. Podjednotky HsdR a HsdM byly detekovány v buňce ve formě solubilní, podjednotka HsdS ve formě nesolubilní. Jediný rozdíl byl zjištěn v účinku trypsinu, který u EcoR124I plně degradoval podjednotku HsdR, což ukázalo, že podjednotka

HsdR je jako součást endonukleasy pravděpodobně exponovaná značnou částí své struktury do periplazmatického prostoru (Holubova et al., 2004).

2.4.4. Regulace proteolysou podjednotky HsdR

V buňkách *E. coli* se vyskytuje proteasa ClpXP, která je tvořena dvěma proteiny. ClpP s proteolytickou aktivitou a ClpX, který hraje roli chaperonu (Makovets et al., 1999). Jestliže bakteriální chromosom není methylován, proteasa ClpXP chrání hostitelskou bakterii před letálním účinkem vlastního R-M systému tím, že proteolysuje podjednotku HsdR zodpovědnou za restrikci DNA (Makovets et al., 1999). Stav, kdy je rozpoznávací sekvence pozměněna nebo nepřístupná methylací může nastat v případě chyb při replikaci, mutací za tvorby nových rozpoznávacích míst na DNA, chybné methylace DNA, ale i v případě oprav homologními rekombinacemi (Makovets et al., 2004).

Pokud dojde k vazbě restrikčně-modifikačních enzymů na nemodifikovanou rozpoznávací sekvenci, dojde k iniciaci translokaci a následně proteasa ClpXP proteolysuje podjednotku HsdR a tím ji odstraní z komplexu. K degradaci podjednotky HsdR nedochází v případě mutací v každém ze sedmi DEAD-boxů, které jsou odpovědné za translokaci a ATPasovou aktivitu (Makovets et al., 1999), a v nepřítomnosti podjednotky HsdM nebo HsdS. Restrikční aktivita je takto regulována jen u R-M skupiny IA a IB.

2.5. Popis podjednotek R-M enzymů Typu I

2.5.1. Podjednotka HsdM a methyltransferasa

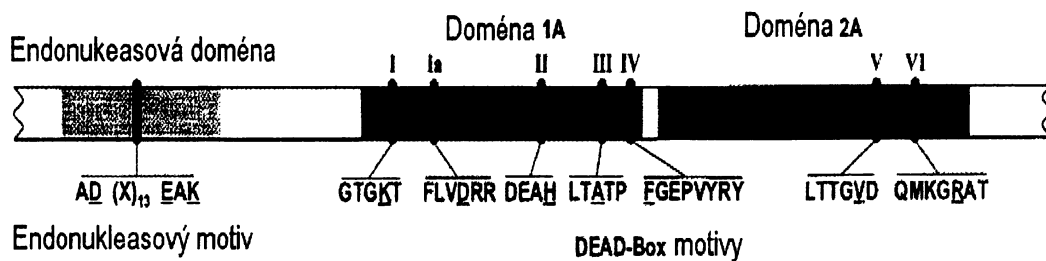
Podjednotka HsdM EcoKI obsahuje tři domény. N-koncová doména, která je odpovědná za rozpoznávání methylovaného stavu cílové sekvence na DNA (Kelleher et al., 1991). Centrální doména katalyzuje methylaci a je zodpovědná za vazbu AdoMet na vazebné místo. C-koncová doména je pravděpodobně zodpovědná za interakce mezi dalšími dvěma podjednotkami (Powell et al., 2003).

Aktivní methyltransferasa je tvořena dvěma podjednotkami HsdM a jednou HsdS, má tedy stechiometrii M_2S_1 (Dryden et al., 1993). Systému EcoKI má v podmínkách *in vivo* MTasu M_2S_1 , která je nestabilní a rozpadá se na volnou podjednotku HsdM a neaktivní dvoupodjednotkový komplex M_1S_1 (Dryden et al., 1993). Methylasa

EcoR124I je stabilní ve stechiometrii M_2S_1 (Taylor et al., 1992). MTasa váže AdoMet, který používá jako donor methylové skupiny při methylaci adeninu ve specifické rozpoznávací sekvenci na DNA. AdoMet hraje pravděpodobně významnou roli při rozlišení methylované a nemethylované DNA (Powell a Murray, 1995).

2.5.2. Podjednotka HsdR

Podjednotka HsdR (Obr.3) je tvořena N-koncovou doménou (endonukleasovou), centrální oblastí a C-koncovou doménou. V centrální oblasti se nachází 7 DEAD-boxů aminokyselinových motivů (Asp-Glu-Ala-Asp) zodpovědných za vazbu ATP, ATP hydrolyzu a DNA translokaci (Murray, 2000). Mutace v DEAD boxech způsobují ztrátu ATPasové i translokační aktivity (Davies et al., 1999 b).



Obr.3: Struktura podjednotky HsdR EcoKI (Murray, 2000)

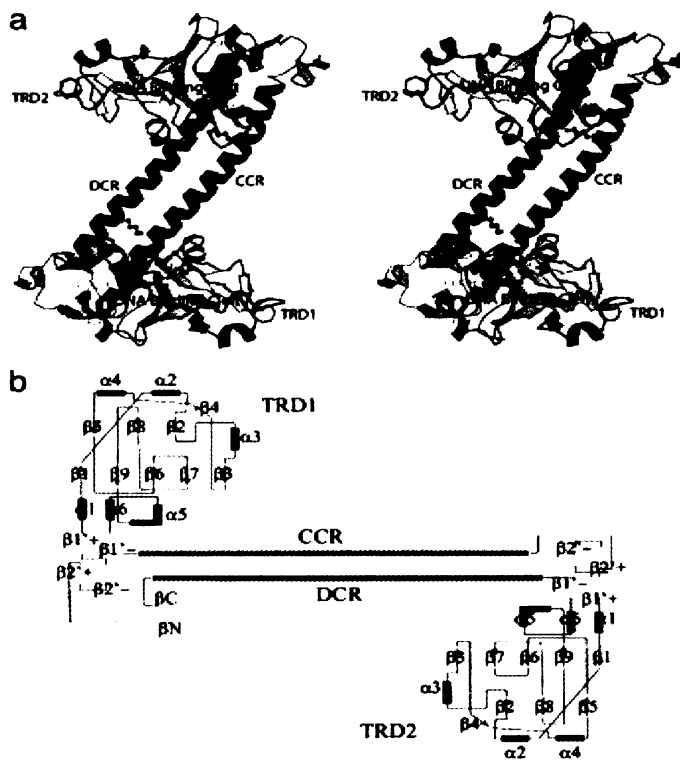
C-koncová doména podjednotky HsdR je zodpovědná za vazbu s podjednotkou HsdM a interakci s konzervovanými doménami podjednotky HsdS (Davies et al., 1999 a).

2.5.3. Podjednotka HsdS

Polypeptid HsdS hraje klíčovou úlohu při rozpoznávání cílové sekvence na DNA. Srovnání sekvencí genů *hsdS* u příbuzných systémů prokázalo existenci dvou rozsáhlých variabilních oblastí, které kódují dvě proteinové domény 150 a 180 aminokyselin dlouhé, z nichž každá rozpoznává jednu polovinu specifických rozpoznávaných sekvencí (Cowan et al., 1989).

N-koncová TRD1 rozpoznává 5'-koncovou část rozpoznávací sekvence a C-koncová TRD2 rozpoznává 3'-koncovou část rozpoznávací sekvence (Fuller-Pace a

Murray, 1986; Gubler et al., 1992). Kromě variabilních oblastí obsahují podjednotky HsdS dvě konzervované domény, centrální (délka zhruba 30 aminokyselin) a na C-konci (délka 80 aminokyselin). Typ IC a IB obsahuje ještě krátkou konzervovanou oblast na N-konci. Tyto domény jsou zodpovědné za interakce s ostatními podjednotkami (Janscak et al., 1998) Vytvořením první krystalové struktury HsdS podjednotky R-M systému Typu I u kmene *Methanococcus jannaschii* (Obr.4) byla odhalena terciální struktura této podjednotky. Konzervované domény tvoří dva antiparalelní α -helixy, které na základě hydrofobních vazeb interagují mezi sebou a pravděpodobně i s podjednotkami HsdM a HsdR (Kim et al., 2005).



Obr.4. Struktura podjednotky HsdS *M. jannaschii* (Kim et al., 2005) (a) Stereogram celkové struktury. (b) Topologický diagram. (CCR, central conserved region = centrální konzervovaná oblast; DCR, distal conserved region = distální konzervovaná oblast; DNA Binding Cleft = žlábek pro vazbu DNA)

Další průlom v pochopení struktury i funkce rozpoznávací podjednotky přispěla analýza mutace v genu *hsdS* specifity R124I, která měla za následek výměnu thyminu²⁵⁹⁴cytosin, což způsobilo v podjednotce HsdS změnu Trp²¹²Arg na začátku oblasti TRD2 s výsledným fenotypem $r^- m^+$. Tento fenotyp je „neklasickým“ fenotypem pro mutanty v genu *hsdS*. *In vitro* bylo prokázáno, že tato záměna ovlivňuje vazbu s podjednotkou HsdM a tím i vazbu MTasy na DNA (Weiserova a

Firman, 1998). Obvykle mutace v genu *hsdS* způsobují r⁻ m⁻ genotyp, který se řadí k tzv. klasickým fenotypům (Glover, 1970). Podobné výsledky byly získány i u teplotně senzitivní mutace v genu *hsdS* EcoKI, které způsobily výměnu cytosinu¹⁰¹⁹ thymín odpovídající substituci Ser³⁴⁰Phe na pravém okraji domény TRD2 podjednotky HsdS. Tato mutace ovlivnila vazbu proteinu na DNA (Zinkevich et al., 1992; Janscak et al., 2000). Tyto a řada dalších poznatků o struktuře a funkci rozpoznávací podjednotky nám umožňují další studium interakcí protein-DNA a protein-protein u R-M enzymů Typu I a tím i identifikovat další aminokyseliny v podjednotce HsdS, které jsou zodpovědné za tyto interakce.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Bakteriální kmeny, plasmidy a bakteriofágy

3.1.1. Bakteriální kmeny a plasmidy

Seznam použitých bakteriálních kmenů *E.coli* a plasmidů je uvedený v tabulce 3.

Tab.3: Bakteriální kmeny a plasmidy

Kmen	Genetická charakteristika	Citace
JM109(DE3)	F' <i>tra</i> Δ36, <i>lacI</i> , Δ(<i>lacZ</i>)M15 <i>proAB, recA1, endA1, gyrA96</i> (Nal ^R), <i>hsdR17, mcrA, relA1,</i> <i>supE, sbcBC, thi-1, Δ(lac-</i> <i>proAB) λ(ΔE3)</i>	Promega
C 122	<i>E.coli</i> C prototroph Δ(<i>hsdR-</i> <i>S</i>)	sbírka kmenů Velké Británie, kmen č.122
Plasmid	Genetická charakteristika	Citace
R124	plasmid IncFIV nesoucí geny <i>hsd</i> EcoR124I, Tc ^R	Hedges a Datta, 1972
R124/3	plasmid R124 IncFIV nesoucí geny <i>hsd</i> EcoR124II, Tc ^R	Hedges a Datta, 1972
pKF650	pACYC184 nesoucí <i>hsd</i> R, M, S, geny EcoR124II R-M systému Cm ^R	Abadjieva et al., 1993
pAC15M	<i>hsdM</i> pod T7 promotorem v pACYC184 Tc ^R	Weiserova et al. 2004

pJS491	<i>hsdS</i> pod T7 promotorem Ap ^R	Patel et al., 1992
pJS491(K184N) pJS491(K384N) pJS491(K184N,K384N)	deriváty pJS491 nesoucí mutantní geny <i>hsdS</i> EcoR124I pod kontrolou P _{T7} Ap ^R	Obarska et al., 2006
pCFD30	pTZ19R nesoucí 30 pb oligoduplex s jedním rozpoznávacím místem pro EcoR124I Ap ^R	Weiserova et al., 2000

3.1.2. Bakteriofágy

λ_{vir}

mutant fága λ, je schopný se množit na lyzogenních i nelyzogenních buňkách (Ptashne, 1988, sbírka MBÚ)

λ₀

fág λ_{vir} pomnožený na kmeni C r⁻ m⁻, kde nedochází k modifikaci (nemodifikovaný)

λ_{R124I}

fág λ_{vir} pomnožený na kmeni C122/R124I, kde je modifikován na specifitu R124I

λ_{R124II}

fág λ_{vir} pomnožený na kmeni JM109(DE3)/pKF650, kde je modifikován na specifitu R124II

3.2. Kultivační půdy

Půda LB LURIA-BERTANI (modifikace Rosner 1972)

Tryptone10g
Yeast Extract5g
NaCl5g
destilovaná vodaad 1000ml
před autoklávováním pH upravené na 7,2-7,4

Tuhé půdy LA:

1,5% LA: 1,5 g agaru / 100 ml LB
0,6% LA (vrchní agar): 0,6 agaru /100 ml LB

2xYT

Tryptone16g
Yeast Extract10g
NaCl5g
destilovaná vodaad 1000ml
před autoklávováním pH upravené na 7,2

3.3. Antibiotika

Ampicilin

Zásobní roztok: 100 mg/ ml destilované vody; konečná koncentrace v půdách: 100 µg/ml

Tetracyklin

Zásobní roztok: 12,5 mg/ ml destilované vody s 96% ethanolem (50% v/v); konečná koncentrace v půdách: 12,5 µg/ml.

Chloramfenikol

Zásobní roztok: 20 mg/ ml 96% ethanolu; konečná koncentrace v půdách: 50 µg/ml.

3.4. Pufry a roztoky

Fágový pufr; pH 7,2

22 mM KH_2PO_4

49,1 mM Na_2HPO_4

85,6 mM NaCl, pH upraveno před autoklávováním

Po sterilizaci přidáno: 1 mM MgSO_4 , 0,1 mM CaCl_2 , 0,001% želatina

TCM:

1M MgCl_2

1M CaCl_2

1M Tris pH 7,5

Pufr pro zaostřovací gel; pH 6,8

3,48 mM SDS

500 mM Tris-HCl

Pufr pro separační gel; pH 8,8

3,48 mM SDS

375 mM Tris-HCl

Roztok na barvení proteinů

0,1% brilantní modř Coomassie R250

50% methanol

10% kyselina octová

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE (4 x koncentrovaný); pH 6,8

80 mM SDS

5% β -mercaptoethanol

7,9% glycerol

61,9 mM Tris-HCl

0,005% bromfenolová modř

Elektroforetický pufr pro SDS-PAGE (10 x koncentrovaný);

SDS10 g
Tris-HCl..... 33,4 g
Glycine..... 144 g
destilovaná voda.....ad 1 000 ml
pH se neupravuje

STE

10 mM Tris-HCl pH 8
100mM NaCl
0,1 mM EDTA pH 8

Sonikační pufr

50 mM Tris-HCl pH 8
25% sacharosa
5 mM EDTA pH 8
3 mM DTT
1mM benzamidin
0,2M PMSF

Eluční pufr L

10mM Tris-HCl, pH 8
50mM NaCl
0,1mM EDTA, pH 8
1mM DTT

Eluční pufr H

10 mM Tris-HCl, pH 8
2M NaCl
0,1 mM EDTA, pH 8
1mM DTT

Eluční pufr C

10mM Tris-HCl, pH 8

0,2M NaCl

0,1 mM EDTA, pH 8

1mM DTT

TAE; Tris-acetátový pufr, pH 8

40 mM Tris-acetát

1 mM EDTA

TE

10mM Tris-HCl

1mM EDTA

pH 8,0

Restrikční pufr; pH 8

50 mM Tris-HCl

10 mM MgCl₂

1 mM DTT

50 mM NaCl

Stop roztok

2% SDS

100 mM EDTA

10% Glycerol

0,1% BFM

Ředící pufr pro enzymy

50% Eluční pufr L

50% glycerol

BFM; bromfenolová modř

2,5% Glycerol

2,5 mM DTT

0,025% BFM

TBE; Tris-borátový pufr, pH 8

90 mM Tris-borát

2 mM EDTA

Polyakrylamidový gel (SDS PAGE)

Zaostřovací gel: 10 %

AA/BAA (30% zásob. roztok).....0,750 ml

zaostřovací pufr pH 6,8.....1,25 ml

10% peroxidisíran amonný.....20 μ l

TEMED.....5 μ l

destilovaná voda.....3ml

SeparáčnÍ gel: 10%

AA/BAA (30% zásob. roztok).....4 ml

separační pufr pH 8,8.....3ml

10% peroxidisíran amonný.....40 μ l

TEMED.....16 μ l

destilovaná voda.....5ml

Roztoky použité při izolaci plasmidové DNA

Roztok I; pH 8

50 mM glukosa

25 mM Tris-HCl

10 mM EDTA

Roztok II

0,2 N NaOH

1% SDS

Roztok III

7,5 M octan amonný

3.5. Chemikálie

Chemikálie	Výrobce
Acrylamid	Serva
AA/BAA (Acrylamid/bis-acrylamid),29:1, 30% zásobní roztok	Sigma-Aldrich
Agar	Oxoid
Agarosa	Sigma-Aldrich
ATP	Sigma-Aldrich
Benzamidin	Sigma-Aldrich
Bis-acrylamid (N,N'-methylenbisacrylamid)	Serva
Brillantní modř R-250	Serva
Bromphenolová modř	Lachema
CaCl ₂ (chlorid vápenatý)	Lachema
CH ₃ COOH (kys. octová)	Lachema
Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
EDTA (ethylendiamintetractová kyselina)	Lachema
Glycerol	Lachema
Glycin	Sigma-Aldrich
HCl(kys.chlorovodíková)	Fluka
H ₃ BO ₃ (kys. boritá)	Lachema
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid)	Serva
KH ₂ PO ₄ (dihydrogenfosforečnan draselný)	Sigma-Aldrich
Methanol	Lachema
MgCl ₂ (chlorid hořečnatý)	Lachema
MgSO ₄ (síran horečnatý)	Lachema
NaCl ₂ (chlorid sodný)	Lachema
Na ₂ HPO ₄ (hydrogenfosforečnan sodný)	Lachema
NaOH(hydroxid sodný)	Lachema
(NH ₄) ₂ SO ₄ (síran amonný)	Lachema
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ (peroxodisíran amonný)	Lachema
PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluorid)	Sigma-Aldrich
SDS (Sodiumdodecylsulfát)	Serva

Sacharosa	Lachema
TEMED(N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin)	Serva
Tris-HCl	Lachema
Tryptone	Oxoid
Želatína	Oxoid

3.6. Přístroje a pomůcky

3.6.1. Přístroje

Centricon, Amicon, Millipore, USA

Centrifuga K 26, Janetzki, Německo

Odstředivka, Mini Spin Plus, Eppendorf, SRN

OTD-Combi, ultracentrifuační odstředivka, Sorvall-OTD-Combi, DuPont, USA

Orbitální rotačka, Vortex Genie 2, Scientific Industries, USA

Přístroj pro analýsu a dokumentaci gelů GDS 5000, UNLipmex

Sonikátor, U50, Kika Laborortechnik, Německo

Spektrofotometr, Unicam SP, 1700 , UK

Sorvall-RT 6000B, DuPont, USA

Sorvall RC5C, DuPont, USA

Sušička gelů, Model 583 Gel dryer, Bio-Rad, USA

Systém pro elektroforesu proteinů, ATTO gel box, GRI, Japonsko

Systém na purifikaci proteinů, Econo system, Bio Rad, USA

Třepačka, Orbi-Safe TS Net Wise, Schoeller, Německo

Vodní lázeň, SUB 6, Grant Instruments, UK

Zdroj napětí, model 500/200, Bio-Rad Laboratories, USA

3.6.2. Pomůcky

Rotor TFT 80.13 ($r_{\max} = 84,7$ mm), Dupont, USA

Rotor SS 34, ($r_{\max} = 10,7$ mm), Dupont, USA

Chromatografické kolony: Hi Prep16/10 DEAE FF, Amersham Pharmacia Biotech UK

HiTrap Heparin HP, Amersham Pharmacia Biotech UK

3.7. Metody

3.7.1. Kultivace bakterií

Kultivace bakterií *E.coli* probíhala při optimálních podmínkách růstu při 37°C. Bakterie byly kultivované v tekutém médiu LB nebo na Petriho miskách s LA půdou. U bakterií nesoucí plasmid, bylo do média přidáno příslušné antibiotikum.

3.7.2. Transformace

Byla použita metoda transformace (Maniatis, 1982) kompetentních buňek připravovaných pomocí prodloužené inkubace v CaCl₂ (Mandel a Higa, 1970). Transformace je metoda, při které je do kompetentních buňek zaveden vyhovující plasmid. Transformanti jsou pak selektováni růstem na LA s příslušným antibiotikem.

3.7.2.1. Příprava kompetentních buňek

Do 4ml LB bylo přidáno 10μl kultury a kultivováno při 37°C po dobu 16 hodin. 100μl 16-h kultury bylo inokulováno do 10ml LB, kultura byla poté intenzivně třepána při 37°C po dobu 180-240 min. do OD₆₀₀ v rozmezí 0,2- 0,3 (koncentrace kultury 10⁷ buňek/ml). Buňky byly ochlazeny 10 minut na ledové lázni, centrifugovány (4000 x g, 15 min., 4°C). Sediment byl následně resuspendován v 5ml (1/2 výchozího objemu kultury) ledového 50mM CaCl₂. Suspence byla inkubovaná na ledové lázni po dobu 1 h., opět centrifugována a sediment jemně resuspendován v 625μl (1/16 původního objemu) roztoku 50mM CaCl₂ s 20% glycerolem. Suspence kompetentních buňek byla rozplněna po 100μl do Ependorfových mikrozkuvek a uchována pro další práci při teplotě -70°C.

3.7.2.2. Transformace

Ke 100μl kompetentních buňek byl přidán 1μl plasmidové DNA (5 ng/1 μl) a 10 μl 10x koncentrovaného roztoku TCM. Obsah byl pomalým obracením promíchán a inkubován 30 minut na ledové lázni. Potom byla směs ponechána v 37°C teplé vodní lázni po dobu 2 minut a 10 minut při pokojové teplotě. K obsahu byl sterilně přidán

1ml LB, ohřátý na 37°C, a suspence byla několikrát promíchána obrácením. Následoval teplotní šok při 42°C po dobu 2 minut a suspence byla kultivována 1hodinu při 37°C. Buňky byly vysety po 0,1ml na půdu LA s příslušným antibiotikem. Petriho misky byly inkubovány při 37°C přes noc. Jako kontrola byly vysévány kompetentní buňky opracované stejným způsobem, avšak bez přidání DNA.

3.7.3 Metody použité při práci s fagy

3.7.3.1 Příprava fágových lyzátů

0,1 ml zásobního lyzátu fága λ (10^9 - 10^{10} PFU/ml) a 0,5 ml 16-h kultury vhodného bakteriálního kmene bylo přidáno ke 3 ml 45°C teplé půdy LB s 0,6 % agaru a vylito na povrch misky s LA. Po 16-h kultivaci při 37°C dojde k téměř kompletní lyzi buněk.

Měkký agar byl setřen do Ehrlenmayerovy baňky a se 3 ml fágového pufru a 0,5 ml chloroformu intenzivně třepán 3 h při 37°C. (Obvykle jsme získávali lyzát ze 3 Petriho misek najednou.) Poté byla suspence centrifugována (4 000 x g, 30 min, LT), supernatant odebrán a vhodně naředěn roztokem FF a byl stanoven titr fágového lyzátu.

Vhodné kmeny pro pomnožení fága byly voleny s ohledem na požadovanou modifikaci fágové DNA. Fág $\lambda_{vir.0}$ s nemodifikovanou DNA se získá pomnožením na kmeni C122 ($r^- m^-$), fág $\lambda_{vir.R124I}$ označuje DNA fága R124 specifity, kterou fág získal pomnožením na kmeni C122/R124. a fág $\lambda_{vir.R124II}$ byl získán pomnožením na kmeni JM109/pKF650.

3.7.3.2 Stanovení titru fágového lyzátu

3 ml půdy LB s 0,6 % agaru vyhřáté na 45°C byly smíseny s 0,1 ml vhodně zředěného fágového lyzátu a s 0,5 ml 16-h kultury buněk indikátorového kmene (1×10^9 buněk/ml) a nality na misky s půdou LA. Po ztuhnutí byly misky přeneseny do 37°C a po 24 h kultivace byl odečten počet plaků v souvislém nárůstu indikátorové kultury. Podle ředění byl vypočten titr fága v lyzátu (počet PFU/ml).

3.7.4. Testování restriktivně-modifikačního fenotypu

Fenotyp r-m EcoR124 zahrnuje dva znaky : a)znak pro restrikci (r), b)znak pro modifikaci (m)

Tento test nám slouží k ověření fenotypu kmenů *E.coli* transformovaných příslušnými plasmidy.

3.7.4.1. Stanovení restriktivního fenotypu

Na stanovení restriktivního fenotypu byl používán kvalitativní (kapkový) test (Colson et al., 1965).

Povrch misek s LA půdou a odpovídajícím antibiotikem byl převrstven 3 ml 0,6% agaru obsahujícím 0,5 ml ON narostlé testovací i kontrolní kultury. Po ztuhnutí byl na povrch agarů nakapán lyzát příslušných fágů o známé pracovní koncentraci 10^3 , 10^4 a 10^6 PFU/ml.

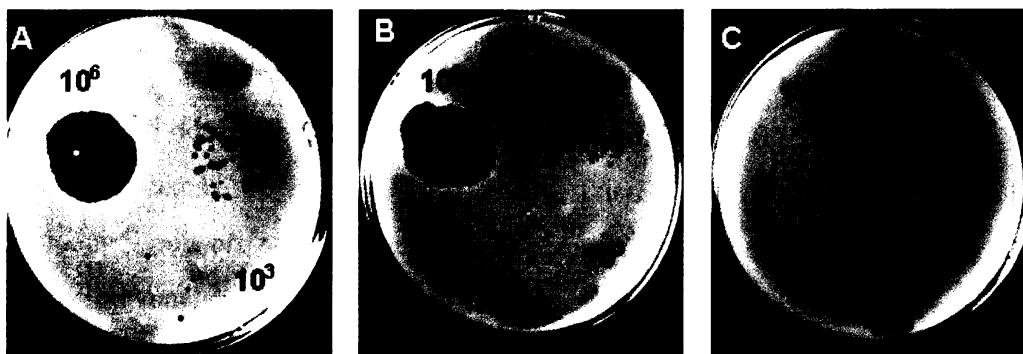
Po 16 hodinách kultivace při teplotě 37°C byl spočítán počet plaků. Účinnost restrikce (e.o.p. = efficiency of plating) je dána podílem počtu plaků na testovaném a kontrolním nerestringujícím kmeni r^- . Hodnoty 0,0001- 0,01 odpovídají r^+ , hodnoty 0,01-0,1 r^{+-} a hodnoty 0,1-1,0 fenotypu r^- .

3.7.4.2. Stanovení modifikačního fenotypu

Pro určení modifikačního fenotypu (m) se používá lyzát fága λ vir pomnožený na testovaném kmeni, který se získává z plaků vytvořených při testování restriktivního fenotypu.

Do středu plaku byl zaveden sterilní platinový drátek a mírným kroužením došlo k zachycení fágových částic. Tyto částice byly resuspendovány v 1ml roztoku fágového pufru. Ze získané suspence fágů (přibližně 10^5 PFU/ml) byla vytvořena ředění 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} . Znovu byl použit kapkový test (Colson et al., 1965). Jednotlivá ředění fága byla nakapána paralelně na povrch ztuhlé půdy LB s 0,6% agaru s obsahem indikátorových kmenů (restringující a nerestringující kmen). Tyto kmeny byly předem pomnoženy při 37°C 16hodin ve 4ml LB. Po 16 hodinách kultivaci při

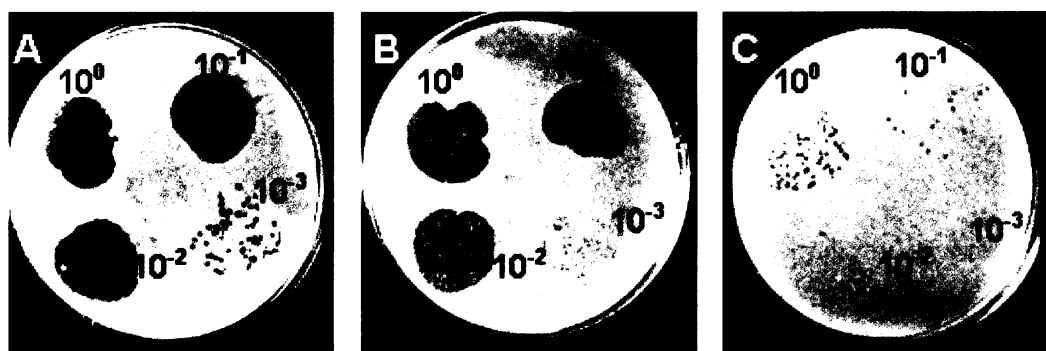
byly předem pomnoženy při 37°C 16hodin ve 4ml LB. Po 16 hodinách kultivaci při 37°C byla vypočtena účinnost modifikace, která je dána podílem titru fága na kmeni restringujícím (nesoucí plasmid s danou specifitou) a nerestringujícím. Hodnoty 1,0-0,5 odpovídají fenotypu m^+ , 0,5- 0,09 fenotypu m^{+-} a hodnoty pod 0,09 fenotypu m^- .



Obr. 6: Stanovení restričního fenotypu

Účinnost restrikce (e.o.p. = efficiency of plating) je dána podílem počtu plaků na testovaném a kontrolním nerestringujícím kmeni r^- . Hodnoty 0,0001- 0,01 odpovídají r^+ , hodnoty 0,01-0,1 r^{+-} a hodnoty 0,1-1,0 fenotypu r^- .

(A) Fágy o známé pracovní koncentraci 10^3 , 10^4 a 10^6 PFU/ml nakapané na kontrolní nerestringující kmen a na testované kmene (B) nerestringující; (C) restringující .



Obr.7: Stanovení modifikačního fenotypu

Účinnost modifikace je dána podílem titru fága na kmeni restringujícím (nesoucí plasmid s danou specifitou) a nerestringujícím. Hodnoty 1,0-0,5 odpovídají fenotypu m^+ , 0,5- 0,09 fenotypu m^{+-} a hodnoty pod 0,09 fenotypu m^- .

(A) Lyzát fága pomnoženého na testovaném kmeni nakapaný na kontrolní nerestringující kmen; a na kmene specifity B a C . Testovaný fágový lyzát získal pomnožením na testovaném kmeni specifitu B.

3.7.5. Práce s plasmidovou DNA

3.7.5.1. Isolace plasmidové DNA z *E. coli*

Pro izolaci plasmidové DNA byla použita metoda alkalické lyze (Maniatis, 1982). Isolované kolonie nesoucí vhodný plasmid byly kultivovány ON ve 3 ml LB s příslušným antibiotikem. Opakovanou centrifugací byly buňky ze 3 ml kultury shromážděny v EP mikrokyvetě (15 000 x g, 3min, LT, laboratorní stolní centrifuga). Supernatant byl odsán a pelet resuspendován na vortexu ve 200 µl ledového roztoku I (50 mM glukosa, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8,0) a suspence byla inkubována 5 min při pokojové teplotě. K suspensi bylo přidáno 400 µl ledového čerstvě připraveného roztoku II (0,2 N NaOH, 1% SDS). Obsah EP mikrokyvet byl promíchán převrácením a po 5 min inkubace v ledu bylo přidáno 300 µl ledového roztoku III (7,5 M octan amonný). Obsah byl velmi jemně promíchán převrácením EP mikrokyvet a ponechán 10 min na ledu.

Vzniklá sraženina byla odstraněna centrifugací (15 000 x g, 15 min, LT) a DNA v supernatantu byla vysrážena 600 µl ml isopropanolu, 10 - 60 min ponechána při pokojové teplotě, sedimentována centrifugací (16 000 x g, 10 min,LT), jedenkrát promyta 0,8 ml 70 % ethanolu, centrifugována, vysušena v termostatu při 37°C a rozpuštěna ve 20 µl pufru TE. 3 µl byly použity pro ověření přítomnosti plasmidové DNA elektroforesou v agarosovém gelu.

3.7.5.2. Elektroforesa plasmidové DNA v agarosovém gelu

Elektroforesa plasmidové DNA byla prováděna v horizontálním uspořádání (přístroj firmy Pharmacia LKB, Švédsko) v 0,9 % agarosovém gelu. Do 50 °C teplé agarosy bylo přidáno 5 µl EtBr (konečná koncentrace 0,2 µg/1 ml). Vzorky DNA byly smíseny s indikační směsí (0,07 % bromfenolová modř, 7% SDS. 33% glycerol) v poměru 3:1 a nanášeny na gel. Elektroforesa probíhala v pufru TAE při LT a napětí 60-80 V. DNA byla detekována v ultrafialovém světle (254 nm) na přístroji GDS 5 000.

3.7.6. Elektroforesa proteinů v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS- PAGE)

Proteiny jsme analysovali metodou SDS-PAGE v diskontinuálním systému pufrů (Laemmli, 1970). Mezi dvě skla (16x 16cm) přístroje ATTO gel box (Japonsko GRI) na elektroforesu proteinů byl nalit do 2/3 výšky 10% separační gel, povrch jsme převrstvili destilovanou vodou. Po zpolymerování separačního gelu byla vylita voda a na osušený gel nalit zaostřovací gel, do něhož jsme zasunuli teflonový hřeben. Takto připravený gel byl umístěn do přístroje na elektroforesu a převrstven SDS elektroforetickým pufrům. Smícháme 10-15 μ l vzorku se vzorkovým pufrům pro SDS-PAGE(v poměru 1:2), necháme 3 minuty povařit a nanese na gel. Elektroforesa zpočátku probíhala při konstantním proudu 10mA/gel, při přechodu vedoucího čela ze zaostřovacího gelu do gelu separačního byl proud zdvojnásoben. Elektroforesa byla ukončena po dosažení vedoucího čela konce gelu.

Po ukončení SDS-PAGE byl oddělen separační gel, promyt destilovanou vodou a proteiny byly detekovány barvením gelu v roztoku Coomasie brilantní modři R-250 30 minut při 30°C nebo 16 hodin při LT. Poté byl gel odbarvován v destilované vodě zahříván k bodu varu po dobu 10-15 minut. Gely byly sušeny 1 hodinu při 80°C v sušičce gelů.

3.7.7. Expres podjednotek HsdR, HsdM a HsdS

100 μ l 16-h kultury bylo inokulováno do 10 ml LB s příslušným antibiotikem, kultura byla intenzivně třepána při 37 °C do OD₆₀₀ 0,4-0,6. K suspensi buněk byl přidán isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) do konečné koncentrace 0,5 mM. Po 16h kultivaci při 25 °C byla suspence inkubována 10 min na ledové lázni a poté centrifugována (4 000 x g, 15 min, 4 °C). Pelet byl promyt ledovým roztokem STE a resuspendován ve 2 ml sonikačního pufru. Vzorek byl sonikován 2 min na ledové lázni do projasnění (přístroj pro sonikaci – U50, IKA, cyklus 0,5, amplituda 90 %). Bylo odebráno 200 μ l sonikované kultury na analýsu celkových buněčných proteinů.

3.7.8. Purifikace proteinů

3.7.8.1. Příprava buněčného extraktu

2 000 ml půdy 2xYT (Maniatis, 1982) s příslušným antibiotikem bylo inokulováno 20 ml 16-h kultury kmene JM109(DE3) s jednotlivými plasmidy pro purifikaci MTas. Buněčná suspence byla intenzivně třepána při 37 °C do OD₆₀₀ 0,4-0,6 a po přidání 1 ml 1 M IPTG dalších 16 h při 25°C. Kultura byla ochlazena 30 min na ledu a centrifugována (K26, 30 min, 4 500 rpm, 4 °C). Pelety byly resuspendovány ve 20 ml ledového STE a centrifugovány při 4 500 rpm, 15 min, 4 °C (centrifuga Sorvall-RT 6000B). Pelety byly znovu promyty 10ml ledovým STE, resuspendovány a centrifugovány na SorvalRC5C (rotor SS 34, 10 000rpm, 15 min., 4 °C) a získaná buněčná hmota byla zvážena. Účinnost indukce byla kontrolována elektroforeticky.

3 g buněčné hmoty bylo resuspendováno v ledovém sonikačním pufru, suspence sonikována (cyklus 0,5, amplituda 90 %) a centrifugována při 18 000 rpm, 20 min, 4 °C (centrifuga SorvalRC5C, rotor SS 34). K supernatantu byl přidán síran amonný do 70% saturace, směs byla míchána 3h při 4 °C a precipitát proteinů byl centrifugována 18 000 rpm, 20 min, 4 °C (centrifuga SorvalRC5C, rotor SS 34). Pelet byl resuspendován ve 20 ml pufru s nízkou koncentrací NaCl (Eluční pufr L, 50 mM NaCl) a roztok byl dialysován proti 5 l Elučního pufru L s 0,5 mM dithiothreitem (DTT) při 4 °C (16 h). Po dialyze byl nerozpustný podíl ve vzorku odstraněn ultracentrifugací 50000rpm, 60 min, 4 °C (ultracentrifuga Sorval, rotor TFT 80.13) a supernatant byl nanášen na chromatografickou kolonu. K purifikaci všech enzymů byl použit přístroj Econo System, Bio Rad.

3.7.8.2. Purifikace methylas

Enzymy byly purifikovány použitím iontoměničové a afinitní chromatografie (Taylor et al., 1992; Weiserova et al., 2000).

Iontoměničová chromatografie

Pro iontoměničovou chromatografii byla použita kolona Hi Prep 16/10 DEAE FF, 20ml (Amersham). Kolona byla uchována ve 20% ethanolu, před prvním použitím byla ekvilibrována 5V kolony Elučního pufru L s nízkou koncentrací NaCl (50 mM, pH 8,2; dále označovaný L,), 5V kolony Elučního pufru H s vysokou koncentrací

NaCl (2 M, pH 8.2; dále označovaný H) a 5V kolony L pufru, při průtoku 1 ml/min, 4 °C. Při opakovaném používání byla ekvilibrována 2V kolony H pufru a 10 V kolony L pufru při průtoku 1 ml/min, 4 °C.

Po dialyze byl vzorek nanesen na ekvilibrovanou kolonu rychlostí 1 ml/min. Kolona byla promyta stejnou rychlostí 5V pufru L a navázané proteiny byly vymývány lineárním gradientem NaCl (0,05 – 0,5 M NaCl). Eluce byla monitorována kontinuálním měřením absorbance při 280 nm a přítomnost dvoupodjednotkového komplexu MTasy byla ve vybraných frakcích kontrolována elektroforeticky porovnáváním se standardem. Frakce s nejvyšším obsahem enzymu byly spojeny a obsah NaCl byl naředěn na koncentraci NaCl v L pufru (0,05 M) „L*“ pufrům bez obsahu NaCl.

Afinitní chromatografie

Pro afinitní chromatografii byla použita heparinová Hi Trap kolona, 5 ml (Amersham). Kolona byla uchována ve 20% ethanolu, před prvním použitím byla ekvilibrována 10V kolony L pufru, následně 2V kolony H pufru a 10V kolony L pufru. Mezi purifikacemi byla kolona ekvilibrována 2V kolony H pufru a 10V kolony L pufru. Průtok pro afinitní kolonu v průběhu ekvilibrace a purifikace MTas byl 1 ml/min při 4 °C.

Spojené frakce po iontoměničové chromatografii byly nanesený na ekvilibrovanou heparinovou kolonu. Kolona byla promyta 10V pufru L a navázané proteiny byly vymývány lineárním gradientem NaCl (0,05 – 1 M NaCl, celkový objem 50 ml). Po ukončení gradientu byly vybrány frakce s nejvyšším obsahem bílkovin. Přítomnost enzymů v těchto frakcích byla kontrolována elektroforeticky. Frakce s nejvyšším obsahem enzymu byly spojeny a zakoncentrovány na Centrikonu 30 (odstředivka Amicon- 5 000 g, 30 min, 4 °C). Koncentrace proteinu byla stanovena na základě absorbance UV při 280 nm s použitím extinkčního koeficientu odvozeného z obsahu aromatických aminokyselin MTasy EcoR124I ($E_{280} = 157\,800\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). Enzymy byly uchovány v 50% glycerolu při -20 °C.

3.7.8.3. Purifikace podjednotky HsdR

Podjednotka HsdR byla purifikována z kmene *E.coli* JM109(DE3) nesoucí plasmid pVZR2 použitím iontoměničové chromatografie a gelové filtrace (Janscak et al., 1996).

Iontoměničová chromatografie

Pro iontoměničovou chromatografii byla použita kolona Hi Prep 16/10 DEAE FF, 20ml, Amersham jako při purifikaci MTas a stejným způsobem ekvilibrována (kapitola 3.14.2.1.). Pro ekvilibraci a purifikaci byl použit průtok 1 ml/min.

Po dialyse byl vzorek nanesen na ekvilibrovanou kolonu. Kolona byla promyta 5 V pufru L a navázané proteiny byly vymývány lineárním gradientem NaCl (0,05-0,3 M NaCl, celkový objem 200 ml). Přítomnost proteinů ve vybraných frakcích byla kontrolována elektroforeticky. Frakce s nejvyšším obsahem podjednotky HsdR byly spojeny, zkoncentrovány na Centrikonu 30 (odstředivka Amicon – 5 000g, 30 min, 4 °C) na objem maximálně do 4,8 ml a připraveny pro gelovou chromatografii.

Gelová filtrace

Pro gelovou filtraci byla použita kolona Hi Prep 16/60 Sephacryl S-200 HR, 120ml, Amersham. Před prvním použitím byla kolona ekvilibrována destilovanou vodou (0,5 V kolony, průtok 0,5 ml/min) a následně H pufrem (2V kolony, průtok 1 ml/min).

Zakoncentrované frakce po iontoměničové chromatografii byly nanесeny na ekvilibrovanou sephacryl kolonu rychlostí 0,5 ml/min. Kolona byla promývána stejnou rychlostí H pufrem (celkový objem 480 ml). Frakce byly kontrolovány elektroforeticky, ty s nejvyšším obsahem podjednotky HsdR spojeny, zkoncentrovány na Centrikonu 30 a koncentrát byl uchován v 50% glycerolu při -20 °C.

3.7.9. Biochemická charakterizace purifikovaných enzymů

3.7.9.1. Restrikční aktivita *in vitro* sestavených endonukleas

Restrikční aktivita u *in vitro* sestavených standardních a mutantních REas byla sledována na základě restrikce kruhové plasmidové DNA na lineární formu .

REasy byly rekonstituovány smísením podjednotky HsdR se standardní MTasou nebo mutantními MTasami v molárním poměru 5:1. Rekonstituce probíhala v prostředí restrikčního pufru při pokojové teplotě po dobu 10 min. Jako kontrola restrikční reakce byla použita směs bez přítomnosti REasy. Substrátem byl plasmid pCFD30 s jedním rozpoznávacím místem specifity R124I, poměr enzym:DNA byl 1:1. Restrikční reakce byla zahájena přidáním 0,1 M ATP do konečné koncentrace v reakční směsi 2 mM. Reakce probíhala po dobu 5 min při 37 °C v objemu 20 µl, byla zastavena přidáním 10 µl stop roztoku a deaktivována 5 min při 65 °C. Jednotlivé formy DNA byly rozděleny a detekovány v 0,8% agarosovém gelu barveném v EtBr .

3.7.9.2. DNA methylace *in vitro*

Tato metoda je založena na vystavení plasmidu pCFD30 nesoucí 30 pb oligoduplex (CCCCGTGCAGAATTTCGAGGTCGACGGATCCGGG) s jedním rozpoznávacím místem specifity R124I (Weiserova et al., 2000) účinku mutantních MTas a následně účinku restrikčního enzymu Typu II EcoRI. Enzym EcoR124I skupina IC rozpoznává sekvenci 5'GAA N₆ RTCG 3' zatímco enzym EcoRI Typ II sekvenci 5'GAATTC 3' přítomnou v oligoduplexu pCFD30. Proto v případě, že by DNA byla plně methylována MTasou R124I, enzym EcoRI by DNA neštěpil.

Objem reakční směsi byl 25µl, 50 nM nedomodifikovaná DNA byla inkubována s 150 nM MTasou v prostředí 1 x koncentrovaného restrikčního pufru a 200 µM AdoMet. Methylace DNA probíhala 1 h při 37 °C. Poté byly MTasy deaktivovány 10 min. při 65°C, bylo přidáno 10 U restrikčního enzymu EcoRI, reakce byla inkubována 1 h při 37 °C a poté deaktivována 10 min při 65°C. Jednotlivé formy DNA byly visualisovány barvením gelu v EtBr .

4. VÝSLEDKY

Podjednotka HsdS hraje klíčovou roli v komplexním enzymu, neboť rozpoznává specifické místo na DNA v procesu modifikace i restrikce. A také má hlavní úlohu ve vazbě s ostatními podjednotkami prostřednictvím konzervovaných domén, na což jsme se zaměřili.

Na základě objevení mutace v *hsdS72* genu (Weiserova et al., 1998) s tzv. „neklasickým“ fenotypem byly zkonstruovány plasmidy s mutacemi v centrální konzervované doméně *hsdS* genu specifity R124I. Výchozím materiálem pro moji práci byly deriváty plasmidu pJS491 nesoucí geny *hsdS* s bodovými mutacemi vedoucí k záměně lysinu v pozici 184 a/nebo 384 za arginin (K184N, K384N). U těchto mutací se na základě strukturního modelu (Obarska et al., 2006), předpokládal vliv na interakci protein-protein a tedy na vazbu podjednotek.

4.1. Příprava analysovaných klonů

4.1.1. Transformace mutantních plasmidů do JM109(DE3)/pKF650

Do kmene JM109(DE3)/pKF650 (plasmid nese geny *hsdR,M,S* systému EcoR124II,Cm^R) (Abadjieva et al.,1993) byly transformovány mutantní plasmidy (kapitola 3.7.2.2.). Transformanti byly selektováni na Petriho miskách s LA a antibiotikem (Cm,Ap).

Následně byl proveden komplementační test restrikčního fenotypu u všech připravených kmenů.

4.2. Testování restrikčního a modifikačního fenotypu

Nejprve byl testován restrikční fenotyp komplementační analýsou (kapitola 3.7.4.1.) založenou na kompetici mezi dvěma blízce příbuznými podjednotkami HsdS se specifitou R124I a podjednotkou HsdS se specifitou R124II, o vazbu s podjednotkami HsdM a HsdR. Tento test nám umožňuje rozlišit potenciální DNA-vazebné mutanty (dochází ke kompetici mezi příbuznými podjednotkami HsdS) od mutantů neschopných vazby s ostatními podjednotkami (ke kompetici nedochází) (Abadjieva et al., 1993). K analýze byly použity plasmidy pKF650 a pJS491.

Plasmid pKF650 nese geny *hsdR*, *hsdM* a *hsdS* kódující komplexní endonukleasu systému EcoR124II (restringuje fága λ .R124I) a je kompatibilní s plasmidem pJS491, který kóduje podjednotku HsdS systému EcoR124I (restringuje fága λ .R124II). Byla porovnávána schopnost restrikce fágů λ .R124II a λ .R124I transformanty JM109(DE3) nesoucími plasmid pKF650 a jednotlivé mutantní plasmidy pJS491 s kmenem nesoucím plasmidy pKF650 a pJS491 a s kmenem nesoucím pouze plasmid pKF650.

Kompetice mezi podjednotkami HsdS specifity R124I a R124II o vazbu s podjednotkami HsdM, HsdR v komplexní endonukleasu EcoR124I se projeví sníženou restrikcí fága λ .R124I systémem EcoR124II na plasmidu pKF650. A snížená restrikce fága λ .R124II ukazuje na potenciální DNA-vazebné mutanty. U našich mutací tedy nalézáme potenciální DNA-vazebné mutanty vzhledem k hodnotám restrikce (Tab. 4.). Protože tento test byl jen orientačním, přistoupili jsme v dalším kroku k testování restrikčního i modifikačního fenotypu.

Hodnoty, které jsme získali jsou shrnuty do tabulky 5., z nichž vyplývá, že u všech testovaných mutant v podjednotce HsdS dochází ke vzniku methylasy, schopné vazby na DNA a následné modifikace na specifitu R124I. Jedná se tedy o další „neklasické“ mutace ($r\text{-m}^+$) s primárně poškozenou vazbou s podjednotkou HsdR.

Tab.4: Testování restrikčního fenotypu komplementační analýsou

Kmen JM109(DE3)	bez plasmidu	pKF650	pKF650 pJS491	pKF650 pJS491K184N	pKF650 pJS491K384N	pKF650 pJS491K184N,K384N
λ.R124I	1	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²
λ.R124II	1	1	10 ⁻⁴	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹

e.o.p. („efficiency of plating“) je účinnost restrikce, která je dána podílem počtu plaků na testovaném a kontrolním kmene r⁻.

Tab.5: Testování restrikčně-modifikačního fenotypu komplementační analýsou

Kmen	RESTRIKCE ^a		MODIFIKACE ^b		R-M FENOTYP
	Fág		Kmen		
JM109(DE3)	$\lambda 0$	NT			
	λI	1	R124I	NT	
	λII	1	R124II	NT	
JM109(DE3)/pKF650	$\lambda 0$	10^{-3}			
	λI	10^{-3}	R124I	10^{-3}	$r^-_{R124I} m^-_{R124I}$
	λII	1	R124II	1	$r^+_{R124II} m^+_{R124II}$
JM109(DE3)/pKF650, pJS491	$\lambda 0$	10^{-4}			
	λI	10^{-3}	R124I	1	$r^+_{R124I} m^+_{R124I}$
	λII	10^{-4}	R124II	1	$r^+_{R124II} m^+_{R124II}$
JM109(DE3)/pKF650, pJS491K184N	$\lambda 0$	10^{-2}			
	λI	10^{-2}	R124I	1	$r^-_{R124I} m^+_{R124I}$
	λII	10^{-1}	R124II	1	$r^-_{R124II} m^+_{R124II}$
JM109(DE3)/pKF650, pJS491K384N	$\lambda 0$	10^{-2}			
	λI	10^{-2}	R124I	1	$r^-_{R124I} m^+_{R124I}$
	λII	10^{-1}	R124II	1	$r^-_{R124II} m^+_{R124II}$
JM109(DE3)/pKF650, pJS491K184N,K384N	$\lambda 0$	10^{-2}			
	λI	10^{-2}	R124I	1	$r^-_{R124I} m^+_{R124I}$
	λII	10^{-1}	R124II	1	$r^-_{R124II} m^+_{R124II}$

a – účinnost restrikce je dána podílem titru fága specifity λ .R124I a λ .R124II na testovaném a kontrolním kmeni r^-

b – účinnost modifikace je dána podílem titru fága (pomnoženého v transformantech) na kontrolních kmenech C122/R124 $r^+_{R124I} m^+_{R124I}$, C122/R124/3 $r^+_{R124II} m^+_{R124II}$ (restringující, nesoucí plasmid s danou specifitou) a nerestringujícím kmeni C122 $r^- m^-$.

4.3. Příprava mutantních methylass

4.3.1. Transformace mutantních plasmidů do JM109(DE3)/pAC15M

Do kmene *E.coli* JM109(DE3) byl postupně vnesen metodou transformace (Mandel a Higa, 1970) (kapitola 3.7.2.2.) plasmid pAC15M (Holubova et al., 2004) s genem *hsdM* pod promotorem p_{T7} a následně plasmidy s jednotlivými mutantními geny *hsdS*. Transformanti byli selektováni na Petriho miskách s LA a příslušným antibiotikem (Ap., Tc).

4.3.2 Kontrola R-M fenotypu u transformantů

Dalším krokem bylo u získaných transformantů ověřit funkci u dvou-plasmidového systému.

Získané výsledky jsou shrnuty v tabulce 6. Testování restriktivního i modifikačního fenotypu ukázalo, že u všech mutantů došlo k zachování modifikační funkce. K restrikci nedochází vzhledem k nepřítomnosti genu *hsdR* v buňce a je provedena jen za účelem pomnožení fága na testovaném kmeni.

Tab.6: R-M fenotyp u mutantních podjednotek HsdS

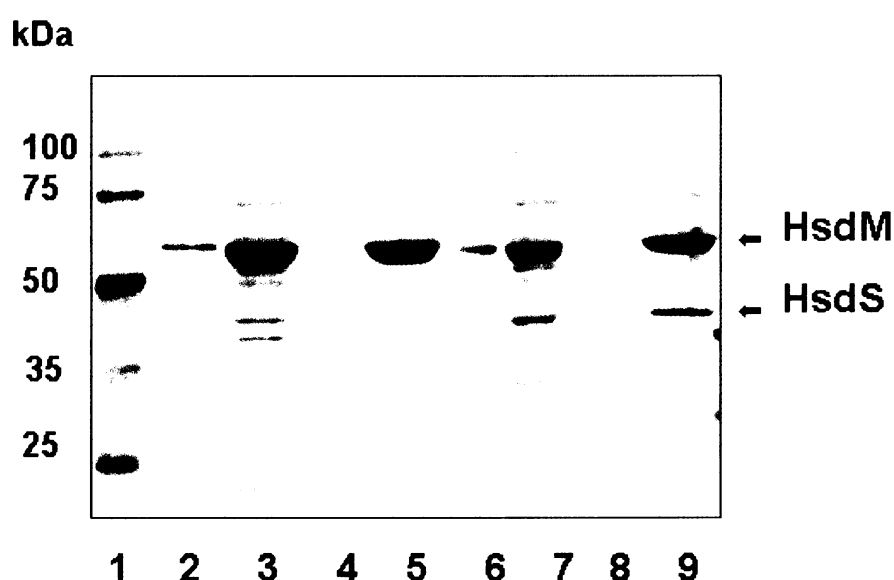
JM109(DE3)/pAC15M	Restrikce	Modifikace	R-M fenotyp
pJS491(wt)	1,0	1,0	$r^- m^+$
pJS491 K184N	0,6	1,0	$r^- m^+$
pJS491 K384N	1,0	0,9	$r^- m^+$
pJS491 K184N,K384N	1,0	1,0	$r^- m^+$

– účinnost modifikace je dána podílem titru fága na kontrolním, restringujícím kmeni C122/R124 $r^+_{R124I} m^+_{R124I}$ a na nerestringujícím kmeni C122 $r^- m^-$.

4. 4. Kontrola indukované exprese genů *hsdS* a *hsdM*

Restrikční a modifikační funkce byly testovány *in vivo* v neindukovaném kmeni JM109(DE3), který je zdrojem T7 polymerasy. Je známo, že hladina T7 RNA polymerasy je u tohoto kmene v podmínkách bez indukce dostatečná pro analýsu R-M aktivity (Abadjieva et al.,1993). Pro purifikaci enzymů bylo nejprve nutné ověřit indukovatelnou expresi genů *hsdS* a *hsdM* tvořících methylasu.

Indukce byla prováděna pomocí 0,1M IPTG. Po přidání IPTG došlo k nadprodukci příslušných podjednotek, což je zřetelně vidět na obrázku 7. U všech námi testovaných klonů byla indukce exprese genů funkční (Obr. 7). Indukované podjednotky byly separovány na 10% SDS-PAGE.



Obr.7: Kontrola exprese genu

Mutantní geny *hsdS* byly exprimovány v klonech JM109(DE3)/pAC15M s příslušným mutantním plasmidem.

Dráhy: 1 - proteinový standard; 2 - pJS491K184N, exprese před indukci, 3 - pJS491K184N, exprese po indukci; 4- pJS491K384N, exprese před indukci; 5- pJS491K384N, exprese po indukci; 6- pJS491K184N, K384N, exprese před indukci; 7 - pJS491K184N, K384N, exprese po indukci; 8 - pJS491, exprese před indukci; 9 - pJS491, exprese po indukci

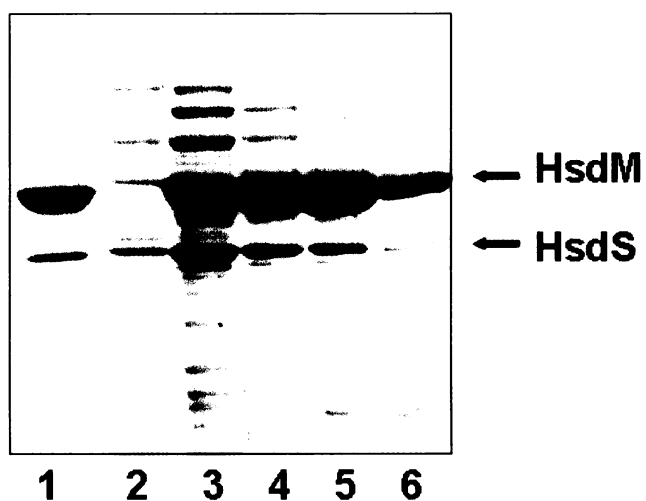
4.5. Purifikace methylas

Porovnání výsledků biochemické analýsy purifikovaných mutantních methylas s výsledky standardního enzymu nám poskytne bližší informace o tom jaký vliv mají mutace na vlastnosti podjednotky HsdS *in vitro*. K analýze byla vybrána mutanta K384N.

Enzym byl purifikován z kmene JM109(DE3) nesoucí plasmidy pAC15M (Holubová et al., 2004) a pJS491 (Patel et al., 1992). Enzym byl izolován nejprve pomocí iontoměničové chromatografie na koloně Hi Prep 16/10 DEAE FF, kdy největší množství proteinu bylo eluováno ve frakcích č.31, č.32 a č.33 (Obr. 8). Spojené frakce byly následně naneseny na heparinovou HiTrap kolonu (afinitní chromatografie) podle metody uvedené v kapitole 3.7.8. Čistota proteinu byla kontrolována pomocí elektroforezy proteinu v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (Obr.9) (kapitola 3.7.6.). Následovalo zakonzentrování enzymu (nejčistší frakce č.11) na centrifugačním filtru YM-30 (Amicon). Centrifugační filtry 30 zadržují proteiny o molekulové hmotnosti vyšší než 30kDa. Podjednotka HsdM má molekulovou hmotnost 66kDa a podjednotka HsdS 45kDa. Obdobným způsobem jsme purifikovali mutantní MTasu z klonu JM109(DE3)/pAC15M,pJS491K384N. Výsledné získané molární koncentrace purifikovaných MTas jsou uvedeny v tabulce 7.

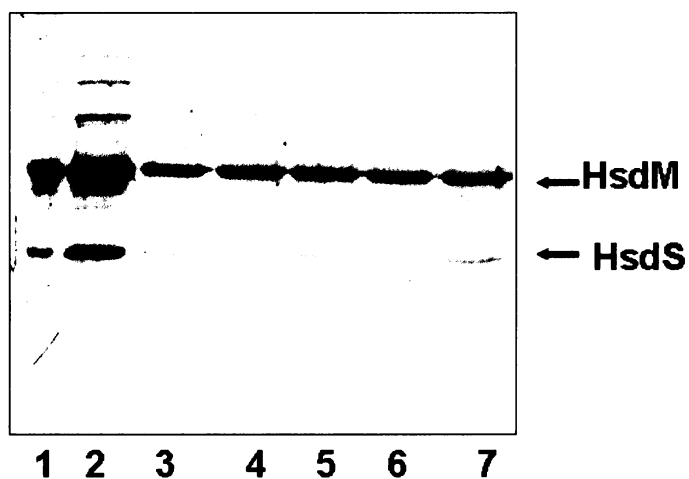
Tab.7: Výsledné molární koncentrace purifikovaných MTas

MTasa	Molární koncentrace / μ M
standardní	128,0
mutanta K384N	10,0



Obr.8: Kontrola frakcí - Iontoměničová chromatografie na koloně Hi Prep 16/10 DEAE FF

Dráhy: 1 – standardní enzym nanášený na kolonu ; 2 - frakce č. 30; 3 - frakce č. 31; 4 - frakce č. 32; 5 - frakce č. 33; 6 - frakce č. 34



Obr.9: Kontrola frakcí - Afinitní chromatografie na heparinové HiTrap koloně

Dráhy: 1 – marker ; 2 – frakce nanášená na kolonu; 3 – frakce č.9; 4 – frakce č.10; 5 – výsledná zakonzervovaná frakce č.11; 6 – frakce č.12; 7 – frakce č. 13

4.6. Purifikace podjednotky HsdR

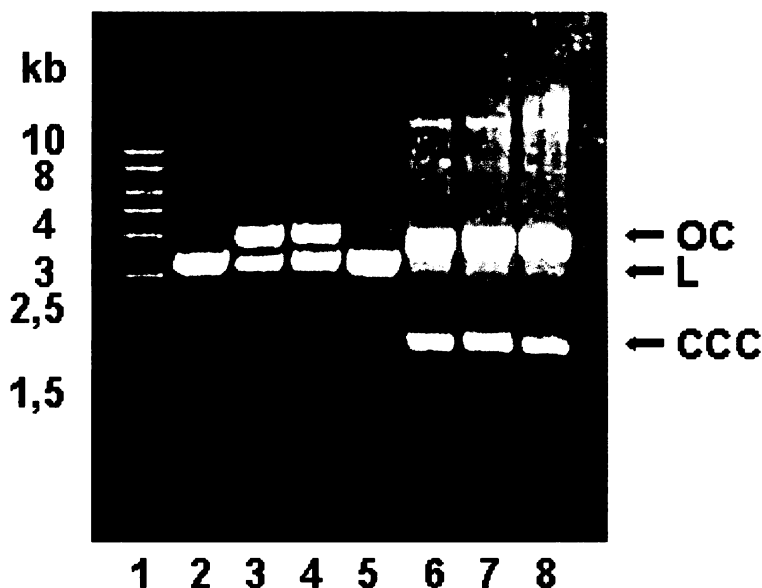
Pro biochemickou analýzu *in vitro* rekonstituovaných endonukleas, je nutné izolovat také podjednotku HsdR, která je nezbytnou součástí restriční endonukleasy. Podjednotka HsdR byla purifikována použitím iontoměničové a gelové chromatografie S-200 Sephacryl HR. Podjednotka HsdR byla purifikována Ing. Evou Šišákovou (MBÚ) a s jejím souhlasem použita pro biochemickou charakterizaci mutantních forem methylas.

4.7. Biochemická charakterizace mutantní formy MTasy

4.7.1. Methylační aktivita *in vitro*

Principem tohoto testu je vystavení plasmidu pCFD30 nesoucí 30 pb oligoduplex (CCCCGTGCAGAAATTCGAGGTCGACGGATCCGGG) s jedním rozpoznávacím místem specifity R124I (Weiserova et al., 2000) účinku mutantních MTas a následně účinku restričního enzymu Typu II EcoRI. Enzym EcoR124I skupina IC rozpoznává sekvenci 5'GAA N₆ RTCG 3' zatímco enzym EcoRI Typ II sekvenci 5'GAATTC 3' přítomnou v oligoduplexu pCFD30. Proto v případě, že by DNA byla plně methylována MTasou R124I, enzym EcoRI by DNA neštěpil. Test methylace byl proveden podle metody uvedené v kapitole 3.7.9.2.

Za standardních podmínek je plasmid pCFD30 s jedním rozpoznávacím místem pro enzym EcoRI štěpen za vzniku lineární formy, jak v prostředí restričního pufru specifického pro EcoRI tak v prostředí pufru specifického pro MTasy Typu I (Obr.10, dráhy 2,5). Vystavením plasmidu pCFD30 standardní a mutantní Mtase nedošlo ve srovnání s nativním plasmidem ke změně poměru CCC a OC forem plasmidu (Obr.10, dráhy 6,7,8). Za daných podmínek působením standardní a mutantí MTasy došlo k methylaci rozpoznávacího místa pro enzym EcoRI, který následně nebyl schopen rozštěpit veškerou plasmidovou DNA na lineární formu (Obr. 10, dráhy 3,4). U mutantní methylasy tak byla prokázána schopnost methylovat DNA *in vitro* srovnatelně se standardním enzymem.



Obr.10: Methylační aktivita standardní MTasy a mutantní MTasy K384N

Na obrázku je ukázána restrikce 50 nM pCFD30 EcoRI. Reakční směsi byly nanášeny na 0,8% agarosový gel. OC – otevřená forma, L – lineární forma, CCC – kruhově uzavřená forma pCFD30.

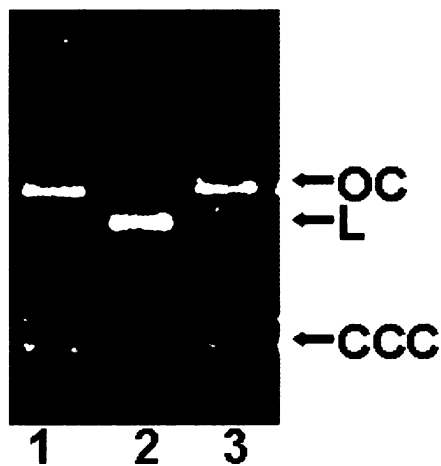
Dráhy: 1 – DNA marker; 2 – pCFD30 štěpen enzymem EcoRI; 3 – štěpení enzymem EcoRI po působení standardní MTasy; 4 – štěpení enzymem EcoRI po působení mutantní MTasyK384N 5 – kontrolní štěpení enzymem EcoRI v pufru specifickém pro MTasy Typu I ; 6 – plasmid po působení standardní MTasy; 7 – plasmid po působení mutantní MTasy; 8 - kontrola nativního plasmidu

4.7.2. Restrikce *in vitro*

Restrikce *in vitro* je založena na štěpení kovalentně uzavřené kruhové formy DNA restrikční endonukleasou, na lineární formu při poměru REasa:DNA 1:1.

Jako substrát byl použit plasmid pCFD30 nesoucí jedno rozpoznávací místo specifity R124I . DNA byla štěpena *in vitro* rekonstruovanými REasami o poměru HsdR:MTasa 5:1, který zaručí tvorbu komplexu $R_2M_2S_1$ Zatímco při poměru HsdR:MTasa 1:1 vznikající komplex $R_1M_2S_1$ DNA neštěpí, vykazuje pouze translokační aktivitu. Restrikční aktivita standardní endonukleasy byla porovnána s výsledky restrikční aktivity mutantních endonukleas. Test restrikce byl proveden

podle metody uvedené v kapitole 3.7.9.1. Působením standardní REasy došlo k dvouvláknovému štěpení kruhové formy DNA a k částečnému štěpení otevřené formy DNA na formu lineární (Obr.11 , dráha 2). Mutanta K384N (Obr.11 , dráha 3) nevykazovala restriční aktivitu. Z předložených výsledků je zřejmé, že schopnost restrikce nebyla obnovena ani při zvýšeném poměru podjednotky HsdR. Výsledky se tedy shodují s analýzou *in vivo*.



Obr.11: Restrikce kruhové formy pCFD30 *in vitro* sestavenými REasami

In vitro sestavené REasy o poměru podjednotek 5:1 byly kultivovány v ekvimolárním poměru s 30 nM DNA. Restriční reakce byly nanášeny na 0,8% agarosový gel. OC – otevřená forma, L – lineární forma, CCC – kruhově uzavřená forma pCFD30.

Dráhy: 1 – pCFD30 bez přítomnosti REasy; 2 – standardní REasa; 3– REasa mutanty K384N

5. DISKUSE

Restrikčně-modifikační systémy chrání bakteriální buňku před vstupem cizorodé DNA v procesech transformace, konjugace nebo transfekce. R-M systémy jsou součástí řady bakteriálních kmenů jako produkty genů chromosomální nebo plastidové DNA (Luria, 1953). Tyto systémy hrají nemalou roli v oblasti molekulární biologie, a proto je jim věnována značná pozornost.

Jeden z nejsložitějších enzymových komplexů nacházíme u systému R-M Typu I (Murray, 2000). Enzymový komplex je složen ze tří podjednotek, které tvoří restrikční endonukleasu schopnou štěpit i methylovat DNA. Každá z těchto podjednotek má svoji specifickou funkci. Podjednotka HsdS rozpoznává specifické vazebné místo na DNA, v podjednotce HsdM je soustředěna methylační, v HsdR endonukleasová, ATPasová a DNA translokační aktivita (Murray, 2000).

Největší pozornost je věnována podjednotce HsdS, která obsahuje konzervované oblasti, které se významně účastní interakcí protein-protein s podjednotkami HsdM, HsdR a variabilní oblasti, které jsou odpovědné za vazbu enzymu ke specifickým sekvencím na DNA (Janscak et al., 1998, Weiserova et al., 1998). Předpokládá se, že celé konzervované a variabilní domény se přímo neúčastní interakce, ale jen pomocí úseků nacházejících se v těchto doménách. V centrální konzervované doméně podjednotky HsdS specifity R124I v oblasti 161–200 aa se vyskytují opakující se aminokyselinové sekvence, které byly také nalezeny i v C-koncové konzervované doméně v oblasti 362–401 aa. Opakující se aminokyselinová sekvence centrální konzervované oblasti je pravděpodobně nejvíce odpovědná za interakci s podjednotkou HsdM.

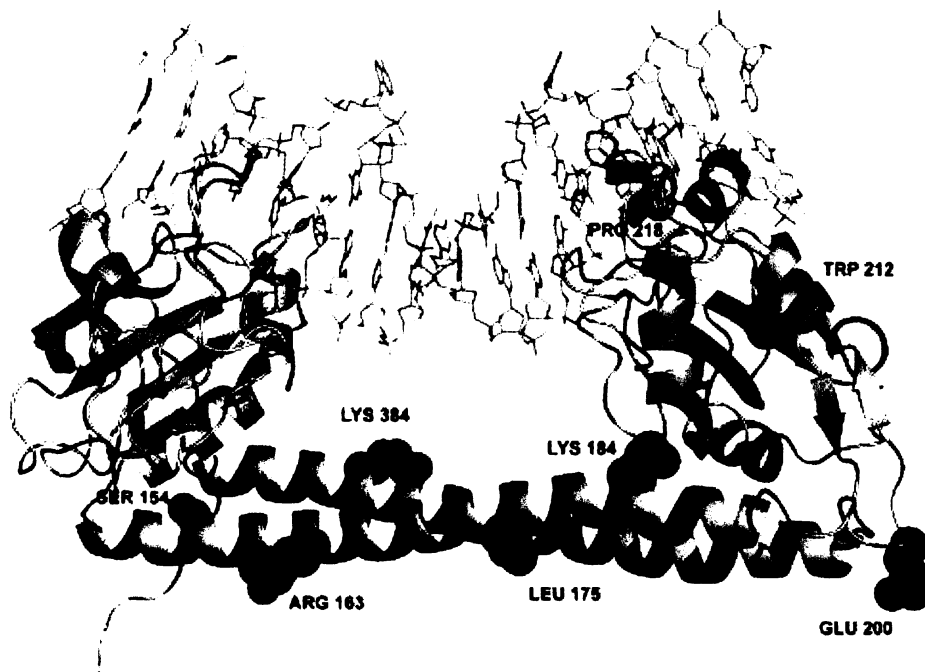
Pomocí krystalové struktury podjednotky HsdS (Kim et al., 2005) bylo zjištěno, že konzervované domény tvoří dva antiparalelní α -helixy, které díky hydrofobním vazbám mezi sebou interagují a pravděpodobně i s ostatními podjednotkami.

Cílem této diplomové práce bylo identifikovat soubor mutací v konzervovaných doménách rozpoznávací podjednotky HsdS. Měli jsme k dispozici tři mutantní geny *hsdS* R124I, které byly připraveny chybnou inkorporací v procesu PCR, způsobenou přítomností různých koncentrací manganu (Weiserova et al., 1998). Jednalo se o mutace přítomné v opakujících se aminokyselinových sekvencích

v centrální a C-terminální konzervované doméně podjednotky HsdS. Mutace v genu *hsdS* obvykle způsobí $r^- m^+$ fenotyp stejně jako v genu *hsdM*. Ale byla již objevena mutace v genu *hsdS* specifity R124I, která vedla ke změně $Trp^{212}Arg$, na rozhraní centrální konzervované oblasti a distální variabilní oblasti TRD2 (Obr.12). Mutace ovlivnila vazbu HsdS a HsdM do funkční MTasy a tím byla poškozena i schopnost vazby na DNA. Následné biochemické testy *in vitro* ukázaly, že její methylační aktivita se částečně obnovila po přidání podjednotky HsdR, která uzpůsobila její konformaci k vazbě na DNA. Mutace HsdS72 byla tedy prvním případem tzv. „neklasického“ fenotypu $r^- m^+$ (Weiserova et al, 1998) a poukázala na význam centrální konzervované domény při sestavování komplexního restriktivně-modifikačního enzymu.

„Neklasický“ fenotyp byl zjištěn i u teplotně senzitivních mutací v genu *hsdS* EcoKI (Zinkevich et al., 1992), které se nacházely ve stejné oblasti jako v případě výše uvedené mutanty v genu *hsdS* R124I.

První námi testovaná mutanta pJS491K184N se záměnou $Lys^{184}Asn$ patří k dalším mutacím s „neklasickým“ fenotypem. Jedná se o záměnu aminokyseliny s dlouhým postranním řetězcem, bazickým za aminokyselinu s postranním řetězcem o menším počtu atomů uhlíku. Tato mutanta je velmi zajímavá, protože po odhalení terciální struktury HsdS podjednotky R-M systému Typu I C u kmene *Methanococcus jannaschii*, bylo zjištěno že se nachází v důležité oblasti zodpovědné za interakce mezi podjednotkami. Další byla mutace pJS491K384N (záměna $Lys^{384}Asn$), která se nachází na paralelním helixu (Obr.10.), a je ekvivalentem předešlé aminokyselinové záměny. Z těchto indicií se domníváme, že bude také vytvářet stejný fenotyp. Poslední mutanta pJS491K184N,K384N má obě záměny a to $Lys^{184}Asn$ a $Lys^{384}Asn$. Jak u mutant jednobodových tak i u dvojitě mutanty jsme přepokládali, že budou vykazovat tzv. „neklasický“ fenotyp $r^- m^+$ (Obarska et al., 2005). Příslušné mutanty jsou znázorněny na obrázku 12.



Obr.12 : Lokalizace neklasických mutací u HsdS podjednotky (Obarska et al., 2005). Mutace charakterizovány jako neklasické, vzhledem k r^-m^+ fenotypu jsou označeny červeně. Slabé mutace jsou znázorněny modře a žlutě je znázorněna záměna Pro²¹⁸, která vykazuje r^-m^- fenotyp.

Mutantní plasmidy byly transformovány (kapitola 3.7.2.) do kmene JM109(DE3), který byl použit pro expresi proteinů. Pomocí komplementačního testu na zjištění restriční fenotypu, jsme zjistili, že u daných mutant dochází ke kompetici mezi podjednotkami HsdS specifity R124I a R124II o vazbu s podjednotkami HsdM, HsdR (viz Tab.4). Což značí, že se jedná o mutace způsobující potenciální DNA-vazebné mutace. Po otestování restričního i modifikačního fenotypu, použitím metody kvalitativního („kapkového“) testu (kapitola 3.7.4.), jsme dospěli k překvapivým výsledkům. Dané mutanty jsou schopny modifikovat fágy na specifitu R124I, a proto nemohou být klasifikovány jako DNA-vazebné mutanty, ale musí být u nich primárně poškozená vazba podjednotek. U všech mutant tedy byl prokázán „neklasický“ fenotyp r^-m^+ (viz Tab.5).

Dále jsme přistoupili ke kontrole indukované exprese genů *hsdM* a mutantních *hsdS* (kapitola 3.7.7.). Exprese u všech mutantních genů *hsdS* byla funkční (viz Obr.5).

Na základě výsledků kontroly indukované exprese genů bylo možné přistoupit k vlastní purifikaci standardní a mutantní methylasy (záměna K384N).

Během purifikace se vyskytly problémy s navázáním mutantní Mtasy na heparinovou kolonu, která zde představovala matici DNA. Domníváme se, že tato snížená schopnost vazby na DNA je způsobená přítomnou mutací (interakce protein - DNA nebyla testována).

Následovalo srovnání fenotypového projevu s biochemickou analýzou *in vitro*. Pro biochemickou analýzu *in vitro* jsme si vybrali mutantu se záměnou Lys³⁸⁴Asn, neboť u mutanty se záměnou Lys¹⁸⁴Asn byla již provedena studie *in vivo* i *in vitro* (Vejsadová Š., PhD these, 2005).

Nejprve byla testována DNA methylace *in vitro* (kapitola 3.7.9.2). Námí vybraná mutanta byla schopna methylovat DNA, přítomná mutanta tedy primárně neovlivní vznik methylasy. Tyto výsledky souhlasí s fenotypovým projevem, kdy se jedná o m⁺ fenotyp.

Biochemicky byla dále testována restriční aktivita *in vitro* rekonstruovaných REas. Aktivní restriční endonukleasa vzniká vazbou Mtasy s podjednotkou HsdR. Bylo prokázáno, že podjednotka HsdR je v buňce *in vivo* limitována (Dryden et al, 1993). V bakteriální buňce nejprve dochází k vytvoření komplexu R₁M₂S₁ čímž dojde k navázání většiny podjednotek HsdR, a až v případě nadbytku podjednotky HsdR dojde k vytvoření komplexu R₂M₂S₁. Protože je známo, že při poměru HsdR:MTasa menší než 1 vzniká komplex R₁M₂S₁, zatímco při poměru HsdR:MTasa větší než 1 vzniká komplex R₂M₂S₁, který na rozdíl od prvního komplexu vykazuje restriční aktivitu (Janscak et al.,1998; Weiserova et al.,2000). Použili jsme poměr HsdR:MTasa 5:1 pro zajištění tvorby komplexu R₂M₂S₁. Již dříve získané výsledky u „neklasického“ fenotypu mutanty HsdS72 (Weiserova et al., 2000) ukazovaly, že nadbytek podjednotky HsdR ovlivní správné uzpůsobení MTasy a její funkce se následně obnoví. Tyto závěry bychom mohli očekávat i u naší mutanty. Získané výsledky nám ukázaly, že mutantní REasa se záměnou Lys³⁸⁴Asn neštěpí DNA (viz Obr.10). Nadbytek podjednotky HsdR tedy pravděpodobně nebyl schopen uzpůsobit REasu, tak aby mohlo dojít ke štěpení DNA. Tato mutace tedy výrazně ovlivní schopnost rozpoznávací podjednotky HsdS vazby s podjednotkou HsdR.

Získané výsledky z této práce potvrdily, že u jednotlivých záměn Lys¹⁸⁴Asn, Lys³⁸⁴Asn a u dvojité záměny (Lys¹⁸⁴Asn, Lys³⁸⁴Asn), které se nacházejí v konzervovaných doménách podjednotky HsdS, mají výrazný vliv na sestavování restričně-modifikačního enzymu. Předkládané poznatky o struktuře rozpoznávací

podjednotky HsdS otvírají cestu pro další studium interakcí protein-DNA a protein-protein u R-M enzymů Typu I a tím identifikovat další aminokyseliny v podjednotce, které jsou zodpovědné za tyto interakce.

6. SOUHRN

Diplomová práce byla zaměřena na analýsu mutací v konzervovaných doménách rozpoznávací podjednotky HsdS ovlivňujících vazbu podjednotek.

U všech námi testovaných mutantů byl prokázán tzv. „neklasický“ fenotyp r^m^+ metodou komplementační analýs.

Za podmínek *in vitro* byla testována methylace DNA, která prokázala schopnost mutantní MTasy methylovat DNA.

Biochemická analýza restrikce *in vitro* nepotvrdila obnovenou funkci restrikční aktivity v důsledku nadbytku podjednotky HsdR.

Z těchto výsledků jsme dospěli k tomuto závěru. Mutantní enzymy si zachovávají modifikační aktivitu *in vivo* a *in vitro*, ale ztrácejí schopnost vazby mezi HsdS (Mtasou) a HsdR podjednotkou v procesu sestavování podjednotek.

Analysované záměny lysinu v konzervovaných doménách rozpoznávací podjednotky HsdS mají výrazný vliv na interakci podjednotek.

Všech cílů diplomové práce bylo dosaženo.

7. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

Arber, W., Dussoix, D. (1962). Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. I. Host controlled modification of bacteriophage lambda. *J Mol Biol* 5, 18-36.

Arber, W. a. L., S. (1969). DNA modification and restriction. *Annu Rev Biochem* 38, 467.

Bertani, G., Weigle, J. J. (1953). Host controlled variation in bacterial viruses. *J Bacteriol* 65, 113-121.

Bickle, T. A., Krüger, D. H. (1993). Biology of DNA restriction. *Microbiological Reviews* 57, 434-450.

Bourniquel, A. A., Bickle, T. A. (2002). Complex restriction enzymes: NTP-driven molecular motors. *Biochimie* 84, 1047-1059.

Boyer, H. W. (1971). DNA restriction and modification mechanisms in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 25, 153-176.

Burckhardt, J., Weisemann, J., Hamilton, D., Yuan, R. (1981a). Complexes formed between the restriction endonuclease EcoK and heteroduplex DNA. *J Mol Biol* 153, 425-440.

Burckhardt, J., Weisemann, J., Yuan, R. (1981b). Characterization of the DNA methylase activity of the restriction enzyme from *Escherichia coli* K. *J Biol Chem* 256, 4024-4032.

Colson, C., Glover, S. W., Symonds, N., Stacey, K. A. (1965). The location of the genes for host-controlled modification and restriction in *Escherichia coli* K-12. *Genetics* 52, 1043-1050.

Cowan, G. M., Gann, A. A., Murray, N. E. (1989). Conservation of complex DNA recognition domains between families of restriction enzymes. *Cell* 56, 103-109.

Daniel, A. S., Fuller-Pace, F. V., Legge, D. M., Murray, N. E. (1988). Distribution and diversity of hsd genes in *Escherichia coli* and other enteric bacteria. *Journal Of Bacteriology* 170, 1775-1782.

Dartois, V., De Backer, O., Colson, C. (1993). Sequence of the *Salmonella typhimurium* StyLT1 restriction-modification genes: homologies with EcoP1 and EcoP15 type-III R-M systems and presence of helicase domains. *Gene* 127, 105-110.

Davies, G. P., Kemp, P., Molineux, I. J., Murray, N. E. (1999 b). The DNA translocation and ATPase activities of restriction-deficient mutants of Eco KI. *J Mol Biol* 292, 787-796.

Davies, G. P., Martin, I., Sturrock, S. S., Cronshaw, A., Murray, N. E., Dryden, D. T. (1999 a). On the structure and operation of type I DNA restriction enzymes. *Journal Of Molecular Biology* 290, 565-579.

Dreier, J., MacWilliams, P., Bickle, T. (1996, b). DNA cleavage by the type IC restriction-modification enzyme EcoR124II. *J Mol Biol* 264, 722-733.

Dryden, D. T. (2004). Reeling in the bases. *Nat Struct Mol Biol* 11, 804-806.

Dryden, D. T., Cooper, L. P., Murray, N. E. (1993). Purification and characterization of the methyltransferase from the type 1 restriction and modification system of *Escherichia coli* K12. *Journal Of Biological Chemistry* 268, 13228-13236.

Dryden, D. T., 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, 1065-1076.

Dryden, D. T., Murray, N. E., Rao, D. N. (2001). Nucleoside triphosphate-dependent restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* 29, 3728-3741.

Eskin, B., Linn, S. (1972). The deoxyribonucleic acid modification and restriction enzymes of *Escherichia coli* B. II. Purification, subunit structure, and catalytic properties of the restriction endonuclease. *J Biol Chem* *247*, 6183-6191.

Firman, K., Creasey, W. A., Watson, G., Price, C., Glover, S. W. (1983). Genetic and physical studies of restriction-deficient mutants of the Inc FIV plasmids R124 and R124/3. *Mol Gen Genet* *191*, 145-153.

Firman, K., Szczelkun, M. D. (2000). Measuring motion on DNA by the type I restriction endonuclease EcoR124I using triplex displacement. *Embo J* *19*, 2094-2102.

Fuller-Pace, F. V., Bullas, L. R., Delius, H., Murray, N. E. (1984). Genetic recombination can generate altered restriction specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *81*, 6095-6099.

Fuller-Pace, F. V., Cowan, G. M., Murray, N. E. (1985). EcoA and EcoE: alternatives to the EcoK family of type I restriction and modification systems of *Escherichia coli*. *Journal Of Molecular Biology* *186*, 65-75

Fuller-Pace, F. V., Murray, N. E. (1986). Two DNA recognition domains of the specificity polypeptides of a family of type I restriction enzymes. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* *83*, 9368-9372.

Glover, S. W. (1970). Functional analysis of host-specificity mutants in *Escherichia coli*. *Genet Res* *15*, 237-250.

Gough, J. A., Murray, N. E. (1983). Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *Journal Of Molecular Biology* *166*, 1-19.

Gubler, M., Braguglia, D., Meyer, J., Piekarowicz, A., Bickle, T. (1992). Recombination of constant and variable modules alters DNA sequence recognition by type IC restriction-modification enzymes. *EMBO J* 11, 233-240.

Hadi, S. M., Yuan, R. (1974). Complementation in vitro by mutant restriction enzymes from *Escherichia coli* K. *Journal Of Biological Chemistry* 249, 4580-4586.

Holubova, I., Vejsadova, S., Firman, K., Weiserova, M. (2004). Cellular localization of Type I restriction-modification enzymes is family dependent. *Biochem Biophys Res Commun* 319, 375-380.

Holubova, I., Vejsadova, S., Weiserova, M., Firman, K. (2000). Localization of the Type I Restriction-Modification Enzyme EcoKI in the Bacterial Cell. *Biochem Biophys Res Commun* 270, 46-51.

Hubacek, J., Glover, S. W. (1970). Complementation analysis of temperature-sensitive host specificity mutations in *Escherichia coli*. *Journal Of Molecular Biology* 50, 111-127.

Hubacek, J., Holubova, I., Weiserova, M. (1998). The effect of *recA* mutation on the expression of EcoKI and EcoR124I *hsd* genes cloned in a multicopy plasmid. *Folia Microbiol* 43, 353-359.

Chin, V., Valinluck, V., Magaki, S., Ryu, J. (2004). KpnBI is the prototype of a new family (IE) of bacterial type I restriction-modification system. *Nucleic Acids Res* 32, e138.

Janscak, P., Abadjieva, A., Firman, K. (1996). The type I restriction endonuclease R.EcoR124I: over-production and biochemical properties. *Journal Of Molecular Biology* 257, 977-991.

Janscak, P., Dryden, D. T., Firman, K. (1998). Analysis of the subunit assembly of the typeIC restriction-modification enzyme EcoR124I. *Nucleic Acids Research* 26, 4439-4445.

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. *Embo Journal* 18, 2638-2647.

Janscak, P., Sandmeier, U., Szczelkun, M. D., Bickle, T. A. (2001). Subunit assembly and mode of DNA cleavage of the type III restriction endonucleases EcoP1I and EcoP15I. *J Mol Biol* 306, 417-431.

Kelleher, J. E., Daniel, A. S., Murray, N. E. (1991). Mutations that confer de novo activity upon a maintenance methyltransferase. *Journal Of Molecular Biology* 221, 431-440.

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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3248-3253.

Kulik, E., Bickle, T. (1996). Regulation of the activity of the type IC EcoR124I restriction enzyme. *J Mol Biol* 264, 891-906.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lark, C., Arber, W. (1970). Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. 13. Breakdown of cellular DNA upon growth in ethionine of strains with r plus-15, r plus-P1 or r plus-N3 restriction phenotypes. *J Mol Biol* 52, 337-348.

Linn, S., Arber, W. (1968). Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*, X. In vitro restriction of phage fd replicative form. *Proc Natl Acad Sci U S A* 59, 1300-1306.

Loenen, W. A., Daniel, A. S., Braymer, H. D., Murray, N. E. (1987). Organization and sequence of the hsd genes of *Escherichia coli* K-12. *Journal Of Molecular Biology* 198, 159-170.

Luria, S. E. (1953). Host-induced modifications of viruses. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 18, 237-244.

Makovets, S., Doronina, V. A., Murray, N. E. (1999). Regulation of endonuclease activity by proteolysis prevents breakage of unmodified bacterial chromosomes by type I restriction enzymes. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 96, 9757-9762.

Makovets, S., Powell, L. M., Titheradge, A. J., Blakely, G. W., Murray, N. E. (2004). Is modification sufficient to protect a bacterial chromosome from a resident restriction endonuclease? *Mol Microbiol* 51, 135-147.

Mandel, M., Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53, 159-162.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982). *Molecular Clonig. A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.

Meisel, A., Mackeldanz, P., Bickle, T. A., Krüger, D. H., Schroeder, C. (1995). Type III restriction endonucleases translocate DNA in a reaction driven by recognition site-specific ATP hydrolysis. *Embo Journal* 14, 2958-2966.

Meselson, M., Yuan, R., Heywood, J. (1972). Restriction and modification of DNA. *Annual Review Of Biochemistry* 41, 447-466.

Minsky, A., Summers, R.G., Knowles, J.R. (1986). Secretion of beta-lactamase into the periplasm of *Escherichia coli*: evidence for a distinct release step associated with a conformational change. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 83, 4180-4184.

Murray, N. E. (2000). Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 412-434.

Nagaraja, V., Shepherd, J., Pripfl, T., Bickle, T. (1985a). Two type I restriction enzymes from *Salmonella* species. Purification and DNA recognition sequences. *J Mol Biol* 182, 579-587.

Nagaraja, V., Shepherd, J. C., Bickle, T. A. (1985b). A hybrid recognition sequence in a recombinant restriction enzyme and the evolution of DNA sequence specificity. *Nature* 316, 371-372.

Nestle, M., Roberts, W. K. (1969). An extracellular nuclease from *Serratia marcescens*. I. Purification and some properties of the enzyme. *Journal Of Biological Chemistry* 244, 5213-5218.

Pieper, U., Schweitzer, T., Groll, D. H., Gast, F. U., Pingoud, A. (1999). The GTP-binding domain of McrB: more than just a variation on a common theme? *J Mol Biol* 292, 547-556.

Powell, L. M., Lejeune, E., Hussain, F. S., Cronshaw, A. D., Kelly, S. M., Price, N. C., Dryden, D. T. (2003). Assembly of EcoKI DNA methyltransferase requires the C-terminal region of the HsdM modification subunit. *Biophys Chem* 103, 129-137.

Powell, L. M., Murray, N. E. (1995). S-adenosyl methionine alters the DNA contacts of the EcoKI methyltransferase. *Nucleic Acids Research* 23, 967-974.

Prakash-Cheng, A., Chung, S. S., Ryu, J. (1993). The expression and regulation of hsdK genes after conjugative transfer. *Molecular And General Genetics* 241, 491-496.

Prakash-Cheng, A., Ryu, J. (1993). Delayed expression of in vivo restriction activity following conjugal transfer of *Escherichia coli* hsdK (restriction-modification) genes. *Journal Of Bacteriology* 175, 4905-4906.

Price, C., Lingner, J., Bickle, T. A., Firman, K., Glover, S. W. (1989). Basis for changes in DNA recognition by the EcoR124 and EcoR124/3 type I DNA restriction and modification enzymes. *J Mol Biol* 205:115-125.

Price, C., Shepherd, J., Bickle, T. (1987). DNA recognition by a new family of type I restriction enzymes: a unique relationship between two different DNA specificities. *EMBO J* 6, 1493-1497.

Ravetch, J. V., Horiuchi, K., Zinder, N. D. (1978). Nucleotide sequence of the recognition site for the restriction-modification enzyme of *Escherichia coli* B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 2266-2270.

Roberts, R. J., Belfort, M., Bestor, T., Bhagwat, A. S., Bickle, T. A., Bitinaite, J., Blumenthal, R. M., Degtyarev, S., Dryden, D. T., Dybvig, K., *et al.* (2003). A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res* 31, 1805-1812.

Seidel, R., van Noort, J., van der Scheer, C., Bloom, J. G., Dekker, N. H., Dutta, C. F., Blundell, A., Robinson, T., Firman, K., Dekker, C. (2004). Real-time observation of DNA translocation by the type I restriction modification enzyme EcoR124I. *Nat Struct Mol Biol* 11, 838-843.

Sharp, P. M., Kelleher, J. E., Daniel, A. S., Cowan, G. M., Murray, N. E. (1992). Roles of selection and recombination in the evolution of type I restriction-modification systems in enterobacteria. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 89, 9836-9840.

Sistla, S., Rao, D. N. (2004). S-Adenosyl-L-methionine-dependent restriction enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 39, 1-19.

Smith, J. D., Arber, W., Kuhnlein, U. (1972). Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. XIV. The role of nucleotide methylation in *in vivo* B-specific modification. *J Mol Biol* 63, 1-8.

Studier, F., Bandyopadhyay, P. (1988). Model for how type I restriction enzymes select cleavage sites in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4677-4681.

Su, P., Im, H., Hsieh, H., Kang, A. S., Dunn, N. W. (1999). LlaFI, a type III restriction and modification system in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 65, 686-693.

Suri, B., Bickle, T. A. (1985). EcoA: the first member of a new family of type I restriction modification systems. Gene organization and enzymatic activities. *Journal Of Molecular Biology* 186, 77-85.

Tanaka, T., Weisblum, B. (1975). Systematic difference in the methylation of ribosomal ribonucleic acid from gram-positive and gram-negative bacteria. *Journal Of Bacteriology* 123, 771-774.

Taylor, I., Patel, J., Firman, K., Kneale, G. (1992). Purification and biochemical characterisation of the EcoR124 type I modification methylase. *Nucleic Acids Res* 20, 179-186.

Thorpe, P. H., Ternent, D., Murray, N. E. (1997). The specificity of sty SKI, a type I restriction enzyme, implies a structure with rotational symmetry. *Nucleic Acids Research* 25, 1694-1700.

Titheradge, A. J., King, J., Ryu, J., Murray, N. E. (2001). Families of restriction enzymes: an analysis prompted by molecular and genetic data for type ID restriction and modification systems. *Nucleic Acids Res* 29, 4195-4205.

Titheradge, A. J., Ternent, D., Murray, N. E. (1996). A third family of allelic hsd genes in *Salmonella enterica*: sequence comparisons with related proteins identify conserved regions implicated in restriction of DNA [published erratum appears in *Mol Microbiol* 1997 Feb;23(4):851]. *Molecular Microbiology* 22, 437-447.

Vejsadová Š.,(2004) Analýza mutací v rozpoznávací podjednotce HsdS restriktivně-modifikačního enzymu EcoR124I ovlivňující vazbu podjednotek. Disertační práce.VŠCHT, Praha.

Weiserova, M., Dutta, C. F., Firman, K. (2000). A Novel Mutant of the Type I Restriction-Modification Enzyme EcoR124I is Altered at a Key Stage of the Subunit Assembly Pathway. *J Mol Biol* 304, 301-310.

Weiserova, M., Firman, K. (1998). Isolation of a non-classical mutant of the DNA recognition subunit of the type I restriction endonuclease R.EcoR124I. *Biol Chem* 379, 585-589.

Weiserova, M., Janscak, P., Benada, O., Hubáček, J., Zinkevich, V. E., Glover, S. W., Firman, K. (1993). Cloning, production and characterisation of wild type and mutant forms of the R.EcoK endonucleases [published erratum appears in *Nucleic Acids Res* 1993 Apr 11;21(7):1686]. *Nucleic Acids Research* 21, 373-379.

Weiserova, M., Janscak, P., Zinkevich, V., Hubacek, J. (1994). Overproduction of the Hsd subunits leads to the loss of temperature-sensitive restriction and modification phenotype. *Folia Microbiol (Praha)* 39, 452-458.

Wilson, G. G., Murray, N. E. (1991). Restriction and modification systems. *Annual Review Of Genetics* 25, 585-627.

Yuan, R. (1981). Structure and mechanism of multifunctional restriction endonucleases. *Annu Rev Biochem* 50, 285-319.

Yuan, R., Hamilton, D. L., Hadi, S. M., Bickle, T. A. (1980). Role of ATP in the cleavage mechanism of the EcoP15 restriction endonuclease. *Journal Of Molecular Biology* 144, 501-519.

Yuan, R., Heywood, J., Meselson, M. (1972). ATP hydrolysis by restriction endonuclease from *E. coli* K. *Nature New Biology* 240, 42-43.

Zinkevich, V., Heslop, P., Glover, S., Weiserova, M., Hubacek, J., Firman, K. (1992). Mutation in the specificity polypeptide of the type I restriction endonuclease R.EcoK that affects subunit assembly [published erratum appears in J Mol Biol 1993 Apr 20;230(4):1321]. J Mol Biol 227, 597-601.