

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2010

Eva Tomašíková

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



Studium aktivity restričních enzymů typu I

Diplomová práce

Eva Tomašíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2010

Vedoucí práce: Ing. Eva Cséfalvay, Ph.D.

Odborný konzultant: Ing. Ladislav Cséfalvay

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala sama s použitím literatury citované v závěru.

V Olomouci dne 11. 5. 2010

.....

Souhrn

Restrikčně-modifikační systémy typu I jsou enzymatické komplexy přítomné v mnoha bakteriálních druzích, kde slouží jako součást jejich obranného systému. Tyto enzymy se skládají ze tří různých podjednotek, HsdS, HsdM a HsdR. Rozpoznávají specifickou nemodifikovanou sekvenci na DNA. DNA je translokována skrze enzymový komplex pomocí energie získané z hydrolýzy ATP, zatímco enzym zůstává pevně vázán v rozpoznávacím místě. V momentě, kdy je translokace zastavena, dojde ke štěpení dvouvláknové DNA v nesespecifickém místě vzdáleném od rozpoznávací sekvence. Pro translokační a endonukleázovou aktivitu má zásadní význam HsdR podjednotka, která se skládá z jedné endonukleázové, dvou helikázových a jedné helikální domény. První známá krystalová struktura HsdR podjednotky byla popsána u enzymu EcoR124I. Znalost této struktury mimo jiné odhaluje neobvyklé zapojení endonukleázové domény do vazby ATP, které je u helikáz vázáno výhradně helikázovými doménami. Tato vazba, které se účastní Lysin 220 na endonukleázové doméně, s největší pravděpodobností hraje důležitou roli ve spřažení translokační a restrikční aktivity. Biochemickými testy bylo zjištěno, že změna této vazby výrazně ovlivňuje endonukleázovou aktivitu při zachování plné ATPázové aktivity.

Abychom zjistili všeobecnou platnost těchto poznatků byl, vzhledem k malé sekvenční podobnosti této oblasti mezi jednotlivými zástupci endonukleáz typu I, testován vliv mutace analogového lysinu na ATPázovou aktivitu u HsdR podjednotky enzymu EcoAI, restrikčního enzymu typu IB. Pro tyto testy byly použity mutanty s lysinem (kladný náboj) substituovaným aminokyselinami argininem (kladný náboj), alaninem (neutrální) a glutamovou kyselinou (záporný náboj). Bylo zjištěno, že u všech uvedených mutací je ATPázová aktivita zachovaná, stejně jako u enzymu EcoR124I (typ IC).

Klíčová slova: restrikčně-modifikační systému typu I, EcoAI, HsdR podjednotka, translokační aktivita, ATPázová aktivita

Summary

The type I restriction-modification systems are enzymatic complexes, which are present in several bacterial species. They are involved in the protection of bacteria against bacteriophage attack. These enzymes consist of three different subunits – HsdS, HsdM and HsdR. They recognize an unmodified specific DNA sequence. The DNA is translocated through the stationary enzyme complex while tightly bound at the recognition site. Translocation relies on energy gained by hydrolysis of ATP. When translocation is stalled, DNA is cleaved in a nonspecific site far from the recognition sequence. The HsdR subunit which consists of one endonuclease, two helicase and one helical domain plays a major role in translocation and endonuclease activities. The first described crystal structure was the HsdR subunit of the EcoR124I. This structure unexpectedly revealed a contribution of the endonuclease domain to ATP binding, which is in helicases bound only by the two helicase domains. This contact through Lysine 220 residue is probably important for coupling endonuclease and translocase functions. Substitution of this contact does alter the endonuclease activity while retaining full ATPase activity.

As the Lysine containing region is of low sequence similarity between different endonucleases, to support the general validity of this finding the influence of mutations of potential analogous lysine in the HsdR subunit of the enzyme EcoAI from IB family on the ATPase activity was tested. Mutants with lysine residues (positive) changed to arginine (positive), alanine (neutral) or glutamic acid (negative) were used. We found out that all of these mutations do retain full ATPase activity which is in agreement with the EcoR124I.

Keywords: type I restriction-modification systems, EcoAI enzyme, HsdR subunit, restriction activity, ATPase activity

Poděkování:

Děkuji své školitelce, Ing. Evě Cséfalvay, Ph.D.za cenné rady a připomínky a Ing. Ladislavu Cséfalvay za odbornou pomoc při provádění experimentů.

Obsah

1	Úvod	1
2	Současný stav řešené problematiky	3
2.1	Restrikčně-modifikační systémy	3
2.2	R-M typu I	4
2.2.1	Obecná charakteristika	4
2.2.2	HsdS podjednotka.....	6
2.2.3	HsdM podjednotka	7
2.2.4	HsdR podjednotka	8
2.3	Enzymová aktivita R-M typu I.....	13
2.3.1	Všeobecný popis.....	13
2.3.2	Průběh iniciace translokace	13
2.3.3	Molekulární mechanismus translokace	14
2.3.4	Blokace v translokaci.....	16
2.3.5	Endonukleázová aktivita.....	17
3	Cíle práce.....	20
4	Materiál a metody	21
4.1.1	Bakteriální kmeny	21
4.1.2	Použité plazmidy	21
4.1.3	Mutace HsdR podjednotky EcoAI.....	21
4.1.4	Expresse proteinu a purifikace	23
4.1.5	Restrikční reakce	24
4.1.6	Test ATPázové aktivity	25
5	Výsledky.....	27

5.1	Příprava expresních systémů pro přípravu mutantních HsdR podjednotek	27
5.2	Exprese a purifikace HsdR podjednotky EcoAI.....	27
5.3	Restrikční reakce	32
5.4	Test ATPázové aktivity	33
6	Diskuze	41
7	Závěr	43
8	Seznam použitých zkratk	44
9	Použitá literatura.....	46
10	Přílohy	53

1 Úvod

Restriktivně-modifikační systémy jsou enzymatické komplexy, které byly popsány v řadě bakterií. Chrání bakterie před vnikem cizorodé DNA do buňky tak, že methylují vlastní DNA a štěpí cizorodou nemodifikovanou DNA. V současné době jsou známy čtyři typy restriktivně-modifikačních systémů, rozlišované na základě své skladby a kofaktorů které vyžadují. Nejznámějšími restriktivně-modifikačními systémy jsou restriktivně-modifikační systémy typu II široce využívané v molekulární biologii v technologiích rekombinantní DNA. Tato diplomová práce se zabývá restriktivně-modifikačními systémy typu I (Murray, 2000).

Restriktivně-modifikační systémy typu I (R-M typu I) jsou enzymatické komplexy složené z pěti podjednotek – jedné specifické (HsdS), dvou modifikačních (HsdM) a dvou restriktivních (HsdR). HsdS podjednotka je odpovědná za rozpoznání cílové sekvence DNA. HsdM podjednotka poté zjišťuje, zda cílová sekvence DNA je či není modifikována. Dohromady tvoří tyto podjednotky samostatný enzym DNA-methyltransferázu. Po připojení HsdR podjednotek je sestavena endonukleáza a pokud není DNA modifikována, dochází k její translokaci skrze enzymatický komplex a náhodnému štěpení DNA mimo rozpoznávací sekvenci (Murray, 2000).

HsdR podjednotka je největší z celého komplexu a sestává ze čtyř globulárních domén – endonukleázové, dvou helikázových a helikální domény. Endonukleázová doména zahrnuje Region X klasifikovatelný jako část PD-(E/D)xK rodiny. V Regionu X se nachází katalytické místo pro endonukleázovou aktivitu, v jehož centru jsou přítomny tři aminokyselinové zbytky, které jsou za tuto aktivitu zodpovědné. Jedná se o kyselinu asparagovou, kyselinu glutamovou a lysin (Lapkouski *et al.*, 2009). Dvě helikázové domény obsahují sedm DEAD-box motivů klasických pro helikázy z rodiny SF2, které jsou důležité pro vazbu a hydrolýzu ATP a s ní související DNA translokaci. Helikální doména má pravděpodobně vazebnou funkci.

Molekulární mechanismus translokace dvouvláknové DNA (dsDNA), štěpení DNA a hydrolýzy ATP není zatím objasněn. V současnosti je známa krystalová struktura HsdR podjednotky enzymu EcoR124I, první u R-M typu I. Struktura odhaluje interakci Lys220 endonukleázové domény s ATP, ačkoliv doposud byla známa pouze interakce ATP s helikázovými doménami. Tento aminokyselinový zbytek tak pravděpodobně propojuje endonukleázovou a helikázovou aktivitu HsdR podjednotky (Lapkouski *et al.*, 2009).

Teoretická část diplomové práce je zaměřena na popis restriktivně-modifikačních systémů, informaci o jejich skladbě a funkci. Popsány jsou také konzervované aminokyselinové zbytky nezbytné pro aktivitu restriktivně-modifikačních systémů typu I. V experimentální části bude u enzymu EcoAI, který náleží do IB rodiny R-M typu I, testován vliv substituce lysinu, který na základě porovnání primární a sekundární struktury s HsdR podjednotkou EcoR124I zprostředkovává vazbu endonukleázové domény a ATP, na hydrolýzu ATP a s ní spojenou translokaci DNA. Lysin bude nahrazen aminokyselinami argininem, glutamovou kyselinou a nebo alaninem. Wt („wild-type“) a mutantní HsdR podjednotky budou exprimovány v bakterii *Escherichia coli*, kmenu JM109(DE3) a purifikovány pomocí kapalinové chromatografie. Po *in vitro* rekonstituci jednotlivých enzymových komplexu bude testována jejich ATPázová aktivita na DNA substrátu s jedním rozpoznávacím místem pro EcoAI. Na základě výsledků ATPázové aktivity bude stanoven vliv příslušných mutací na translokační aktivitu tohoto enzymu.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Restrikčně-modifikační systémy

Restrikčně-modifikační systémy (R-M) byly identifikovány v mnoha bakteriálních druzích. Tyto enzymové systémy chrání bakterie před vnikem cizorodé DNA do buňky. První klasické R-M systémy objevili Bertani *et* Weigle (1953) u bakterie *Escherichia coli* (*E. coli*) kmenů K12 a B.

Známe čtyři typy restrikčně-modifikačních systémů, které rozlišujeme na základě skladby enzymu, vyžadovaných kofaktorů, charakteru rozpoznávací sekvence a pozice místa, kde je štěpena DNA (v tab. 2.1 charakteristika restrikčně-modifikačních systémů).

R-M typu I jsou nejvíce komplexní, sestávající ze tří podjednotek v různém zastoupení. Tyto enzymy jsou multifunkční, katalyzují jak modifikaci, tak restrikci DNA. Pro restrikci vyžadují hydrolýzu ATP, jako kofaktory pak S-adenosylmethionin (AdoMet) a Mg^{2+} . DNA štěpí mimo rozpoznávací sekvenci, která je asymetrická (přehledně zpracováno v Bickle *et* Krüger, 1993). R-M typu I je věnována celá diplomová práce.

R-M typu II jsou strukturně jednoduché enzymy, které plní zvlášť restrikční a modifikační funkce. Jako kofaktor vyžadují pouze Mg^{2+} , i když některé mohou mít i další specifické požadavky. DNA štěpí přímo v rozpoznávací sekvenci, ta je symetrická. Na štěpených koncích zanechávají 5'-fosfáty a 3'-hydroxyly, díky čemuž jsou využívány v technologiích rekombinantní DNA. Náleží sem např. enzymy EcoRI a HindIII (Roberts *et al.*, 2003).

R-M typu III jsou restrikční enzymy sestávající ze dvou podjednotek, jedna má DNA-rozpoznávací a methylační funkci, druhá funkci restrikční. Štěpení probíhá pouze v případě, že je restrikční podjednotka v komplexu s podjednotkou methylační. Restrikce vyžaduje ATP a S-adenosylmethionin jako kofaktor. Ke štěpení DNA musí enzym interagovat se dvěma nepalindromickými rozpoznávacími sekvencemi, které jsou v obrácené orientaci. Nejznámějšími jsou EcoP1I a EcoP15I (Roberts *et al.*, 2003).

R-M typu IV jsou restrikční enzymy, které sestávají ze dvou rozdílných podjednotek. Enzym má endonukleázovou a translokázovou aktivitu, pro než vyžadují hydrolýzu GTP (guanosin trifosfát). Jako kofaktor slouží Mg^{2+} . Štěpí pouze modifikovanou DNA, která může

být methylována, hydroxylmethylována nebo glukosyl-hydroxylmethylována. Rozpoznávací sekvence je dvojdílná, rozpoznávají purinovou bázi následovanou modifikovaným cytosinem. Nejlépe prostudovaným enzymem z této třídy je enzym EcoKMcrcBC z *E. coli* (Roberts *et al.*, 2003).

Tab. 2.1: **Typy restriktivně-modifikačních systémů** (převzato z Sistla *et Rao*, 2004)

Typy restriktivně-modifikačních enzymů				
Vlastnost	Typ I	Typ II	Typ III	Typ IV
Strukturní				
Podjednotky	3 rozdílné	2 shodné	2 rozdílné	2 rozdílné
Enzymatická aktivita	Endonukleáza, methyltransferáza, ATPáza	Endonukleáza nebo methyltransferáza	Endonukleáza, methyltransferáza, ATPáza	Endonukleáza, GTPáza
Biochemická				
Kofaktory nezbytné pro štěpení DNA	ATP, AdoMet, Mg ²⁺	Mg ²⁺	ATP, Mg ²⁺ (AdoMet)	Mg ²⁺ , GTP
Methylace	AdoMet, Mg ²⁺	AdoMet	AdoMet, Mg ²⁺	-
Rozpoznávací sekvence	Asymetrická, dvojdílná	Obvykle symetrická	Asymetrická	Dvojdílná, methylována
Místo štěpení	Náhodné, nejméně 1000 bp od rozpoznávacího místa	Přímo v rozpoznávacím místě nebo poblíž	25 – 27 bp od rozpoznávacího místa	Mezi methylovanými bázemi v různých pozicích
Translokace DNA	Ano	Ne	Ano	Ano

2.2 R-M typu I

2.2.1 Obecná charakteristika

Jak již bylo řečeno, R-M typu I jsou multifunkční enzymy, které mohou fungovat jako DNA methyltransferáza (Mtáza), DNA-dependentní ATPáza, DNA-translokáza a restriktivní endonukleáza. AdoMet slouží jako kofaktor a při methylaci jako donor methylové skupiny. Endonukleázová aktivita vyžaduje ATP, AdoMet a Mg²⁺. Typická nukleotidová sekvence, kterou rozpoznávají, je asymetrická a zahrnuje 2 složky – první je 3 až 4 bází dlouhá, druhá 4 až 5 bází dlouhá a tyto dvě jsou odděleny nespecifickým mezerníkem o velikosti 6 až 8 bází. R-M typu I se váží ke své rozpoznávací sekvenci a v závislosti na methylovaném stavu cílové sekvence vykazují buď modifikační nebo restriktivní aktivitu. Pokud je cílová sekvence hemimethylována, dochází k methylaci druhého vlákna řetězce. Jestliže sekvence

methylována není, je rozpoznána jako cizorodá a dochází k její translokaci skrz enzym a k restrikci (přehledně zpracováno v Murray, 2001).

R-M typu I sestávají ze tří podjednotek – HsdS (S), HsdM (M) a HsdR (R), přičemž podjednotky HsdS a HsdM tvoří dohromady DNA-methyltransferázu (Mtázu), která rozpoznává cílovou sekvenci DNA, stav modifikace a případně methyluje adenin v DNA. Pokud jsou pohromadě i s HsdR podjednotkou, tak na základě methylovaného stavu DNA dochází k translokaci a restrikci nemethylované DNA. Symbol *hsd* („host specificity for DNA“) se používá také obecně pro geny kódující jednotlivé podjednotky (přehledně zpracováno v Murray, 2001).

R-M typu I jsou rozděleny na základě komplementačních testů, DNA-DNA hybridizace, proteinové homologie a křížové reaktivitě protilátek do několika genových rodin (IA – např. EcoKI, IB – EcoAI, IC – EcoR124I, ID – StySBLI, IE – KpnBI). Do všech z nich patří velké enzymatické komplexy o molekulové váze 400 až 500 kDa. Zástupci jedné rodiny mají značnou podobnost v podjednotkách HsdR a HsdM, ale jinou strukturu a specifitu podjednotky HsdS (Chin *et al.*, 2004) (Tab. 2.2).

Tab. 2.2: **Rodiny restrikčních systémů typu I** (převzato z Sistla *et Rao*, 2004). V tabulce jsou zástupci jednotlivých rodin s rozpoznávací sekvencí a charakteristickými vlastnostmi

Typy R-M typu I					
Rodina	Členové	Enzym / rozpoznávací sekvence		Charakteristická vlastnost	
A	<i>E.coli</i> , <i>Klebsiella</i> sp., <i>Salmonella</i> sp.	EcoKI	AAC(N) ₆ GTGC	Gen na chromozomu, alelický	
		StySBI	GAG(N) ₆ RTAYG		
		EcoID	TTA(N) ₆ GTCY		
B	<i>E. coli</i> , <i>C. freundii</i>	EcoAI	GAG(N) ₇ GTCA	Gen na chromozomu, alelický	
		CfrAI	GCA(N) ₆ GTGG		
		StySKI	CGAT(N) ₇ GTTA		
C	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> sp., <i>Neisseria</i> sp.	EcoR124I	AA(N) ₆ RTCG	Na konjugativním plazmidu (u <i>E. coli</i>), nealelický	
		EcoR124/3I	GAA(N) ₇ RTCG		
		EcoDXXI	TCA(N) ₇ RTTC		
D	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> sp., <i>Salmonella</i> sp.	NgoAV	GCA(N) ₈ TGC		
		StySBLI	CGA(N) ₆ TACC		
		KpnAI	GAA(N) ₆ TGCC		
		EcoR9I			
E	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	LldI		Gen na chromozomu	
		KpnBI	CAAA(N) ₆ RTCA		

2.2.2 HsdS podjednotka

HsdS podjednotka restriktivně-modifikačních systémů typu I odpovídá za rozpoznání cílové sekvence DNA a navázání na ni. Je kódována genem *hsdS* a sestává z variabilní a strukturně konzervované oblasti.

Variabilní region je hlavní komponenta podléjící se na rozpoznání dvojdielné asymetrické cílové sekvence DNA. Analýzou hybridních *hsdS* genů bylo prokázáno, že variabilní region kóduje dvě cílová rozpoznávací místa („target recognition domain“, TRD). Každá TRD doména je složena z přibližně 150 aminokyselin. N-koncová TRD interaguje s třemi či čtyřmi nukleotidy (nt) na 5' vlákně cílového místa, C-koncová TRD s čtyřmi až pěti nt na 3' vlákně cílového místa DNA. Tato dvě místa jsou oddělena nesespecifickým mezerníkem o délce 6 až 8 nukleotidů. Obě TRD se na DNA váží nezávisle na sobě, díky čemuž je možný vznik nových hybridních variant (O'Neill, 1998). Sturrock *et Dryden* (1997) prokázali na základě porovnání homologických sekvencí v TRD a predikce sekundární struktury, že k interakcím protein-DNA dochází v místě TRD, kde se nachází motiv smyčka- β list-smyčka interagující s větším žlábkem dvoušroubovice, mezi 84. a 121. aminokyselinou TRD. Stejný motiv mezi aminokyselinami 80 až 110 TRD později identifikovali pomocí náhodné mutagenese i O'Neill *et al.* (1998). TRD mohou být snadno změněny za jiné TRD a poté enzym rozpoznává novou DNA-rozpoznávací sekvenci (O'Neill *et al.*, 1998).

Konzervované domény mají pravděpodobně dvě funkce – udržují pozici TRD a zajišťují asociace podjednotky HsdS s ostatními složkami restriktivně-modifikačního systému (přehledně zpracováno v Murray, 2000). Změny v konzervované oblasti genu odpovídající za specifitu podjednotky nemají vliv na rozpoznání sekvence, pokud nejsou spojeny i se změnami ve variabilní oblasti, respektive TRD (Cowen *et al.*, 1989). Kromě těchto oblastí, které jsou konzervované v rámci všech R-M typu I, se v HsdS nacházejí i oblasti konzervované v rámci každé HsdS podjednotky. Weiserova *et Firman* (1998) prokázali na základě experimentů se zkrácenými polypeptidy enzymu EcoR124I, že konzervované oblasti mají hlavní úlohu ve vazbě HsdS s HsdM i přesto, že nejde přímo o místa, kde dochází k interakcím těchto dvou podjednotek.

V celkové struktuře HsdS podjednotky jsou N- a C-konec u sebe a celá je uspořádána do kruhu (přehledně zpracováno v Kneale, 1994). Kruhovou strukturu potvrdili svými

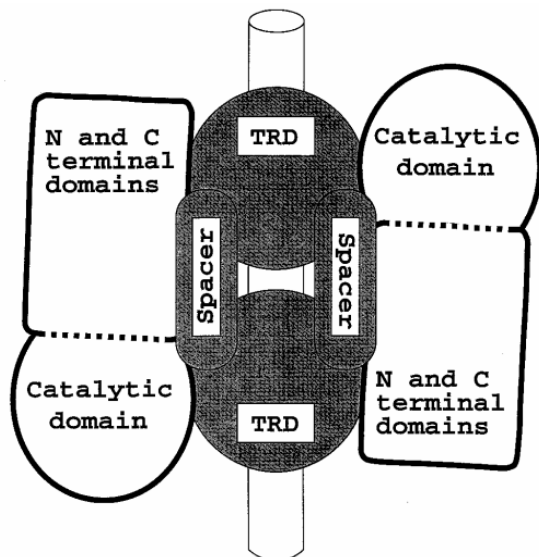
experimenty i Janscak *et Bickle* (1998a). HsdS podjednotka váže jednu HsdM podjednotku na přibližný N- a C-konec a druhou HsdM podjednotku na centrální konzervovanou oblast (Janscak *et Bickle*, 1998a). Kim *et al.*, (2005) analyzovali první krystalovou strukturu HsdS podjednotky MjaXIP a Calisto *et al.*, (2005) MgeORF438 a potvrdili její kruhový charakter a blízkost N- a C-konce.

2.2.3 HsdM podjednotka

Hlavní funkcí HsdM podjednotky je určení methylovaného stavu cílové sekvence a její případná methylace za přítomnosti kofaktoru S-adenosylmethioninu (AdoMet). Je kódována genem *hsdM*, v rámci genové rodiny je poměrně geneticky konzervovaná. HsdM katalyzuje přenos methylové skupiny z AdoMet na N6 pozici specifického adeninu pravděpodobně rotací bází, kdy cílová báze je otočena o 180° mimo DNA helix do katalytického místa enzymu (Mernagh *et al.*, 1998). HsdM podjednotka obsahuje motivy charakteristické pro všechny adeninové methyltransferázy. Zahrnuje motiv I (D/E/SXFXGXG) zodpovědný za vazbu AdoMet, motiv IV (N/DPPF/Y/W), který je zapojen v katalýze reakce (Willcock *et al.*, 1994). C-konec podjednotky se váže na HsdS. Heterodimer M₁S₁ může vázat DNA, ale teprve po asociaci druhé HsdM podjednotky má komplex methyltransferázovou aktivitu (Janscak *et al.*, 1998b).

Enzymy z jednotlivých genových rodin se liší v preferenci stavu methylace cílové DNA. EcoAI, zástupce IB skupiny, nevykazuje téměř žádnou afinitu k hemimethylované DNA, stejně jako je tomu u většiny dalších methyltransferáz. Enzymy z IA a IC skupiny mají naopak velmi silnou preferenci hemimethylovaných substrátů (přehledně zpracováno v Murray, 2000). Powell *et al.* (1998) prokázali, že u EcoKI nemá methylovaný stav cílové sekvence žádný vliv na vazbu enzymu, z čehož je zřejmé, že preference k methylovanému či nemethylovanému DNA substrátu jsou závislé především na míře katalýzy. Dryden *et al.* (1995) pozorovali, že přidáním AdoMet se efektivita vazby protein-DNA výrazně zvýšila, v jeho nepřítomnosti měl enzym tendenci disociovat na neúplnou formu s jednou HsdM i HsdS podjednotkou. Autoři dále zjistili, že taková Mtáza zaujímá na DNA stejnou plochu jako kompletní Mtáza. HsdM je tedy lokalizována na HsdS mimo helikální osu DNA a obsahuje katalytickou doménu, která vstupuje do menšího žlábků DNA v místech, kde má dojít k methylaci. Mernagh *et al.* (1996) prokázali, že Mtáza EcoKI (M.EcoKI) a EcoR124I (M.EcoR124I) interaguje s DNA v jejím větším žlábků. Vazba

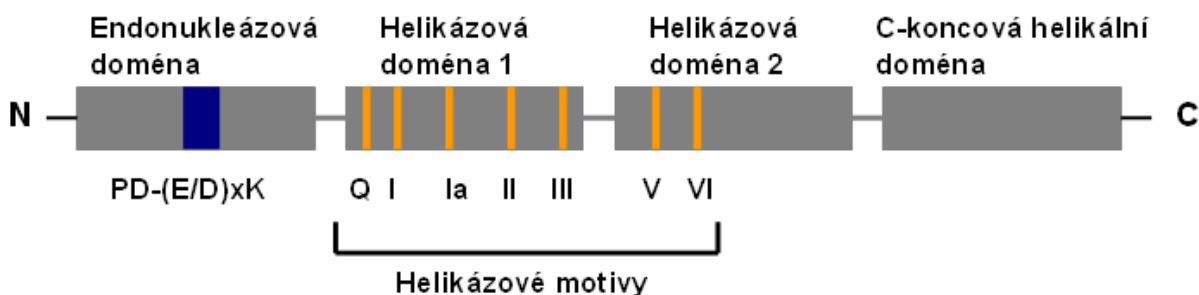
enzymu způsobuje konformační změnu v cukr-fosfátové páteři DNA okolo bází, které jsou cílem methylace, poté se adeninové zbytky obrátí směrem ven z DNA tak, aby byla umožněna jejich methylace (Mernagh *et al.*, 1996). Model vazby methyltransferázy R-M typu I s DNA je na obrázku 2.1.



Obr. 2.1: **Model vazby Mtázy na DNA.** HsdS (tmavě šedá) leží podél helikální osy DNA (bílý válec). HsdS sestává ze dvou TRD, z nichž každá rozpoznává jednu část dvojité rozpoznávací sekvence. Odděleny jsou nesespecifickým mezerníkem („spacer“). HsdM (bílá) jsou umístěny na obou stranách HsdS a obklopují ji. Katalytická doména HsdM („catalytic domain“) je spojena s TRD (převzato z Powell *et al.*, 1998)

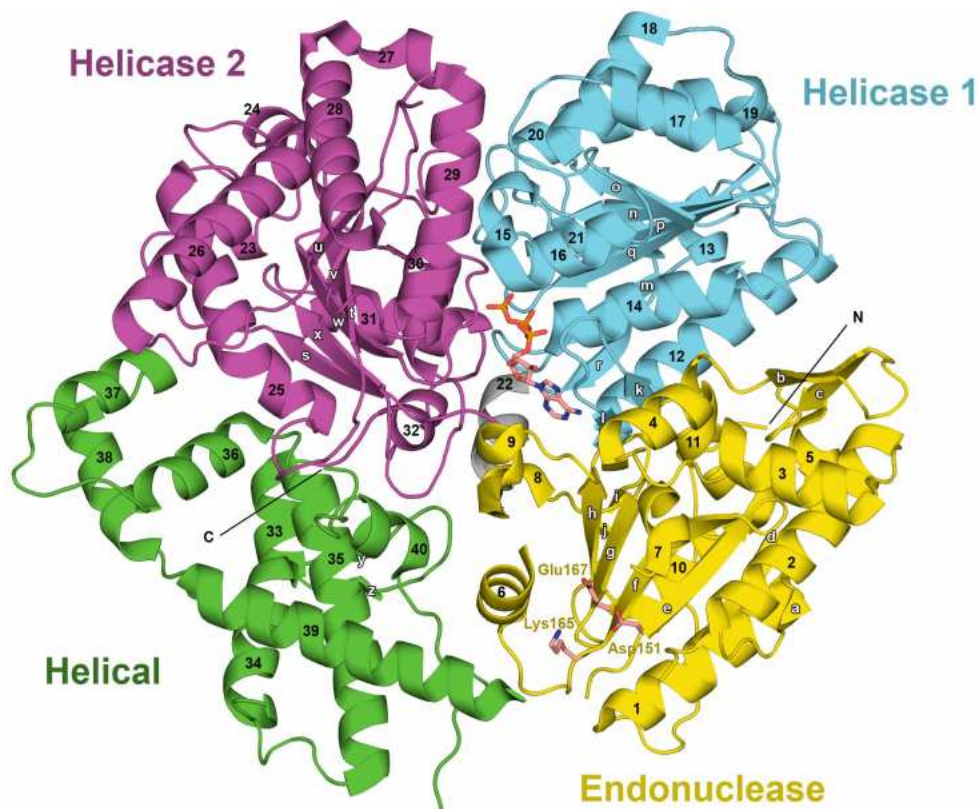
2.2.4 HsdR podjednotka

HsdR podjednotka R-M typu I je nezbytná pro štěpení DNA, má ATPázovou, translokační a endonukleázovou aktivitu. Je kódována genem *hsdR*, který v rámci celé rodiny R-M typu I vykazuje pouze 20% identitu. Gelová filtrace prokázala, že v roztoku je HsdR podjednotka přítomna jako monomer (Zinkevich *et al.*, 1997).



Obr. 2.2: **Domény a motivy HsdR podjednotky R-M typu I.** Jednotlivé domény jsou znázorněny jako šedé obdélníky. Modrý obdélník znázorňuje Region X obsahující Glu, Asp a Lys, tvořící místo s endonukleázovou aktivitou. Oranžové obdélníky znázorňují jednotlivé helikázové motivy (převzato z Powell *et al.*, 1998, upraveno)

HsdR podjednotka je tvořena čtyřmi téměř stejně velkými globulárními doménami. Tyto domény se podobají již známým doménám motorových podjednotek (obr. 2.2). Struktura je nejpřesněji popsána u HsdR podjednotky EcoR124I, jejíž celková délka je 1038 aminokyselin. N-terminální doména, tvořená aminokyselinami 13–260 je podobná endonukleázové doméně, která se vyskytuje u ostatních restriktivně-modifikačních enzymů. Druhá a třetí doména mezi zbytky 261–461 a 470–731 vykazuje podobnosti s RecA-like helikázovými doménami 1 a 2. Čtvrtá, C-koncová helikální doména, se nachází mezi aminokyselinami 732–892. Mezi každým párem domén se nacházejí nápadné žlábký (Lapkouski *et al.*, 2008). Na obr. 2.3 je zřejmé, jak dvě helikázové domény tvoří helikázovou štěrbinu, podobnou té, které se vyskytují u helikáz a translokáz (Durr *et al.*, 2005).

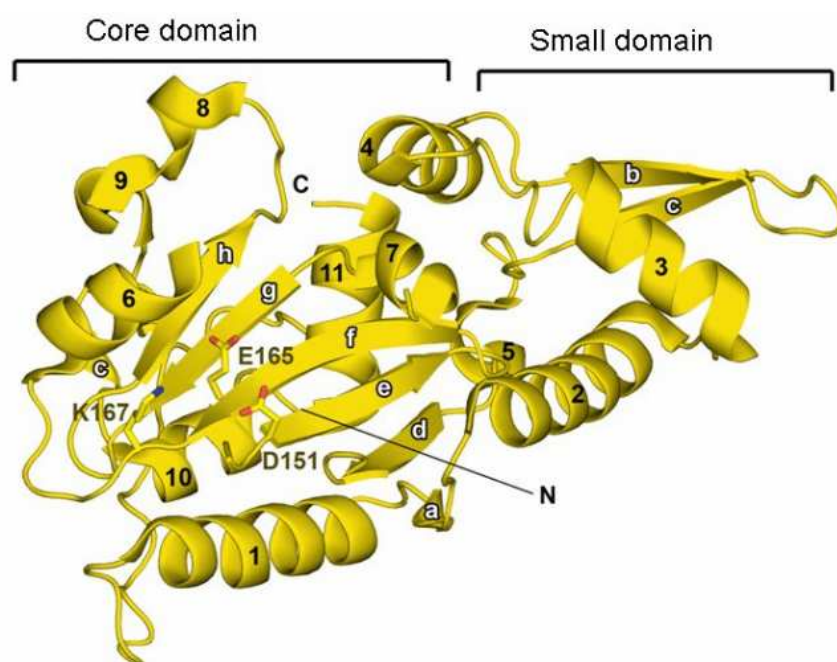


Obr. 2.3: **Struktura HsdR podjednotky EcoR124I.** Od C- k N- konci jsou α -helixy číslovány 1–40 (černé číslice) a β -listy a–z (bílá písmenka). ATP a aminokyseliny v aktivním místě endonukleázového motivu tyčinkovými modely (Lapkouski *et al.*, 2009)

Endonukleázová doména HsdR podjednotky je tvořena konzervovaným strukturálním jádrem $\alpha\beta$, typickým i pro endonukleázové podjednotky R-M typu II a dále subdoménou,

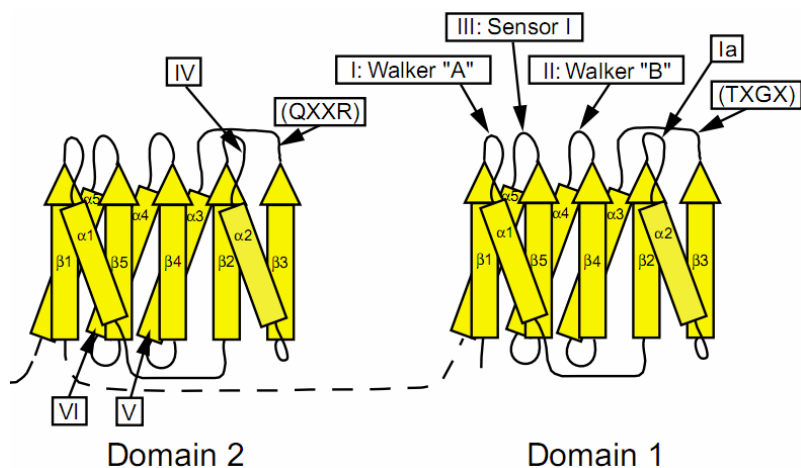
jejíž funkce prozatím nebyla zjištěna (Niv *et al.*, 2007, Lapkouski *et al.*, 2009). V konzervovaném strukturním jádru je přítomen Region X, který může být klasifikován jako část PD-(E/D)xK rodiny. Ta zahrnuje jak R-M systémy typu I–III, tak velkou část opravných a rekombinačních nukleáz (Sisakova *et al.*, 2008).

V Regionu X se nachází katalytické místo pro endonukleázovou aktivitu, které je tvořeno třemi aminokyselinovými zbytky – Asp (151 u EcoR124I, 61 u EcoAI), Glu (165 u EcoR124I, 76 u EcoAI) a Lys (167 u EcoR124I, 78 u EcoAI, vychází z alignmentu sekundární struktury, v příloze) (Lapkouski *et al.*, 2009; Janscak *et al.*, 1999; Davies *et al.*, 1999). V helixu 6 endonukleázové domény je přítomen konzervovaný motiv QxxxY (Gln179 u EcoR124I, Gln90 u EcoAI; Tyr183 u EcoR124I, Tyr94 u EcoAI), který nemá významný vliv pro štěpení DNA, ale pravděpodobně se podílí na stabilizaci katalytické domény na DNA (Sisakova *et al.*, 2008b). Struktura endonukleázové domény HsdR EcoR124I na obr. 2.4.



Obr. 2.4: **Struktura endonukleázové domény.** Doménu lze rozdělit na dvě části, konzervovanou centrální doménu obsahující PD-(D/E)xK motiv a menší doménu jejíž funkce zatím není známa (Lapkouski *et al.*, 2008)

Helikázové domény 1 a 2 u HsdR obsahují RecA-like doménu (obr. 2.5) složenou ze sedmi DEAD-box motivů konzervovaných v rámci všech helikáz. Obě domény mají přibližně stejnou strukturu a dohromady tvoří vzhledem ke své podobnosti téměř homodimer, který váže jednu molekulu ATP. Vazbu ATP zprostředkovávají klasické „Walker A“ (fosfát-vazebná smyčka) a „Walker B“ (Mg^{2+} -vázající asparagovou kyselinu) domény (Caruthers *et McKay*, 2002).

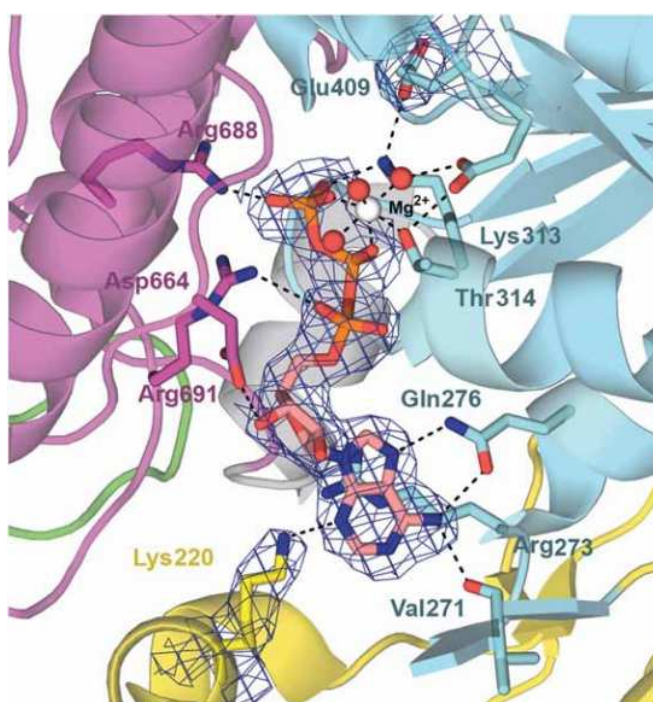


Obr. 2.5: Schematické znázornění RecA-like domény helikáz (převzato z Caruthers *et McKay*, 2002)

První krystalová struktura byla popsána u SF1 helikázy PcrA bakterie *Bacillus stearothermophilus*. Obsahuje 4 významné domény, 1A, 1B, 2A, 2B. Domény 1A a 2A jsou tvořeny sedmi DEAD-box motivy, uplatňujícími se při hydrolýze ATP. Velankar *et al.* (1999) studovali strukturu PcrA v komplexu s DNA a zjistili, že ssDNA (jednovláknová DNA) řetězec DNA substrátu se váže na vrchol 1A a 2A domén a dvojitý úsek substrátu se váže podél domény 2B. Domény 1A a 2A jsou přítomny i u rekombinačního enzymu RecA u *E. coli* a shodně obsahují všech sedm helikázových motivů a také NTP-vazebné místo, které je vytvořeno mezi nimi. Porovnáním struktur jednotlivých typů helikáz bylo zjištěno, že HsdR náleží do skupiny SF2 helikáz, která zahrnuje jak enzymy rozplétající dsDNA, tak enzymy, které mohou translokovat dsDNA. EcoR124I translokuje dsDNA bez nutnosti jejího rozplétání ve směru 3'–5' (Stanley *et al.*, 2006). Helikázová štěrbinu HsdR podjednotky obsahuje motivy Ia, Ib, Ic a II domény 1 a motiv IVa domény 2 v podobném uspořádání, jako ostatní SF2 helikázy (Durr *et al.*, 2005). Do této štěrbinu je vázána dsDNA a každá

helikázová doména HsdR je pravděpodobně v kontaktu s jedním vláknem molekuly DNA. Doména 1 může kontaktovat vlákno DNA ve směru 5′–3′, doména 2 zprostředkovává kontakty s 3′–5′ vláknem přes motiv IVa (Lapkouski *et al.*, 2008).

Lys220 EcoR124I (u EcoAI Lys126 nebo Lys142) váže ATP v helikázové doméně a pravděpodobně propojuje endonukleázovou a helikázovou aktivitu (Lapkouski *et al.*, 2009). Adenin z ATP je připojen k Arg273 a je obklopen dalšími zbytky z Q-motivu. Glu409 z DEAD-box motivu je také připojena k ATP. Narozdíl od běžných helikáz je karboxylace Glu409 pozměněna interakcí s Lys313, která umožňuje menší změnu vazebného úhlu Glu409 k ATP (Lapkouski *et al.*, 2008, obr. 2.6).



Obr. 2.6: **Vazba ATP mezi nukleázovou a helikázovou doménou u EcoR124I.** Na vazbě se podílí Lys220 a Glu409. Mg^{2+} jako bílá kulička, červeně jsou znázorněny atomy kyslíku pocházející z vody. Přerušovanou čarou jsou spojeny atomy, které jsou dostatečně blízko pro interakci (Lapkouski *et al.*, 2008)

2.3 Enzymová aktivita R-M typu I

2.3.1 Všeobecný popis

Základem kontroly aktivity EcoR124I je skládání celého komplexu po konjugativním přenosu *hsd* genů do buňky. Buňka přežívá pouze v okamžiku, kdy je nadbytek HsdM a HsdS podjednotek nad HsdR podjednotkou (Janscak *et al.*, 1996). V průběhu sestavování celého enzymu je nejprve poskládána funkční Mtáza, díky čemuž může být methylována bakteriální DNA a takto chráněna před restrikcí vlastním enzymem. K Mtáze se připojuje HsdR podjednotka do stechiometrie $R_1M_2S_1$, která neštěpí DNA. Komplex je daleko více stabilní než komplex $R_2M_2S_1$, který vzniká k již vzniklému po navázání druhé HsdR podjednotky. $R_2M_2S_1$ komplex poměrně snadno disociuje zpátky na $R_1M_2S_1$ (Janscak *et al.*, 1998b).

Enzymatický komplex štěpí DNA při různých poměrech DNA ku enzymu. Při nízkých poměrech mezi DNA a enzymem vznikají především nickované produkty. Dvouvláknové štěpení DNA se objevuje až při koncentracích enzymu ku DNA alespoň dvakrát vyšších. AdoMet, který vystupuje u R-M typu I jako allosterický efektor nutný ke spuštění reakce také zvyšuje aktivitu štěpení DNA (Janscak *et al.*, 1996). U EcoR124I není nutná přítomnost AdoMet, protože ke štěpení DNA není nutná konformační změna enzymu, nicméně přidáním AdoMet se zvyšuje míra hydrolyzy ATP a štěpení DNA (Janscak *et al.*, 1996).

Buněčná lokalizace enzymů se liší podle příslušnosti k jednotlivým genovým rodinám. EcoKI se nachází za vnitřní membránou pravděpodobně díky kontaktu s chromozomální DNA, zatímco HsdR podjednotka zůstává za vnější membránou cytoplazmatické membrány. Podobnou lokalizaci má i enzym EcoR124I (Holubova *et al.*, 2000; Holubova *et al.*, 2004). Enzym EcoAI je přichycen k membráně bakterie či nějakým způsobem chráněn před účinky proteáz, jelikož při ovlivnění periplazmatického prostoru bakterie proteázou není žádným způsobem poškozen (Holubova *et al.*, 2004).

2.3.2 Průběh iniciace translokace

Jak už bylo řečeno, HsdM a HsdS podjednotky tvoří samostatný enzym – Mtázu, se stechiometrií M_2S_1 . Komplexní enzym je sestaven přidáním dvou HsdR podjednotek. Toto je možné provést i *in vitro* kdy k Mtáze, která tvoří jádro enzymu, jsou přidány HsdR podjednotky. Enzym může být sestaven i z Mtázy a jedné HsdR podjednotky, v tomto případě

si komplex $R_1M_2S_1$ zachovává ATPázovou aktivitu a může translokovat DNA, komplex $R_2M_2S_1$ je schopen DNA i štěpit (Janscak *et al.*, 1998b).

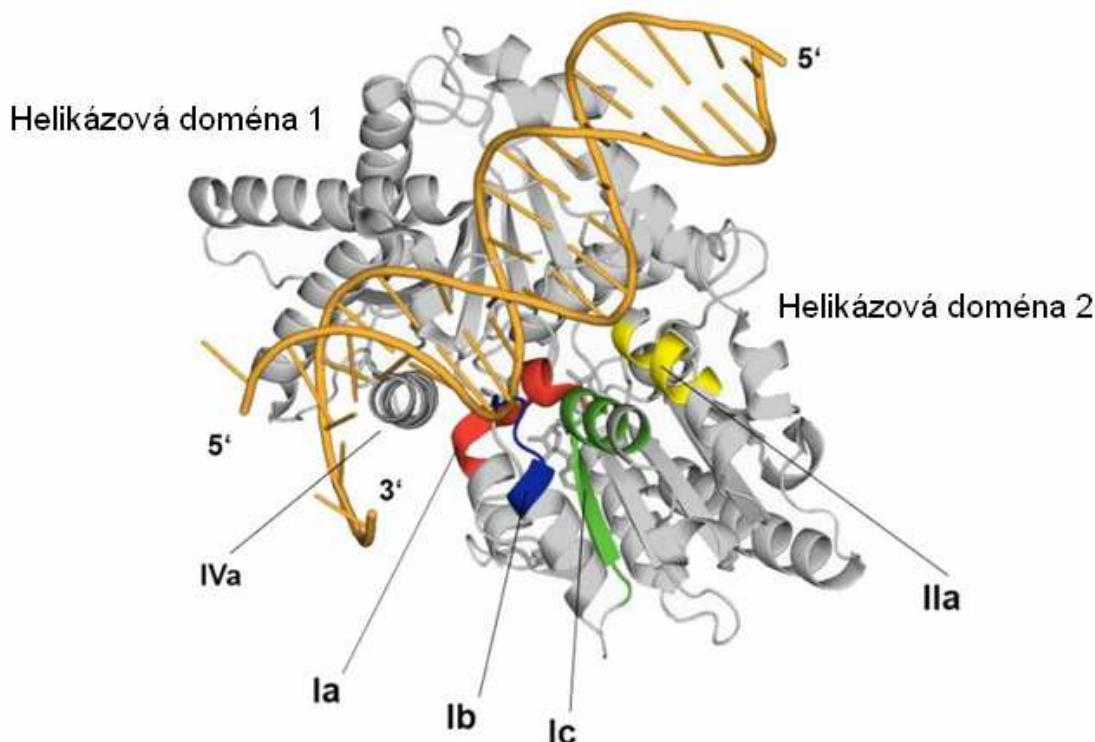
R-M typu I štěpí DNA mimo DNA rozpoznávací sekvenci, ke štěpení může dojít až několik tisíc párů bází od ní. Takový způsob štěpení je možný díky translokaci DNA, která je řízena hydrolýzou ATP. Narozdíl od jiných motorových proteinů, které translokují DNA, se R-M typu I nepohybují podél DNA. Motorový protein je celou dobu navázán v rozpoznávacím místě přes Mtázu a tlačí DNA směrem dopředu. První model iniciace translokace vytvořili Studier *et Bandyopadhyay* (1988). Translokace lineární DNA T7 fága enzymem EcoK probíhá simultánně v obou směrech, čímž se vytváří dvě smyčky translokované DNA, tzv. „osmičková struktura“ (Studier *et Bandyopadhyay*, 1988).

Velmi přesný model iniciace translokace pak podali van Noort *et al.* (2004). Mechanismus byl blíže studován pomocí mikroskopie atomárních sil („atomic force microscopy“, AFM). Pro začátek translokace musí enzym vyprodukovat smyčku o délce asi 8 nm. Tato smyčka představuje konformaci iniciačního komplexu, kde jedno vlákno DNA je přítomno v enzymu a chráněno před restriční endonukleázou a druhé je vystaveno štěpení endonukleázou. Porovnáním rychlosti translokace obou HsdR u enzymu EcoR124I bylo zjištěno, že translokace probíhá nezávisle na obou motorových podjednotkách jednoho komplexu. U některých smyček vytvořených na DNA bylo pozorováno nadšroubovicové vinutí. Během celého procesu translokace je HsdR podjednotka navázána k Mtáze (van Noort *et al.*, 2004). Pokud dojde k disociaci HsdR podjednotky, translokace je zastavena a k reiniciaci celého procesu je třeba navázání nové HsdR podjednotky (Seidel *et al.*, 2005).

2.3.3 Molekulární mechanismus translokace

Základní otázkou při translokaci helikázami a tedy i R-M typu I zůstává, zda je nezbytné rozdělení řetězců nukleové kyseliny a jaké vlastnosti sdílejí R-M typu I s ostatními helikázami. Přestože HsdR náleží do SF2 skupiny helikáz s RecA-like motivem typickým pro všechny helikáz, HsdR EcoR124I se pohybuje výhradně po dsDNA bez nutnosti její separace a tímto mechanismem je podobná translokázám (Stanley *et al.*, 2006). Transport DNA se pak podobá transportu translokázou SsoRad54cd (katalytická doména homologní k eukaryotickému Rad54 ze *Sulfolobus solfataricus*) (Lapkouski *et al.*, 2008). U SsoRad54cd stimuluje dvouvláknová DNA hydrolýzu ATP, enzym se tak může po dsDNA pohybovat stejně jako HsdR. V průběhu tohoto procesu vnáší do DNA nadšroubovicové vinutí.

Helikázová štěrbina interagující s DNA je tvořena motivy Ia, Ib, Ic a II helikázové domény 1 a motivem IVa helikázové domény 2 (Durr *et al.*, 2005). Model komplexu HsdR s DNA je na obr. 2.7.



Obr. 2.7: **Model komplexu HsdR s dsDNA.** Model helikázových domén znázorněných s DNA v helikázové štěrbině. Konzervované domény (Ia, Ib, Ic, IIa a IVa) jsou znázorněny jako barevné části HsdR molekuly (převzato z Lapkouski, 2008; upraveno)

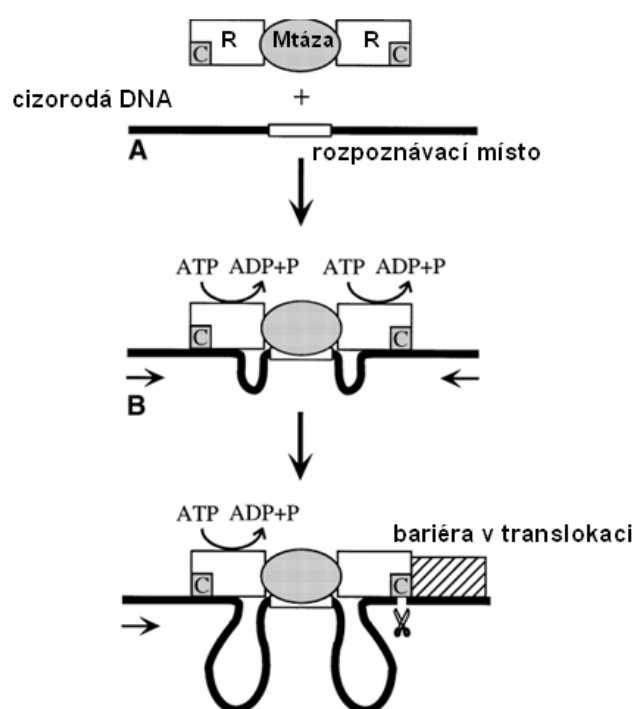
V nepřítomnosti DNA je DExx-box motiv SsoRad54cd v β -konformaci, která neumožňuje hydrolýzu ATP. Po vazbě dsDNA se přepíná do aktivní α -konformace. Přepnutí z β - do α -konformace je umožněno interakcí motivu IIa s cukr-fosfátovou páteří 5'-3' vlákna DNA (Durr *et al.*, 2005). Během ní dojde k posunu domény 1 vůči doméně 2 o 180° (Lewis *et al.*, 2008). V této pozici se může aktivní místo podílet na polarizaci molekuly vody během hydrolýzy ATP. Stanley *et al.* (2006) doplnili pro HsdR EcoR124I, že na 5'-3' vlákně vytváří čepičku, která nemá při translokaci významnou funkci, ale zajišťuje, že enzym zůstává po celou dobu v úzkém kontaktu s 3'-5' vláknem.

Celá translokace SsoRad54cd pak vypadá následovně: dsDNA se váže na rozhraní domény 1A a 2A do takové pozice, která je nejlepší pro translokaci DNA řízenou

konformační změnou domén 1A a 2A pomocí ATP. DNA se váže k doméně 1 přes cukr-fosfátovou páteř obou DNA řetězců menšího žlábků. Celkově se doména 1 váže na 6–7 nukleotidů, stejně jako se SF1 helikázy váží na ssDNA. Domény 1B a 2B pak hrají roli v translokaci DNA. DsDNA je pak navázána na enzym v β -konformaci bez jakéhokoliv náznaku jejího rozplétání (Durr *et al.*, 2006). Translokace je ukončena v okamžiku, kdy dojde k disociaci HsdR podjednotky (Seidel *et al.*, 2005).

2.3.4 Blokace v translokaci

Blokaci v translokaci jako mechanismus štěpení DNA studovali Janscak *et al.* (1999). K pokusu byly použity molekuly DNA obsahující nějakou bariéru v translokaci – pozitivní vinutí, Hollidayův spoj a nebo enzymy z různých rodin, které se střetávají na DNA. Bylo zjištěno, že topologická bariéra nemá vliv na štěpení DNA. Štěpení DNA je spuštěno v okamžiku, kdy je zastavena translokace DNA. Pozitivní vinutí není bariérou vedoucí k zastavení translokace a tudíž ke spuštění štěpení DNA. Bariéra v translokaci je tedy jediným možným důvodem k zastavení translokace, na jejímž základě byl navržen model štěpení DNA R-M typu I (obr. 2.8) (Janscak *et al.*, 1999). Pro úspěšné štěpení je důležitější integrita 5′–3′ vlákna DNA, mezery v 3′–5′ vláknech mohou být při translokaci tolerovány. 5′–3′ vlákno hraje při translokaci hlavní úlohu, vlákno 3′–5′ při translokaci pouze napomáhá (Stanley *et al.*, 2006).



Obr. 2.8: **Model štěpení DNA spouštěného bariérou v translokaci.** Po obou stranách Mtázy se nacházejí HsdR podjednotky. Schematicky je znázorněna cizorodá DNA s roznávacím místem a bariéra v translokaci (převzato z Janscak *et al.*, 1999; upraveno)

2.3.5 Endonukleázová aktivita

Již Studier *et al.* (1980) studovali aktivitu R-M typu I a změny, ke kterým dochází v průběhu reakce. Na základě jejich modelu popisujícího štěpení DNA mimo rozpoznávací sekvenci a vyžadujícího translokaci DNA enzymem mohlo být navázáno dalšími experimenty.

Szczelkun *et al.* (1996) zkoumali na lineárních a kruhových DNA molekulách štěpení enzymem EcoR124I. U lineárních substrátů poskytuje primární štěpení lineární produkty. Pokud obsahuje lineární DNA jedno rozpoznávací místo, je štěpení možné pouze za vysokých koncentrací enzymu. Nejdříve se váže jeden enzymatický komplex specificky, poté druhý enzymatický komplex do nespecifického vazebného místa. K rozštěpení dochází při kolizi těchto dvou proteinových komplexů (Szczelkun *et al.*, 1996).

K poněkud jiné situaci dochází při štěpení kruhových DNA substrátů. Na kruhové molekule DNA je štěpení umožněno prostorovými vlastnostmi molekuly. Při pohybu enzymu po kruhové molekule DNA dochází ke změně jejího nadšroubovicového vinutí. U lineárních molekul DNA je veškeré nadšroubovicové vinutí vznikající pohybem enzymu odstraněno volnou rotací na obou koncích molekuly. Simultánně probíhající vazba endonukleázy na rozpoznávací místo (přes Mtázu) i místo kde začíná translokace uchycuje protein a tak zabraňuje jeho rotaci okolo DNA, čímž jsou vyvolány otáčky DNA. Na kruhové molekule DNA potom dochází k tvorbě kladného a záporného vinutí. Translokace je zastavena až tehdy, když je vinutí na krátkém úseku DNA natolik zhuštěno, že vzniká termodynamická bariéra k další translokaci (Szczelkun *et al.*, 1996). Jediná možnost, jak tuto bariéru překonat, je přeštipnutím jednoho vlákna DNA před začátkem translokace. U většiny R-M typu I bylo pozorováno toto přeštipnutí jednovlákná a ne dvouvláknové štěpení. Pokud je jedno vlákno DNA v translokované smyčce DNA přeštipnuto, je umožněno jeho odkroucení a tím se vlákno stane opět relaxovaným. Translokace může dále pokračovat, ale s možností vytvoření dalšího nadšroubovicového vinutí (Janscak *et al.*, 1996).

Janscak *et al.* (1996) popsali, že pokud je kruhová DNA relaxovaná, EcoR124I ji štěpí efektivněji, než pokud má negativní vinutí. Zvýšení negativního vinutí snižuje efektivnost štěpení, jak bylo pozorováno na základě akumulace množství lineárních produktů po štěpení DNA (Janscak *et al.*, 1996). Délka DNA, kterou musí enzymatický komplex translokovat a potažmo množství hydrolyzované ATP je menší u relaxované DNA než u té, která má

negativní vinutí. Vytvoření pozitivního vinutí ve zkracujícím se DNA vlákně může spouštět štěpení DNA na kruhových substrátech. Jakmile je pohyb po DNA vlivem nadměrného pozitivního vinutí zastaven, je umožněno rozštípnutí obou vláken DNA (Szczelkun *et al.*, 1996).

Berge *et al.* (2000) objevili pomocí AFM, že na linearizovaném plazmidu obsahujícím dvě rozpoznávací místa, dochází k dimerizaci enzymatických komplexů ještě před přidáním ATP, čímž doplnil existující model restriční reakce, že enzymy se mohou potkat v průběhu translokace při jejich kolizi, kdy dochází k restrikci (Janscak *et al.*, 1999). Bergeovy výsledky potvrdili Neaves *et al.* (2009) pozorováním dimerů enzymu EcoKI na DNA s jedním rozpoznávacím místem. K dimerizaci nedochází pokud není jedna molekula EcoKI navázána na DNA, z čehož lze soudit, že po navázání na DNA prochází enzymatický komplex konformační změnou, která umožňuje jeho dimerizaci. Pro enzym EcoKI dále navrhl mechanismus jeho fungování. Monomer EcoKI se nejprve připojí kamkoliv na DNA, pohybuje se podél ní a v případě, že narazí na cílovou sekvenci, váže se na ni. Na tento enzym se může vázat druhý enzym za tvorby dimeru. Dimer je stabilnější, pokud je navázán v cílovém místě DNA. Dimer navázaný v cílovém místě se může připojit na další specifické či častěji nespecifické místo na DNA, vytváří se smyčka a enzym opět hledá cílovou sekvenci pohybem podél DNA. Předtím než je nalezeno druhé rozpoznávací místo, může dojít několikrát k rozpojení vzniklé smyčky. Až poté, co je dimer spojen se dvěma cílovými místy může začít translokace řízená hydrolýzou ATP a iniciace štěpení DNA. Proč enzym využívá tento proces není zatím zcela zřejmé, dimerizace enzymu a pohyb po DNA totiž není nezbytný pro translokaci. Jedním z možných vysvětlení je, že bakterie si takto chrání svou vlastní DNA, protože ve stresových podmínkách by se mohl enzymatický komplex vázat na vlastní nemodifikovanou DNA a štěpit ji (Neaves *et al.*, 2009).

Charakter konců, které jsou produkovány R-M typu I při štěpení DNA studovali Jindrova *et al.* (2005). Byly analyzovány štěpené konce na kruhových molekulách DNA pomocí enzymů EcoKI, EcoAI a EcoR124I jako zástupců R-M typu IA, IB a IC. Bylo prokázáno, že všechny tyto enzymatické komplexy mají podobný mechanismus štěpení DNA. Zanechávají lepivé konce na 5' tak na 3' konci DNA o různé délce, tupé konce nebyly pozorovány. EcoKI produkuje lepivé konce především na 5' konci o délce 6–7 nt, EcoAI na 3' konci o délce 2–3 nt a EcoR124I na 5' konci o délce 3–5 nt. Kromě preference krátkých přesahů byla pozorována i produkce lepivých konců na 3' konci DNA přesahujících 100 nt,

jak to již bylo popsáno pro IA enzym EcoBI (Kimball *et Linn*, 1976; Endlich *et Linn*, 1985). Jindrova *et al.* (2005) dále studovali, zda k dvouvláknovým zlomům na DNA je třeba přítomnost jedné či dvou HsdR podjednotek. Mutací v Regionu X byla narušena endonukleázová aktivita enzymu EcoAI, přičemž schopnost pohybu po DNA zůstala zachována. Bylo zjištěno, že pro vnesení dvouvláknového zlomu na DNA je třeba přítomnost dvou aktivních nukleázových center poblíž sebe. (Jindrova *et al.*, 2005).

3 Cíle práce

1. Zpracování dostupných informací o restrikčně-modifikačních systémech typu I, vypracování literární rešerše.
2. Příprava expresních systému pro přípravu mutantních HsdR podjednotek enzymu EcoAI.
3. Exprese a purifikace wild-type a mutantních HsdR podjednotek enzymu EcoAI.
4. Rekonstituce kompletního enzymatického komplexu (Mtázy a HsdR podjednotky) a stanovení optimálních podmínek pro restrikční reakci wild-type EcoAI.
5. Testování ATPázové aktivity wild-type a mutantních HsdR podjednotek EcoAI.

4 Materiál a metody

4.1.1 Bakteriální kmeny

K přípravě plazmidů byl použit bakteriální kmen *E. coli* DH5 α . Kmen JM109(DE3) byl využit k expresi wt a mutantních HsdR podjednotek.

4.1.2 Použité plazmidy

K expresi wt HsdR podjednotky byl použit plazmid pJP22 (Janscak *et al.*, 1998). Mutantní HsdR podjednotky byly připraveny z plazmidů pJP22K126R, pJP22K126A, pJP22K126E, pJP22K142R, pJP22K142A a pJP22K142E, které vznikly mutací wt hsdR genu v plazmidu pJP22 v pozici, která kóduje Lys126 a Lys142.

4.1.3 Mutace HsdR podjednotky EcoAI

Mutantní HsdR podjednotky EcoAI byly připraveny místně-specifickou mutagenezí ve wt hsdR genu plazmidu pJP22 (Hutchinson *et al.*, 1978). K mutaci Lys126 a Lys142 byly použity komplementární primery uvedené v následující tabulce (tab. 4.1). Tyto aminokyseliny byly substituovány za alanin (neutrální, mutant A), glutamovou kyselinu (kyselá, mutant E) a arginin (bazický, mutant R). K amplifikaci byla použita Expand LongRange DNA polymeráza pro amplifikaci velkých DNA fragmentů (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Složení PCR reakční směsi je uvedeno v tab. 4.2. Podmínky PCR reakce jsou uvedeny v tab. 4.3.

Tab.4.1: **Primery použité k PCR s mutací v HsdR genu EcoAI** (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Mutace	Primer	Sekvence
K126A	F	5'-GTGAATGCCTTGAAGAGCAAATAACGCTGGATG-3'
	R	5'-GATCCAGCGCGTTATTTGCTCTTCAAGCATTAC-5'
K126E	F	5'-GTGAATGCCTTGAAGCGCAAATAACGCTGGATG-3'
	R	5'-GATCCAGCGCGTTATTTGCGCTTCAAGCATTAC-5'
K126R	F	5'-GTGAATGCCTGGAAAGGCAAATAACGCTGGATG-3'
	R	5'-GATCCAGCGCGTTATTTGCCTTTCAAGCATTAC-5'
K142A	F	5'-CTGAACTCTGGCAAGAATTCTGCCTCTGGAAAG-3'
	R	5'-CTTTCCAGAGGCAGAATTCTTGCCAGAGTTCAG-3'
K142E	F	5'-CTGAACTCTGGCAAGCATTCTGCCTCTGGAAAG-3'
	R	5'-CTTTCCAGAGGCAGAATGCTTGCCAGAGTTCAG-3'
K142R	F	5'-CTGAACTCTGGCAAAGATTCTGCCTCTGGAAAG-3'
	R	5'-CTTTCCAGAGGCAGAATCTTTGCCAGAGTTCAG-3'

Tab. 4.2: **Složení PCR reakční směsi**

Složka	1 reakce
pJP22	0,25 µg
dNTP	200 µmol.dm ⁻³
Expand LongRange DNA polymeráza	1,5 U
Pufr (bez MgCl ₂)	1x
Primer reverse	0,3 µmol.dm ⁻³
Primer forward	0,3 µmol.dm ⁻³
DMSO	3%
Celkový objem	20 µl

Tab. 4.3: **Podmínky PCR reakce**

Proces	Teplota	Čas
úvodní denaturace templátu	96 °C	2 min
30 cyklů	denaturace	96 °C
	nasednutí primerů	55 °C
	syntéza DNA	68 °C
závěrečná elongace	68 °C	7 min

Po provedení PCR byla zbytková templátová DNA odstraněna restriční endonukleázou DpnI (20 U na reakci, New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, USA) při 37 °C po dobu 2 hod, poté byl enzym inaktivován při 80 °C po dobu 20 min (Dri-Block DB2A, TECHNE, Staffordshire, GB).

Reakční směsi PCR byly použity pro transformaci buněk *E. coli* DH5 α a z narostlých bakteriálních kolonií byla vyizolována DNA a odeslána k sekvenaci pro kontrolu přítomnosti mutace. K sekvenaci byl použit primer 5'-CATTGAAGCCGTCTCCAAC-3'.

4.1.4 Exprese proteinu a purifikace

Pro produkci wt a mutantních EcoAI HsdR podjednotek byl kmen *E. coli* JM109(DE3) transformován plazmidem pJP22 s wt či mutantními hsdR geny. *E. coli* nesoucí rekombinantní plazmid byly přes noc kultivovány v LB médiu (Formedium, Norfolk, GB) s carbemycilinem (50 mg carbemycilinu na 1 ml LB média, Duchefa biochemie, NL). Tyto kultury byly použity na inokulaci 5x 200 ml LB média obsahujícího antibiotikum ampicilin (100 μ g ampicilinu na 1 ml LB média, Formedium, Norfolk, GB) pro expresi jednotlivých podjednotek. Kultura byla inkubována na třepačce při 37 °C a po dosažení $OD_{600} = 0,6$ byla indukována exprese proteinu přidáním 1 $mmol \cdot dm^{-3}$ IPTG (izopropyl β -D-thiogalaktopyranosid, Duchefa biochemie, NL) po dobu 4 h. Poté byly kultury centrifugovány při 4000 x g po dobu 10 min a skladovány při -20 °C. Expresi jednotlivých proteinů byla kontrolována na 10% SDS-PAGE (Sodium dodecylsulfát polyakrylamidová gelová elektroforéza) v SDS pufru (**1x SDS pufr** – 0,1% SDS; 25 $mmol \cdot dm^{-3}$ TRIS; 192 $mmol \cdot dm^{-3}$ glycin) (zdroj pro elektroforézu Power Station 300, LABNET, Edison, NJ, USA). Vizualizace proteinů byla provedena barvením v Commasie Brilliant Blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Před samotnou purifikací byly buňky lyzovány enzymaticky 30 min přidáním lysozymu (100 mg na 1 ml, Duchefa Biochemie, NL) v pufru A (**pufr A** – 20 $mmol \cdot dm^{-3}$ TRIS, pH 8; 50 $mmol \cdot dm^{-3}$ NaCl; 0,1 $mmol \cdot dm^{-3}$ EDTA; 1 $mmol \cdot dm^{-3}$ DTT; na pH 8) a mechanicky za použití French Pressu (138 MPa, Thermo Fisher Scientific Inc.) a buněčný lyzát byl pročištěn na ultracentrifuze (230000 x g, 1 hod 30 min, 4 °C, Optima L-90 K Ultracentrifuge, Beckman-Coulter Inc.).

Proteiny byly purifikovány za použití ionexové chromatografie přístrojem AKTA Purifier 900 (GE Healthcare). Proteinový extrakt byl nanesen na DEAE Sepharose kolonu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ekvilibrovanou pufrem A. Navázané proteiny byly eluovány lineárním gradientem NaCl [$0,05 \text{ mol.dm}^{-3}$ – 1 mol.dm^{-3} , 10 CV (objem kolony)] postupným přidáváním pufru B (**pufr B** – 20 mmol.dm^{-3} TRIS pH 8; 1 mol.dm^{-3} NaCl; $0,1 \text{ mmol.dm}^{-3}$ EDTA; 1 mmol.dm^{-3} DTT; na pH 8). Jednotlivé frakce byly sbírány do zkumavek po 2 ml přístrojem AKTA Purifier FRAC 950 (GE Healthcare) a úspěšnost purifikace kontrolována na 10% SDS-PAGE. V dalším kroku byly frakce obsahující exprimovanou HsdR podjednotku zakoncentrovány použitím centrikonu Amicon Ultra-4 50000 NMWL (Millipore, Billerica, MA, USA) a promyty pufrem S300 (**S300 pufr** – 10 mmol.dm^{-3} TRIS, pH 8; 150 mmol.dm^{-3} NaCl; 3 mmol.dm^{-3} DTT; $0,1 \text{ mmol.dm}^{-3}$ EDTA), pročištěny gelovou filtrací na koloně Sephacryl S300 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Úspěšnost pročištění byla opět kontrolována na 10% SDS-PAGE a frakce obsahující přečištěnou HsdR podjednotku byly zakoncentrovány použitím centrikonu Amicon Ultra-4 50000 NMWL a promyty NEB2 pufrem (**10x NEB2 pufr** – 100 mmol.dm^{-3} TRIS; 500 mmol.dm^{-3} NaCl; 100 mmol.dm^{-3} MgCl₂; 1 mol.dm^{-3} DTT), pro dlouhodobé skladování při -20°C s přidavkem 50 % (v/v) glycerolu. Koncentrace proteinů byla stanovena spektrofotometricky při 280 nm ($\epsilon_{\text{HsdR EcoAI}} = 101\,565 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

4.1.5 Restrikční reakce

Pro restrikční reakce byl jako DNA substrát použit plazmid pARK obsahující jedno restrikční místo pro enzym EcoAI (Janscak *et al.*, 1996). Wt EcoAI byla *in vitro* rekonstituována smícháním Mtázy EcoAI s HsdR podjednotkou v poměru 1:4. Reakce byla provedena v objemu 280 μl . Reakční směs obsahovala 1x NEB2 pufr, 5 nmol.dm^{-3} DNA, 30 nmol.dm^{-3} EcoAI a byla preinkubována 1 min při 37°C (vodní lázeň WNE11 Excellent, MEMMERT, Schwabach, D) a samotná reakce byla zahájena přidáním ATP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) o koncentraci 20 mmol.dm^{-3} a AdoMet (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA) o koncentraci $0,1 \text{ mmol.dm}^{-3}$. Během reakce byly odebírány 20 μl alikvoty reakční směsi v časech 0, 15, 30, 45, 60, 600 a 1800 s. Reakce byla zastavena přidáním 8 μl $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ EDTA. Pro rozvolnění komplexů protein-DNA byly přidány 2 μl 10% SDS. Účinnost restrikce byla kontrolována na 0,9% agarózovém gelu s 1x TBE (**5x TBE pufr** na 11 54 g TRIS; 27,5 g kys. boritá; 20 ml $0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$ EDTA). DNA byla

vizualizována barvením ethidium bromidem (0,5 µg EtBr na 1 ml pufru, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA).

4.1.6 Test ATPázové aktivity

Stanovení uvolněného anorganického fosfátu z hydrolýzy ATP

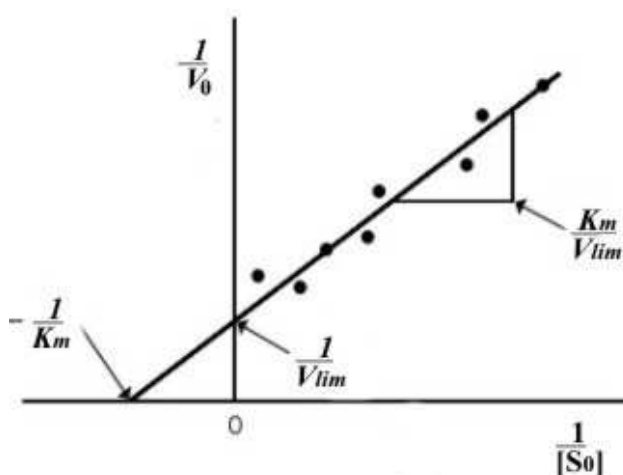
Testy ATPázové aktivity probíhaly s DNA o koncentraci 20 nmol.dm⁻³, Mtázou 10 nmol.dm⁻³ a HsdR podjednotkou 40 nmol.dm⁻³. Reakce probíhaly stejným způsobem jako restriční reakce, odebírány byly 40µl alikvoty reakční směsi v časech 0, 15, 30, 45, 60, 240 a 900 s. Reakce byly zastaveny přidáním 10 µl 0,1 mol.dm⁻³ EDTA. Koncentrace anorganického fosfátu, který vzniká při hydrolýze ATP byla měřena testem založeným na tvorbě komplexu mezi malachitovou zelení, molybdenátem amonným a uvolněným anorganickým fosfátem. Uvolněný anorganický fosfát (P_i) byl kvantifikována spektrofotometricky (při 620 nm, spektrofotometr Infinite 200, TECAN, Mannendorf, CH, program Spectra Manager) (Chan *et al.*, 1986). Množství uvolněného anorganického fosfátu bylo určeno z kalibrační křivky, odvozené z roztoků KH₂PO₄ o známé koncentraci. U jednotlivých vzorků bylo smícháno 40 µl vzorku (v případě vysoké koncentrace anorganického fosfátu byl vzorek naředěn s H₂O) se 100 µl molybdenátu amonného (5,72 % w/v, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 50 µl malachitové zeleně (0,0812 % w/v, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Stanovení kinetických parametrů hydrolýzy ATP

K_m, V_{lim} a K_{cat} hydrolytické reakce ATP byly vypočítány z tzv. dvojnásobně reciproké rovnice Lineweavera a Burka
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m + [S_0]}{V_{lim} \cdot [S_0]} = \frac{K_m}{V_{lim} \cdot [S_0]} + \frac{1}{V_{lim}}$$
 (Lineweaver *et* Burk, 1934), která vychází z rovnice Michaelise a Mentenové
$$V_0 = \frac{V_{lim} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$
. V₀ odpovídá počáteční rychlosti reakce, kterou lze změřit *in vitro* po přidání enzymu v okamžiku, kdy je nulová koncentrace produktů, V_{lim} je maximální rychlost kterou může reakce za daných podmínek probíhat v případě, že je enzym plně saturován substrátem. [S₀] je počáteční koncentrace substrátu (Kodicek, 2007). V našich experimentech byly použity koncentrace substrátu 1, 2, 6 a 20 mmol.dm⁻³.

Z grafu závislosti rychlosti enzymové reakce na koncentraci uvolněného anorganického fosfátu při různých koncentracích ATP získáme hodnoty počáteční rychlosti V_0 , která odpovídá směrnici přímky v lineární oblasti hyperbolické závislosti. Vynesením závislosti $\frac{1}{V_0}$ na $\frac{1}{[S_0]}$ pak získáme přímku, která odpovídá rovnici Lineweavera a Burka

(obr. 4.1, Lineweaver *et* Burk, 1934), kde $\frac{K_m}{V_{lim}}$ udává sklon přímky, $\frac{1}{V_{lim}}$ posun přímky od počátku po ose y (obr. 4.1).



Obr. 4.1: **Reciproké rozložení Lineweavera a Burka** (Lineweaver *et* Burk, 1934).

5 Výsledky

5.1 Příprava expresních systémů pro přípravu mutantních HsdR podjednotek

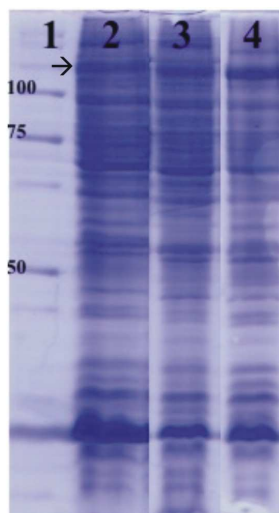
Jak už bylo předesláno v teoretické části této diplomové práce, z první krystalové struktury HsdR podjednotky EcoR124I, R-M typu I, byla identifikována neobvyklá vazba Lys220 endonukleázové domény s ATP, které je u popsáných helikáz běžně vázáno pouze helikázovými doménami (Lapkouski *et al.*, 2009). Tato vazba je pravděpodobně důležitá pro propojení translokační a endonukleázové funkce R-M typu I.

Jelikož se Lys220 nachází v sekvenčně nekonzervované oblasti, byly na základě porovnání primární a sekundární struktury HsdR podjednotky EcoAI a EcoR124I vybrány u enzymu EcoAI dva aminokyselinové zbytky – Lys126 a Lys142 (příloha 1), které mohou odpovídat Lys220 u enzymu EcoR124I. Mutantní HsdR podjednotky EcoAI byly připraveny místně-specifickou mutagenézí ve wt hsdR genu (Hutchison *et al.*, 1978). PCR reakce byla provedena s plazmidem pJP22 nesoucím hsdR gen EcoAI. Lysinové zbytky (kladný náboj) byly substituovány za alanin (neutrální, mutanty K126A a K142A), glutamovou kyselinu (záporný náboj, mutanty K126E a K142E) a arginin (kladný náboj, mutanty K126R a K142R). Použité primery jsou uvedeny v tab. 4.1. K amplifikaci mutantních plazmidů byla použita Expand LongRange DNA polymeráza pro amplifikaci velkých DNA fragmentů (Roche Applied Science, Mannheim, D). Podmínky PCR reakce jsou uvedeny v tab. 4.2. Pro odstranění templátové nemutované DNA byla použita restriční endonukleáza DpnI, která štěpí methylovanou DNA. Po transformaci DNA do *E. coli* DH5 α byla přítomnost mutace zjištěna sekvenací. Plazmidy nesoucí mutovaný gen hsdR byly pro expresi mutantního proteinu transformovány do expresního kmene *E. coli* JM109(DE3).

5.2 Exprese a purifikace HsdR podjednotky EcoAI

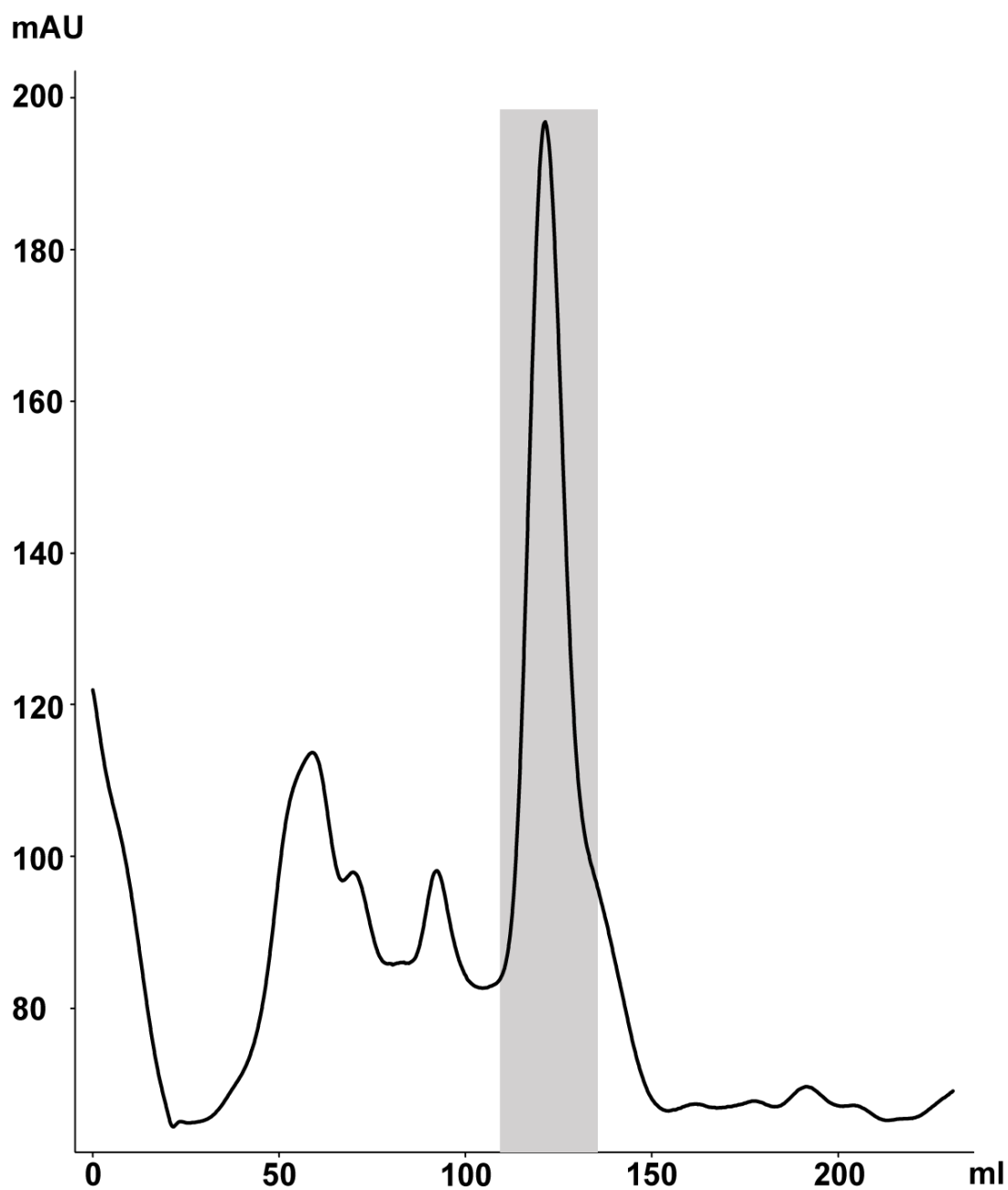
HsdR podjednotky (wt i mutantní) byly exprimovány v bakterii *E. coli*, kmenu JM109(DE3) a vzorky byly připraveny pro purifikaci, jak je popsáno v kapitole Materiál a metody. Úspěšnost indukce exprese jednotlivých proteinů byla vizualizovaná na 10% SDS-PAGE (obr. 5.1). Koncentrace exprimovaných mutantů K142A a K142E byla nižší než wt, u ostatních mutantů jsme nepozorovali snížení exprese oproti wt. Vzorky byly purifikovány použitím ionexové chromatografie (DEAE Sepharose) a následně přečištěny gelovou filtrací (Sephacryl S300) jak je popsáno v kapitole Materiál a metody. Vzhledem k tomu, že se

purifikační podmínky pro jednotlivé proteiny nelišily, uvádíme v této kapitole pouze výsledky purifikace u HsdR K142R podjednotky. Frakce z ionexové chromatografie eluované lineárním gradientem NaCl (50 mmol.dm^{-3} – 1 mol.dm^{-3} , 10 CV), které vykazovaly přítomnost proteinu (pík, A_{280} , obr. 5.2), byly vizualizovány na 10% SDS-PAGE (obr. 5.3).

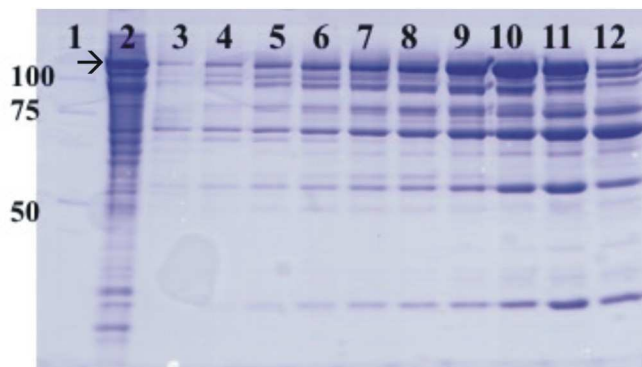


Obr. 5.1: **Kontrola indukce exprese HsdR podjednotky EcoAI K142I.** Dráha č. 1 – proteinový standard (Precision Plus Protein Standard 250 kD, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), dráha č. 2 – exprese HsdR K142A, dráha č. 3 – exprese HsdR K142E, dráha č. 4 – exprese HsdR K142R.

HsdR podjednotky, jak wt tak mutantní, byly eluovány jako jediný pík, v rozmezí 27 %–33 % pufru B, což odpovídá koncentraci NaCl 320 mmol.dm^{-3} – 380 mmol.dm^{-3} (obr. 5.2). Frakce obsahující přečištěnou HsdR podjednotku (obr. 5.3, dráha 7–11) byly zakonzentrovány a dále přečištěny gelovou filtrací.

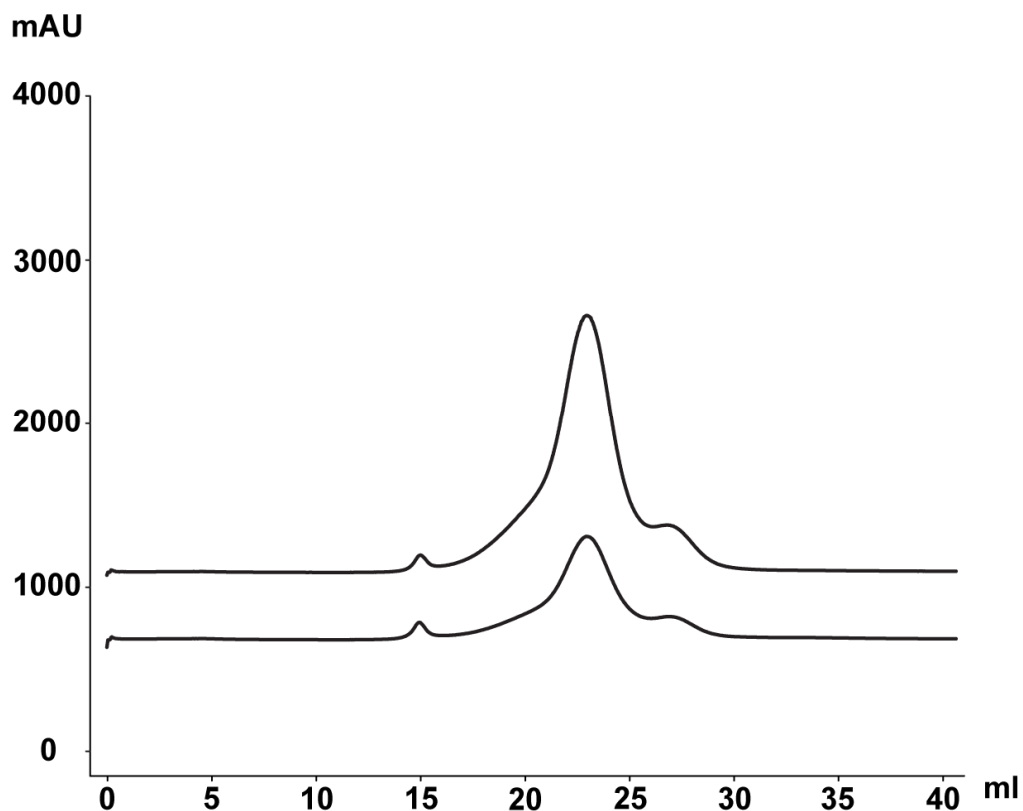


Obr. 5.2: Eluční profil purifikace mutantní podjednotky HsdR K142 EcoAI na DEAE **Sepharose**. Pík označený v šedém poli obsahuje HsdR K142 EcoAI. Eluční profily purifikace wt a ostatních mutantních HsdR podjednotek byly srovnatelné, z toho důvodu zde nejsou zobrazeny. Pík označený šedým polem obsahoval HsdR podjednotku.

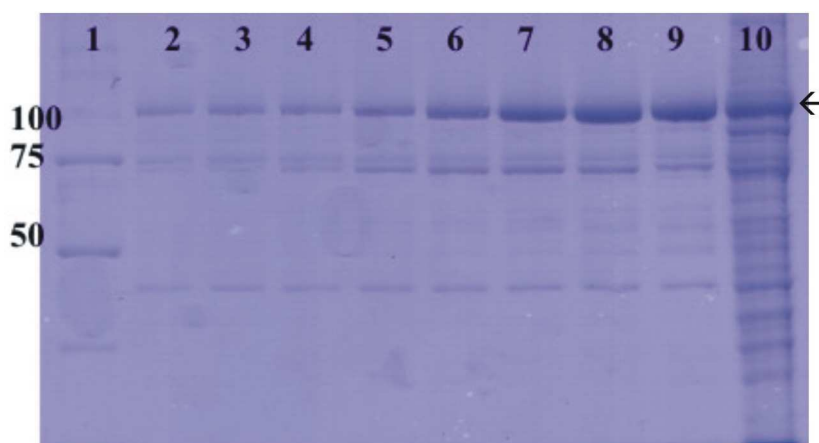


Obr. 5.3: **SDS-PAGE znázorňující purifikaci HsdR K142R podjednotky EcoAI na DEAE Sepharose koloně.** Dráha č. 1 – proteinový standard (Precision Plus Protein Standard 250 kD, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 2 – pozitivní kontrola – HsdR EcoAI, 3–9 purifikovaná HsdR podjednotka. HsdR podjednotka EcoAI má molekulovou hmotnost okolo 100 kDa. Frakce v drahách 7 až 11 byly zakoncentrovány. Stejným způsobem byly kontrolovány všechny purifikované HsdR podjednotky

Po purifikaci na DEAE Sepharose byly zakoncentrované frakce pročištěny na koloně Sephadex S300, fungující jako molekulové síto (obr. 5.4). Frakce z oblasti celého píku byly kontrolovány na 10% SDS-PAGE gelu. Frakce obsahující přečištěnou HsdR podjednotku EcoAI (obr. 5.5, dráha č. 6 až 9) byly zakoncentrovány a promyty 1x NEB2 pufrem. Po zakoncentrování byla stanovena koncentrace proteinu spektrofotometricky (A_{280} , Jasco V-530 UV-VIS, Easten, MD, USA) s použitím extinkčního koeficientu pro HsdR EcoAI ($\epsilon_{\text{HsdR EcoAI}} = 101\,565\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a proteiny byly skladovány v 50% glycerolu (v/v) při $-20\ ^\circ\text{C}$. Získané HsdR podjednotky byly použity pro restriční a ATPázové testy.



Obr. 5.4: Eluční profil pročištění HsdR K142R podjednotky EcoAI na koloně Sephadex S300.

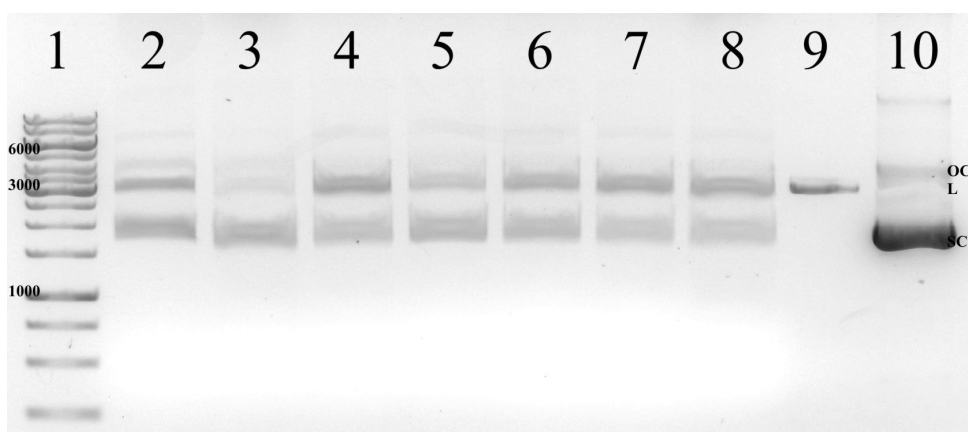


Obr. 5.5: SDS-PAGE ukazující pročištění HsdR podjednotky EcoAI na Sephadexu S300.

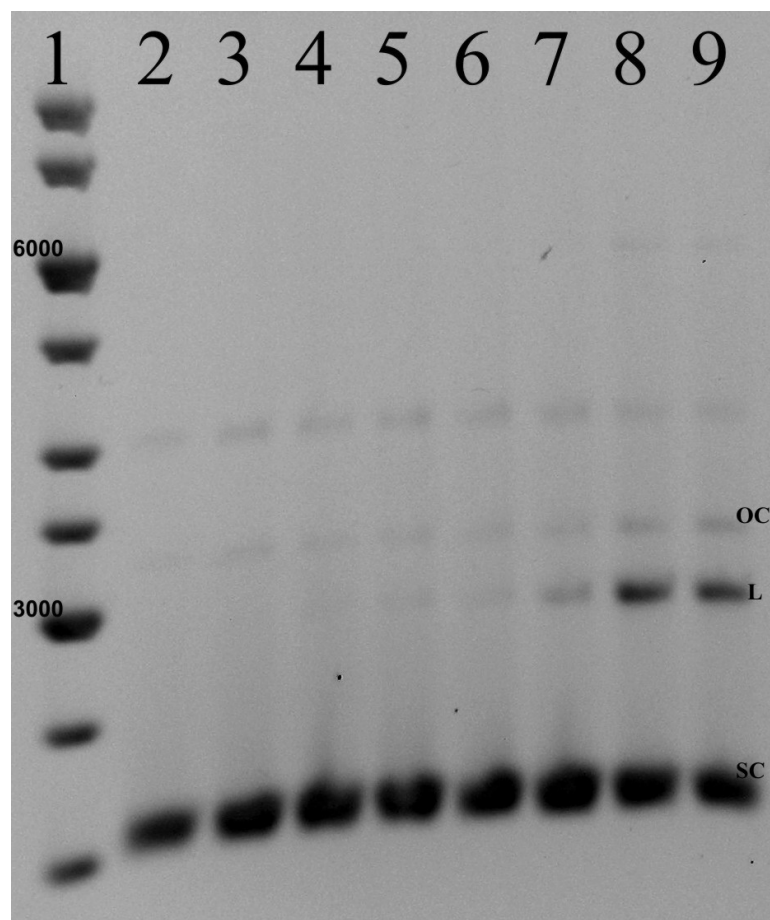
Dráha č. 1 – proteinový standard (Precision Plus Protein Standard 250 kD, Hercules, CA, USA), 2–9 pročištěná HsdR podjednotka, 10 – pozitivní kontrola – HsdR EcoAI. Frakce v drahách 6 až 9 byly zakoncentrovány. Stejným způsobem byly kontrolovány všechny pročištěné HsdR podjednotky

5.3 Restrikční reakce

Pro restrikční reakci byl enzymový komplex EcoAI rekonstituován *in vitro* z Mtázy a wt HsdR podjednotky. V literatuře je uvedeno, že pro štěpení DNA je zapotřebí použít poměru DNA:enzym 1:1, Mtáza:HsdR podjednotka 1:6 (Janscak *et al.*, 1998). Vzhledem k tomu, že enzymové prepy obsahují jistý podíl neaktivního proteinu, jsou tyto poměry jiné a je nutno je experimentálně stanovit. Pro toto stanovení jsme použili následující poměry DNA:enzym 1:1–1:6, Mtáza:HsdR 1:2–1:8. Jako DNA byl použit plazmid pARK s jedním rozpoznávacím místem pro EcoAI. Přítomnost linearizované DNA byla vizualizována elektroforeticky na 0,9% agarózovém gelu. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo při poměru DNA:enzym 1:6, a pro další experimenty byl vybrán poměr Mtáza:HsdR 1:4 (obr. 5.6, dráha č. 4, obr. 5.7).



Obr. 5.6: Testování účinnosti restrikce při různých poměrech HsdR podjednotky a Mtázy. Dráha č. 1 – marker molekulových hmotností (Gene Ruler 1kb DNA ladder, Fermentas, Ontario, CA), dráha č. 2–8 poměr DNA:enzym 1:6, Mtáza:HsdR 1:2–1:8, dráha č. 9 štěpená kontrola (pARK štěpený HindIII enzymem (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, USA), dráha č. 10 neštěpený plazmid pARK. OC – otevřená kružnice, L – linearizovaná DNA, SC – nadšroubovicově vinutá DNA.



Obr. 5.7: Časový průběh restriční reakce wt *EcoAI*. Použita byla 5 nmol.dm^{-3} DNA, 30 nmol.dm^{-3} Mtáza a 120 nmol.dm^{-3} wt HsdR podjednotka. Dráha č. 1 – marker molekulových hmotností (Gene Ruler 1kb DNA ladder, Fermentas, Ontario, CA), dráhy č. 2–9 štěpení DNA v časech 0, 15, 30, 45, 60 s, 4, 30, 60 min. OC – otevřená kružnice, L – linearizovaná DNA, SC – nadšroubovicově vinutá DNA.

5.4 Test ATPázové aktivity

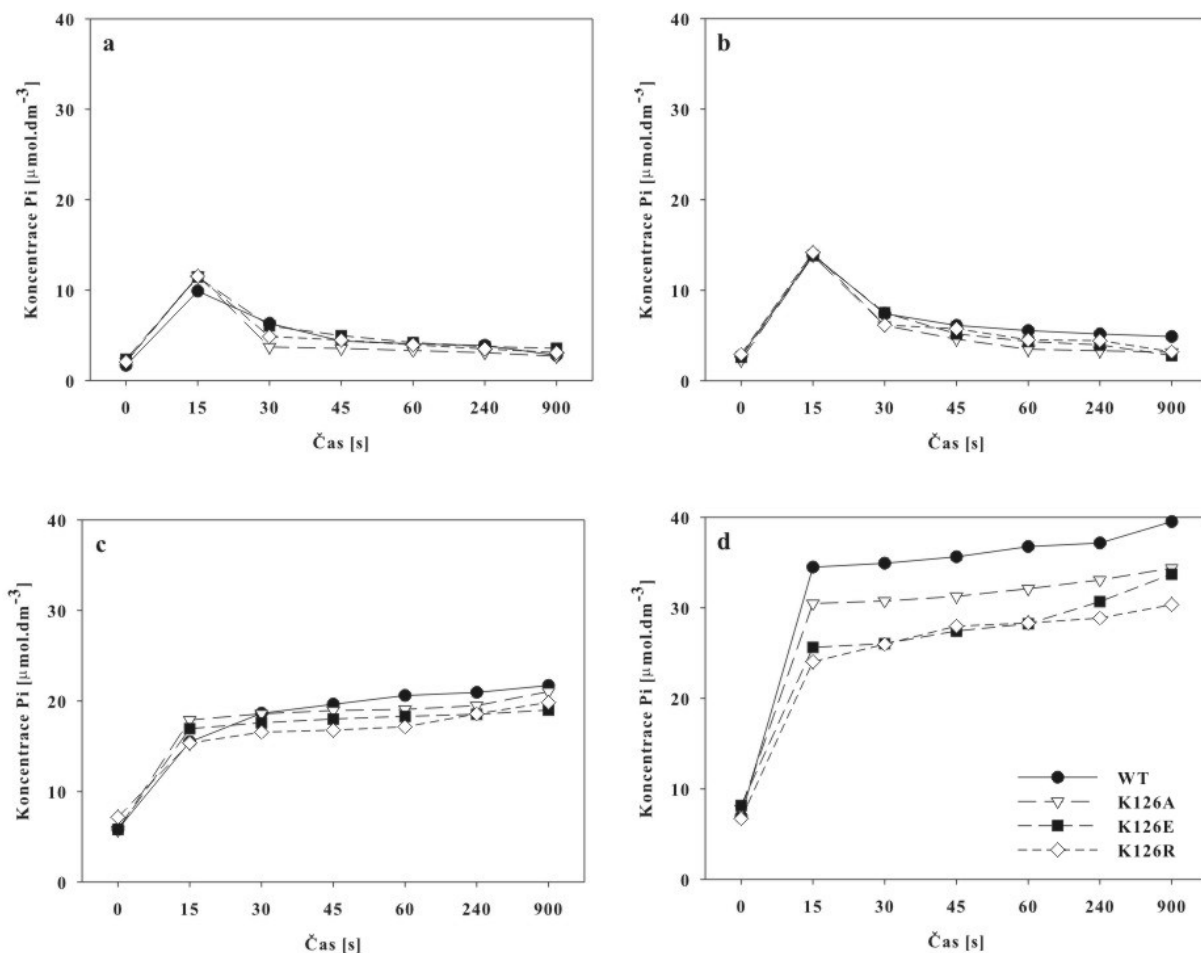
Pro testy ATPázové aktivity byly wt a mutantní endonukleázy *EcoAI* rekonstituovány *in vitro* v poměru Mtáza:HsdR 1:4, který byl experimentálně stanoven z restričních experimentů (kapitola 5.3). Experimentálně bylo stanoven (Janscak, osobní komunikace), že enzym v nadbytku DNA preferuje translokační aktivitu před aktivitou restriční. Proto byla pro stanovení ATPázové aktivity použita DNA v nadbytku (20 nmol.dm^{-3} , poměr DNA:enzym 4:1). Testy ATPázové aktivity byly provedeny tak, jak je popsáno v kapitole Materiál a metody. ATPázová aktivita byla určována nepřímo spektrofotometrickým

stanovením uvolněného anorganického fosfátu během hydrolýzy ATP. Pro stanovení ATPázové aktivity byly použity různé koncentrace ATP (1, 2, 6, 20 mmol.dm⁻³), aby bylo možné stanovit konstantu Michaelise-Mentenové (K_m) těchto reakcí.

ATPázová aktivita jednotlivých enzymů byla stanovena na základě časového průběhu uvolňování anorganického fosfátu (P_i) během hydrolýzy ATP v časech 0, 15, 30, 45, 60, 240 a 900 s. Grafy závislosti uvolněného anorganického fosfátu na čase při různých koncentracích ATP jsou zobrazeny na obr. 5.8–5.11. Ze získaných dat byly vypočítány kinetické parametry hydrolytické reakce, konstanta Michaelise-Mentenové (K_m), limitní rychlost reakce (V_{lim}) a katalytická konstanta (K_{cat}) pro wt a mutantní HsdR podjednotky EcoAI dle dvojnásobně reciproké rovnice Lineweavera a Burka (Lineweaver *et* Burk, 1934).

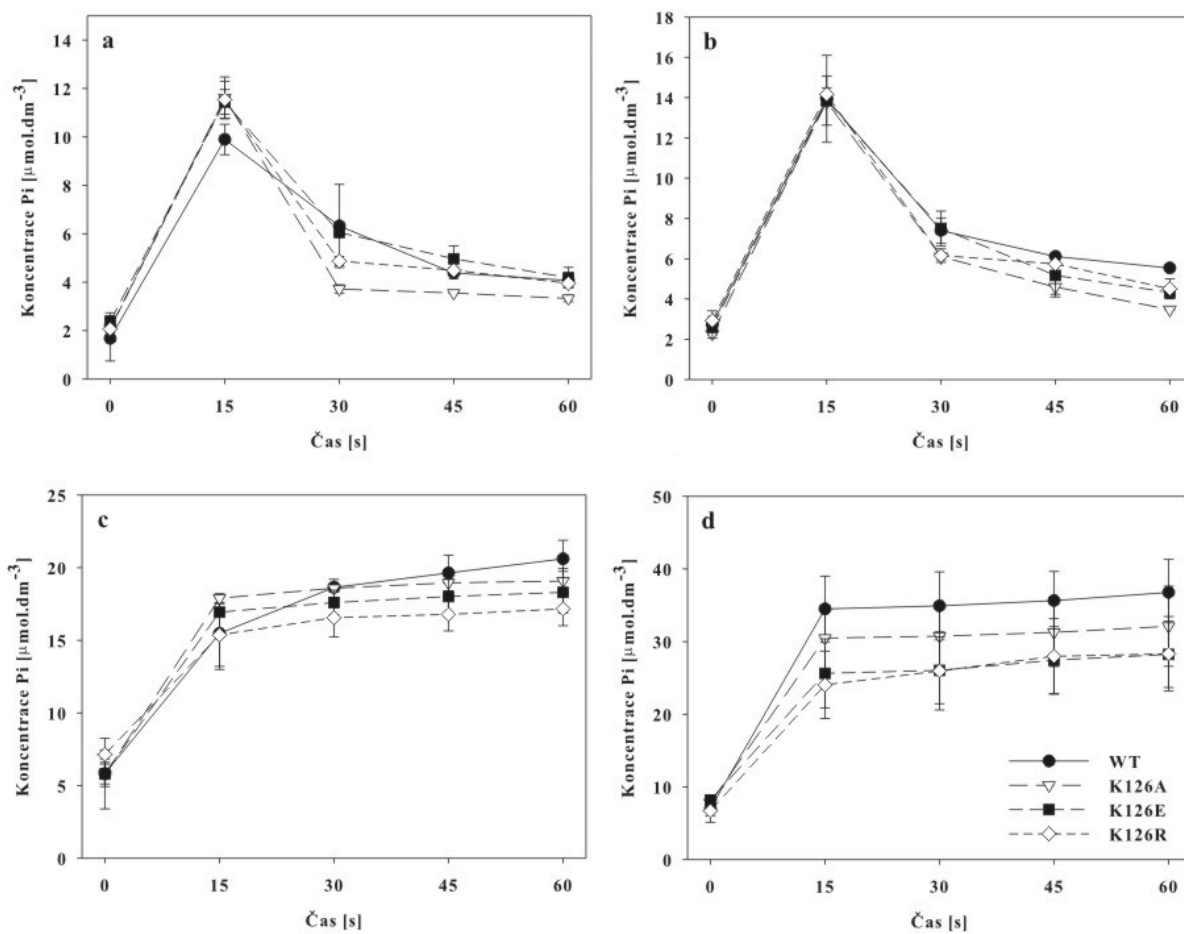
Z grafů na obr. 5.8 a 5.10 je patrné, že koncentrace uvolňovaného anorganického fosfátu během časového průběhu ATPázové reakce je závislá na počáteční koncentraci ATP substrátu, který byl přidán do reakce. V případě malého množství ATP, 1 mmol.dm⁻³ a 2 mmol.dm⁻³ byl substrát vyčerpán po velmi krátké době a po 15 s a množství uvolněného fosfátu bylo velice nízké pro všechny testované enzymy, což svědčí o velice nízké ATPázové aktivitě enzymů. Můžeme konstatovat, že 1 a 2 mmol.dm⁻³ počáteční koncentrace ATP není dostatečně vysoká pro translokaci DNA ani wt EcoAI ani mutantními enzymy. U koncentrace ATP 6 mmol.dm⁻³ a 20 mmol.dm⁻³ dochází k prudké hydrolýze během prvních 15 s, koncentrace uvolněného anorganického fosfátu se postupně zvyšuje v průběhu reakce, až je dosaženo nejvyšší hodnoty v čase 900 s. Tento základní charakter reakcí byl stejný jak u wt EcoAI, tak u mutantů v Lys126 a v Lys142 (k porovnání na obr. 5.8 a 5.10, grafy a a b pro koncentrace substrátu 1 a 2 mmol.dm⁻³, grafy c a d pro koncentrace substrátu 6 a 20 mmol.dm⁻³). Z těchto výsledků je patrné, že všechny testované enzymy vykazují translokační aktivitu při počáteční koncentraci ATP 6 a 20 mmol.dm⁻³ (obr. 5.8, 5.9, 5.10 a 5.11, c, d). ATPázové reakce vykazují pro wt a mutantní enzymy v případě počáteční koncentrace ATP 6 mmol.dm⁻³ podobný trend. V případě koncentrace ATP 20 mmol.dm⁻³ vyazuje nejvyšší aktivitu wt EcoAI a nejnižší mutanty Lys→Arg jak v pozici 126 tak 142, ačkoliv rozdíl není nijak významný. Znamená to, že ani jedna z testovaných mutací neměla výraznější vliv na hydrolýzu ATP.

EcoAI K126I



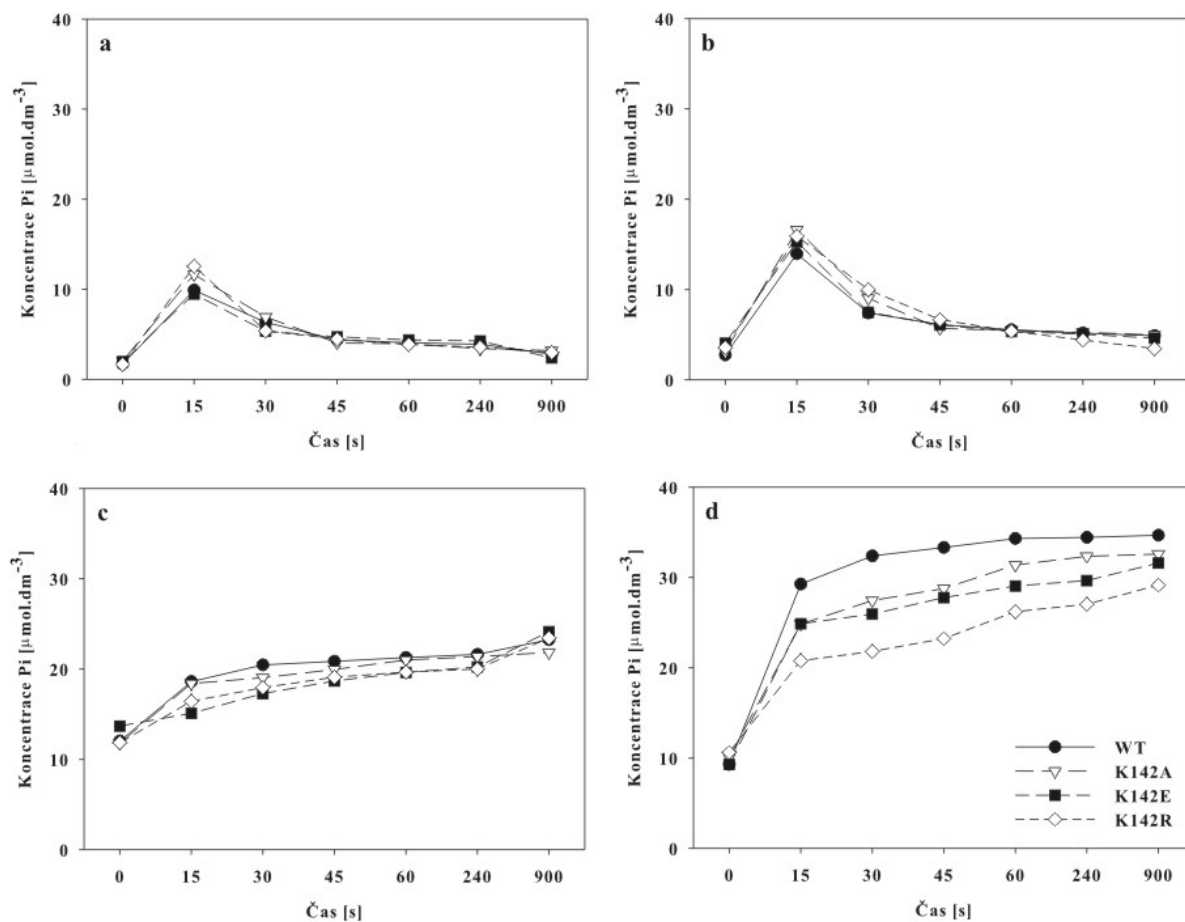
Obr. 5.8: Časový průběh hydrolýzy ATP WT a mutantů v Lys 126 enzymu EcoAI. $20 \text{ nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ plazmid pARK byl inkubován s $10 \text{ nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ Mtázy a $40 \text{ nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HsdR podjednotky. Koncentrace ATP byla $1 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (a), $2 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (b), $6 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (c) a $20 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (d). Detailní znázornění prvních 60 s ATPázového testu je na obr. 5.9

EcoAI K126I – detail



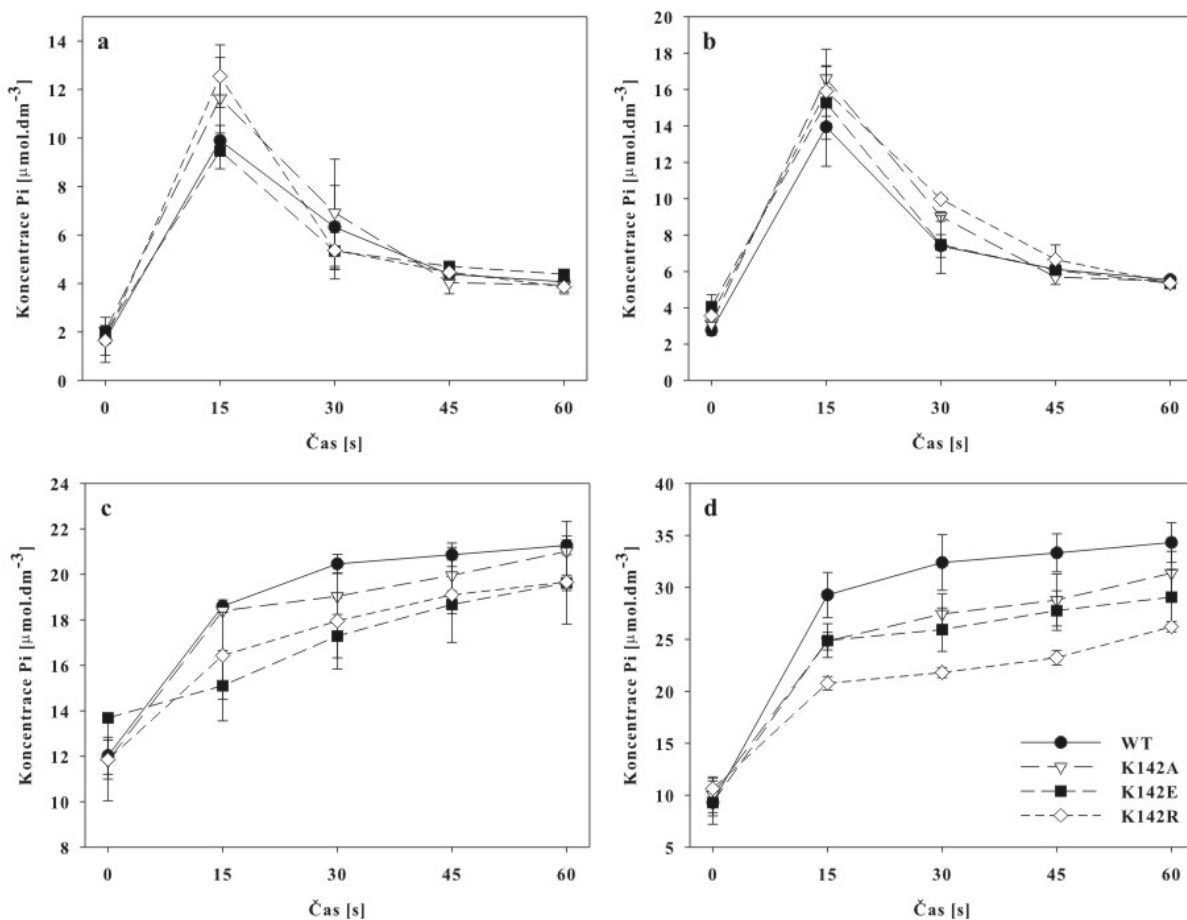
Obr. 5.9: Detailní znázornění časového průběhu hydrolýzy ATP WT a mutantů v Lys 126 enzymu EcoAI. 20 nmol.dm⁻³ plazmid pARK byl inkubován s 10 nmol.dm⁻³ Mtázy a 40 nmol.dm⁻³ HsdR podjednotky. Koncentrace ATP byla 1 mmol.dm⁻³ (a), 2 mmol.dm⁻³ (b), 6 mmol.dm⁻³ (c) a 20 mmol.dm⁻³ (d)

EcoAI K142I



Obr. 5.10: Časový průběh hydrolýzy ATP WT a mutantů v Lys 142 enzymu EcoAI. $20\text{ nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ plazmid pARK byl inkubován s $10\text{ nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ Mtázy a $40\text{ nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HsdR podjednotky. Koncentrace ATP byla $1\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (a), $2\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (b), $6\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (c) a $20\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (d). Detailnější znázornění prvních 60 s ATPázového testu je na obr. 5.11

EcoAI K142I – detail



Obr. 5.11: Detailní znázornění časového průběhu hydrolýzy ATP WT a mutantů v Lys 142 enzymu EcoAI. 20 nmol.dm⁻³ plazmid pARK byl inkubován s 10 nmol.dm⁻³ Mtázy a 40 nmol.dm⁻³ HsdR podjednotky. Koncentrace ATP byla 1 mmol.dm⁻³ (a), 2 mmol.dm⁻³ (b), 6 mmol.dm⁻³ (c) a 20 mmol.dm⁻³ (d)

Pro výpočet K_m , V_{lim} a K_{cat} byla použita reciproká rovnice Lineweavera a Burka, odvozená z rovnice Michaelise a Mentenové jak je popsáno v kapitole Materiál a metody (Lineweaver *et* Burk, 1934). Michaelisova konstanta (K_m) odpovídá koncentraci substrátu, při které reakce probíhá polovinou limitní rychlosti, a tedy kdy je obsazena polovina vazebných míst enzymu. Vypovídá tedy také o vazebné afinitě enzymu k substrátu. Čím nižší je hodnota K_m , tím vyšší má enzym afinitu k substrátu. Limitní rychlost (V_{lim}) udává množství substrátu, při kterém jsou všechna vazebná místa na enzymu obsazena a reakce probíhá maximální rychlostí, které je možné za daných podmínek (pH, teplota) dosáhnout. Hodnota

K_{cat} je definována jako počet molů substrátu, který za časovou jednotku promění jeden mol enzymu při nasycení substrátem (Kodicek, 2007).

Pro výpočet byla použita data z intervalu 0–45 s kde má enzymová kinetika lineární průběh a to pouze z hodnot uvolněného anorganického fosfátu při hydrolýze ATP o koncentraci 6 a 20 mmol.dm⁻³, jelikož křivky získané pro hodnoty počáteční koncentrace ATP 1 a 2 mmol.dm⁻³ nemají počáteční průběh v intervalu 0–45 s lineární a nelze je proto pro výpočet kinetických parametrů touto metodou použít. Počáteční rychlost V_0 byla u všech reakcí stanovena jako směrnice přímky, která popisuje závislost uvolněného anorganického fosfátu na čase v intervalu 0-45 s. Hodnoty kinetických parametrů byly stanoveny z grafu závislosti převrácených hodnot limitních rychlostí $\frac{1}{V_0}$ na převrácených hodnotách počáteční koncentrace substrátu $\frac{1}{[S_0]}$ (obr.4.1). Směrnici vzniklé přímky je $\frac{K_m}{V_{lim}}$, jejím průsečíkem s osou x je hodnota $-\frac{1}{K_m}$ a s osou y hodnota $\frac{1}{V_{lim}}$. Hodnota K_{cat} byla stanovena jako podíl limitní rychlosti a počáteční koncentrace enzymu ($\frac{V_{lim}}{[E_0]}$) (Kodicek *et al.*, 2007). Experimentálně stanovené hodnoty K_m , V_{lim} a K_{cat} jsou uvedeny v tab. 5.1.

Jak je z tab. 5.1 patrné, experimentálně stanovené hodnoty K_m se pohybují ve středu intervalu 10⁻¹–10⁻⁶ mol.dm⁻³ (Racek, J., Klinická biochemie, Galén, Praha 1999), který je definován pro aktivní enzymy. Podle definice K_m , která říká, že čím nižší je hodnota K_m , tím vyšší je afinita enzymu k substrátu vykazují mutanty K126A a K126E vyšší afinitu a mutant K126R má nižší afinitu enzym-substrát vzhledem k wt EcoAI. U mutantů K142I je tomu naopak – mutant K142R vykazuje zvýšenou, kdežto mutant K142A sníženou afinitu enzym-substrát. Wt HsdR podjednotka se svojí afinitou k substrátu nachází uprostřed rozdílů mezi podjednotkami s vyšší a podjednotkami s nižší afinitou enzym-substrát. Diametrálně vyšší hodnoty kinetických parametrů u K142E jsou vzhledem k průběhu reakce (obr. 5.8, 5.9, 5.10 a 5.11, c, d) nereálné a jsou jasně způsobeny chybou stanovení.

Hodnoty V_{lim} a K_{cat} charakterizují rychlost, jakou reakce probíhá. S vyloučením výsledků mutantu K142E můžeme říct, že se hodnoty těchto kinetických parametrů pro jednotlivé enzymy výrazně neliší s výjimkou mutantů K126E a K142R. Přestože mutanty

K126E a K142R vykazují vysokou afinitu enzymu k substrátu, katalyzují reakci dvakrát, respektive třikrát pomaleji než wt EcoAI.

Vzhledem k tomu, že k výpočtu kinetických parametrů však byly použity pouze dvě hodnoty počáteční koncentrace 6 a 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ mohou být jejich rozdíly dány chybou stanovení. Abychom mohly stanovené hodnoty kinetických parametrů brát jako signifikantní, je zapotřebí tyto data doplnit o výsledky ATPázových testů s různými počátečními koncentracemi substrátu, které jsme z časových důvodů nemohli do této práce zahrnout.

Tab. 5.1: Hodnoty K_m , V_{lim} a K_{cat} pro wt a mutantní HsdR podjednotky

	K_m [$\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$]	V_{lim} [$\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$]	K_{cat} [s^{-1}]
WT	13443,6	14,4	963,0
K126A	9598,2	10,5	697,5
K126E	6337,4	7,7	511,2
K126R	20622,0	13,3	889,8
K142A	27082,8	13,8	922,6
K142E	1271798,6	364,8	24322,0
K142R	8030,5	5,4	362,7

6 Diskuze

Restrikční enzymy typu I jsou nejdéle známé enzymy z restrikčně modifikačních systémů. Kvůli jejich komplikovanosti je ale jejich funkce stále obestřena nejasnostmi. K odhalení mechanismu jejich účinku výrazně přispělo vyřešení struktury motorové podjednotky HsdR u enzymu EcoR124I, R-M typu I IC třídy (Lapkouski *et al.*, 2009). Tato struktura odhalila zajímavé zapojení Lys220 EcoR124I do vazby ATP, které je u běžných helikáz vázáno pouze helikázovými doménami (Durr *et al.*, 2005). Tento aminokyselinový zbytek se nachází v helixu 8 „core“ domény (obr. 2.4., 2.6.) mimo konzervativní Region X, důležitý pro endonukleázovou funkci (Janscak *et al.*, 1999, Davies *et al.*, 1999, Sisakova *et al.*, 2008). Tato vazba může být klíčová pro propojení endonukleázové a translokázové aktivity enzymu (Lapkouski *et al.*, 2009). Smyčka, na které se nachází Lys220 není však u RM-systémů typu I výrazně konzervovaná, a tudíž se nabízí otázka, jestli je pro tuto vazbu nutný přímo lysin, nebo jen jiný kladně nabitý aminokyselinový zbytek (v našem případě arginin). Biochemické testy odhalily, že substituce Lys220 jiným aminokyselinovým zbytkem nemá výraznější vliv na ATPázovou aktivitu endonukleázy EcoR124I, ale jiný náboj aminokyselinového zbytku výrazně ovlivňuje *in vitro* a *in vivo* restrikční aktivitu (Csefalvay *et al.*, 2010, submitted). Na základě těchto výsledků byly navrženy mutace analogového Lys v enzymu EcoAI, abychom potvrdili nebo vyvrátili jejich všeobecnou platnost pro restrikční enzymy typu I. Vzhledem k odlišné délce (EcoAI 880 aminokyselin, EcoR124I 1034 aminokyselin) a v této oblasti nekonzervované primární sekvenci, byly vybrány dva aminokyselinové zbytky Lys126 nebo Lys142 u EcoAI, z nichž jeden odpovídá Lys220 u enzymu EcoR124I v publikovaném alignmentu primárních sekvencí (Lapkouski *et al.*, 2009, viz. Přílohy). Tato rezidua byla zaměněna za Arg, Ala a Glu.

Testováním ATPázové aktivity těchto mutantů při různé počáteční koncentraci ATP bylo zjištěno, že časový průběh hydrolyzy ATP se nijak výrazně neliší od wt EcoAI (obr.5.8-5.11), což odpovídá výsledkům z experimentů s enzymem EcoR124I (Csefalvay *et al.*, 2010, submitted).

Porovnáním jednotlivých kinetických parametrů získaných pro enzymy EcoAI a EcoR124I (Csefalvay *et al.*, 2010, submitted) jsme zjistili, že hodnoty V_{lim} a od ní odvozené K_{cat} jsou srovnatelné, přičemž K_{mEcoAI} je o řád vyšší než $K_{mEcoR124I}$. Z toho je možné usoudit, že oba dva enzymy hydrolyzují ATP porovnatelnou rychlostí, ale EcoAI má nižší afinitu

k ATP, než EcoR124I. Tyto hodnoty by potvrzovaly naše experimentální zjištění, že EcoAI není téměř schopný hydrolyzovat ATP při počátečních koncentracích 1 a 2 mmol.dm⁻³, které byly dostatečné pro spuštění hydrolytické reakce enzymem EcoR124I.

Hodnoty kinetických parametrů pro jednotlivé mutanty vykazují v porovnání s wt EcoAI jisté odlišnosti. U mutantů Lys→Arg, kdy nedochází ke změně náboje jsou hodnoty K_m pro K126R vyšší, zatímco pro K142R nižší, přičemž v druhém případě je snížena i V_{lim}. Naopak je to v případě záměny za neutrální Ala. K126A vykazuje nižší, zatímco K142A vyšší hodnotu K_m, Hodnoty V_{lim} se v tomto případě nijak neliší od wt EcoAI. Záměna kladného náboje za záporný vykazuje v případě K126E snížení jak hodnoty K_m tak i V_{lim}. Tak výrazné rozdíly jednotlivých kinetických parametrů nebyly v případě enzymu EcoR124I pozorovány. Abychom ale potvrdily jejich relevanci je nutno získaná data doplnit o další experimenty, kdy budou použity jiné počáteční koncentrace ATP, abychom měli dostatek bodů pro lineární regresi podle Lineweavera a Burka a z ní vycházející kinetické parametry.

Závěrem lze tedy říci, že v této fázi není ze získaných výsledků jednoznačné, který z lysinových zbytků enzymu EcoAI je homologní k Lys220 EcoR124I a je zapojen do vazby ATP. I přesto že ATPázové testy vykazují menší rozdíly, mutanty obou lysinových zbytků mají zachovanou ATPázovou aktivitu, můžeme říct, že tato aktivita je srovnatelná s wt EcoAI. V případě kdy se jedná o aminokyselinu v ATP vazebném místě nejde s určitostí o náhodu, ale o fakt, že tato aminokyselina nepřispěje k ATPasové aktivitě jako takové, ale propojuje translokaci s endonukleázovou aktivitou. Toto propojení endonukleázové a translokázové aktivity se potvrdí při *in vivo* testech, které nám dají odpověď na otázku, zda bakterie nesoucí mutantní *hsdR* geny dokáží přežít útok fága, a tudíž i na to, který z mutovaných lysinových zbytků je zapojen do vazby ATP.

7 Závěr

V této diplomové práci bylo na základě porovnání primární a sekundární struktury enzymů EcoR124I a EcoAI vybrány aminokyselinové zbytky potenciálně homologní k Lys220 EcoR124I. U enzymu EcoAI to pak byly Lys126 a Lys142. Tyto aminokyseliny byly poté mutovány místně-specifickou mutagenezí. Lysin byl v obou případech substituován za arginin, alanin a glutamovou kyselinu. Byla provedena exprese a purifikace wt a mutantních HsdR podjednotek enzymu EcoAI. Po *in vitro* rekonstrukci enzymu a stanovení vhodných poměrů mezi DNA, Mtázou a HsdR podjednotkou bylo testováno ovlivnění ATPázové aktivity jednotlivými mutacemi. Bylo zjištěno, že mutace Lys126 a Lys142 v endonukleázové doméně nemá prokazatelný vliv na ATPázovou aktivitu celého enzymového komplexu a tato aktivita je v obou případech zachovaná v míře srovnatelné s wt EcoAI. Rozdíly kinetických parametrů pro jednotlivé ATPázové reakce jsou s největší pravděpodobností dílem jejich nepřesného stanovení a je nutné potvrdit jejich relevanci dalšími testy. Získané výsledky je nutno porovnat s *in vivo* restričními testy, které jsou cílem práce v jiné laboratoři a prozatím nejsou známy výsledky. Z dostupných dat tedy zatím nemůžeme říci, který z aminokyselinových zbytků je strukturně a funkčně homologní k Lys220 u enzymu EcoR124I, víme ovšem že v případě toho správného z těch dvou je ATPázová aktivita zachovaná stejně jako u EcoR124I, a vliv na endonukleázovou aktivitu bude potvrzen v *in vivo* testech, které nám jasně potvrdí, zda je mechanismus námi popsany pro enzym EcoR124I je všeobecně platný pro Type1 RM-systémy.

8 Seznam použitých zkratk

AdoMet	S-adenosylmethionin, kofaktor restričně-modifikačních typu I
AFM	„Atomic Force Microscopy“, mikroskopie atomárních sil
ATP	adenosin trifosfát
CV	objem kolony
dsDNA	dvouvláknová DNA
DTT	1,4 - dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EtBr	ethidium bromid
GTP	guanosin trifosfát
hsdM	gen kódující modifikační podjednotku R-M typu I
hsdS	gen kódující podjednotku určující specifitu R-M typu I
hsdR	gen kódující podjednotku R-M typu I zodpovědnou za restrikci
HsdM, M	modifikační podjednotka
HsdS, S	podjednotka určující specifitu
HsdR, R	restriční podjednotka
IPTG	izopropyl β -D-thiogalaktopyranosid
MTáza	DNA methyltransferáza
nt	nukleotid
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
P _i	anorganický fosfát vznikající při hydrolýze ATP
R-M systémy	restričně-modifikační systémy

SDS-PAGE	sodium dodecylsulfát polyakrylamidová gelová elektroforéza
SF1	„superfamily 1“ rodina DNA helikáz
SF2	„superfamily 2“ rodina DNA helikáz
ssDNA	jednovláknová DNA
SsoRad54cd	katalytická doména homologní k eukaryotickému Rad54 ze <i>Sulfolobus solfataricus</i>
PCR	„polymerase chain reaction“, polymerázová řetězová reakce
P _i	anorganický fosfát uvolněný při hydrolýze ATP
TRD	„target recognition domain“, cílová rozpoznávací doména
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminometan
wt	„wild-type“ – forma genu vyskytující se v populaci s nejvyšší frekvencí

9 Použitá literatura

Barcus, V. A., Titheradge, A. J. B. & Murray, N. E (1995): The diversity of alleles at the *hsd* locus in natural populations of *Escherichia coli*. *Genetics* 140:1187-1197.

Berge T, Ellis DJ, Dryden DT, Edwardson JM, Henderson RM (2000): Translocation-independent dimerization of the EcoKI endonuclease visualized by atomic force microscopy. *Biophysical Journal* 79:479-484.

Bertani G, Weigle JJ: Host controlled variation in bacterial viruses (1953): *The Journal of Bacteriology* 65:113-121.

Bickle TA, Krüger DH (1993): Biology of DNA restriction. *Microbiological Reviews* 57:434-450.

Bird LE, Subramanya HS, Wigley DB (1998): Helicases: a unifying structural theme? *Current Opinion in Structural Biology* 8:14-18.

Calisto BM, Pich OQ, Pinol J, Fita I, Querol E, Carpena X (2005): Crystal structure of a putative type I restriction-modification S subunit from *Mycoplasma genitalium*. *Journal of Molecular Biology* 351:749-762.

Cowan GM, Gann AA, Murray NE (1989): Conservation of complex DNA recognition domains between families of restriction enzymes. *Cell* 56:103-109.

Csefalvay E, Lapkouski M, Csefalvay L, Carey J, Ettrich R: Functional coupling of duplex translocation to DNA cleavage in a type I restriction enzyme. *Nucleic Acids Research*, submitted.

Davies GP, Kemp P, Molineux IJ, Murray NE (1999): The DNA translocation and ATPase activities of restriction-deficient mutants of EcoKI. *Journal of Molecular Biology* 292:787-796.

Davies GP, Powell LM, Webb JL, Cooper LP, Murray NE (1998): EcoKI with an amino acid substitution in any one of seven DEAD-box motifs has impaired ATPase and endonuclease activities. *Nucleic Acids Research* 26:4828-4836.

Davies GP, Martin I, Sturrock SS, Cronshaw A, Murray NE, Dryden DT (1999): On the structure and operation of type I DNA restriction enzymes. *Journal of Molecular Biology* 290:565-579.

Dryden DT, Cooper LP, Murray NE (1993): Purification and characterization of the methyltransferase from the type I restriction and modification system of *Escherichia coli* K12. *Journal of Biological Chemistry* 268:13228-13236.

Dryden DT, Murray NE, Rao DN (2001): Nucleoside triphosphate-dependent restriction enzymes. *Nucleic Acids Research* 29:3728-3741.

Dryden DT, Sturrock SS, Winter M (1995): Structural modelling of a type I DNA methyltransferase. *Nature Structural & Molecular Biology* 2:632-645.

Durr H, Körner C, Müller M, Hickmann V, Hopfner KP (2005): X-ray structures of the *Sulfolobus solfataricus* SWI2/SNF2 ATPase core and its complex with DNA. *Cell* 121:363-373.

Durr H, Flaus A, Owen-Hughes T, Hopfner KP (2006): Snf2 family ATPases and DExx box helicases: differences and unifying concepts from high-resolution crystal structures. *Nucleic Acids Research* 34:4160-4167.

Endlich B, Linn S (1985): The DNA restriction endonuclease of *Escherichia coli* BII. Further studies of the structure of DNA intermediates and products. *Journal of Biological Chemistry* 260:5729-5738.

Holubová I, Vejsadova S, Weiserova M, Firman K (2000): Localization of the type I restriction-modification enzyme EcoKI in the bacterial cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 270:46-51.

Holubova I, Vejsadova S, Firman K, Weiserova M (2004): Cellular localization of Type I restriction-modification enzymes is family dependent. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 319:375-380.

Hutchison CA, Phillips S, Edgell MH, Gillam S, Jahnke P, Smith M (1978): Mutagenesis at the specific position in a DNA-sequence. *Journal of Biological Chemistry* 253:6551-6560.

Chan KM, Delfert D, Junder KD (1986): A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Analytical Biochemistry* 157:375-380.

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 Research* 32:e138.

Ishikawa K, Handa N, Kobayashi I (2009): Cleavage of a model DNA replication fork by a Type I restriction endonuclease. *Nucleic Acids Research* 37:3531-3544.

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, Bickle TA (1998): The DNA recognition subunit of the type IB restriction-modification enzyme EcoAI tolerates circular permutations of its polypeptide chain. *Journal of Molecular Biology* 284:937-948.

Janscak P, Dryden DT, Firman K (1998): Analysis of the subunit assembly of the type IC restriction-modification enzyme EcoR124I. *Nucleic Acids Research* 26:4439-4445.

Janscak P, MacWilliams MP, Sandmeier U, Nagaraja V, Bickle TA (1999): DNA translocation blockage, a general mechanism of cleavage site selection by type I restriction enzymes. *EMBO Journal* 18:2638-2647.

Janscak P, Bickle TA (2000): DNA supercoiling during ATP-dependent DNA translocation by the type I restriction enzyme EcoAI. *Journal of Molecular Biology* 295:1089-1099.

Jindrova E, Schmid-Nuoffer S, Hamburger F, Janscak P, Bickle TA (2005): On the DNA cleavage mechanism of Type I restriction enzymes. *Nucleic Acids Research* 33:1760-1766.

Kadaré G, Haenni AL (1997): Virus-encoded RNA helicases. *The Journal of Virology* 71:2583-2590.

Kelleher JE, Daniel AS, Murray NE (1991): Mutations that confer de novo activity upon a maintenance methyltransferase. *Journal of Molecular Biology* 221:431-440.

Kim JS, DeGiovanni A, Jancarik J, Adams PD, Yokota H, Kim R, Kim SH (2005): Crystal structure of DNA sequence specificity subunit of a type I restriction-modification enzyme and its functional implications. *The Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 102:3248-3253.

Kimball M, Linn S (1976): The release of oligonucleotides by the Escherichia coli B restriction endonuclease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 68:585–591.

Kneale GG (1994): A symmetrical model for the domain structure of type I DNA methyltransferases. *Journal of Molecular Biology* 243:1-5.

Kodicek, M (2007): *Biochemické pojmy: výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha [cit. 2010-04-11]. Available from http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html.

Lapkouski M, Panjikar S, Janscak P, Smatanova IK, Carey J, Ettrich R, Csefalvay E (2009): Structure of the motor subunit of type I restriction-modification complex EcoR124I. *Nature Structural & Molecular Biology* 16:94-105.

Lapkouski M: Structure of the motor subunit and translocation model for EcoR124I restriction-modification complex. *Dizertační práce (PhD.)*. Nové Hrady: 2008. Jihočeská univerzita, Ústav fyzikální biologie a Akademie věd České republiky, Ústav systémové biologie a ekologie.

Lewis R, Dürr H, Hopfner KP, Michaelis J (2008): Conformational changes of a Swi2/Snf2 ATPase during its mechano-chemical cycle. *Nucleic Acids Research* 36:1881-1890.

Lineweaver H, Burk D (1934): The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society* 56:658-666.

Mernagh DR, Kneale GG (1996): High resolution footprinting of a type I methyltransferase reveals a large structural distortion within the DNA recognition site. *Nucleic Acids Research* 24:4853-4858.

Mernagh DR, Taylor IA, Kneale GG (1998): Interaction of the type I methyltransferase M.EcoR124I with modified DNA substrates: sequence discrimination and base flipping. *Biochemical Journal* 336:719-725.

Murray NE, Batten PL, Murray K (1973): Restriction of bacteriophage lambda by Escherichia coli K. *Journal of Molecular Biology* 81:395-407.

Murray NE (2000): Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64:412-434.

Neaves KJ, Cooper LP, White JH, Carnally SM, Dryden DT, Edwardson JM, Henderson RM (2009): Atomic force microscopy of the EcoKI Type I DNA restriction enzyme bound to DNA shows enzyme dimerization and DNA looping. *Nucleic Acids Research* 37:2053-2063.

Niv MY, Ripoll DR, Vila JA, Liwo A, Vanamee ES, Aggarwal AK, Weinstein H, Scheraga HA (2007): Topology of Type II REases revisited; structural classes and the common conserved core. *Nucleic Acids Research* 35:2227-2237.

O'Neill M, Dryden DT, Murray NE (1998): Localization of a protein-DNA interface by random mutagenesis. *EMBO Journal* 17:7118-7127.

Porter DJ, Short SA, Hanlon MH, Preugschat F, Wilson JE, Willard DH Jr, Consler TG (1998): Product release is the major contributor to *k_{cat}* for the hepatitis C virus helicase-catalyzed strand separation of short duplex DNA. *Journal of Biological Chemistry* 273:18906-18914.

Powell LM, Connolly BA, Dryden DT (1998): The DNA binding characteristics of the trimeric EcoKI methyltransferase and its partially assembled dimeric form determined by fluorescence polarisation and DNA footprinting. *Journal of Molecular Biology* 283:947-961.

Racek J (1999): *Klinická biochemie*, 1. vydání. Praha: Galén. ISBN 80-7262-023-1.

Roberts RJ, Belfort M, Bestor T, Bhagwat AS, Bickle TA, Bitinaite J, Blumenthal RM, Degtyarev SK, Dryden DT, Dybvig K, Firman K, Gromova ES, Gumport RI, Halford SE, Hattman S, Heitman J, Hornby DP, Janulaitis A, Jeltsch A, Josephsen J, Kiss A, Klaenhammer TR, Kobayashi I, Kong H, Kruger DH, Lacks S, Marinus MG, Miyahara M, Morgan RD, Murray NE, Nagaraja V, Piekarowicz A, Pingoud A, Raleigh E, Rao DN, Reich N, Repin VE, Selker EU, Shaw PC, Stein DC, Stoddard BL, Szybalski W, Trautner TA, Van Etten JL, Vitor JM, Wilson GG, Xu SY (2003): A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Research* 31:1805-1812.

Seidel R, Bloom JG, van Noort J, Dutta CF, Dekker NH, Firman K, Szczelkun MD, Dekker C (2005): Dynamics of initiation, termination and reinitiation of DNA translocation by the motor protein EcoR124I. *EMBO Journal* 24:4188-4197.

Sisakova E, Stanley LK, Weiserova M, Szczelkun MD (2008a): A RecB-family nuclease motif in the Type I restriction endonuclease EcoR124I. *Nucleic Acids Research* 36:3939-3949.

Sisakova E, Weiserova M, Dekker C, Seidel R, Szczelkun MD (2008b): The interrelationship of helicase and nuclease domains during DNA translocation by the molecular motor EcoR124I. *Journal of Molecular Biology* 384:1273-1286.

Sistla S, Rao DN (2004): S-Adenosyl-L-methionine-dependent restriction enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 39:1-19.

Soultanas P, Wigley DB (2002): Site-directed mutagenesis reveals roles for conserved amino acid residues in the hexameric DNA helicase DnaB from *Bacillus stearothermophilus*. *Nucleic Acids Research* 30:4051-4060.

Stanley LK, Seidel R, van der Scheer C, Dekker NH, Szczelkun MD, Dekker C (2006): When a helicase is not a helicase: dsDNA tracking by the motor protein EcoR124I. *EMBO Journal* 25:2230-2239.

Studier FW, Bandyopadhyay PK (1988): Model for how type I restriction enzymes select cleavage sites in DNA. *Proceeding of the National Academy of Sciences U S A* 85:4677-4681.

Sturrock SS, Dryden DT (1997): A prediction of the amino acids and structures involved in DNA recognition by type I DNA restriction and modification enzymes. *Nucleic Acids Research* 25:3408-3414.

Szczelkun MD, Dillingham MS, Janscak P, Firman K, Halford SE (1996): Repercussions of DNA tracking by the type IC restriction endonuclease EcoR124I on linear, circular and catenated substrates: *EMBO Journal* 15:6335-6347.

Theis K, Chen PJ, Skorvaga M, Van Houten B, Kisker C (1999): Crystal structure of UvrB, a DNA helicase adapted for nucleotide excision repair. *EMBO Journal* 18:6899-6907.

Uyen NT, Park SY, Choi JW, Lee HJ, Nishi K, Kim JS (2009): The fragment structure of a putative HsdR subunit of a type I restriction enzyme from *Vibrio vulnificus* YJ016: implications for DNA restriction and translocation activity. *Nucleic Acids Research* 37:6960-6969.

van Noort J, van der Heijden T, Dutta CF, Firman K, Dekker C (2004): Initiation of translocation by Type I restriction-modification enzymes is associated with a short DNA extrusion. *Nucleic Acids Research* 32:6540-6547.

Velankar SS, Soutanas P, Dillingham MS, Subramanya HS, Wigley DB (1999): Crystal structures of complexes of PcrA DNA helicase with a DNA substrate indicate an inchworm mechanism. *Cell* 97:75-84.

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

Willcock DF, Dryden DT, Murray NE (1994): A mutational analysis of the two motifs common to adenine methyltransferases. *EMBO Journal* 13:3902-3908.

Zinkevich V, Popova L, Kryukov V, Abadjieva A, Bogdarina I, Janscak P, Firman K (1997): The HsdR subunit of R.EcoR124II: cloning and over-expression of the gene and unexpected properties of the subunit. *Nucleic Acids Research* 25:503-511.


```

EcoR124I  LLIVVGMFLTGFDAPTLNTLTFVDKNLR-YHGLMQAFSRTNRIYDAT-KTFGNIVTFRDLE 709
EcoAI     -----ELMTTGVDAKTCKLVVLDQNIQSMTKFKQIIIGRGTRIDERYGKLWFTILDFK--- 541
           :: **.* * : :. :*:*: : * :.* .* : * : .* :*
EcoR124I  RSTIDAITLFGDKNTKNVVLEKSYTEYMEGFTDAATGEAKRGFMTVVSELEQRFPDPTSI 769
EcoAI     ----KATELFAD-----ERFDGIPEKVMDTTPEDIADPESDFEЕКLEEISEH 584
           .* **.* * :*:*. : . : . : * :*: : : :
EcoR124I  ESEKEKKDFVKLFGEYLRAENILQNYDEFATLKALQQIDLS-DPVAVEKFKAEHYVDDEK 828
EcoAI     DEEQVTGVDEPPAPPYQVTDTDVGLPEEDEKKIRKFHVNGVAVGVIAQRVQYYDADGK 644
           :.*: . * :. . * :*:*. .*.* :*: * *
EcoR124I  FAELQTIIRLPADRKIQDYRSAYNDIRDWQRREKEAEKKEKSTTDWDDVVFVDLLKSQEI 888
EcoAI     LVTESFKDYTRKTLLKEYASLDDFTRKWQADRKE-----AI IHELEQQ----- 688
           :. . . :*: * : *.* : : : : :* :
EcoR124I  NLDYILGLIFEHNRQNKKGEMIEEVKRLIRSSLGNRAKEGLVVDIFIQQTNLDDLPDKAS 948
EcoAI     -----GI IWEVLAEVVGKDLDPDMLCHVYVYGPPLTRKERAENVRKRNYFTKYSEAAQ 742
           *:*:* : : ** . : : . : : : : : : * .
EcoR124I  IIDAFFTFQAQREQQREAEALIKEENLNEDAAKRYIRTSKREYATENGTELNETLPKLSPI008
EcoAI     AVLDNLLDKYADAGVQEIESIQVLKLPFDSMGTLP E I IKTGFGRNG--YNQALSELEN 800
           : : : : * : * : : : * : . .* * :*:*.
EcoR124I  LNPQYKTKKQAVFQKIVSFIEKFKGVGGKI 1038
EcoAI     EIYQLPPRSA----- 810
           * . : .

```

Příloha 2: **Primární sekvence hsdR genu EcoAI**. Červeně označeny nukleotidy, jejichž záměna je zodpovědná za substituci Lys126, zeleně nukleotidy zodpovědné za substituci Lys142.

```

1 atggcggaac tgaacctaag taacctgacg gaagcagaca tcattaccaa atgcggtatg
61 ccagccattc tcaatgcagg ctgggacaac acaacgcaaa tcagacagga ggtcaaactc
121 cgggacggta aagtcacgtc acgtggtaaa gttgcggcac gcagaacggt aaaatctgct
181 gacatcgtgc tgtaccacaa gccaggcatt cccttagccg tgattgaagc aaaagccaac
241 aaacatgaaa ttggcaaaagg gatgcaacag ggcatatgaat atgcgcgcct gctggacggt
301 ccttttgttt ttgccaccaa tggatgatggc tttatcttcc gcgatgccac cgcagccgaa
361 ggtgaatgcc ttgaaagca aataacgctg gatgacttcc cctccccgcg tgaactctgg
421 caaaaattct gcctctggaa aggatacaca caagctcagc ttccgggtgat tactcaggac
481 tattacgacg atggcagcgg taaatcgcca cgttattacc agcttcaggc aatcaacaaa
541 accattgaag ccgtctcaa cgggcaaac cgcgttctgc tggatcatggc gaccggaaca
601 gggaaaaact ataccgcatt ccagatcatc tggcgcctgt ggaatcaaaa aaataaaaaa
661 cgatttttgt tccttgccga tcgcaacatt ctggctcgacc aaacaaaaaa taatgatttc
721 cagccatttg gtacggcaat gaccaaagtc agcggacgca ccattgatcc cgcttatgaa
781 attcacctcg cgctctatca ggctataact ggcccggagg aagacaaaaa agcgtttaa
841 caagtcgcac cagatttctt cgatctgatc gtgatcgacg aatgccatcg cggcagcgca
901 tccgaagaca gcgcctggcg agagatcctt gattatttca gttccgccac ccaaattggc
961 ttaaccgcca cgccaaaaga gacgcatgaa gtctccagca cggattactt cggcgcgacc
1021 gtttacgtct actcgctaaa agaagggatc gaagacggct tcctcgcctt ttataaagtt
1081 gtccgtgttg atattgatgt tgatctgcaa ggctggcgcc caaccaaagg gcaaactgac
1141 ttaaaccgcg aagtgatcga cgatcgtatc tataaccaga aagatttctga tcgcacgatg
1201 gtaatcgacg aacgcacaga actggttgcc agaaccatta ccgactatct caagcgcacc
1261 aacccgatgg ataaaacccat cgtcttctgt aacgacatcg atcatgcaga acgatgcgc
1321 cgcgccctgg ttaatctcaa cccggagcag gtgaaaaaga acgacaaata cgtcatgaaa
1381 atcaccggcg atgatgaaat tggcaaagct cagttggata acttcatcaa cccgaaaaaa
1441 ccgtaccggg ttatcgcgac cacttcagag ctgatgacca ccgggtgtgga tgctaaaacc
1501 tgcaaaactg tagtactgga ccagaacatc cagtcgatga ccaaattcaa gcagattatc
1561 ggtcgtggta cacgcatcga cgaacggtac ggcaaactct ggtttaccat cctcgacttt
1621 aaaaaagcca ccgaactggt tgccgatgag cgttctgatg gcattcccga aaaagtcatg
1681 gataccacac cagaggatat cgcgatcca gaatctgatt ttgaagagaa actcgaagaa
1741 atcagcgaac atgacgaaga acaggttaaca ggcgttgatg aaccgcctgc gccaccatac
1801 caggttaccg ataccgatga tgtcggccca cttccggaag aagacgagaa gaaaatccgc
1861 aagtttcacg tcaacggtgt agcgggtgggc gttattgcc agcgtggtca gtattacgac
1921 gccgacggta aactggttac cgaatctttt aaagattaca cccgcaaac actgctcaa
1981 gaatatgcct cgctggatga ctttaccgcg aagtggcagg acgccgatcg gaaagaagcg
2041 atcattcacg agctggagca acaggggatt atctgggaag tactggcaga agaagtcggt
2101 aaagatctcg acccgttcga catgctttgc cacgtagtgt atggtcagcc gccgtaacc
2161 cgcaaagagc gcgccgagaa cgtgcgcaag cggaactact tcacaaaata ctctgaagca
2221 gcgcaagccg tgctcgataa tctgctggat aaatacgcg atgcgggcgt acaggagatc
2281 gaaagtattc aggtgctgaa acttaaacca ttcgacagca tgggcacctt accggagatt
2341 attaaaaccg gatttggcga ccgtaacggg tataatcagg cgctcagcga gctggaaaa
2401 gaaatctacc aattaccgcc ccgctctgct taa

```