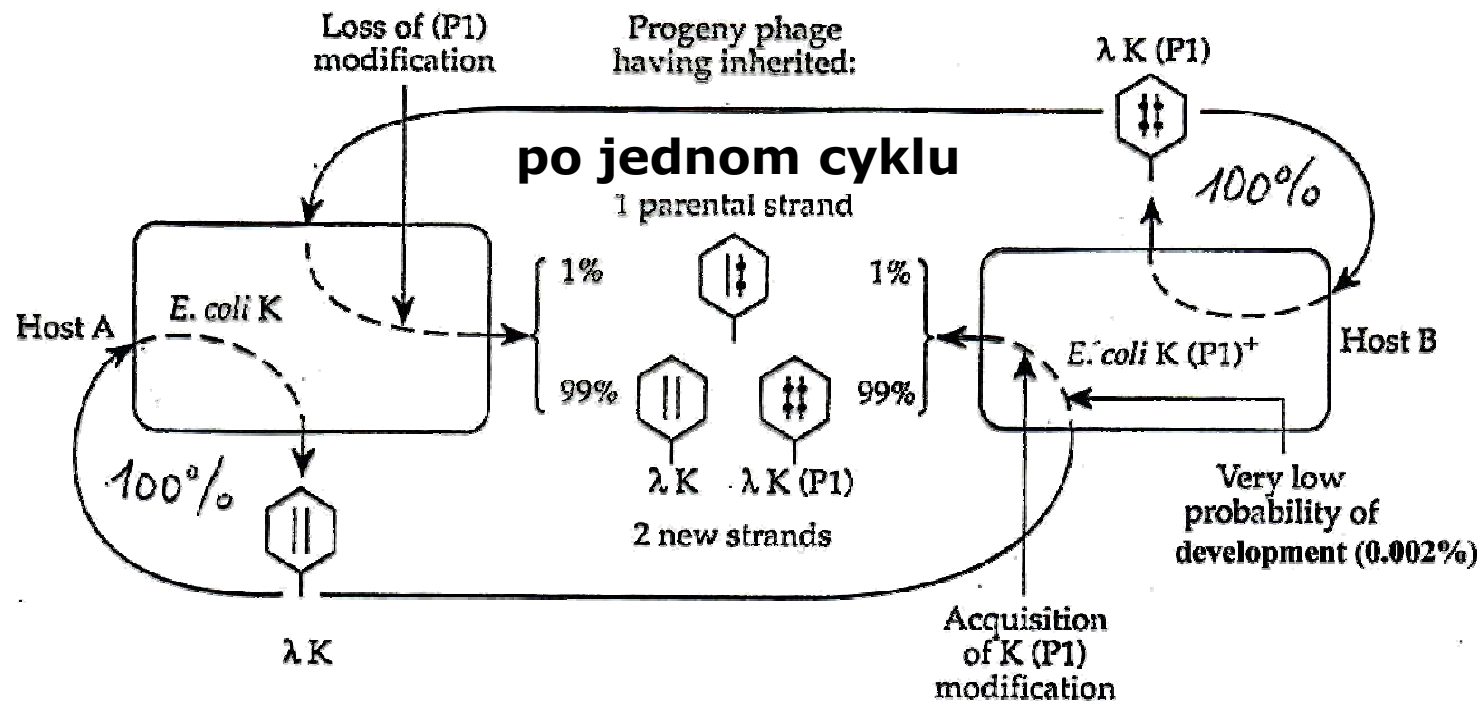
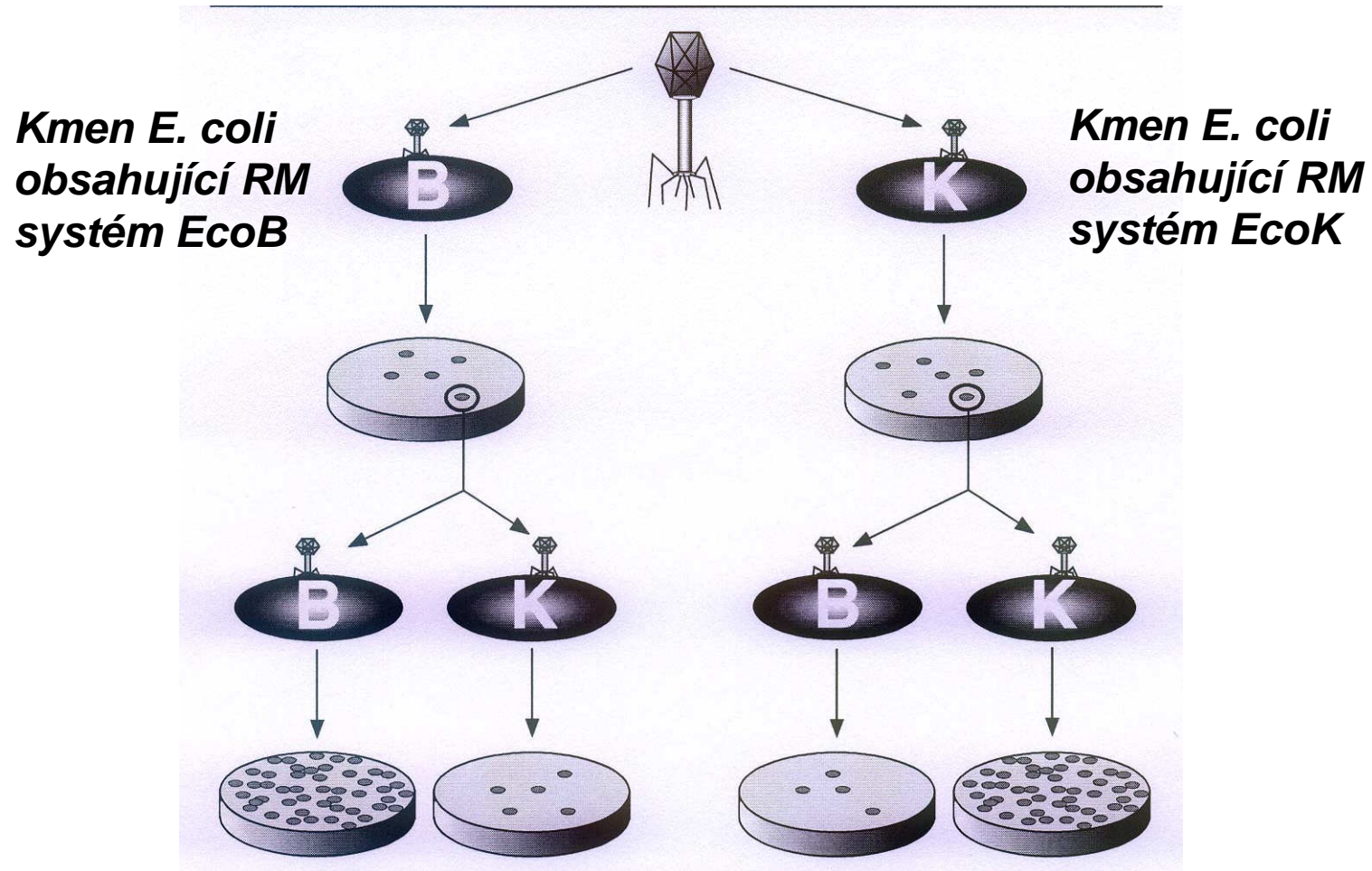


# RESTRIKCE A MODIFIKACE FÁGOVÉ DNA



Kmeny *E. coli* K a K(P1)<sup>+</sup> mají vzájemně odlišnou **hostitelskou specifitu (K a P1)** = obsahují odlišné RM-systémy

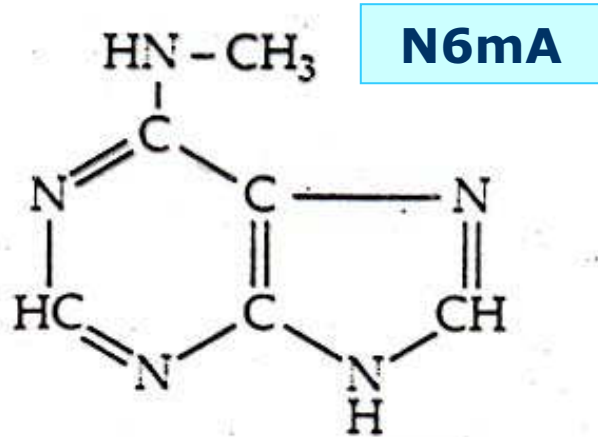
## Experimentální důkaz přítomnosti a působení RM systémů



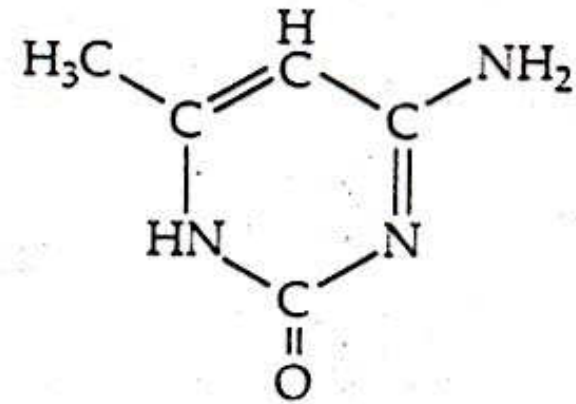
# RESTRIKČNĚ-MODIFIKAČNÍ (RM) SYSTÉMY

- Složkami standardního restričně-modifikačního (RM) systému jsou sekvenčně specifické enzymy:
  - A. modifikační metyláza (metyltransferáza)
  - B. restriční endonukleáza
  
- Restriksi a modifikaci podléhá jen dsDNA:
  1. Při infekci fágem
  2. Při přenosech DNA transdukci a konjugaci, omezeně transformací (při umělé tr.)

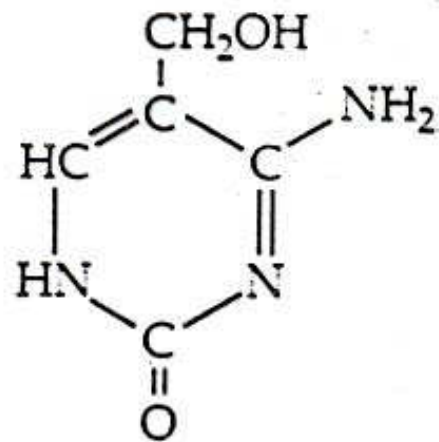
# Metylované báze v DNA



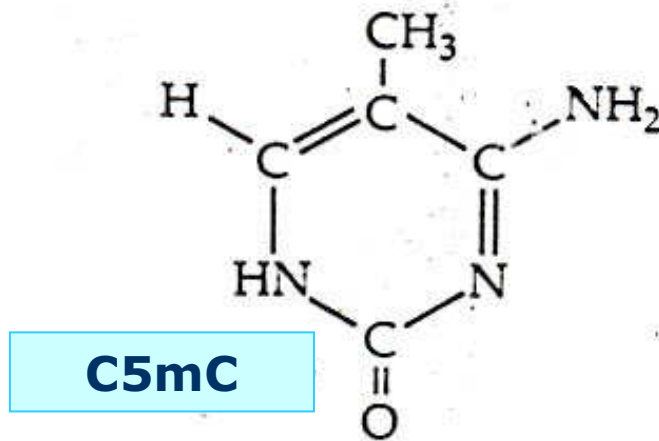
N6-methyl-adenine



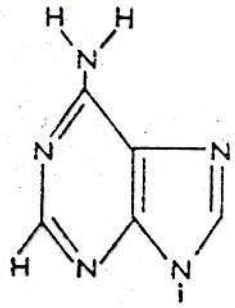
C4-methyl-cytosine



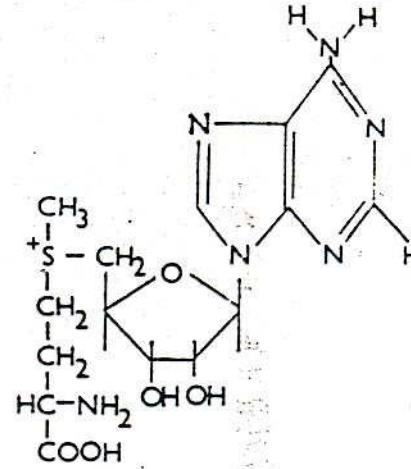
C5-OHmethyl-cytosine



C5-methyl-cytosine

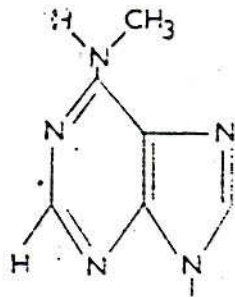
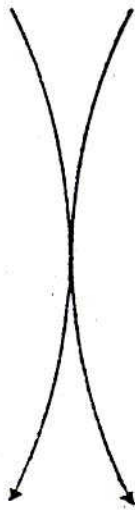


adenin



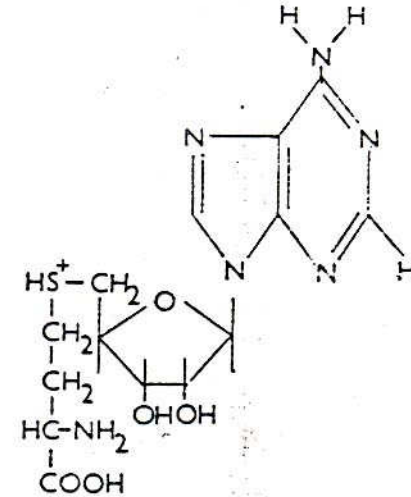
S-adenozylmetionin

Donor  
metylové  
skupiny:  
**SAM**  
(AdoMet)



6-metylaminoapurin

**N6mA**



S-adenozylhomocystein

# SYSTÉMY RESTRIKCE A METYLACE

## 1. Hsd systémy (host specificity of DNA)

- třídy (typy) I, II, III, IV  
restrikční a metylační aktivita

## 2. Systémy restrikce modifikované DNA

- Mar, Mrr (methylated-adenine), DpnI
- Mcr (methylated-cytosine)

## 3. Systémy metylující specifické sekvence DNA

- Dam (adenine-methylation)
- Dcm (cytosine-methylation)



**Table 6.1** Characteristics of the four classes of Hsd systems.

Properties	Class I	Class II <b>95%</b>	Class III <sup>a</sup>	Class IV <sup>a</sup>
R and M activities	Trimeric complex	Single enzymes	Trimeric complex	Single protein + 2nd methylase
Genetic organization	Two transcripts: <i>hsdR</i> , <i>hsdSM</i>	Usually two transcripts: <i>hsdR</i> , <i>hsdM</i>	Two transcripts: <i>hsdR</i> , <i>hsdSM</i>	<b>1-2 geny,</b>
Recognition sequence	Non-symmetric, hyphenated	Usually palindromic	Non-symmetric	Palindromic, hyphenated
Requirements for restriction methylation	SAM <sup>b</sup> SAM, Mg <sup>2+</sup> , ATP	Mg <sup>2+</sup> SAM	SAM, ATP, Mg <sup>++</sup> SAM, ATP, Mg <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
Location of cleavage site	Random, at least 10 <sup>3</sup> bases away from recognition site	Usually within the recognition sequence	24–26 bases 3' of recognition site	<b>30</b> bases 3' of recognition site
Restriction versus methylation	Mutually exclusive	Separate	Simultaneous	<b>protein štěpí jen modifikovanou DNA</b>
Recycling of endonuclease	No	Yes	Yes	
Model systems	<i>EcoB</i> and <i>EcoK</i>	<i>EcoRI</i>	SP1	<i>Eco57I</i> + M- <i>Eco57I</i>

a, Only five Class III and one Class IV cases have been studied. b, SAM: S-adenosylmethionine.

Table 6.2 Recognition sequences of some restriction enzymes.

Enzyme	Name	Organism	Recognition sequence	Observations
Class I	<i>EcoK</i>	<i>E. coli</i> K12	AACN <sub>6</sub> GTGC	Cleavage $\geq 10^3$ bases away
Class II	<i>EcoRI</i>	<i>E. coli</i> RY13	G/AATTC	Palindromic sequence
	M- <i>EcoRI</i>	<i>E. coli</i> RY13	GAA*TTC	Cognate methylase
	<i>RsrI</i>	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>	G/AATTC	Isoschizomer of <i>EcoRI</i>
	<i>AvaI</i>	<i>Anabaena variabilis</i>	C/PyCGPuG	Palindromic degenerate sequence
	<i>DpnI</i>	<i>Diplococcus pneumoniae</i>	GmeA/TC	Necessitates me-DNA
	<i>BamHI</i> <i>MboI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Moraxella bovis</i>	G/GATCC GATC	} Compatible enzymes
Class III	SP1	Phage P1	AGACC	Cleavage 24 bases from 3' end
Class IV	<i>Eco57I</i>	<i>E. coli</i> RFL57	CTGGAG	Cleavage 14 bases from 3' end

By convention, only the 5' to 3' strand is shown. N, nucleotide; Py, pyrimidine; Pu, purine; meA, methyl-  
Ade; \* represents the methylating site; / indicates the cleavage site.



# GENY KÓDUJÍCÍ RM-SYSTÉMY JSOU NESENY NA RŮZNÝCH REPLIKONECH

**TABLE 2. Organization of Types I and III Restriction–Modification Systems**

Group	Members	Recognition sequence	Cellular location of the R–M system
Type IA	<i>EcoK</i>	AAC(N) <sub>6</sub> GTGC	Chromosomal
	<i>EcoB</i>	TGA(N) <sub>8</sub> TGCT	Chromosomal
	<i>EcoD</i>	TTA(N) <sub>7</sub> GTCPy	Chromosomal
	<i>StySB</i>	GAG(N) <sub>6</sub> PuTAPyG	Chromosomal
	<i>StySP</i>	ACC(N) <sub>6</sub> GTPuC	Chromosomal
	<i>StySQ</i>	ACC(N) <sub>6</sub> PuTAPyG	Chromosomal
	<i>EcoDXX1</i>	ATCA(N) <sub>7</sub> ATTC	Plasmid
Type IB	<i>EcoA</i>	GAG(N) <sub>7</sub> GTCA	Chromosomal
	<i>EcoE</i>		Chromosomal
Type IC	<i>EcoR124</i>	GAAN <sub>6</sub> PuTCG	<i>IncFIV</i> plasmid R124
	<i>EcoR124/3</i>	GAAN <sub>7</sub> PuTCG	<i>IncFIV</i> plasmid R124/3
Type III	<i>EcoP1</i>	AGACC	Prophage P1
	<i>EcoP15</i>	CAGCAG	Plasmid 15B
	<i>HinfIII</i>	CGAAAT	Chromosomal

**lokalizace genů na chromozomu,  
plazmidech, nebo profágách**

# Přítomnost genů RM systémů na mobilních elementech

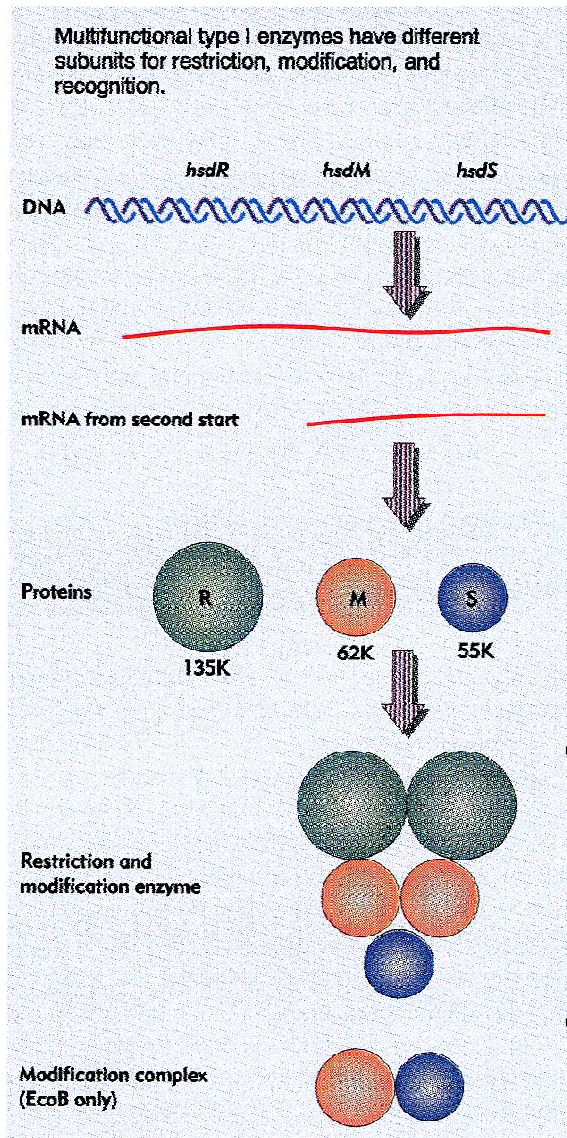
Mobilní element	Příklad RM systému
<b>Plazmid</b>	<p><i>paeR71 P. aeruginosa</i>  <i>ecoRI E. coli</i>  <i>ssoII Shigella sonnei</i>  <i>bsp6I Bacillus sp.</i></p>
<b>Bakteriofág/profág</b>	<p><i>hindIII H. influenzae</i>  <i>sau42I S. aureus</i>  <i>ecoO1091 E. coli</i>  <i>bsuMI B. subtilis</i></p>
<b>Integrační komulativní element/genomický ostrov</b>	<p><i>Sth368I Streptococcus thermophilus</i>  <i>hsdMS S. aureus</i></p>
<b>Transpozon</b>	<p><i>Rle39BI</i></p>
<b>Integron</b>	<p><i>xbaI Xanthomonas campestris</i>  <i>M.Vch0211 Vibrio cholera</i>  <i>hphI Vibrio metschnikovii</i>  <i>CAA68 Lactococcus lactis</i></p>

# Klasifikace RM-systémů

RMS Type	Subunit Arrangement	Examples	Substrate (^=cleavage)	Methyl Added
I		<i>EcoB</i> <i>EcoK</i> <i>StySKI</i>	TG <u>A</u> <sub>8</sub> TGCT ( <u>N6m</u> A) A <u>G</u> C <u>A</u> N <sub>8</sub> N <sub>7</sub> C <u>G</u> AACN <sub>6</sub> GTGC ( <u>N6m</u> A) G <u>C</u> A <u>C</u> N <sub>6</sub> G <u>T</u> CGATN <sub>7</sub> GTTA G <u>C</u> T <u>A</u> CN <sub>7</sub> A <u>T</u>	
II		<i>EcoRI</i> <i>HhaI</i> <i>PvuII</i>	G <sup>^</sup> AATTC ( <u>N6m</u> A) G <u>C</u> G <sup>^</sup> C ( <u>5m</u> C) CAG <sup>^</sup> CTG ( <u>N4m</u> C)	
IIS		<i>FokI</i> <i>HphI</i> <i>MboI</i>	GGATGN <sub>9</sub> <sup>^</sup> ( <u>N6m</u> A) C <u>C</u> L <u>V</u> C <u>A</u> N <sub>13</sub> <sup>^</sup> ( <u>N6m</u> A) GGTGAN <sub>8</sub> <sup>^</sup> ( <u>N6m</u> A) C <u>C</u> V <u>L</u> N <sub>7</sub> <sup>^</sup> ( <u>5m</u> C) GAAGAN <sub>6</sub> <sup>^</sup> ( <u>N6m</u> A) C <u>L</u> L <u>C</u> L N <sub>7</sub> <sup>^</sup> ( <u>N4m</u> C)	
III		<i>EcoP I</i> <i>EcoP15 I</i> <i>StyLTI</i>	AG <u>A</u> CCN <sub>7</sub> <sup>^</sup> ( <u>N6m</u> A) CAGC <u>A</u> GN <sub>25</sub> <sup>^</sup> ( <u>N6m</u> A) CAG <u>A</u> GN <sub>7</sub> <sup>^</sup> ( <u>N6m</u> A)	
IV		<i>Eco57I</i> <i>GsuI</i> <i>MmeI</i>	CTGA <u>A</u> GN <sub>16</sub> <sup>^</sup> ( <u>N6m</u> A) CTGG <u>A</u> GN <sub>16</sub> <sup>^</sup> ( <u>N6m</u> A) TCCR <u>A</u> CN <sub>20</sub> <sup>^</sup> ( <u>N6m</u> A)	
"Bcg-Like"		<i>BcgI</i> <i>BplI</i> <i>BaeI</i>	<sup>^</sup> N <sub>10</sub> CGAN <sub>6</sub> TGCN <sub>12</sub> <sup>^</sup> <sup>^</sup> N <sub>8</sub> GAGN <sub>5</sub> CTCN <sub>13</sub> <sup>^</sup> <sup>^</sup> N <sub>10</sub> ACN <sub>4</sub> GTAYCN <sub>12</sub> <sup>^</sup>	

- target recognition (specificity)     - DNA helicase  
 - modification methyltransferase     - restriction endonuclease





# PODJEDNOTKOVÉ SLOŽENÍ ENZYMOVÉHO KOMPLEXU TYPU I

**S = rozpoznání cílové sekvence**

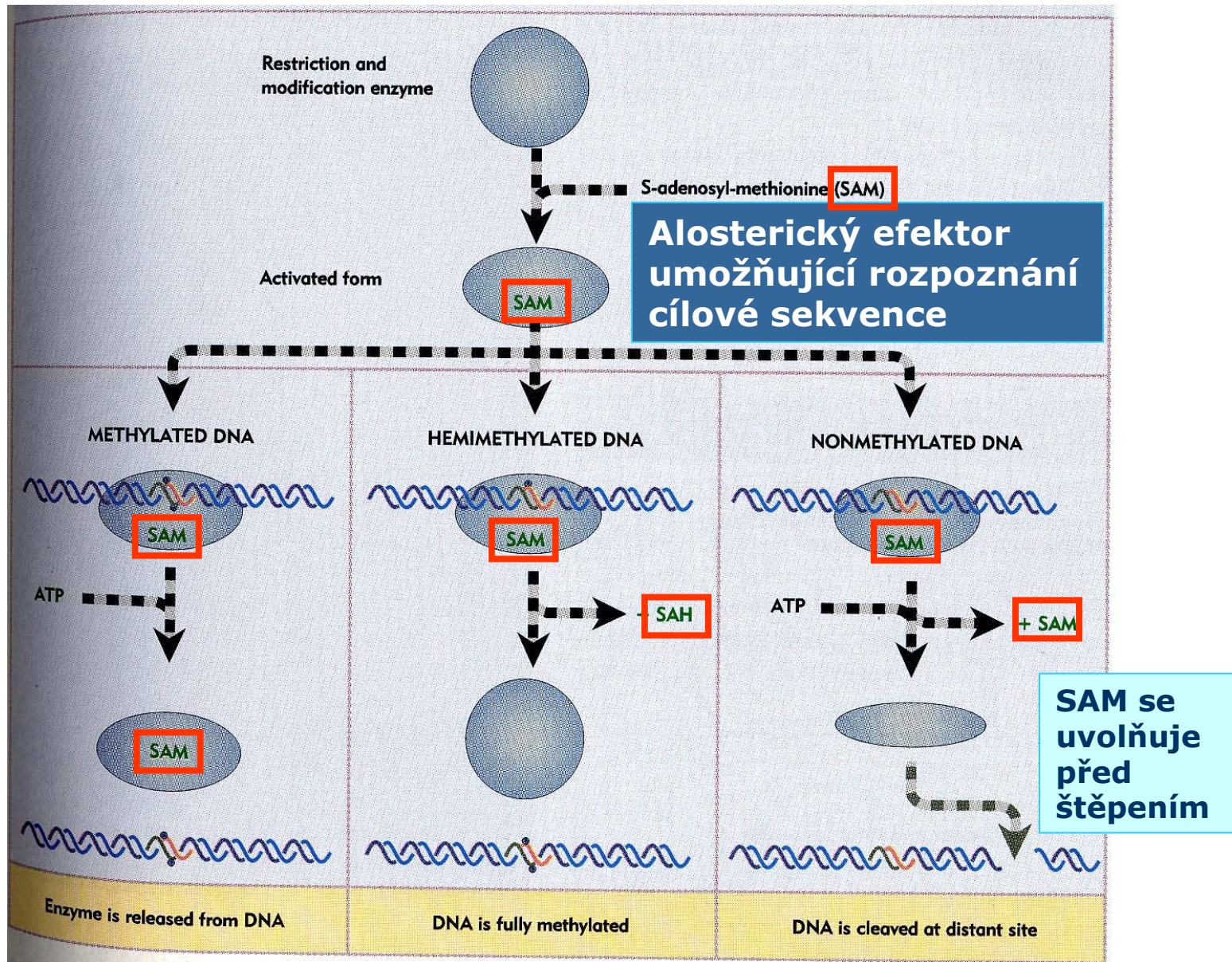
**M = vazebné místo pro SAM a aktivní místo pro metylaci**

**R = aktivní místo pro hydrolýzu ATP, pro translokaci DNA a pro štěpení**

**Multifunkční komplex**

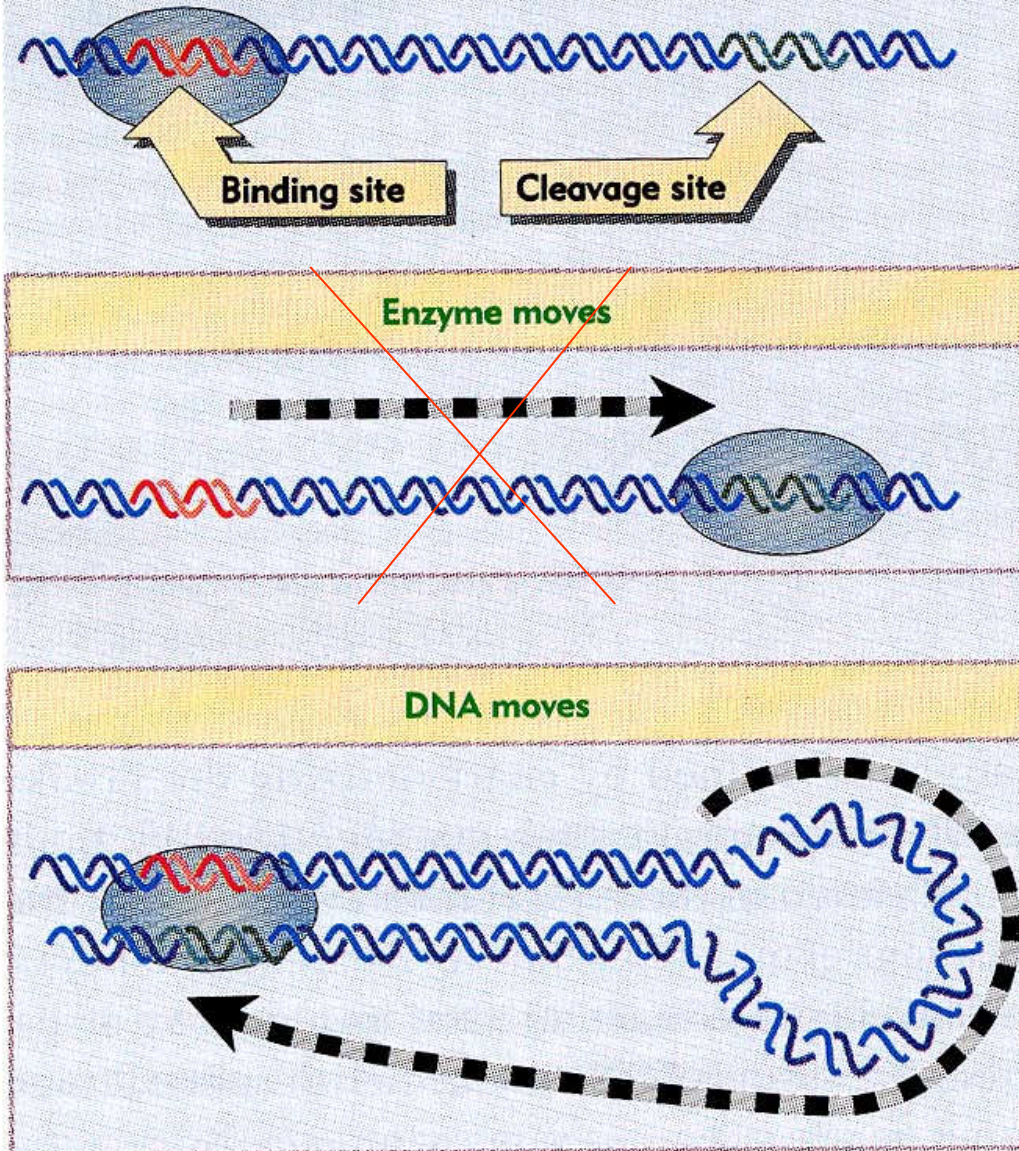


# INTERAKCE ENZYMŮ RM SYSTÉMU TYPU I S CÍLOVOU SEKVENCÍ NA DNA





Does a type I enzyme move along DNA or does it remain at its target site, simultaneously pulling the DNA through the protein?

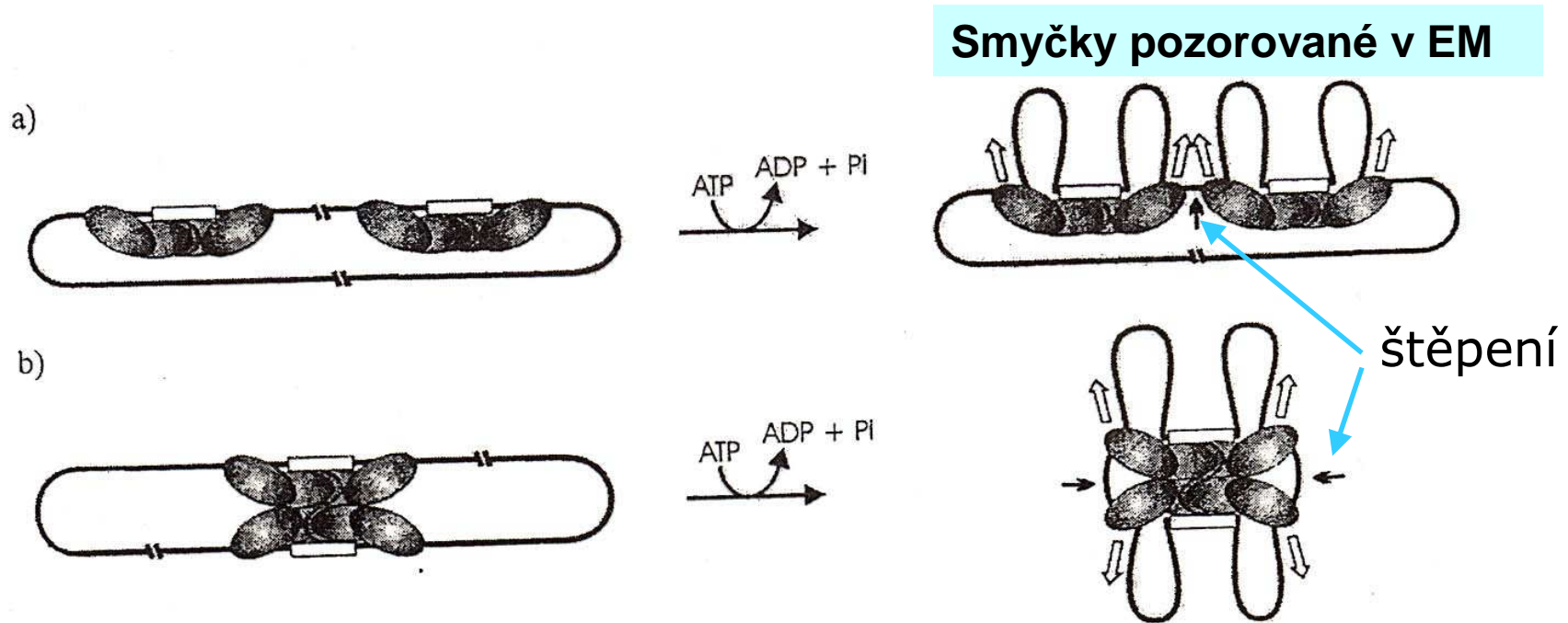


## Interakce enzymového komplexu s rozpoznávacím místem

1. Vyhledání rozpoznávací sekvence
2. Podle stavu sekvence (M, NM, H-M) dochází k
  - a) uvolnění enzymu
  - b) restrikci
  - c) metylaci



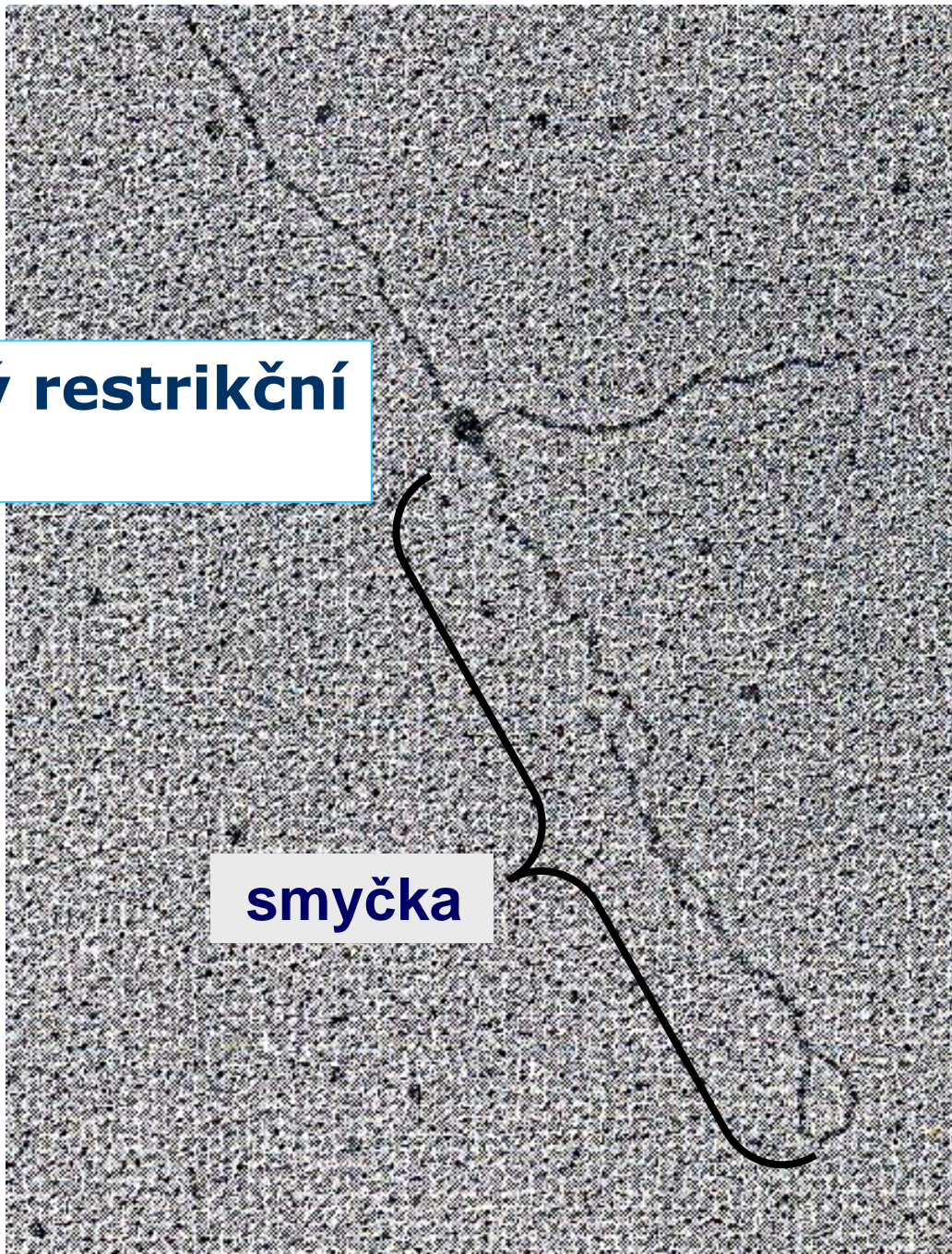
# MODELY TRANSLOKACE DNA ZPROSTŘEDKOVANÉ ENZYMY RM SYSTÉMŮ TYPU I



**ATP-dependentní translokace DNA - ke štěpení dochází po kolizi DNA řetězců v místě navázaného enzymu**

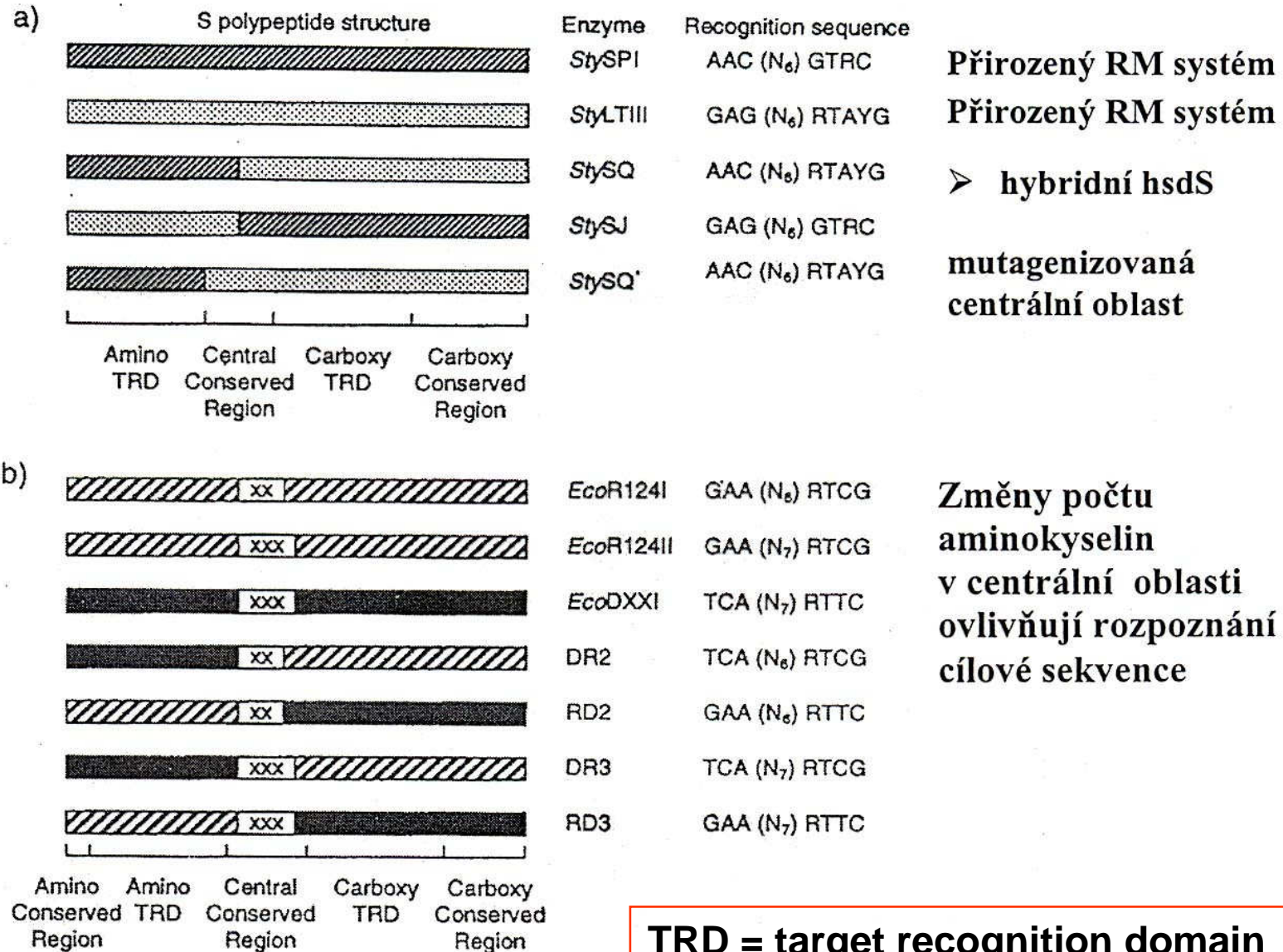
**Navázaný restriční enzym**

**smyčka**



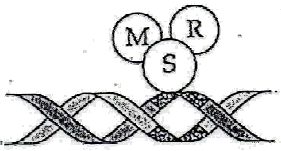
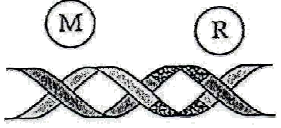
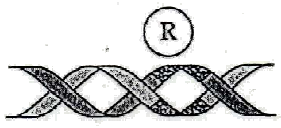
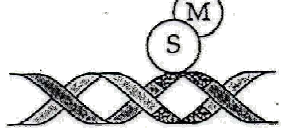
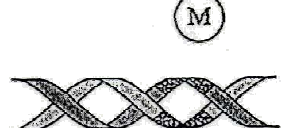
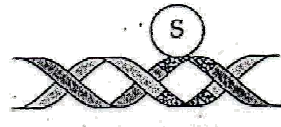
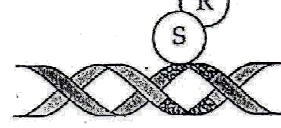


## Vytváření RM systémů typu I s novými sekvenčními specifitami



**TRD = target recognition domain**

# MUTACE V GENECH RM SYSTÉMU

Genotype <i>hsdS hsdR hsdM</i>	Phenotype r m	Protein-DNA interaction	Activity R M
+ + +	+ +		+ +
- + +	- -		- -
- + -	- -		- -
+ - +	- +		- +
- - +	- -		- -
+ - -	- -		- -
+ + -	+ -		<u>lethal</u>

$r^{+/-}/m^{-}$

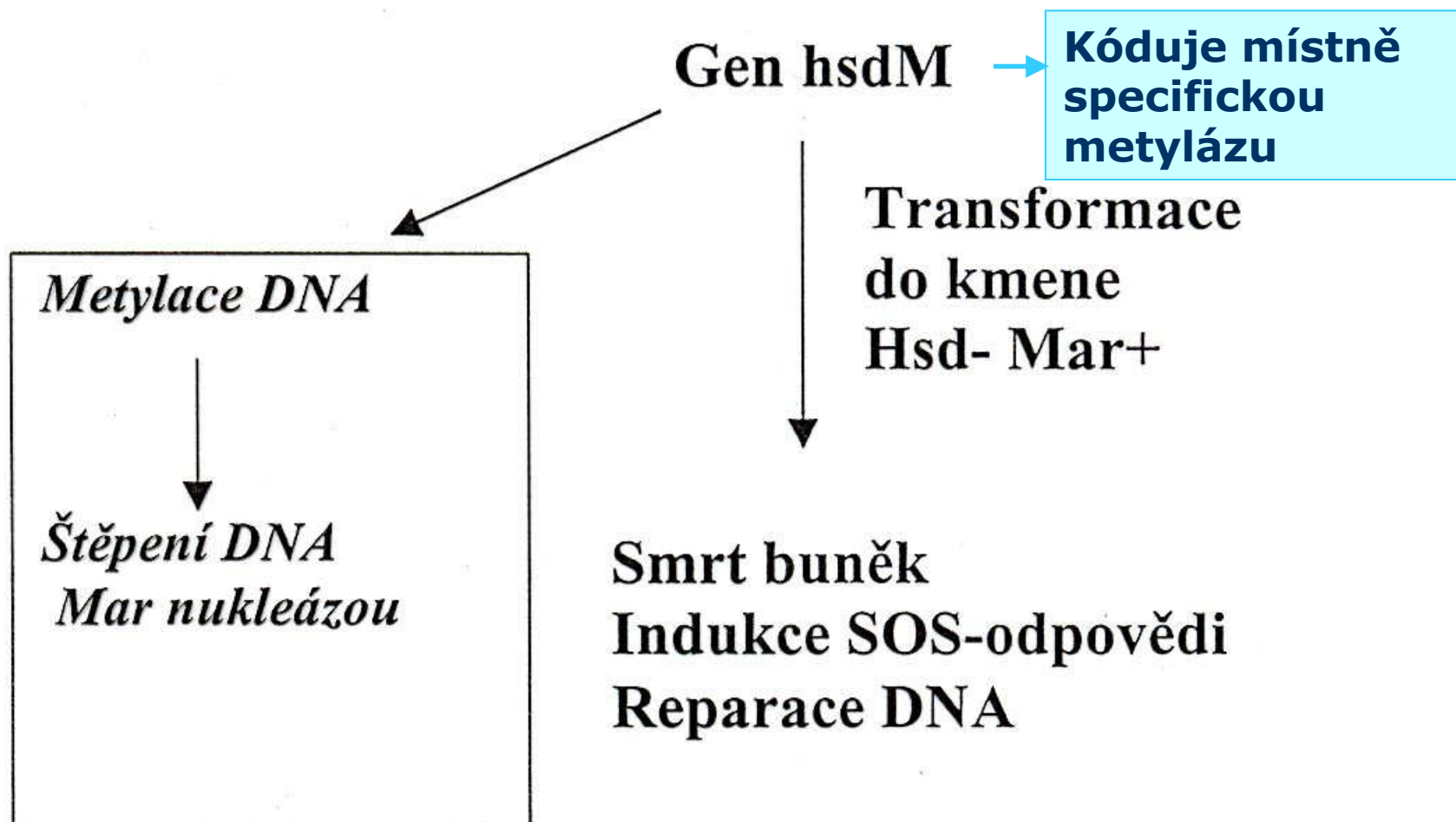
Pro RM systém typu I je nezbytná funkční *hsdS* - její mutace vede k fenotypu r- m-.

**S<sup>-</sup> → M<sup>-</sup>R<sup>-</sup>**

# RM SYSTÉMY, U NICHŽ JE ŠTĚPENA MODIFIKOVANÁ DNA (KMEN NETVOŘÍ METYLÁZU)

- *E. coli* K12
- Mar = methyladenine restriction (GmeAC, GmeAG)
- Mrr = methyladenine recognition and restriction
- Mcr = methylcytosine restriction - modified cytosine restriction (GmeCG - C5, N4, HM-C5) - štěpení sekvence v několika místech (štěpí též neglukozylovanou fágovou DNA)
  
- *Diplocooccus (Streptococcus) pneumoniae*:  
RM systém DpnI - štěpí GmACT
- (*Caulobacter, Neisseria, Acholeplasma, Streptomyces*)

## Detekce restričního systému Mar







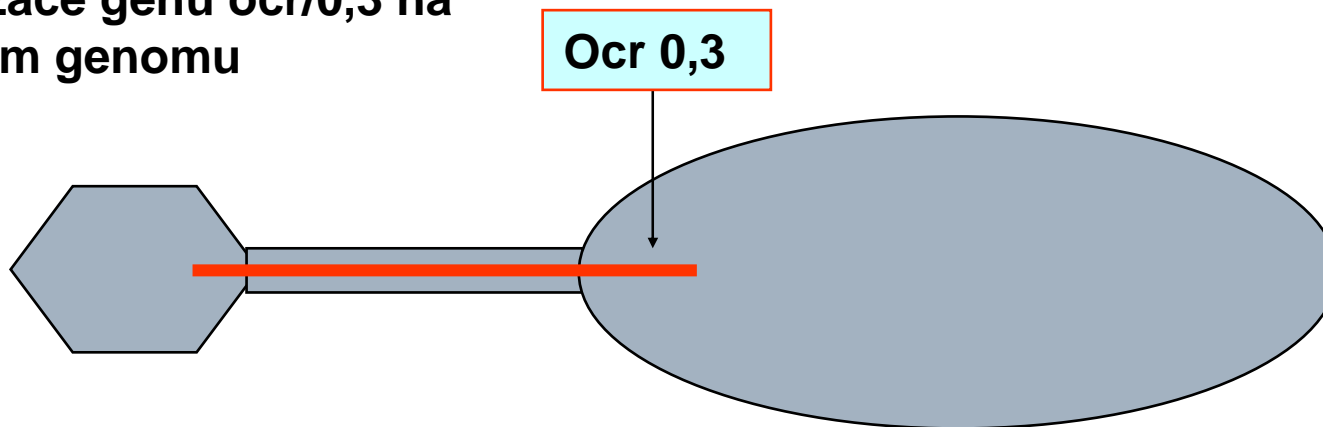
**TABLE 3. Antirestriction Strategies**

Strategy	Bacteriophage	Antirestriction gene, polypeptide, or base modification	Antirestriction target (R-M type)	Reference
Inhibition of endonuclease	T3, T7	<i>ocr</i>	<i>EcoK</i> , <i>EcoB</i> (type I) <i>EcoP1</i> (type III)	Krüger et al., 1978 Krüger et al., 1982
	φNR2rH, φ1rH	20 kD	<i>BamN<sub>x</sub></i> (type II)	Makino et al., 1979 Makino et al., 1980
Protection of viral DNA by viral-encoded methylase	SPβ, φ3T, SPR	<i>M.BsuRI</i>	M.SPR	Warren, 1980 Noyer-Weidner et al., 1981
	T2, T4	T2,4 <i>dam</i>	Mutant <i>EcoP1</i> (type III)	Bächi et al., 1979 Hattman et al., 1985
Overproduction of host-encoded methylase	λ	<i>ral</i>	<i>EcoK</i> , <i>EcoB</i> (type I)	Zabeau et al., 1980
Modified bases in viral genome	SP01, SP8, SP2G	5-Hydroxymethyluracil (for thymine)	Many type II systems	Hemphill and Whiteley, 1975
	φ25, φe, 2C PBS1, PBS2 T-even phages	Uracil (for thymine) Hydroxymethylcytosine (for cytosine)	<i>EcoB</i> (type I) <i>EcoRI</i> , <i>EcoRV</i> (type II)	Warren, 1980 Li et al., 1975 Revel and Georgopoulos, 1969 Takahashi et al., 1978
Metabolism of S-adenosyl-L-methionine (SAM)	P1	<i>darA</i> , <i>darB</i>	<i>EcoK</i> , <i>EcoB</i> (type I)	Krüger and Bickle, 1983
Underrepresentation of restriction sites in phage genome	φ1, φ29	No GGCC sites	<i>BsuRI</i> (type II)	Kawamura et al., 1981 Ito and Roberts, 1979

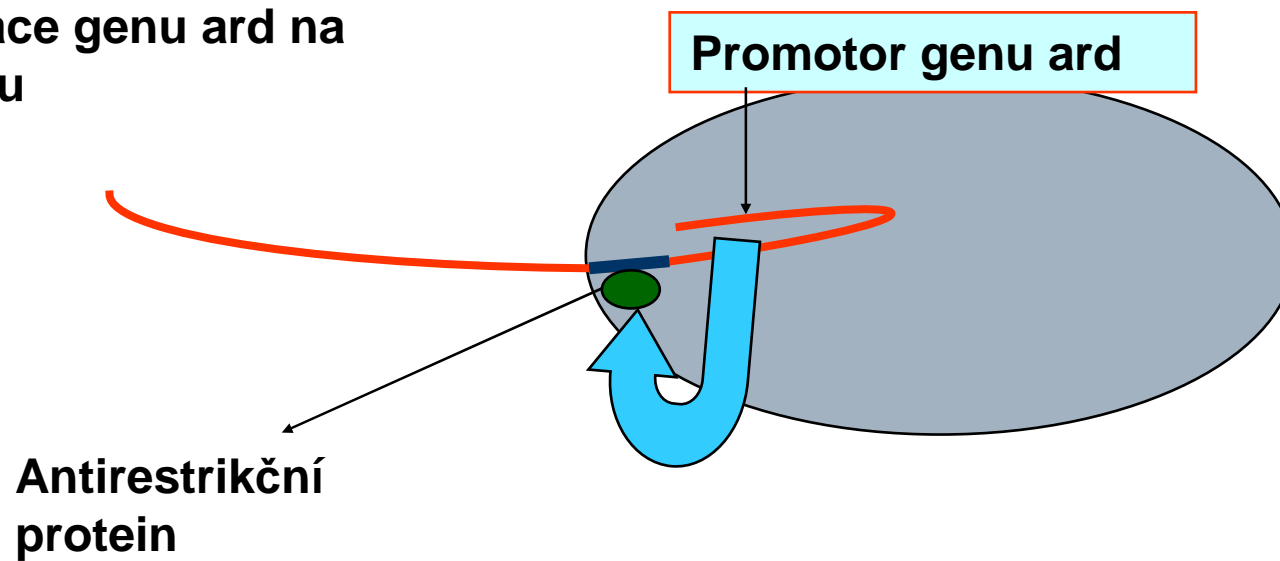
## Příklady antirestrikčních mechanismů

- **Fág MU - konverze adeninu na A-(1-acetamido)adenin**
- **Plazmidy: Ard (alleviation of restriction) - antirestrikční protein**
- **Fág lambda: Ral (restriction alleviation) - antirestrikční protein - zvýšení modifikační aktivity enzymů typu AI na NM DNA**
- **Fágy T3 a T7: (proteiny Ocr = overcoming restriction) inaktivace enzymů typu I (zábrana jejich vazby na DNA)**
- **Fág P1: Dar-proteiny (defense against restriction) ? - rozklad SAM**

Lokalizace genu ocr/0,3 na fágovém genomu

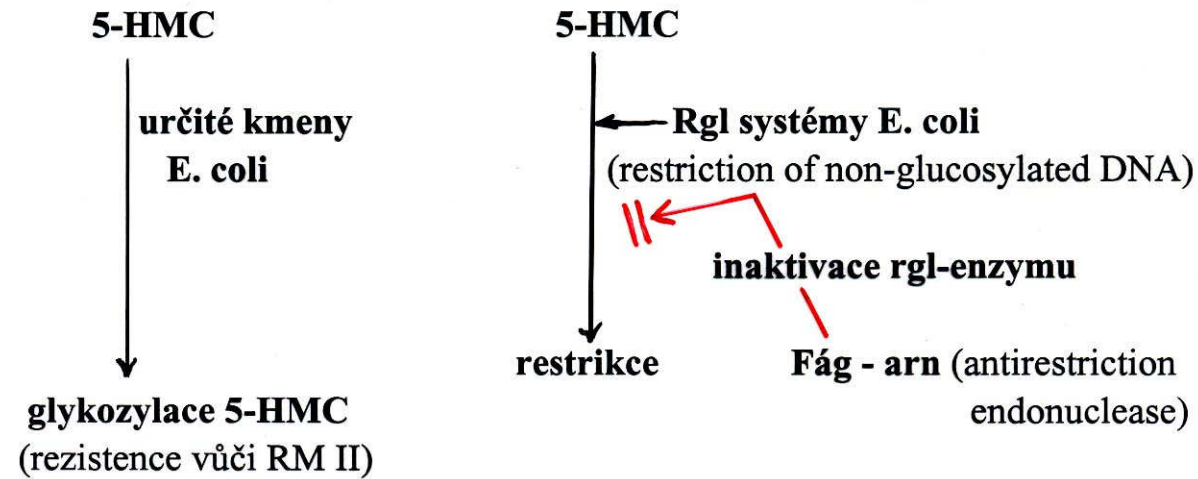


Lokalizace genu ard na plazmidu



## Antirestrikční mechanismy T-sudých fágů

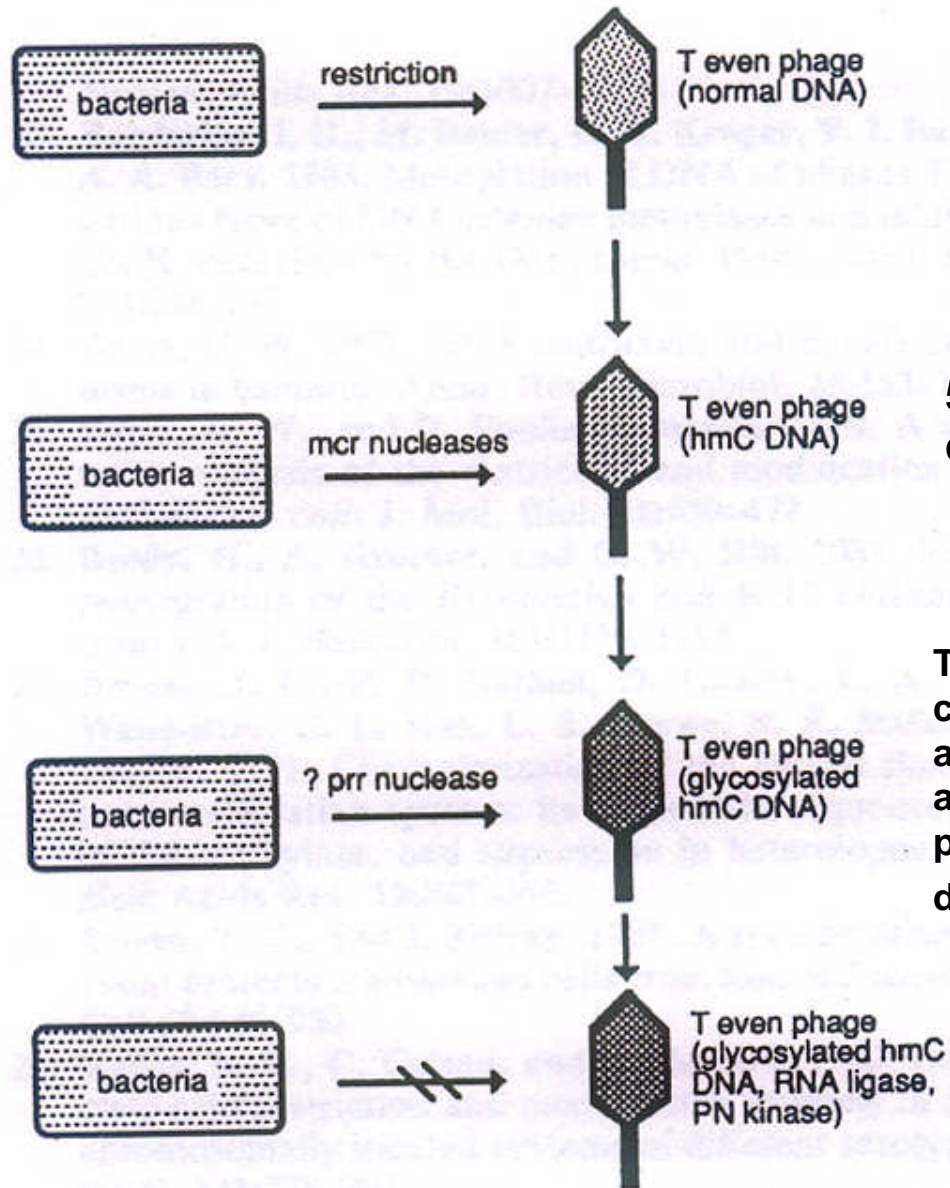
### Fágová DNA



### Reakce fága na restrikci

1. T4 ----> HMC
2. E. coli --> rgl
3. T4 ----> arn
4. T4 ----> glukozylace HMC

## Evoluce interakcí mezi T-sudými fágy a hostiteli



**5-hydroxymethyl-  
cytosin**

The prr locus was originally described as coding a ribonuclease that is activated after phage T4 infection to cut within the anticodon of a specific tRNA, inactivating protein synthesis and thus blocking phage development.

**glykozylace hmC**



# SYSTÉMY METYLACE DNA (E. COLI K12)

- **1. Systém Dam (dam-metyláza)**
  - metylace A v GATC (donor met = SAM)
  - GATC - regulační funkce : počátek replikace, promotory, reparace
- **(sekvence GATC je rozpoznávána 15% RE typu II, je přítomna u 50% všech 4N-RE, není však cílovou sekvencí pro restriktázy v žádném z druhů enterobaktérií.**
  
- **2. DNA cytozin metylační - Dcm (E. coli K12)**
  - metylace cytozinu na C5 v sekvenci CC(A/T)GG (?funkce při reparaci na velmi krátké vzdálenosti)

# **VÝSKYT RM SYSTÉMU U ENTEROBAKTERIÍ (3 DRUHY)**

- 30% kmenů (z 1000 studovaných) obsahuje RM systém**
- u 170 RM systémů bylo zjištěno jen 33 různých cílových sekvencí**
- nebyly zjištěny RM systémy rozpoznávající 4 bp-místa (včetně GATC)**

# VÝZNAM RESTRIKCE

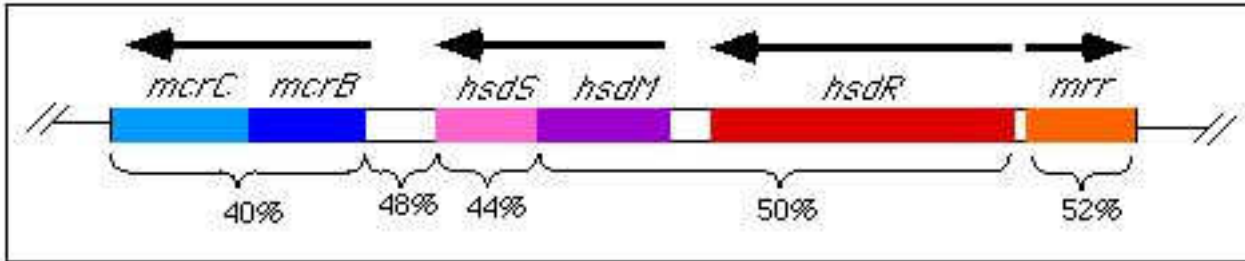
- **Ochrana integrity vlastní DNA**
  - **obrana před bakteriofágy (typ II)**  
...dočasné působení, nutná obměna
- **Systém napomáhající rekombinaci cizorodé DNA (typ I)**
  - **štěpení DNA (náhodně) mimo rozpoznávací sekvenci umožní rekombinaci mnoha genů - analýza přenosu genů transdukací a konjugací podporuje vliv RM systémů při vzniku mozaikových genomů (*E. coli*)**
- **? „Selfish DNA“**
  - **molekulární paraziti bakterií. RM systému typu II se udržují prostřednictvím plazmidů, které je kódují (usmrcení bezplazmidových buněk)**

## RM systémy jako mechanismus postsegregačního zabíjení

Locus (plasmid)	Bacteria	Killer	Target	Anti-killer
<i>B. Restriction-modification systems</i>		<b>restriktáza</b>		<b>metyláza</b>
<i>paeR7I</i> (pMG7)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PaeR7I	5' CTCGAG in the chromosome	M.PaeR7I
<i>ecoRI</i> (RTF-1)	<i>Escherichia coli</i>	EcoRI	5' GAATTC in the chromosome	M.EcoRI
<i>ecoRII</i> (Fig. 6; RTF-2; N-3)	<i>Escherichia coli</i>	EcoRII	5' CCWGG in the chromosome	M.EcoRII
<i>ecoRV</i> (pLG13)	<i>Escherichia coli</i>	EcoRV	5' GATATC in the chromosome	M.EcoRV
<i>ssoII</i> (Fig. 6; P4)	<i>Shigella sonnei</i>	SsoII	5' CCNGG in the chromosome	M.SsoII
<i>bsp6I</i> (pXH13)	<i>Bacillus</i> sp. strain RFL6	Bsp6I	5' GCNGC in the chromosome	M.Bsp6I



"immigration control region"



**Odlišný obsah GC  
– indicie přenosu  
HGT**

<u>R-M genes</u>	<u>Recognition sequence</u>
<i>hsdS<sub>K</sub> hsdM<sub>K</sub> hsdR<sub>K</sub></i>	AACNNNNNNGTGC
<i>hsdS<sub>B</sub> hsdM<sub>K</sub> hsdR<sub>B</sub></i>	TGANNNNNNNNGTGC
<i>hsdS<sub>K</sub> hsdM<sub>B</sub> hsdR<sub>B</sub></i>	AACNNNNNNGTGC

**Gen *hsdS* může být nahrazen genem *hsdS* z jiného RM systému stejné třídy, nebo geny mohou vzájemně rekombinovat**

# VYUŽITÍ RM SYSTÉMŮ V EUKARYOTICKÝCH BUŇKÁCH

Transgenní linie myších buněk exprimující geny RM systémů

1. přenos a exprese genu M.PaeR7 (*Pseudomonas aeruginosa*) - **metyláza** CTCGmeAG
2. přenos a exprese genu R.PaeR7 - endonukleáza (**restriktáza**)
3. infekce buněk HSV1 adenoviry - očekávaná rezistence buněk - vytvoření organismu rezistentního k virům (nebo jen určitých tkání)

**Další možnost: studium vlivu metylace na genovou expresi**

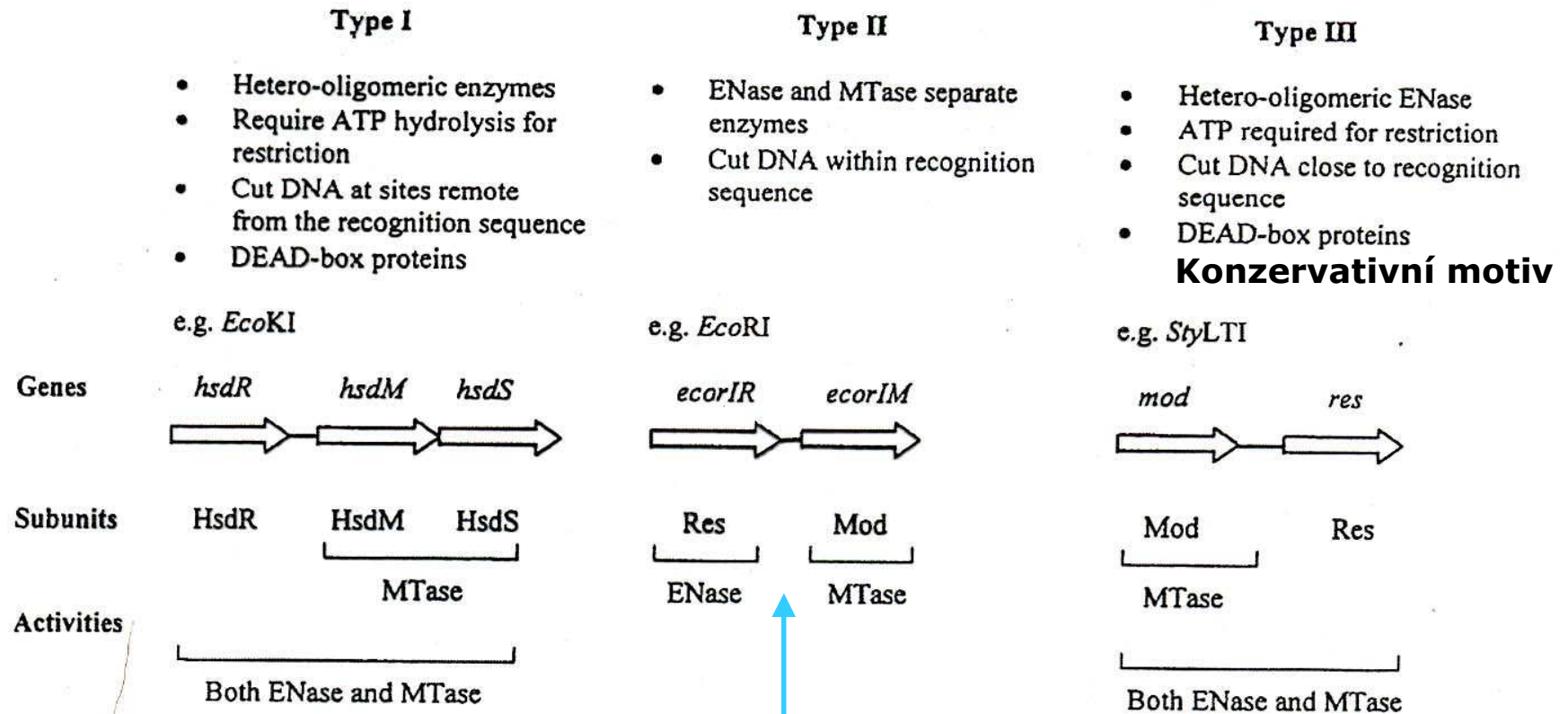


FIG. 1. Distinguishing characteristics and organization of the genetic determinants and subunits of the different types of R-M systems. ENase, restriction endonuclease; Mtase, methyltransferase. Modified with permission from a figure in reference 83.

**Geny pro R a M bývají blízko sebe, ale ne v transkripčních jednotkách**