

Restrikce a modifikace DNA

.

Restrikčně modifikační systémy

- Umožňují rozlišit vlastní DNA od cizí DNA
- Ochraňují buňky před infekcí cizorodou DNA
- Restrikce = degradace
- Modifikace = ochrana před degradací
- Kmen restrikční specificity r má i odpovídající modifikační specificitu m , která chrání vlastní DNA před degradací

Platí

- Chromosomální, plasmidová nebo fágová DNA pronikající do buněk s restriční specificitou **r**
- jsou degradovány, pocházejí-li z buněk,
- které nemají odpovídající modifikační specificitu **m**
- **Modifikace = metylace (A,C)**

Restrikce a modifikace DNA byla zjištěna při množení fága lambda na různých hostitelích

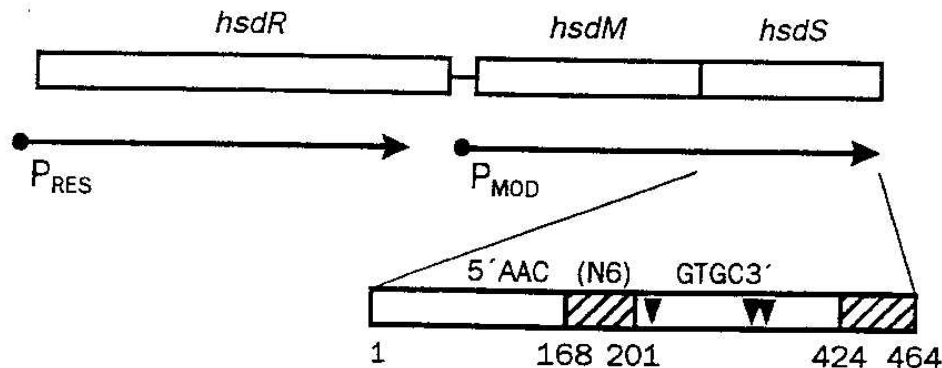
- Lambda/K12 : ***E.coli* K12 +**, *E.coli* C +
- Lambda/C : ***E.coli* K12 -**, *E.coli* C +
(eop nižší než 10^4)
- Lambda/C/K12: ***E.coli* K12 +**, *E.coli* C +
- ***E.coli* K12 má RM systém X *E. coli* C**
- ***E.coli* K12 rozlišuje vlastní DNA od cizí**

Tři typy restričně modifikačních systémů

- I, II, III
- Lokus *hsd* (hostitelská specificita pro DNA)
- *hsdR* – gen pro restriční endonukleázu
- *hsdM* – gen pro modifikační metylázu
- *hsdS* – gen pro subjednotku, která poskytuje přesnou specificitu předchozím enzymům

Kompletní lokus *hsd* R-M systému typu I (Hubáček a spol. 1992)

hsd hostitelská specifita pro DNA



Obr. 1. Kompletní lokus *hsd* R-M systému typu I a jednotlivé segmenty polypeptidu HsdS.

Restriktázy typu I mají

- 3 podjednotky pro restrikci
- 2 nebo 3 podjednotky pro modifikaci
- Další enzymové aktivity (ATPasa, topoizomeráza)
- Vyžadují kofaktory pro restrikci (Mg^{2+} , ATP)
- Vyžadují kofaktory pro modifikaci (AdoMet, reakci stimulují Mg^{2+} , ATP)

Restriktázy typu I

- Rozpoznávají asymetrická místa na DNA
- Štěpí náhodně, daleko od asymetrických rozpoznávacích míst

Restriktázy **typu II** mají

- 1 jednotka pro restrikci
- 1 jednotka pro modifikaci
- Další enzymové aktivity nemají
- Vyžadují kofaktory pro restrikci (jen Mg^{2+})
- Vyžadují kofaktory pro modifikaci (AdoMet)

Restriktázy typu II

- Rozpoznávají specifická symetrická místa
- Štěpí ve specifických symetrických rozpoznávacích místech

Restriktázy typu III mají

- 2 podjednotky pro restrikci
- 1 nebo 2 podjednotky pro modifikaci
- Další enzymové aktivity nemají
- Vyžadují kofaktory pro restrikci (Mg^{2+} , ATP)
- Vyžadují kofaktory pro modifikaci (AdoMet, Mg^{2+})

Restriktázy typu III

- Rozpoznávají asymetrická místa na DNA
- Štěpí 25-27 bp od 3 konce asymetrických rozpoznávacích míst

Mcr/Mrr systémy mají

- několik podjednotek pro restrikci
- Není u nich modifikace
- Další enzymové aktivity nemají
- Vyžadují kofaktory pro restrikci (Mg^{2+} , GTP)

Mcr/Mrr

- McrA/McrBC rozpoznávají a štěpí DNA sekvence s metylovaným C
- Mrr/Mcf rozpoznávají a štěpí DNA sekvence s metylovaným A a C

Restrikčně –modifikační systémy – souhrnná charakteristika jednotlivých typů (Hubáček a spol. 1992)

Tab. I. Charakteristika restrikčně-modifikačních systémů

R-M systémy	Typ I	Typ II	Typ III	Mcr/Mrr
podjednotky pro restrikci	3	1	2	několik
podjednotky pro modifikaci	3 nebo 2	1	1 nebo 2	není modifikace
jiné enzymové aktivity	ATPasa, topoisomerasa	žádné	žádné	žádné
kofaktory pro restrikci ^a	Mg ²⁺ , ATP AdoMet	Mg ²⁺	Mg ²⁺ , ATP, (AdoMet)	Mg ²⁺ , GTP (pro McrBC)
Kofaktory pro modifikaci ^a	AdoMet (ATP, Mg ²⁺)	AdoMet	AdoMet, Mg ²⁺	žádné
Štěpení DNA	štěpí náhodně, daleko od asymetrických rozpoznávacích míst	štěpí v místech uvnitř symetrických rozpoznávacích míst ^b	štěpí 25-27 bp od 3'-konce asymetrických rozpoznávacích míst	štěpí DNA v rozpoznávacích místech s methylováním C nebo A

^aKofaktory (v závorce) reakci stimuluji, ale nejsou absolutně nutné.

^bVýjimka u typu IIS, viz text.

V technikách genových manipulacích

- Se využívají restriční enzymy typu II