

MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE PROKARYOT

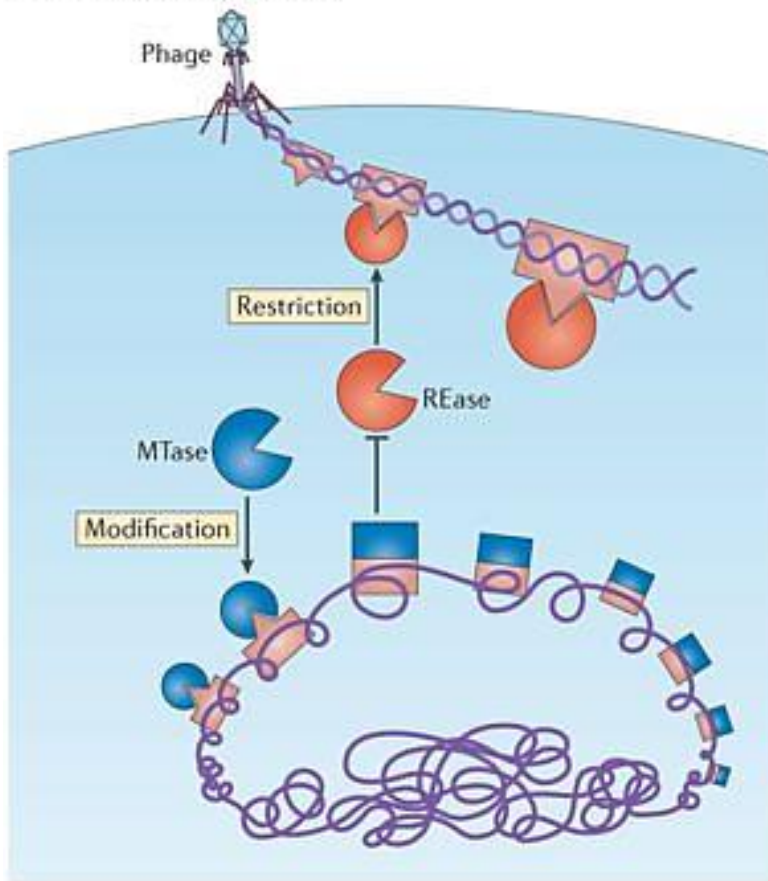
podzim 2018

Restrikčně-modifikační systémy prokaryot

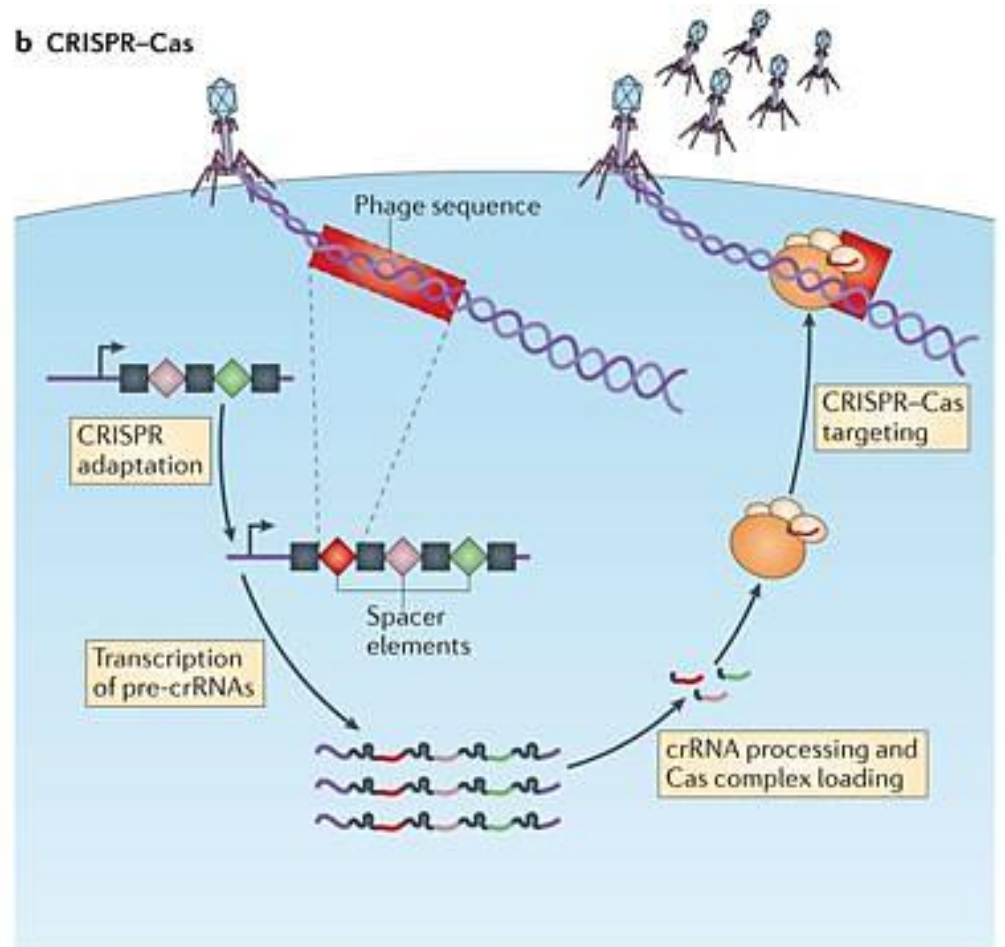
Ivana Mašlaňová

iva.maslanova@gmail.com

a Restriction-modification



b CRISPR-Cas



RM systém – obranný mechanismus hostitele

1950s – poprvé pozorován proces restrikce a modifikace – růst bakteriofágů na různých kmenech

1962 – molekulární podstatu restrikce a modifikace popsal Arber a Dussoix, popsali hostitelem řízené modifikace fága λ

Hlavní znaky RM systémů:

- endonukleolytické štěpení cizorodé DNA – DNA hostitele je chráněna metylací adenosinů nebo cytosinů v definovaných místech (rozpoznávací místa) sekvence.
- RM systém obsahuje složky: restriční endonukleázu (RE), DNA-metyltransferázu (Mtase)

Dvě skupiny R-M systémů:

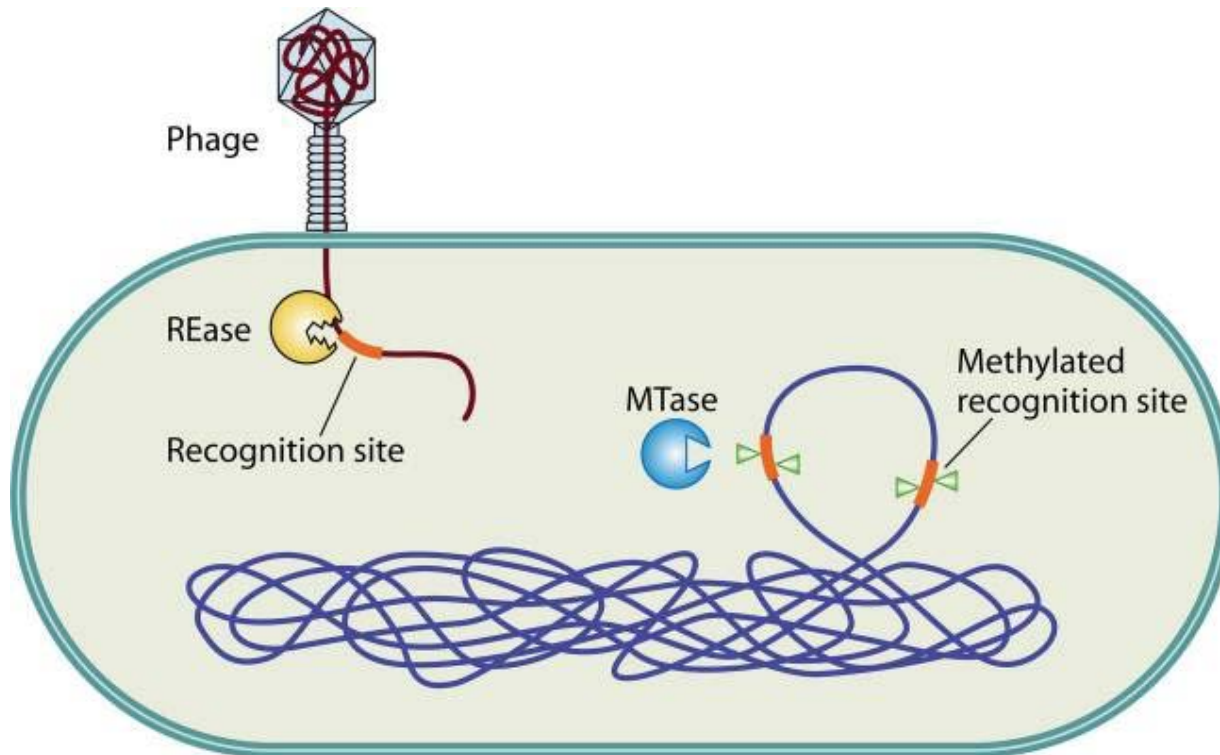
- **(a)** R-M systémy, štěpící nemodifikovanou DNA (výjimkou enzymy podtypu IIM rozpoznávající a štěpící metylovanou DNA např. DpnI, BspI, GluI).
- **(b)** enzymy štěpící modifikovanou DNA např. enzymy, EcoKMcrA, EcoKMcrBC a EcoKMrr, všechny z *Escherichia coli* K (Roberts a kol., 2007).
- Typy RM systémů (podle struktury): I, II, III, IV a V

RM systém – obranný mechanismus hostitele

Názvosloví restričních enzymů, metyltransferáz a jejich genů:

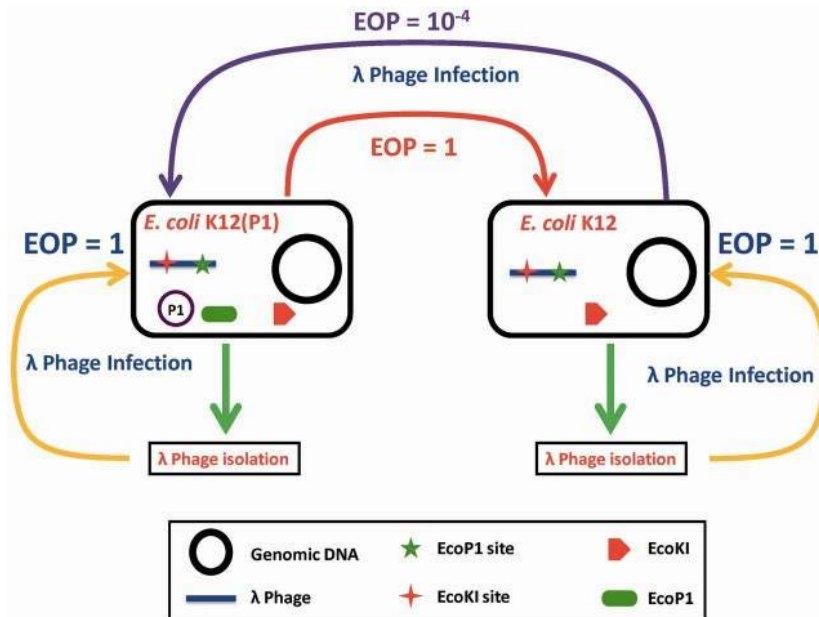
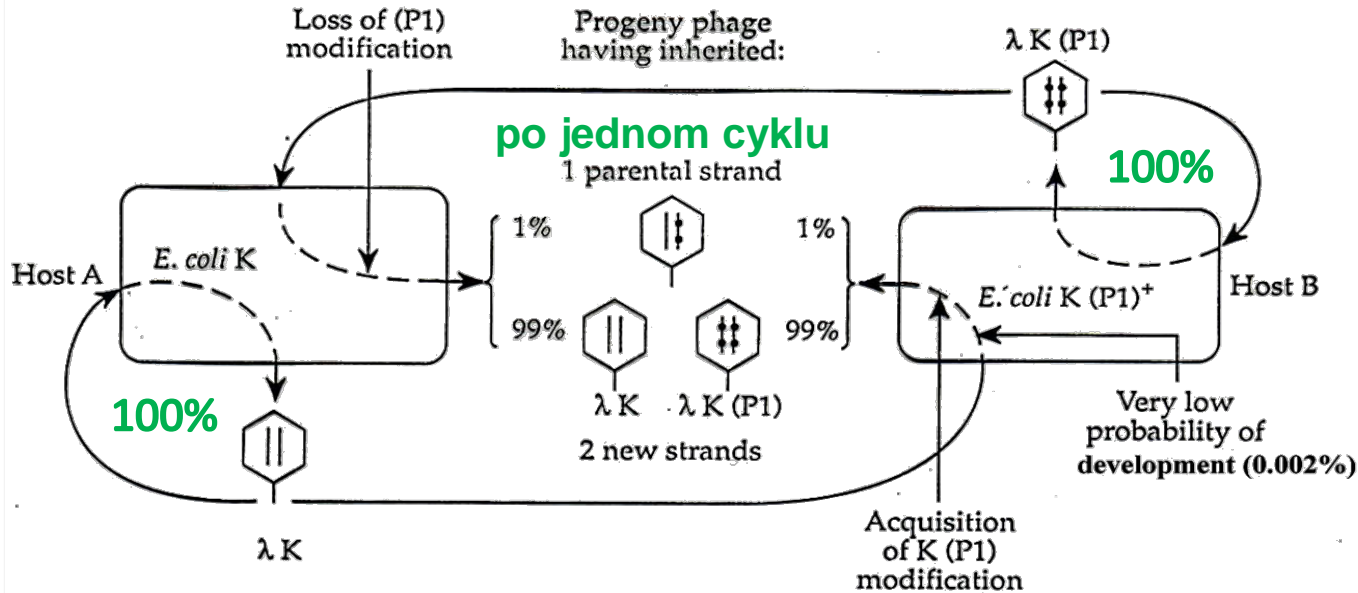
- **1973: H. O. Smith** a **D. Nathans** navrhli systém pravidel, podle kterých byly pojmenovány jak existující, tak i nově objevené enzymy účastnící se procesu restrikce a modifikace DNA
- název enzymu začíná třemi písmeny - první velké písmeno - počáteční písmeno rodu a následující dvě malá písmena - počátečními písmeny druhu
 - Např. enzym *HindIII* – enzym získaných z bakterie *Haemophilus influenzae* sérotypu *d*, římská číslice se používá na odlišení většího počtu enzymů izolovaných ze stejného organismu.
 - Rozdělení restričních enzymů na tři hlavní typy (typ I, typ II, typ III a typ IV):
 - Typ I - podtypy IA, IB, IC, ID a podtyp IE
 - Typ II - podtypy IIA, IIB, IIC, IIE, IIF, IIG, IIH, IIM, IIP, IIS, IIT.
 - Typ IV - enzymy štěpící pouze metylovanou DNA a vykazující malou specifitu, pokud jde o rozpoznávání specifických sekvencí DNA.

RM systém – obranný mechanismus hostitele



RM systém rozpoznává cizorodou DNA – stav metylace, nemetylovaná DNA je rozeznána **restrikční endonukleázou** (REase), metylaci rozpoznávaných míst na hostitelském chromozomu zprostředkovávají **metyltransferázy** (MRase) RM systému.

Restrikce a modifikace fágové DNA

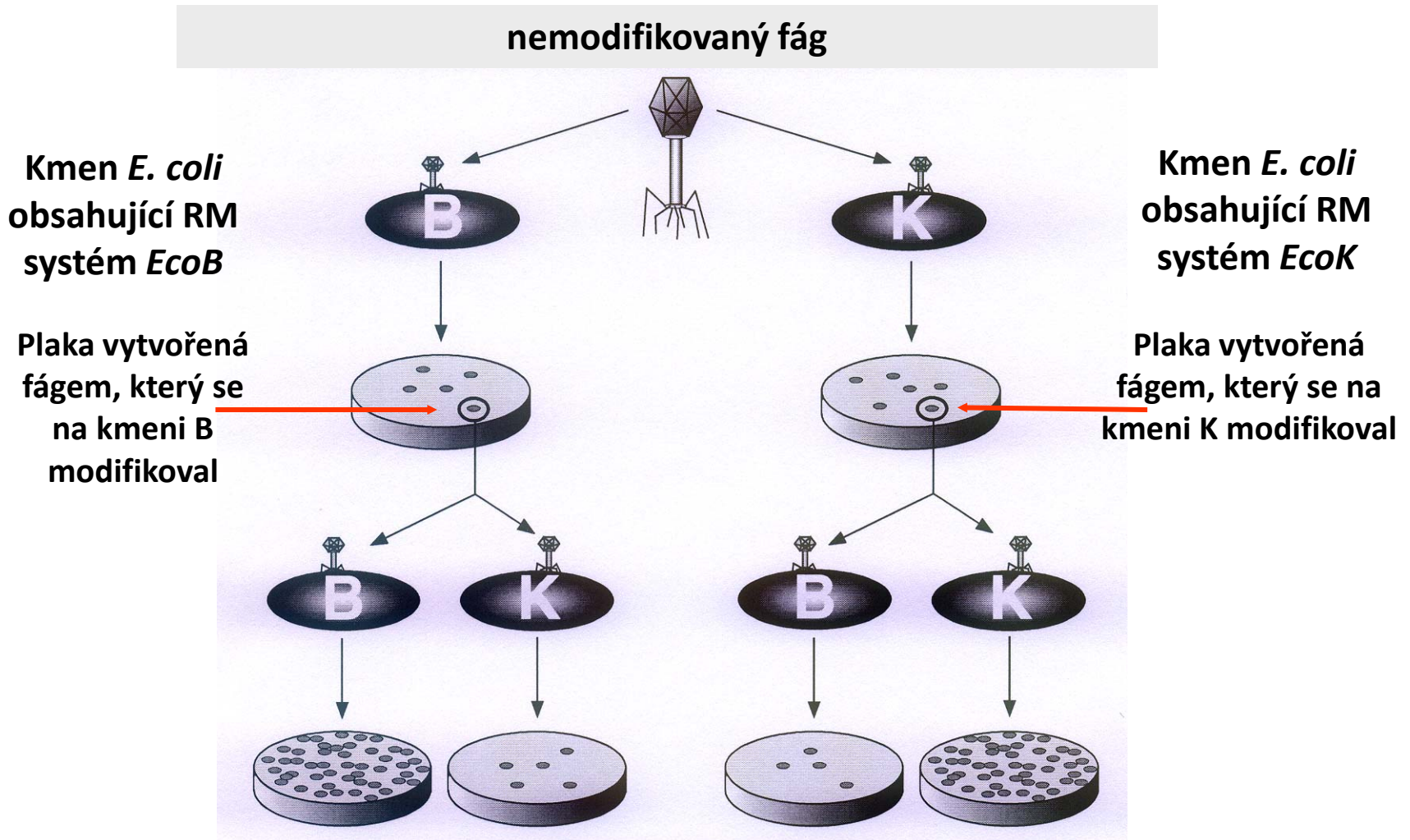


Kmeny *E. coli K* a *E. coli K (P1)⁺* mají vzájemně odlišnou hostitelskou specifitu (K a P1) = obsahují odlišné RM-systémy

Fágy po jednom růstovém cyklu na hostiteli získávají nové hostitelské spektrum.

Nejedná se o mutaci - změna se týká celé populace a není dědičná – epigenetická záležitost.

Experimentální důkaz přítomnosti a působení RM systémů



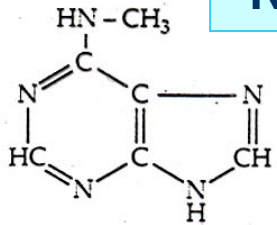
RESTRIKČNĚ-MODIFIKAČNÍ (RM) SYSTÉMY

- Složkami standardního restriktivně-modifikačního (RM) systému jsou sekvencně specifické enzymy:
 - A. modifikační metyláza (metyltransferáza)
 - B. restriktivní endonukleáza
- Restriktivní a modifikační podléhá jen dsDNA:
 - Při infekci fágem
 - Při přenosech DNA transdukací a konjugací, omezeně transformací (při uměle navozené transformaci)

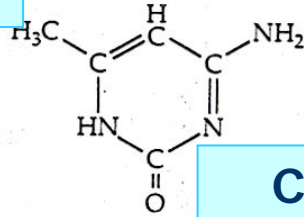
Monitorování příjmu exogenní DNA – „imunitní systém prokaryot“

Metylované báze v DNA

N6mA

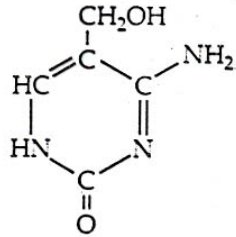


N6-methyl-adenine

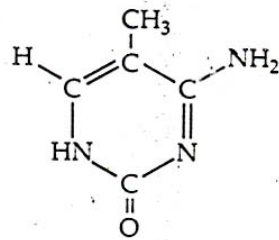


C4mC

C4-methyl-cytosine



C5-OHmethyl-cytosine



C5-methyl-cytosine

C5mC

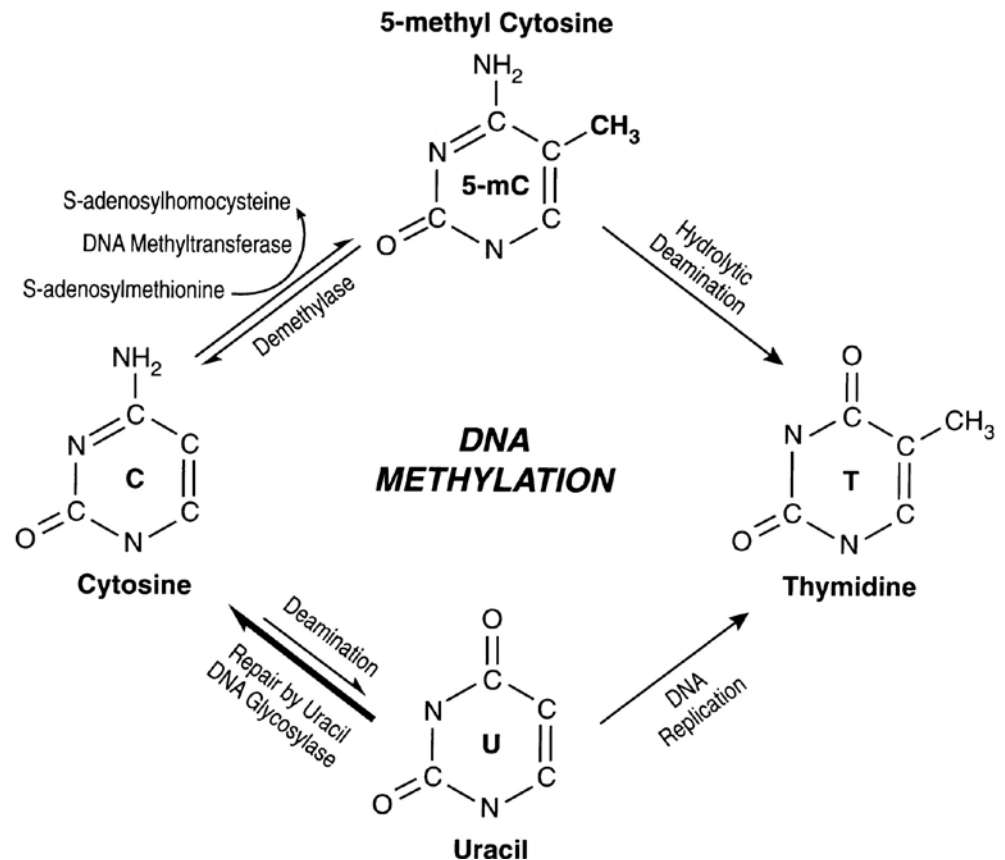
Single-molecule real-time (SMRT)

-detekce metylované DNA

(A) Cytosin – C4metylcytosin,

C5metylcytosin

(B) Adenin – N6metyladenin



Donor metylové skupiny:

SAM (AdoMet)

SYSTÉMY RESTRIKCE A METYLACE

Host specificity
determinant

- **Hsd systémy (host specificity of DNA)**
 - třídy (typy) I, II, III, IV
restrikční a metylační aktivita
- **Systémy restrikce modifikované DNA**
 - Mar, Mrr (methylated-adenine), DpnI
 - Mcr (methylated-cytosine)
- **Systémy metylující specifické sekvence DNA**
 - Dam (adenine-methylation)
 - Dcm (cytosine-methylation)

Charakteristika RM systémů typu I, II a III

Vlastnost	R-M systémy typu I	R-M systémy typu II	R-M systémy typu III
Struktura	jeden multifunkční enzym složený ze tří různých podjednotek	restrikční endonukleáza a metyltransferáza jsou dva oddělené enzymy	jeden multifunkční enzym složený ze dvou různých podjednotek
Kofaktory potřebné pro restrikci DNA	ATP, SAM*, Mg ²⁺	Mg ²⁺	ATP
Stimulační kofaktory pro restrikci DNA	žádné	žádné	SAM*, Mg ²⁺
Kofaktory potřebné pro modifikaci DNA	SAM*	SAM*	SAM*
Stimulační kofaktory pro modifikaci DNA	ATP, Mg ²⁺	žádné	ATP, Mg ²⁺
Rozpoznávací sekvence	asymetrická, složená ze dvou sekvencí oddělených mezerníkovou oblastí	délka 4-6 bp, většinou palindromatická	asymetrická, složená ze dvou opačně orientovaných sekvencí oddělených mezerníkovou oblastí
Místo štěpení DNA	náhodné, vzdálenost od rozpoznávací sekvence řádově stovky až tisíce bp	konstantní, je štěpena rozpoznávací sekvence nebo místo poblíž této sekvence	konstantní, vzdálenost od jedné ze dvou rozpoznávacích sekvencí 24-26 bp
Translokace DNA	Ano	Ne	Ano

*S-adenosylmetionin

Charakteristika RM systémů typů I-IV

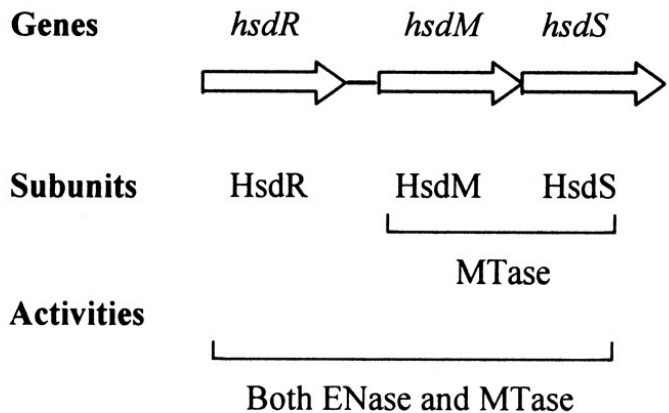
	Type I	Type II	Type III	Type IV
Example R-M system	EcoKI	EcoRI	EcoP1I	EcoMcrBC
Genes	<i>hsdR, hsdM, hsdS</i>	<i>ecorIR, ecorIM</i>	<i>mod, res</i>	<i>mcrB, mcrC</i>
Subunits	Three different subunits (R, M and S) combine to form R ₂ M ₂ S ₁ and M ₂ S ₁	Two different subunits (R and M) combine to form R ₂ or M ₁	Two different subunits (mod and res) combine to form mod ₂ res ₂	Two different subunits are present, McrB and McrC
Enzyme activities	REase, MTase and ATPase	REase or MTase	REase, MTase and ATPase	REase and GTPase
Co-factors required for DNA cleavage	ATP, SAM, Mg ²⁺	Mg ²⁺	ATP, Mg ²⁺ (SAM)	GTP, Mg ²⁺
Co-factors required for methylation	SAM	SAM	SAM	No methylation
Recognition sequence	Asymmetric and bipartite, e.g. EcoKI, 5'AAC(N ₈)GTGC	Mostly symmetric, e.g. EcoRI, 5'GAATTC	Asymmetric, e.g. EcoP1I, 5'AGACC	Bipartite and methylated, e.g. EcoMcrBC, 5'RmC(N ₃₀₋₄₀₀₀)RmC
Cleavage site	Variable locations 1000 bp from recognition site	Fixed location at or near the recognition site	Fixed location 25–27 bp from recognition site	Between methylated bases at multiple sites
DNA translocation	Yes	No	Yes	Yes

Charakteristika RM systémů typu I, II a III

Type I

- Hetero-oligomeric enzymes
- Require ATP hydrolysis for restriction
- Cut DNA at sites remote from the recognition sequence
- DEAD-box proteins

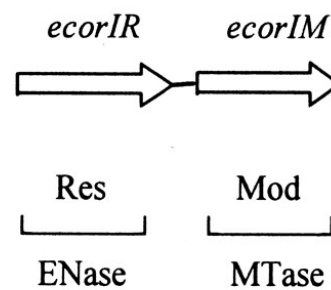
e.g. *EcoKI*



Type II

- ENase and MTase separate enzymes
- Cut DNA within recognition sequence

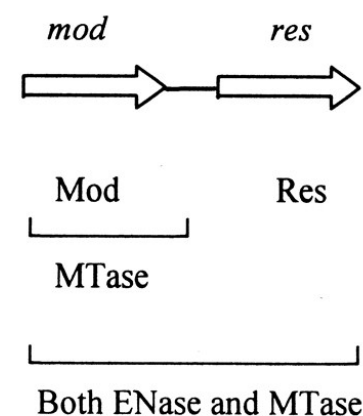
e.g. *EcoRI*



Type III

- Hetero-oligomeric ENase
- ATP required for restriction
- Cut DNA close to recognition sequence
- DEAD-box proteins

e.g. *StyLTI*



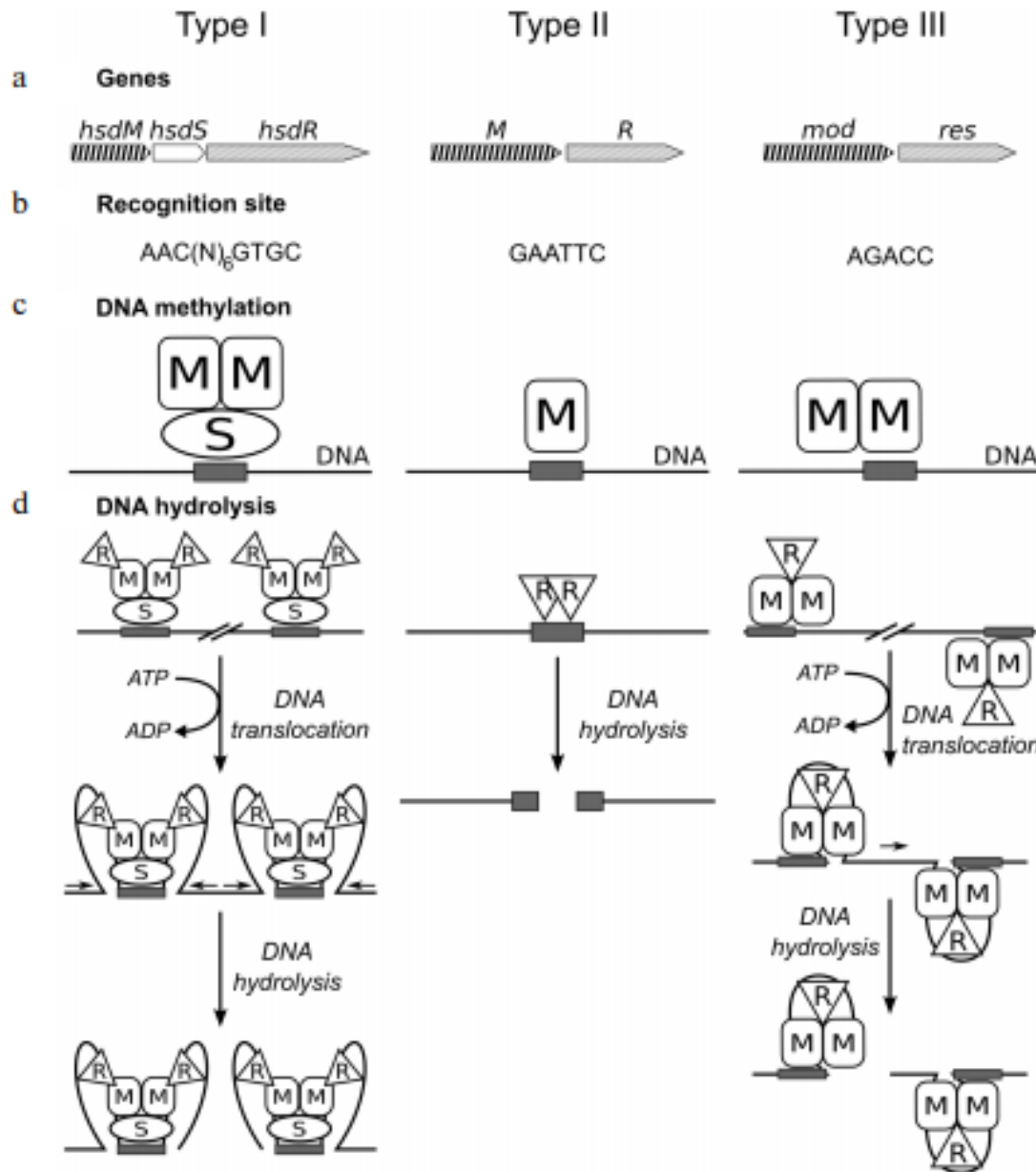
<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.enz.html>

Rebase: 75 tis

13 tis

18 tis

Strukturní a funkční organizace RM systémů typu I-III



(a) **Uspořádání genů;**
hsdM, *M*, *mod* – geny pro DNA-metyltransferázu, *hsdR*, *R*, *res* – geny pro RE, *hsdS* – gen pro DNA rozpoznávací protein u typu I

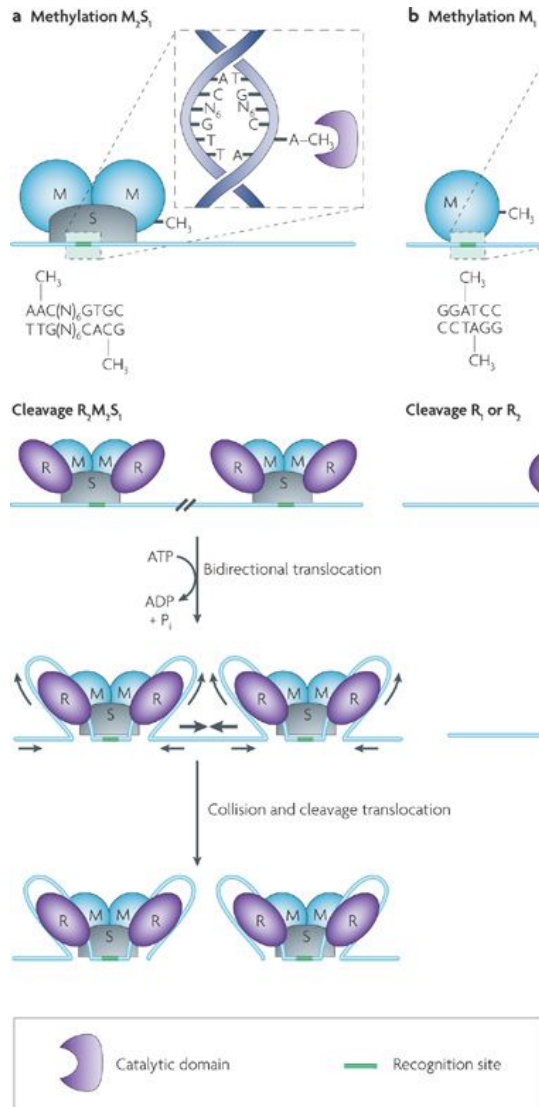
(b) **příklady rozpoznávací sekvence**

(c) **složení DNA-metylačního komplexu,**
 M- metyltransferáza, S- DNA-binding protein

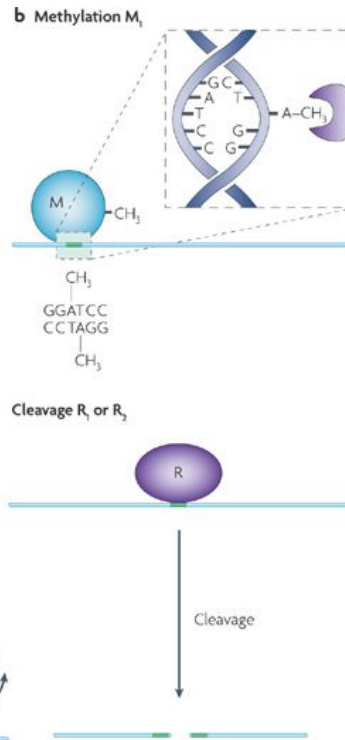
(d) **složení DNA-hydrolyzačního komplexu**

Proces metylace a restrikce DNA u RM typů I, II, III

(a) Type I RM systém



(b) Type II RM



(c) Type III RM

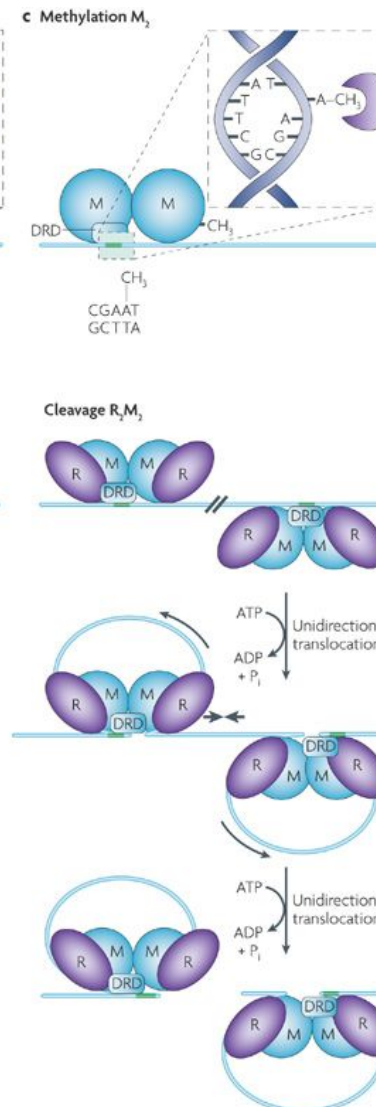


Table 6.2 Recognition sequences of some restriction enzymes.

Enzyme	Name	Organism	Recognition sequence	Observations
Class I	<i>EcoK</i>	<i>E. coli</i> K12	AACN ₆ 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	<u>Cognate methylase</u>
	<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>	GmC/ATC	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	
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; mC, methyl-Adc; * represents the methylating site; / indicates the cleavage site.

GENY KÓDUJÍCÍ RM-SYSTÉMY JSOU NESENY NA RŮZNÝCH REPLIKONECH

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

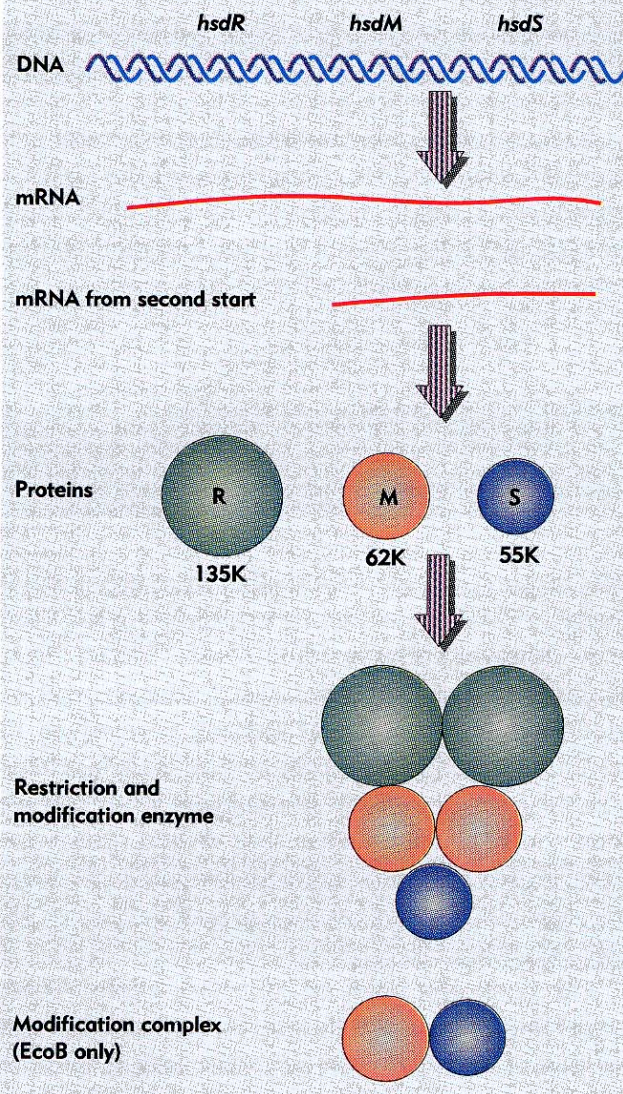
lokalizace genů na chromozomu, plazmidech, nebo profágách

Přítomnost genů RM systémů na mobilních elementech

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) ₆ GTGC	Chromosomal
	<i>EcoB</i>	TGA(N) ₈ TGCT	Chromosomal
	<i>EcoD</i>	TTA(N) ₇ GTCPy	Chromosomal
	<i>StySB</i>	GAG(N) ₆ PuTAPyG	Chromosomal
	<i>StySP</i>	ACC(N) ₆ GTPuC	Chromosomal
	<i>StySQ</i>	ACC(N) ₆ PuTAPyG	Chromosomal
	<i>EcoDXX1</i>	ATCA(N) ₇ ATTC	Plasmid
Type IB	<i>EcoA</i>	GAG(N) ₇ GTCA	Chromosomal
	<i>EcoE</i>		Chromosomal
Type IC	<i>EcoR124</i>	GAAN ₆ PuTCG	<i>IncFIV</i> plasmid R124
	<i>EcoR124/3</i>	GAAN ₇ 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

Multifunctional type I enzymes have different subunits for restriction, modification, and recognition.



PODJEDNOTKOVÉ SLOŽENÍ ENZYMOVÉHO KOMPLEXU TYPU I

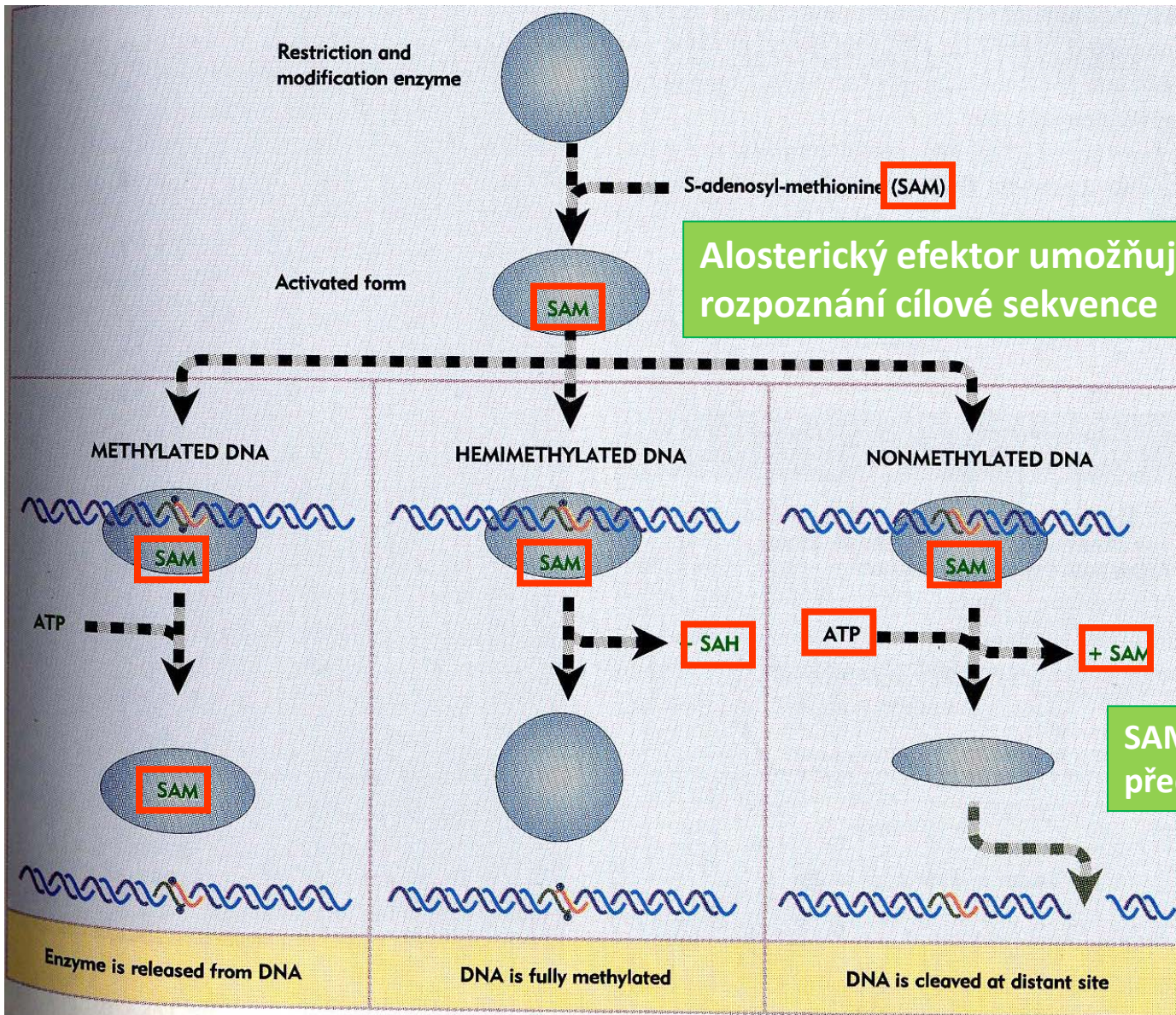
S = rozpoznání cílové sekvence

M = vazebné místo pro SAM a aktivní místo pro metylaci

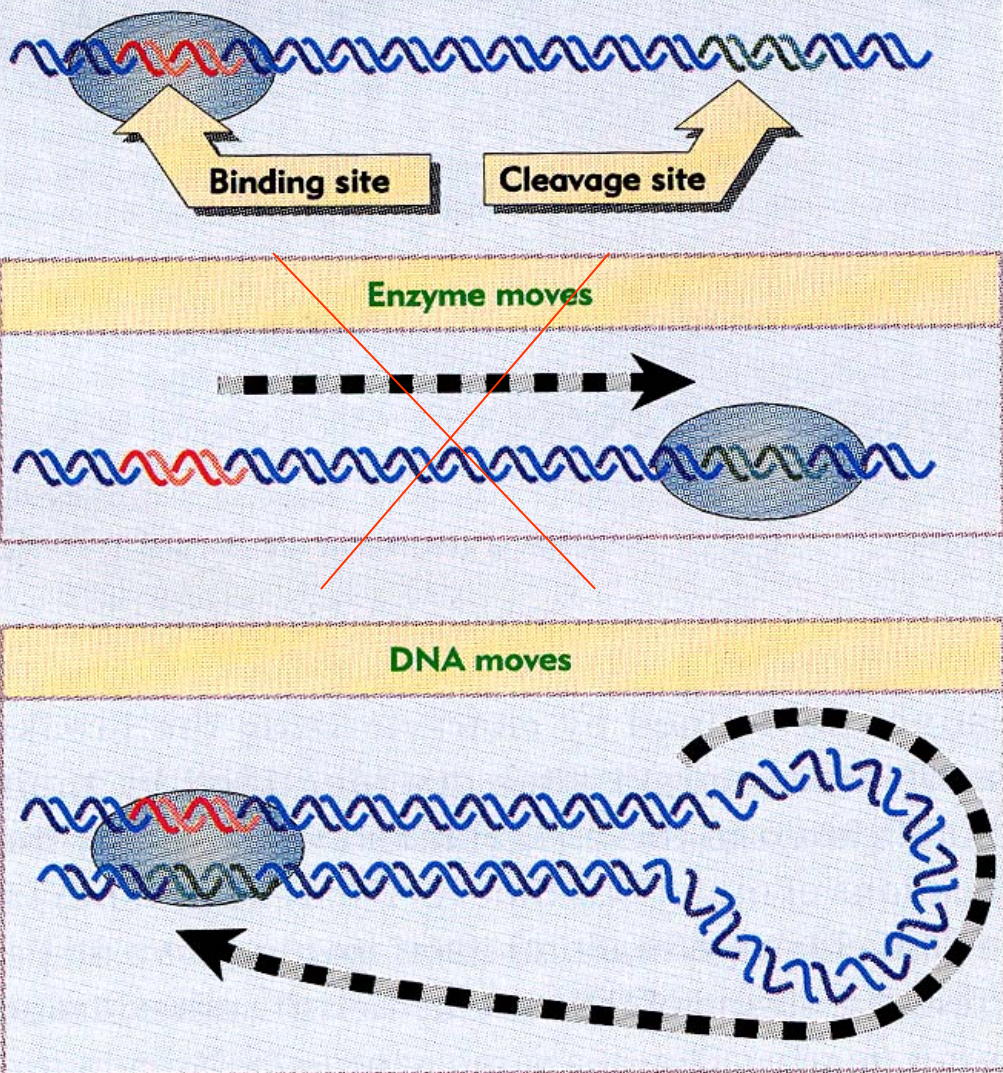
R = aktivní místo pro hydrolýzu ATP, pro translokaci DNA a pro štěpení

Komplex schopný pouze metylace

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?

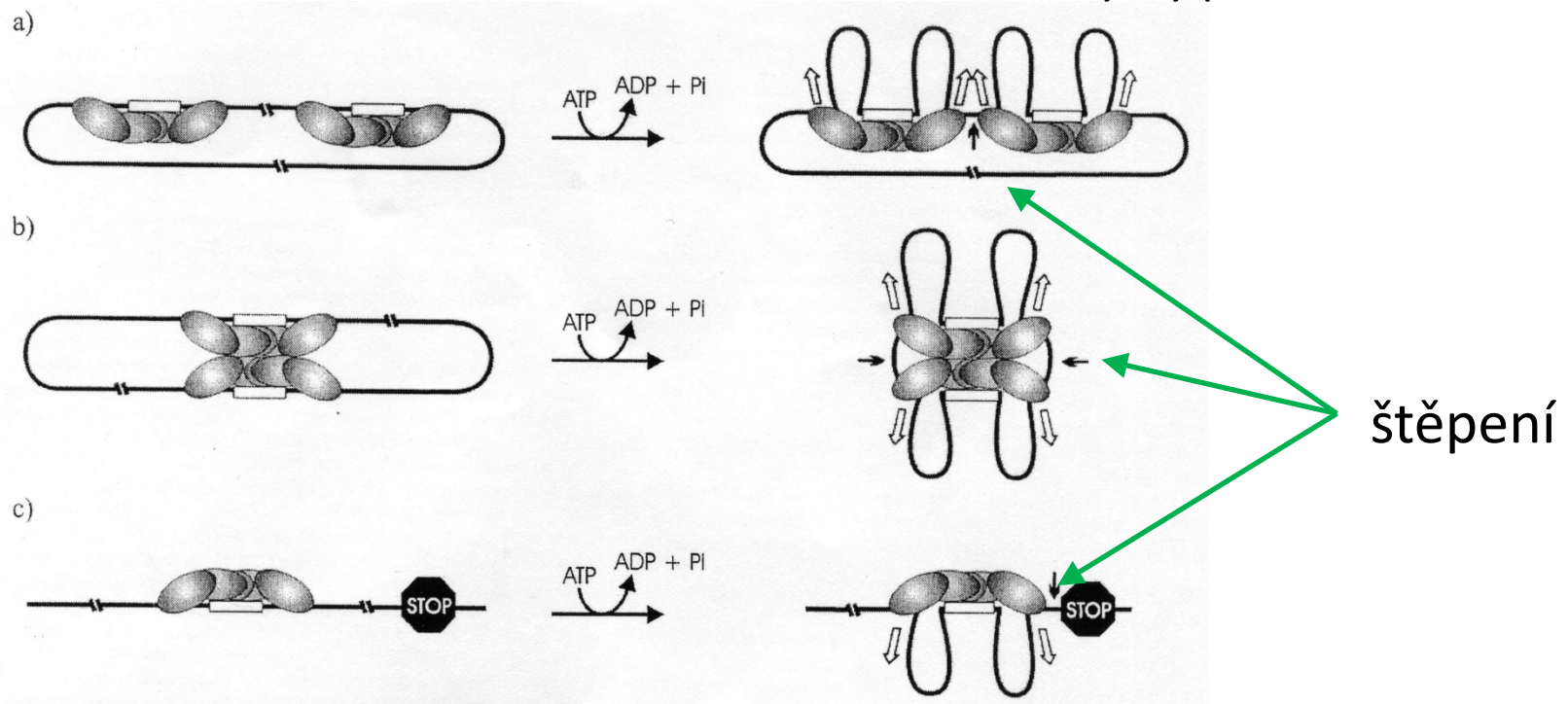


Interakce enzymového komplexu s rozpoznávacím místem

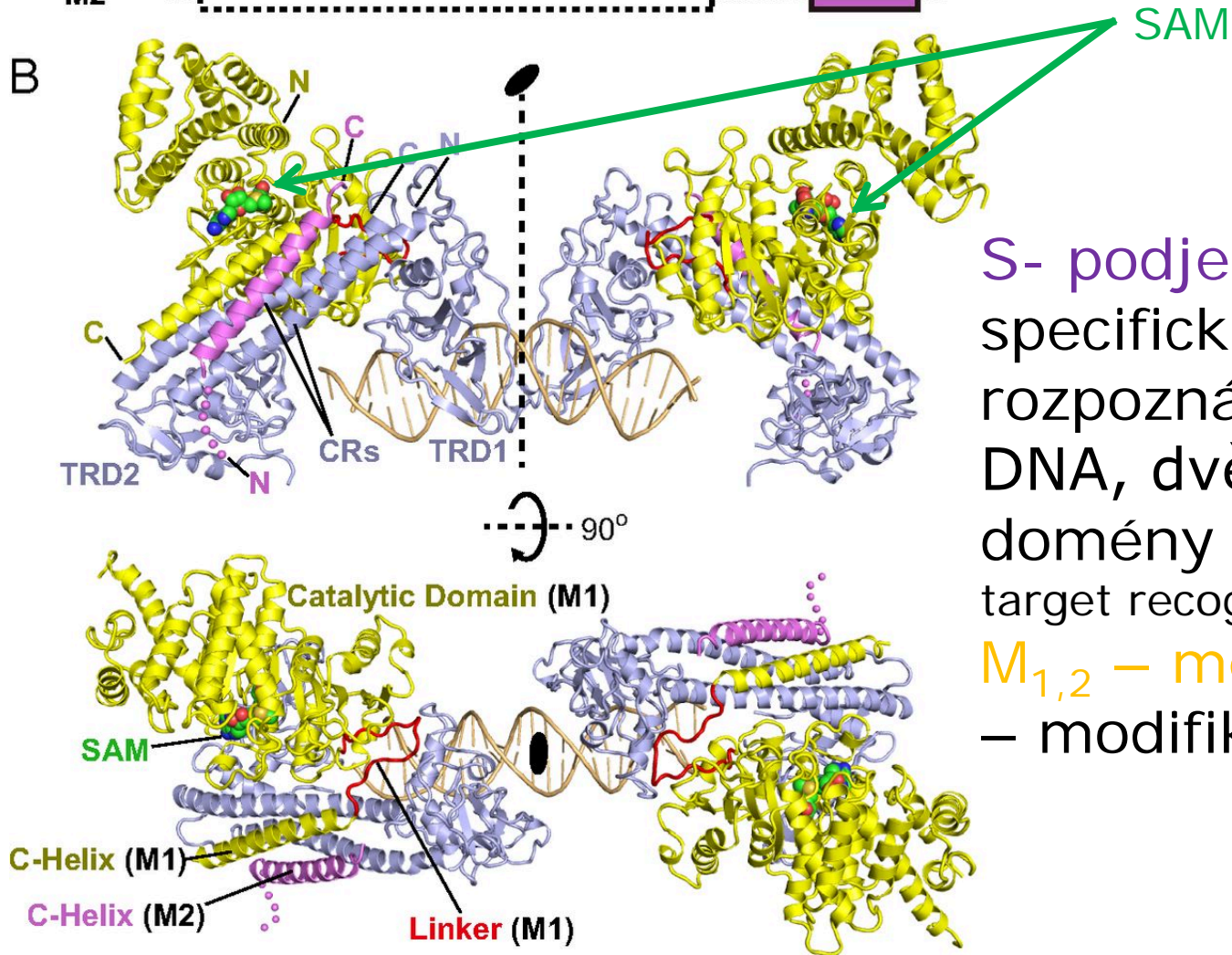
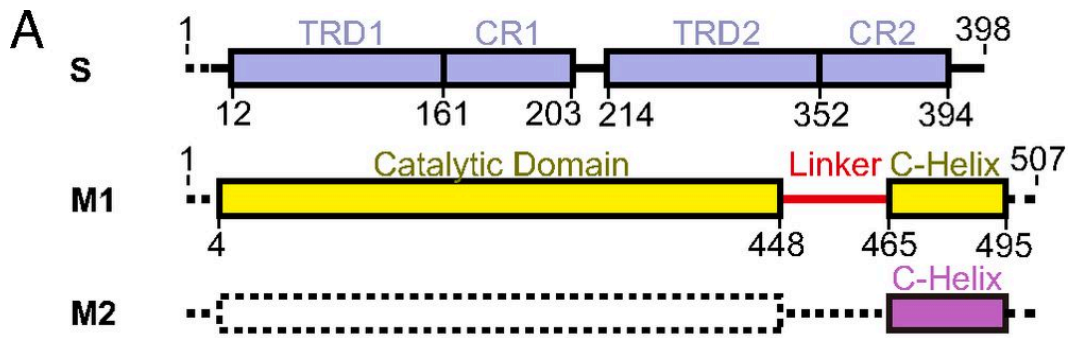
1. Vyhledání rozpoznávací sekvence
2. Podle stavu sekvence (M, NM, H-M) dochází k
 - a) uvolnění enzymu
 - b) restrikci
 - c) metylaci

MODELY TRANSLOKACE DNA ZPROSTŘEDKOVANÉ ENZYMY RM SYSTÉMŮ TYPU I

Smyčky pozorované v EM



Pokud jsou místa nemodifikovaná, vytváří se rozpoznávací komplex, vázaný na rozpoznávací místo, a jím je DNA protahována (translokována) až k místu vzdálenému zhruba 1000 bp nebo více, kde pak proběhne štěpení.

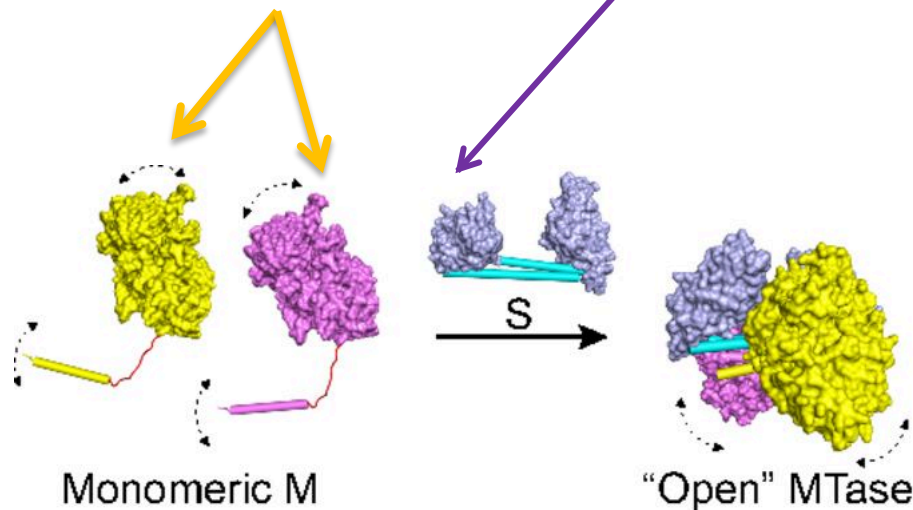


ATP-dependent translokace DNA - ke štěpení dochází po kolizi DNA řetězců v místě navázaného enzymu

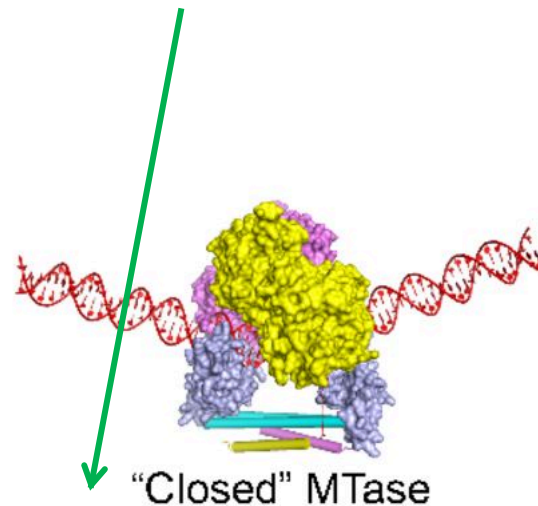
$M_{1,2}$ -
metyltransferázy

S- podjednotka

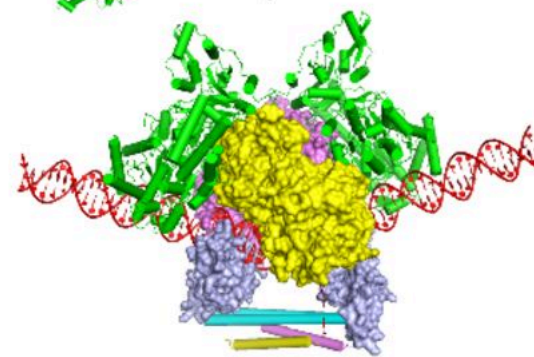
$R_{1,2}$ - dvě molekuly endonukleáz



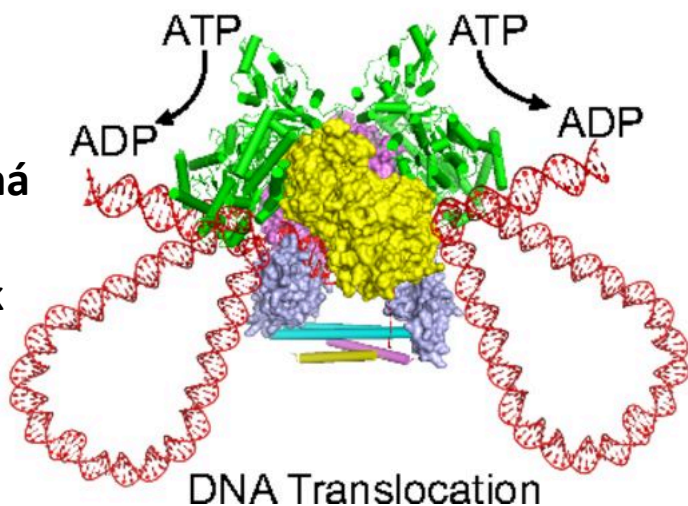
Target DNA



R



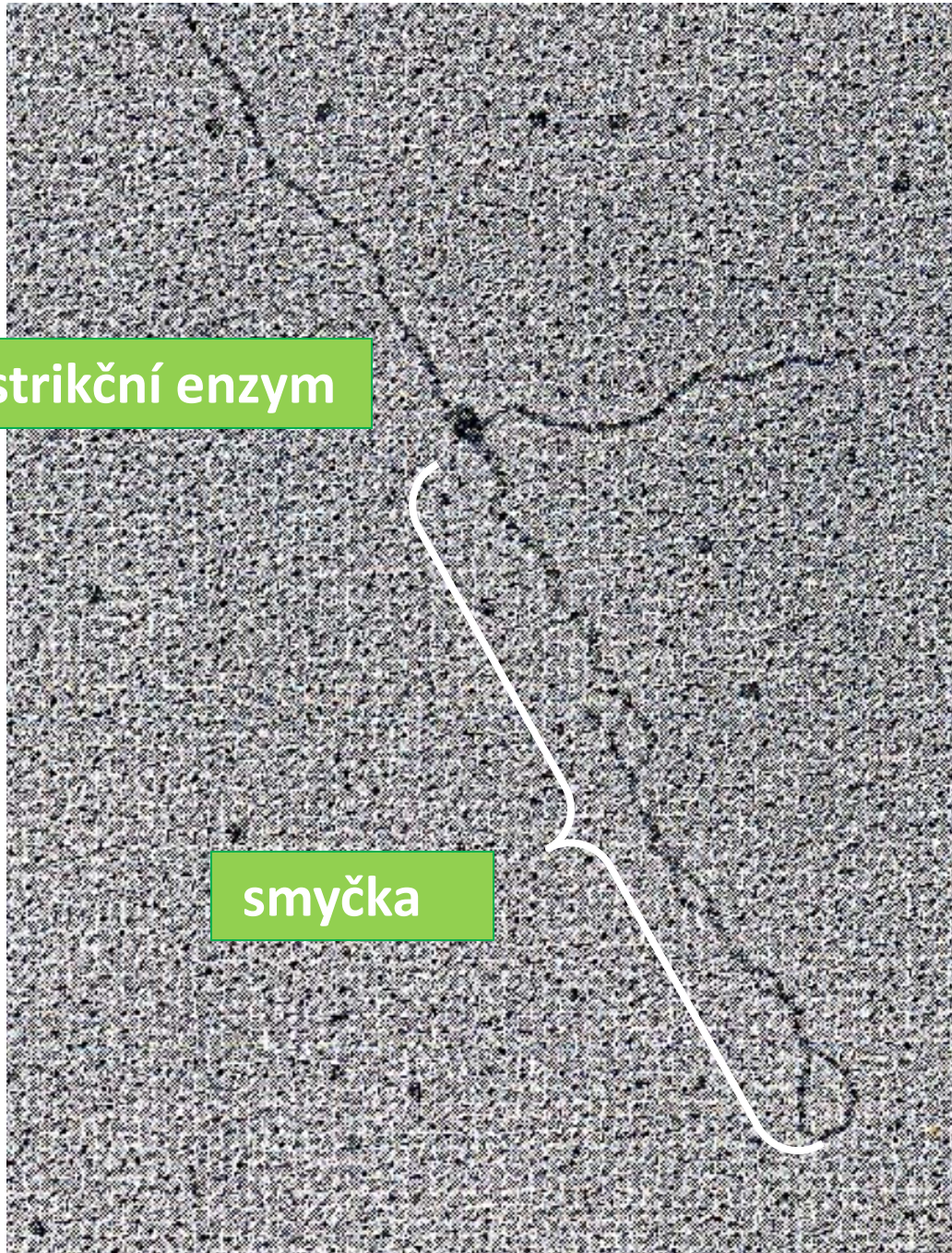
Obousměrná
translokace
DNA vede k
vytvoření
smyček



"Closed" REase

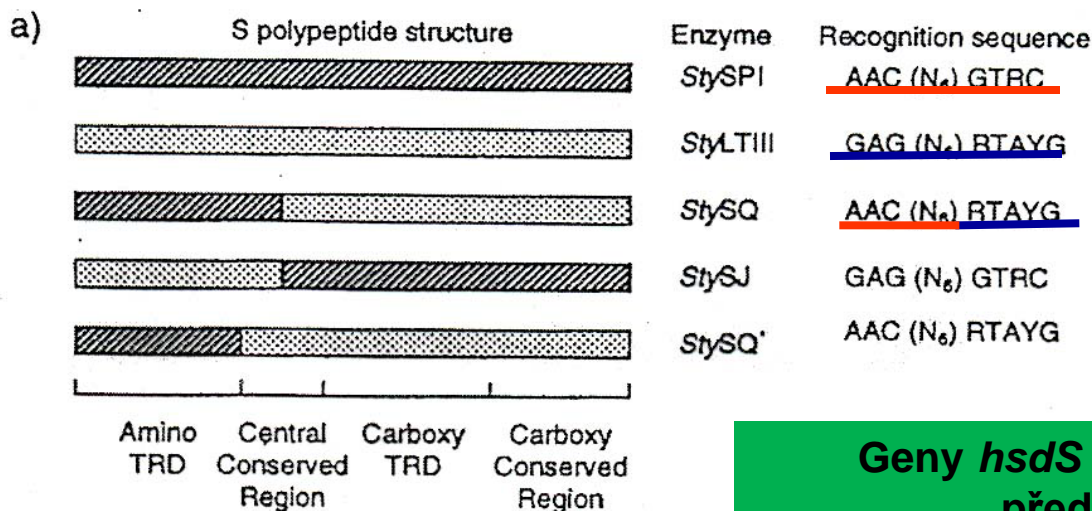
Navázaný restriční enzym

smyčka



Vytváření RM systému typu I s novými sekvenčními specifitami

Struktura rozpoznávací podjednotky - S



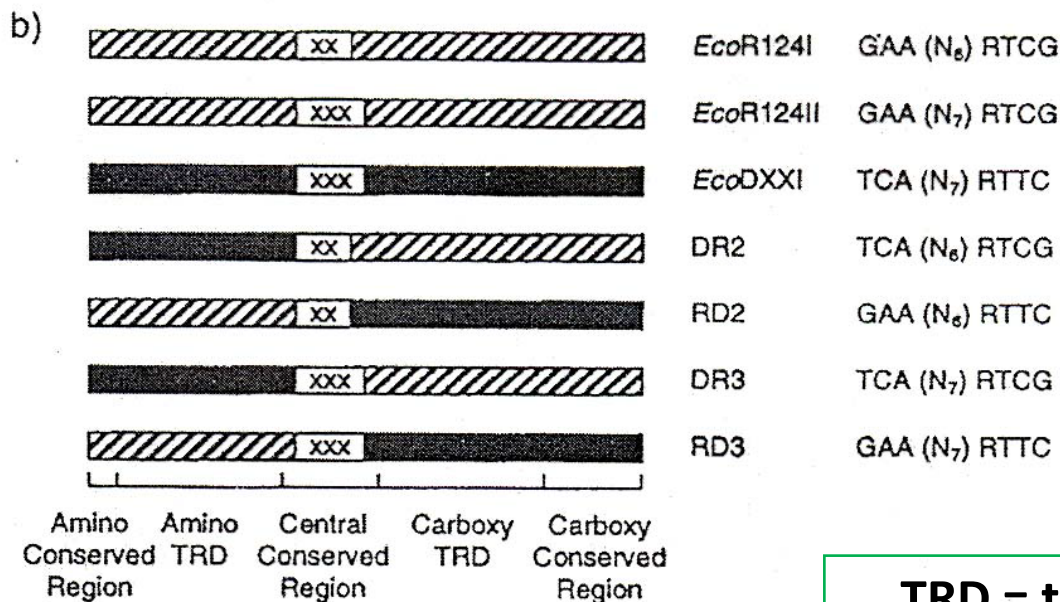
Přirozený RM systém

Přirozený RM systém

➤ hybridní hsdS

mutagenizovaná
centrální oblast

**Geny *hsdS* mohou rekombinovat –
představují dvě alely**



Změny počtu

aminokyselin

v centrální oblasti

ovlivňují rozpoznání

cílové sekvence

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>

Pro RM systém typu I je nezbytná funkční *hsdS* – její mutace vede k fenotypu r- m-.
 $S^- \rightarrow M^-R^-$

Restrikčně-deficientní mutanty

r^-/m^-

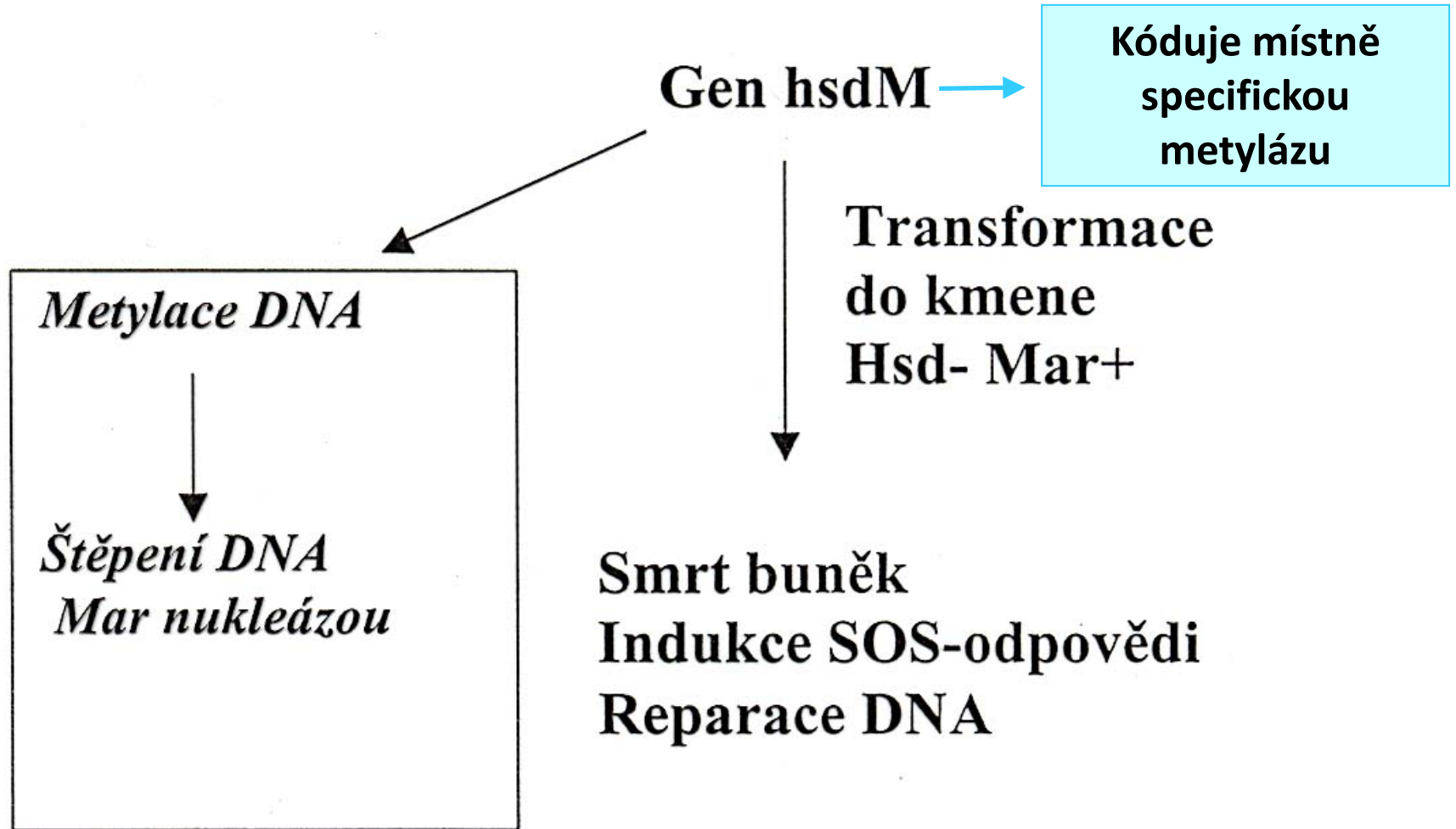
r^-/m^+

$r^+/-/m^-$

RM SYSTÉMY, U NICHŽ JE ŠTĚPENA CIZORODÁ MODIFIKOVANÁ DNA (K MEN 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



SYSTÉMY METYLACE DNA (*E. COLI* K12)

- V buňkách není přítomna RE rozpoznávající metylovanou sekvenci – nejedná se tudíž o standardní RM systém

1. Systém Dam (dam-metyláza)

- metylace A v GATC (donor met = SAM)
- GATC - regulační funkce: počátek replikace, promotory, reparace, transpozice
- sekvence GATC je rozpoznávána 15% RE typu II, je přítomna u 50% všech 4N-RM-systémů, 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)

VÝZNAM RESTRIKCE

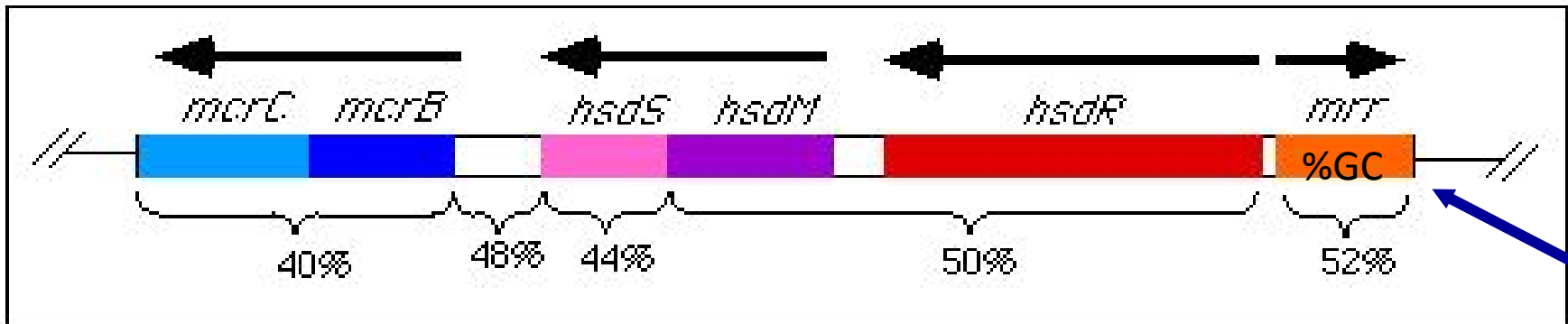
- **Ochrana integrity vlastní DNA**
 - obrana před bakteriofágy (typ II)
dočasné působení – epigenetické změny, na úrovni populace nutná obměna
- **System napomáhající rekombinaci cizorodé DNA (typ I)**
 - štěpení DNA (náhodně) mimo rozpoznávací sekvenci umožní rekombinaci mnoha genů - analýza přenosu genů transdukci a konjugací podporuje vliv RM systémů při vzniku mozaikových genomů (*E. coli*)
- **? „Selfish DNA“**
 - molekulární paraziti bakterií. RM systémy 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>		restriktáza		metyláza
<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

Odlišný obsah GC – indicie přenosu HGT

Oblast "immigration control region" u *E. coli* – 14 kbp ("immigration island",
- značné rozdíly u různých kmenů



<u>R-M genes</u>	<u>Recognition sequence</u>
<i>hsdS</i> _K <i>hsdM</i> _K <i>hsdR</i> _K	AACNNNNNNGTGC
<i>hsdS</i> _B <i>hsdM</i> _K <i>hsdR</i> _B	TGANNNNNNNNTGTC
<i>hsdS</i> _K <i>hsdM</i> _B <i>hsdR</i> _B	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** CTCGAG
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)

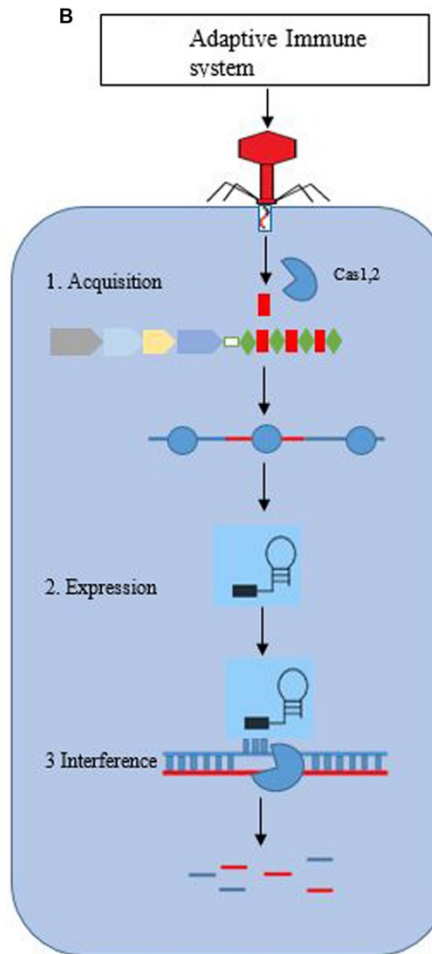
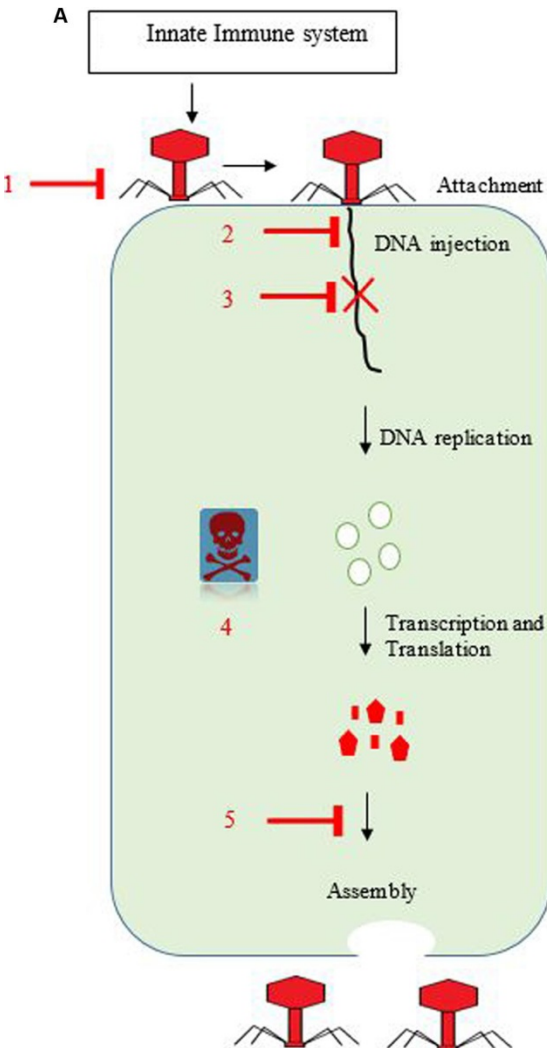
Další možnost:

studium vlivu metylace na genovou expresi

Další obranné mechanismy bakterií

(A) vrozená imunitní odpověď

(B) adaptivní imunitní odpověď



(A)

1. **Zabránění adsorbce fágů –** modifikace RBP (receptor binding protein)
2. **Blokování vstupu** fágové DNA do buňky
3. **Působení RM systémů**
4. **Abortivní infekce**
5. **Blokování sestavování fágových virionů**

(B) CRISPR-Cas systém

Další obranné mechanismy bakterií

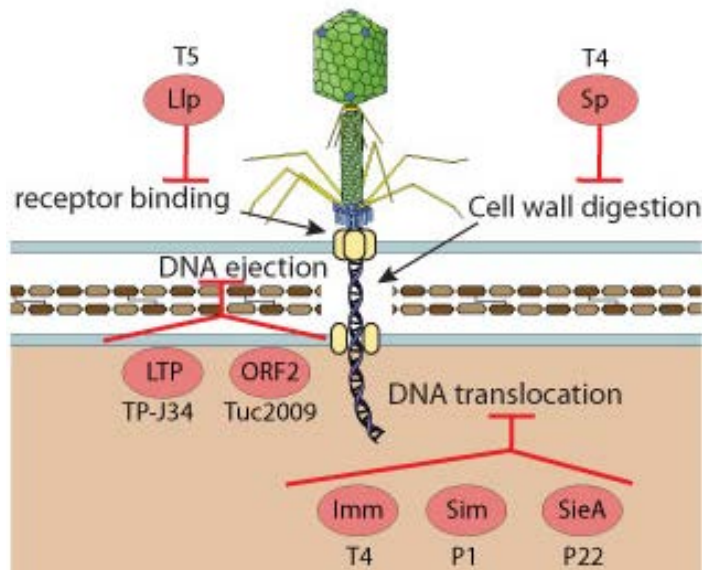
(A)

2. Superinfection exclusion (SIE) systems - Systémy zabraňující superinfekci bakterií – působí na vstupující fágovou DNA.

Tyto systémy se skládají z **membránově asociovaných proteinů** kódovaných profágy a chrání jejich hostitele před infekcí jinými blízko příbuznými fágy.

Např. *Streptococcus thermophilus* obsahuje fágy TP-J34, které produkují lipoprotein asociovaný s membránou hostitele LtpTP-J34, který interaguje s tape measure proteinem jiných fágů.

Čeď Siphoviridae – tape measure protein usnadňuje průchod fágové DNA tvorbou kanálu v membráně hostitele, LtpTP-J34 nejenže blokuje injekční proces fágové DNA, ale také snižuje počet neinfekčních fágových částic uvnitř hostitele.



Další obranné mechanismy bakterií

(A)

4. Abortivní infekce – fágová infekce vede k předčasné řízené smrti bakterie, čímž chrání sousední bakteriální populaci.

Abi systémy jsou často kódovány MGE, jako jsou plazmidy a profágy.

Tyto systémy působí v jakémkoli stádiu životního cyklu bakteriofága - zabraňují jeho šíření.

Např. **fág lambda** - systém **RexAB** chrání lysogenizované buňky před infekcí dalšími coliphagy prostřednictvím ztráty membránového potenciálu, což vede ke snížení hladiny ATP a nedochází k adsorbci dalších fágů na povrch hostitele. **20 Abi (AbiA - AbiZ)** - identifikováno u bakterie *Lactococcus lactis*.

5. Blokování sestavování fágových virionů

Phage packaging interference (Ppi) proteins - kódovány SaPI - hrají roli při **blokování malé podjednotky fágové terminázy**, potřebné pro rozpoznávání fágové DNA, stejně jako pro zahájení sbalování - umožňuje malé podjednotce SaPI terminázy interagovat s fágem-kódovanou velkou podjednotkou pro usnadnění štěpení SaPI DNA s sbalením do virionu.

Další interferenční mechanismus zahrnuje přerušení transkripce pozdních genů fága – sbalení DNA do virionu, sestavení virionu, lyze.

V. cholerae obsahují ostrov podobný PIC1, který působí inhibičně na virulentní fágy.

BREX – nově objevený obranný mechanismus bakterií proti fágové DNA (2015)

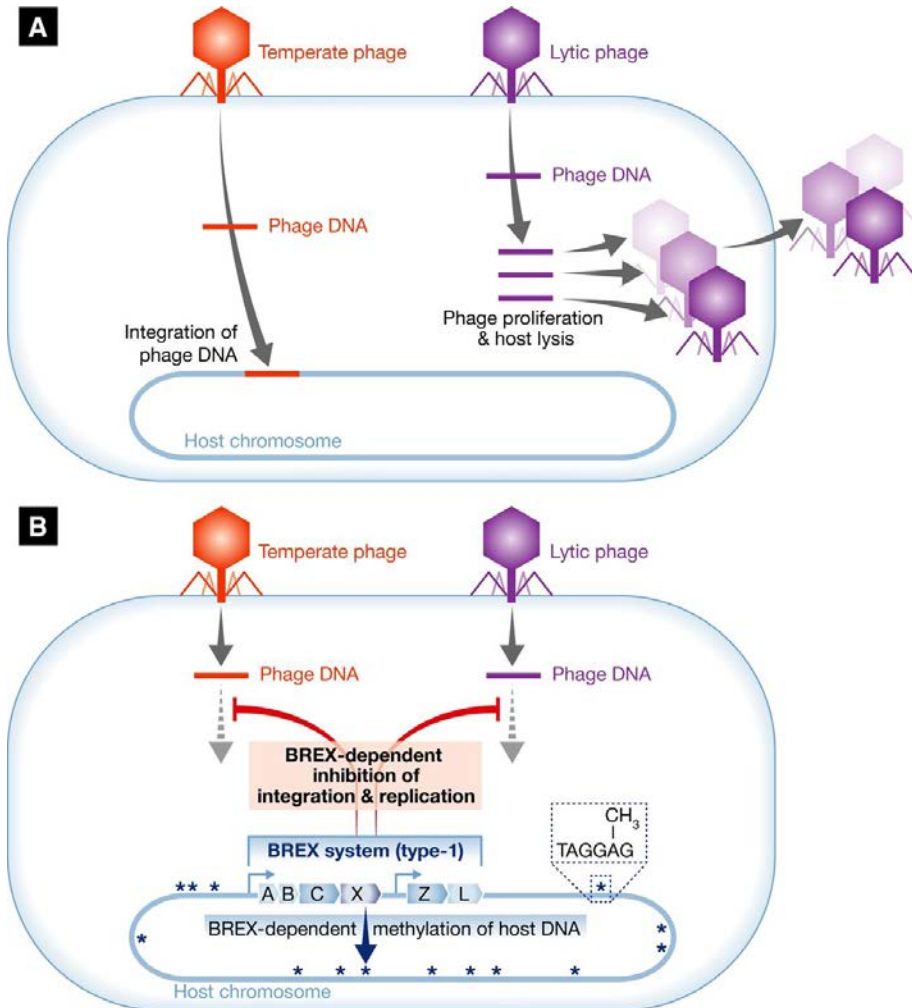
(A) Mírný fág (červeně) nebo lytický fág (fialově) infikuje bakteriální buňku. Temperovaný fág se začleňuje do hostitelského chromozomu a lytický fág se replikuje, tvoří potomstvo a lyzuje buňku.

(B) Bakterie s „bacteriophage exclusion“ (BREX) systémem je rezistentní k mnoha mírným nebo lytickým fágům.

Různé typy systémů BREX jsou kódovány konzervovanými operony (BREX typu 1 z *Bacillus cereus*, dva operony: brxABC-pglX a pak pglZ-brxL).

Konzervovaná část BREX systému - tři enzymy: ATP-vázající se na P-smyčku proteinu (PglY / BrxC, C), alkalickou fosfatázou (PglZ, Z) a metyltransferázou (PglX, X), která specificky metyluje TAGGAG.

BREX *B. cereus* inhibuje integraci mírných fágů do hostitelského chromozomu, stejně jako replikaci (a proliferaci) lytických fágů.



Antirestriční mechanismy

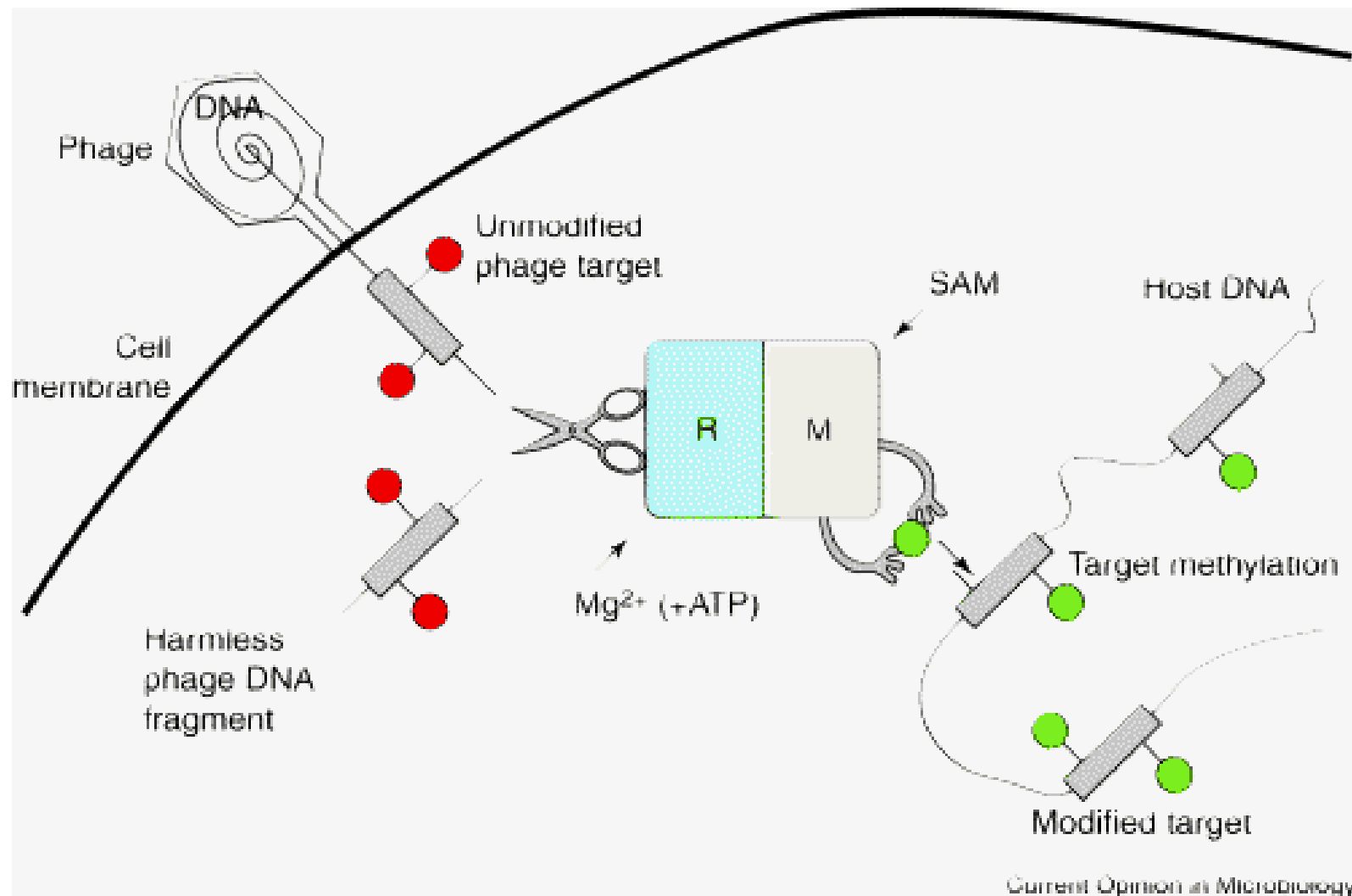


TABLE 3. Antirestriction Strategies

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_x</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 <i>EcoB</i> (type I) <i>EcoRI</i> , <i>EcoRV</i> (type II)	Hemphill and Whiteley, 1975 Warren, 1980
	φ25, φe, 2C PBS1, PBS2 T-even phages	Uracil (for thymine) Hydroxymethylcytosine (for cytosine)		
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	φ1, φ29	No GGCC sites	<i>BsuRI</i> (type II)	Kawamura et al., 1981 Ito and Roberts, 1979

Mechanismy, kterými plazmidy a fágy unikají restrikci

1. Neobvyklé modifikace DNA
2. Nízká frekvence cílových míst
3. Tvorba proteinů, které interferují s jednou nebo více aktivitami RM systému
4. DNA vstupující do buňky ve formě ssDNA (konjugativní plazmidy nebo některé fágy), neuniká restrikci, ale stává se k nim citlivá po syntéze druhého vlákna.

Příklady antirestrikčních mechanismů

- Fág MU – funkce MOM: konverze adeninu na A-(1-acetamido)adenin, který je necitlivý k EcoKI a EcoBI.
- Plazmidy: Ard (alleviation of restriction) - antirestrikční protein, zmírnění restrikce
- 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

Příklady antirestrikčních mechanismů

Anti-restriction strategy	Example
Changes in DNA sequence	
Loss of R-M recognition sites	EcoRII sites in phage T7 and T3 genomes. IncP plasmids are remarkably deficient in restriction sites for Type II enzymes.
Strand-biased asymmetrical recognition sequences	EcoP15I sites in the phage T7 genome.
Incorporation of unusual bases into phage genomes	Many <i>B. subtilis</i> phage replace thymine with 5-hydroxymethyluracil.
Phage-encoded DNA-modifying enzymes	MTases encoded by many <i>B. subtilis</i> phage, Mu phage and T-even phage.

Příklady antirestrikčních mechanismů

Transient occlusion of restriction sites

Co-injection of proteins

DarA and DarB proteins of phage P1 coat phage DNA.

ArdC protein encoded by the IncW pSa protects the incoming T-strand during conjugation.

Subversion of R-M activities

Stimulation of R-M system
MTase

Product of the λ phage *ral* gene stimulates Type I R-M enzymes to act as MTases.

Depletion of intracellular co-factors

SAM hydrolase from phage T3 depletes concentrations of intracellular SAM.

Inhibition of R-M enzymes

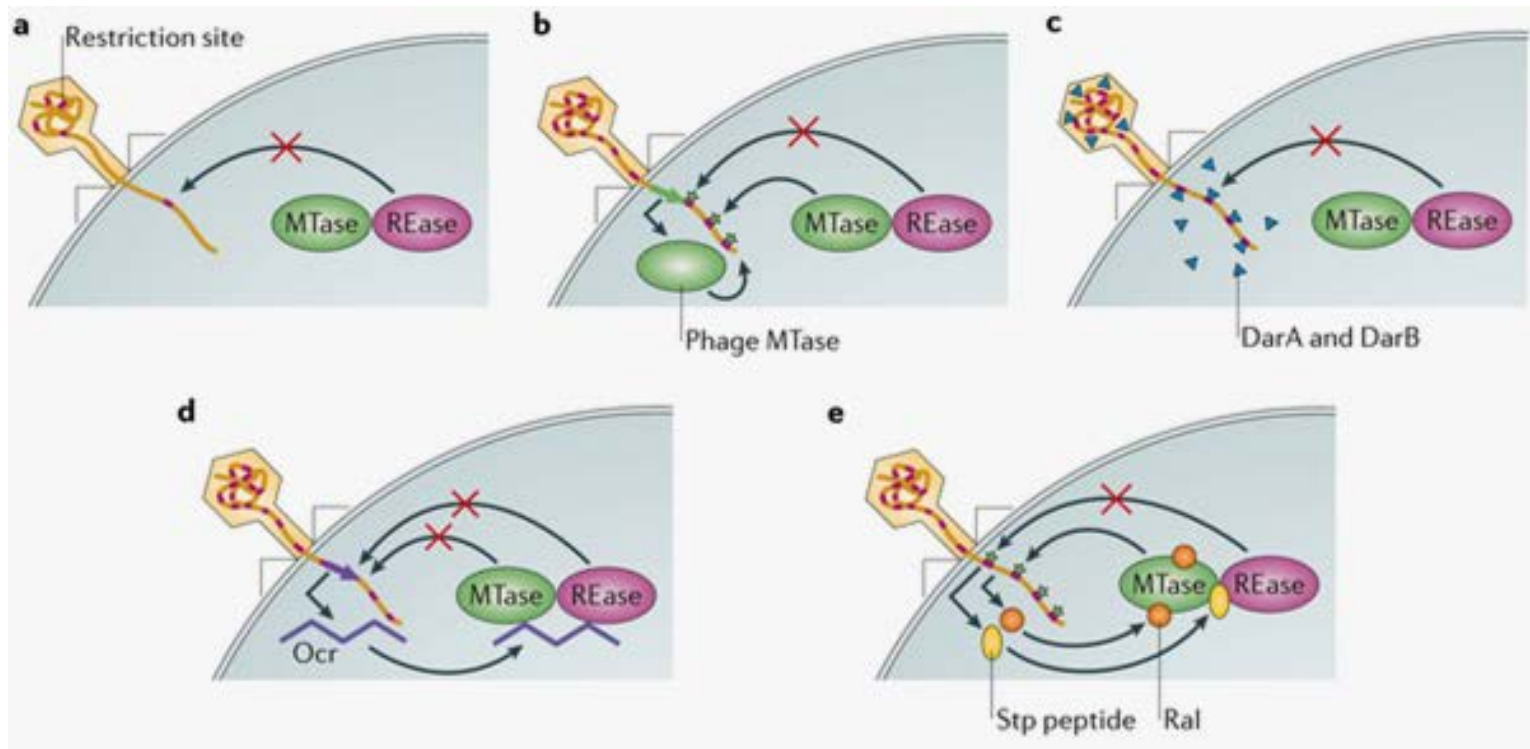
Phage-encoded proteins

Ocr proteins of phage T3 and T7 inhibit Type I R-M enzymes.

Plasmid-encoded proteins

ArdA and ArdB proteins inhibit Type I and in some cases Type II R-M enzymes.

Pasivní a aktivní strategie fágů pro únik před působením RM systémů



- Eliminace restričních míst nebo jejich velká vzdálenost od sebe
- Fág je modifikován metylázami hostitelské buňky, případně takové metylázy vytváří sám
- Fág při infekci koinjikuje do buňky proteiny, které se vážou na cílové rozpoznávací sekvence RE a tím je chrání (maskují).
- Fág vytváří protein, který imituje cílovou sekvenci, váže RE a tím ho inhibuje.
- Fágový protein navozuje aktivitu metylázy a tím urychluje obranu před RE. Peptid Stp fága T4 může inhibovat restrikci změnou struktury komplexu restriktáza-methyláza.

"Loss" of restriction sites.

Some phage have many fewer recognition sites for certain restriction endonucleases than you would predict by random chance. For example, the phages T3 and T7 lack the 5-bp *EcoRII* recognition site CC(A or T)GG. This is thought to arise by selection for phage with mutations that prevent cleavage by restriction endonucleases commonly encountered in their hosts

Modified bases.

Some phage have modified bases that prevent recognition by restriction endonucleases. For example, phages T2 and T4 have hydroxymethylcytosine instead of cytosine in their DNA.

Self-methylation.

Some phage encode a methylase that can modify their DNA so that it is not cleaved by certain restriction endonucleases. For example, the *E. coli* phages T2, T4, and the *Myxococcus* phage Mx8 encode dAdenine methylases (*dam*). Certain plasmids also encode methylases that may provide protection against restriction endonucleases

Activation of a host methylase.

Some phage encode a protein that stimulates the host's methylase to modify the phage DNA. For example, the Lambda Ral ("restriction alleviation") protein enhances methylation by the HsdM subunit of the *EcoK* and *EcoB* restriction systems]. Ral seems to act by stimulating the expression of the host *hsdS* and *hsdM* genes

Degradation of host S-adenosylmethionine.

Some host restriction systems only recognize modified DNA (e.g. the McrA and McrB systems in *E. coli*). Phage T3 encodes a S-adenosylmethionine hydrolase activity that degrades the substrate required for methylation by host enzymes, thus avoiding modification of the phage DNA and subsequent cleavage by modification-dependent host endonucleases

Inhibition of host restriction endonucleases.

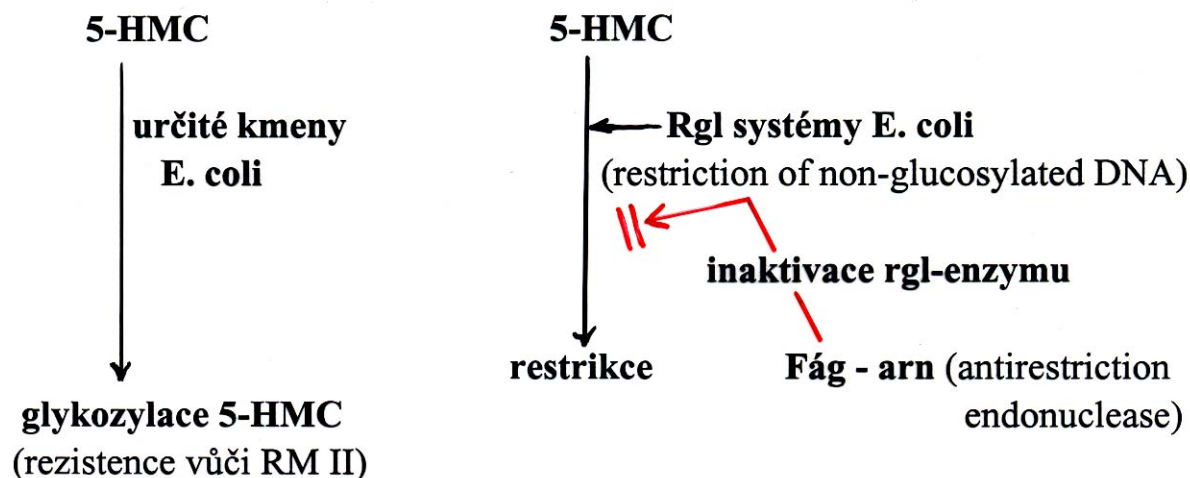
Many conjugal plasmids produce antirestriction proteins (called Ard) that specifically inhibit Type I restriction endonucleases. The Ard proteins have a motif that is very similar to a motif found in the HsdS subunit, thus it is possible that the Ard proteins prevent proper assembly of the restriction endonuclease complex by binding to the other Hsd subunits. Phage T3 produces a protein called Ocr which inhibits host methylases, resulting in resistance to modification-dependent restriction systems

DNA repair systems.

Activity of certain phage genes may allow repair of the double-stranded breaks produced by restriction endonucleases. For example, the lambda Gam and Red proteins may repair the cleaved DNA by recombination with another copy of the phage DNA

Antirestrikční mechanismy T-sudých fágů

Fágová DNA



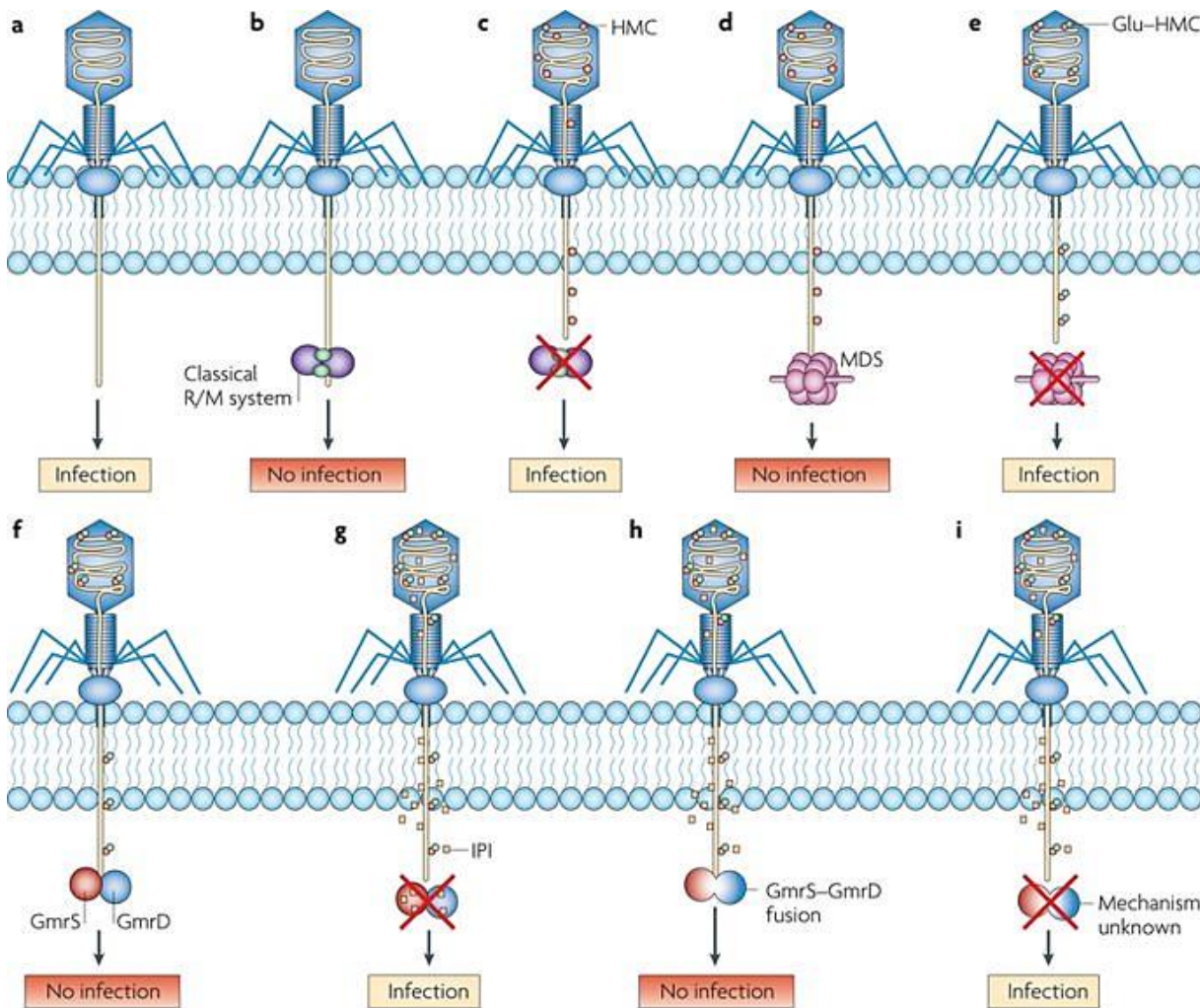
Reakce fága na restrikci

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

Glukozylace HMC zbytků DNA T-sudých fágů je účinnou ochranou před většinou RE – a navíc slouží k identifikaci fágové DNA, takže enzymy kódované fágy mohou selektivně degradovat hostitelský chromozom

Strategie fága T4 pro překonání RM systémů a reakce *E. coli*

Evoluce interakcí mezi T-sudými fágy a hostiteli



- Fág infikující normálního hostitele
- Fág infikuje *E. coli* s RM systémem, RE štěpí
- Genom fága obsahuje HMC, RE neštěpí
- Některé kmeny *E. coli* mají RM systém štěpící DNA s HMC
- Fág glykozyluje HMC (na glu-HMC) a jeho DNA není štěpena MDS (modif. depend. syst.)
- Některé kmeny *E. coli* mají RM systém (Gmr) štěpící glu-HMC, ne však neglykozylovanou
- Některé fágy (like-T4) mají gen kódující IPI, který ruší působení Gmr
- Některé kmeny *E. coli* mají modifikovaný Gmr (fúze GmrS-GmrD), který ruší působení IPI
- Některé mutanty fága T4 překonávají GmrS-GmrD a úspěšně infikují *E. coli*