

4 Závěry

1. Miestne cielehou mutagenézou sme pripravili kolekciu mutantov s jednou substitúciou konzervovaných aminokyselínových zvyškov v motívoch II a III v N-terminálnej doméne podjednotky HsdR enzýmu EcoR124I: D151A, E165A, E165D, E165H and K167A.

- Pozitívnym a negatívnym komplementačným testom *in vivo* sme zistili, že všetky mutanty prejavili fenotyp r^m^+ .
- Test restrikcie DNA *in vitro* potvrdil výsledky *in vivo* testov, že žiadny z mutantov nebol schopný štiepiť plazmidovú DNA na lineárnu formu.
- Test väzbovosti DNA (EMSA) neodhalil žiadne významné rozdiely medzi divokým a mutantnými enzýmami v schopnosti viazať DNA.
- Metóda na meranie ATPázovej aktivity, založená na použití proteínu viažúceho fosfát, ukázala, že substitúcie v motíve II a III u väčšiny mutantov spôsobila viac než 2-násobnú redukciu hydrolýzy ATP. Mutant K167A bol jediný, ktorý prejavil aktivitu porovnateľnú s divokým enzýmom.
- Translokačný proces bol analyzovaný disociáciou triplexu na stopped-flow fluorimetri a pomocou magnetickej pinzety. Obe techniky ukázali znížené translokačné rýchlosti mutantov, rozdiely medzi mutantami a divokým enzýmom boli ešte výraznejšie pri meraní na magnetickej pinzete. Pozorovali sme tak tiež zmenenú procesivitu, iniciáciu a bimodálnu distribúciu R1 rýchlostí.

2. Aminokyselínové zvyšky Q a Y v motíve QxxxY podjednotky HsdR boli substituované miestne cielehou mutagenézou, pričom boli vytvorené nasledovné mutanty: Q179A, Q179K, Y183A, Y183F advojité mutant Q179A,Y183A.

- EMSA ukázala, že všetky mutácie destabilizovali väzbu R_2 komplexu, pričom najväčší efekt bol pozorovaný u zvyšku Y183. Dvojité mutant (Q179A,Y183A) prejavil najväčšie zníženie afinity k DNA.

- S výnimkou dvojitého mutantu (Q179A,Y183A), všetky ostatné mutanty ukázali rovnaké translokačné vlastnosti ako divoký enzým. Vzhľadom k veľkej experimentálnej chybe v Q179A,Y183A dátach sme neboli schopní posúdiť, či bol tento enzým najrýchlejší motor.
- Všetky mutácie v motíve QxxxY zmenili rýchlosť a efektivitu štiepenia DNA. Rýchlosť aj hydrolyzy jedného aj oboch reťazcov bola znížená, pričom väčšmi bola ovplyvnená hydrolyza druhého reťazca.