

## Virknimælingar á stökkbreyttum DNA lígasa úr hitapolinni bakteríu *Thermus scoto*

Margrét Helga Ögmundsdóttir, Arnar Pálsson, Jón Már Björnsson, Sigríður Elsa Vilmundardóttir, Arnar Pálsson, Eirný Þöll Þórólfsdóttir, Zophanías Oddur Jónsson, Guðmundur Eggertsson og Sigríður Helga Þorbjarnardóttir, Líffræðistofnun Háskólans. [sighelga@hi.is](mailto:sighelga@hi.is)

DNA lígasar eru nauðsynlegir öllum lífverum. Við DNA eftirmyndun líma þeir saman Okazaki búta, þeir taka þátt í DNA endurröðun og viðgerð. Lígasar eru flokkaðir eftir því hvort þeir nota NAD eða ATP sem hjálparþátt við límingu. Fyrsta skref límingar er myndun samgilds tengis milli ensíms og adenyls sem kemur annaðhvort frá ATP eða NAD og myndast pyrofosfat eða NMN um leið. Annað skref límingar er flutningur adenyl hópsins af ensíminu yfir á 5' enda á rifuðu DNA. Í þriðja skrefi gerir hydroxyl hópur á 3' enda rifunnar kjarnsækna árás á fosfathóp á 5' App-DNA enda rifunnar, DNA rifan lokast og AMP og ensím losna frá. DNA lígasageni úr *Thermus scoto* (*T. scoto*) var stökkbreytt.

Útbúnar voru 7 stökkbreytingar af klónaða lígasanum, tvær punktbreytingar og 5 úrfellingar eða styttur. Ein styttn nær frá aminosýru 1-567, þ.e. er með  $\Delta 568-674$ . Úrfellingin nær yfir síðasta hneppi lígasans, svokallað BRCT hneppi. Punktbreytingarnar eru í aminosýrum nr. 201 og 219, sem eru báðar í adenyleringshneppi lígasans. Í báðum tilfellum var Arg í villigerð skipt út fyrir Ala.

Bakteríur nota NAD hjálparþátt við límingu. NAD lígasagen fannst fyrst í *Escherichia coli* (*E. coli*). Genið reyndist lífsnauðsynlegt fyrir bakteríuna og einungis hitanæm stökkbrigði voru lífvænleg. Við skilgreindum tvær af þessum fyrstu hitanæmu stökkbreytingum í *E. coli* með raðgreiningu.

Gerðar voru uppbótartilraunir á hitanæmu *E. coli* stökkbreytingunum *in vivo* með einni *T. scoto* styttn og tveimur punktbreytingum. Einnig voru gerðar virknimælingar á límingu rifaðs DNA *in vitro* með sömu *T. scoto* stökkbreytingum. Villigerð *T. scoto* lígasans bætir upp báðar hitanæmu *E. coli* stökkbreytingarnar. Styttn  $\Delta 568-674$  getur bætt upp aðra hitanæmu stökkbreytinguna í *E. coli in vivo*. Allar aðrar uppbótartilraunir voru neikvæðar.

Virknimælingar *in vitro* sýndu að miðað við villigerð hafði styttn um fjórfalt hærra  $K_m$  gildi og hvarffasti ( $k_{cat}$ ) hennar var um fjórum stærðargráðum minni en  $k_{cat}$  villigerðar.  $K_m$  gildi punktbreytingar (219) var um 20 sinnum hærri en villigerðar og hraðafasti um helmingi lægri en villigerðar. Punktbreyting (201) var alveg óvirk *in vivo* og virkni vart mælanleg *in vitro*. Við ályktum að *in vivo* hvarfi styttn skref 1 og 2 í límingu en stökkbreytt *E. coli* ensímið skref 3.