

Amínósýruval og lághitavirkni fosfatasa

Bjarni Ásgeirsson

Raunvísindastofnun Háskólans

Vefútgáfa: 16. ágúst 2004

Ágrip Hvert prótein hefur eina tiltekna röð amínósýra sem ákvarðar eiginleika þess. Með stökkbreytingum á erfðaefninu verða skipti á einstaka amínósýrum í próteinum, og þannig skapast leið til að aðlaga eiginleika próteina sem best að aðstæðum og þörf hverrar lífveru. Við höfum greint amínósýruaðir tveggja kuldavirkra fosfatasa, annars vegar úr þorski en hins vegar úr kaldsjávarörveru af *Vibrio* stofni. Markmið rannsókna okkar er að finna tengsl milli tiltekinnna amínósýra og kuldavirkra eiginleika. Til þess nýtum við m.a. spálíkan varðandi þrívíddarbyggingu ensímanna. Í kuldakæru ensímum hefur vatnsfælnum amínósýrum hlutfallslega fækkað en skautuðum amínósýrum fjölgað. Hlutfallið (Ile+Leu)/(Ile+Leu+Val) hefur þó ekki lækkað, né Gly fækkað, eins og búast mátti við. Mismunur í innri samloðun, lengri yfirborðslykkjur og fleiri yfirborðshleðslur auka væntanlega hreyfanleika í sameindunum og þar með hvötunarvirknina. Ljóst er að mjög ítarleg og staðbundin amínósýrugreining er nauðsynleg, áður en fullur skilningur fæst.

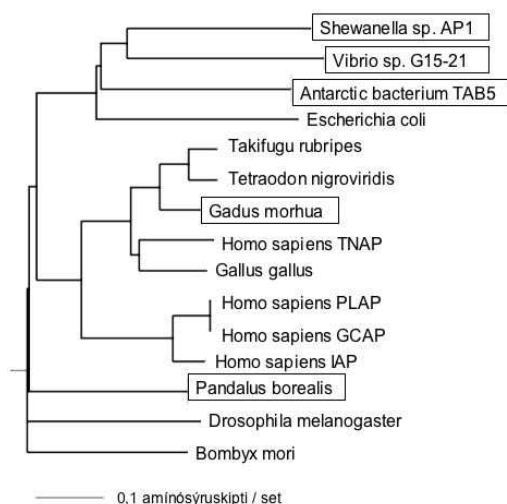
Inngangur

Í tímans rás aðlagast lífverur þeim þáttum í umhverfinu sem hafa áhrif á lífsafkomu þeirra. Hitastig er mikilvæg breyta í því sambandi, vegna almennra áhrifa á hraða efnahvarfa og stöðugleika stórsameinda [1–5]. Aðlögunin verður að stórum hluta með breytingum í eiginleikum próteina, einkum ensíma sem hvata efnahvörf lífvera. Nákvæmlega hvernig ensím aðlagast starfsvettvangi sínum er enn sveipað nokkurri dulúð. Þrír meginleikar ensíma úr mismunandi hitastigsumhverfi breytast; sækni ensímsins í hvarfefnin, hvötunhraði ensímsins, og stöðugleiki ensímins. Kuldakær ensím virðast almennt missa þol gagnvart hita og efnaáreiti vegna fækkunar í innri víxltengingum. Þetta er talið nauðsynlegt til að viðhalda nægum sveigjanleika til kvikra hreyfinga við lág hitastig [6, 7]. Kuldavirk ensím eru enda mun virkari sem hvatar en ensím aðlöguð hærri hitastigum, sé mæling gerð við herra viðmiðunarhitastig (t.d herbergishita).

Ýmis einkenni í amínósýrusamsetningu hafa verið tengd kuldaaðlögun. Má helst nefna: (1) Fleiri skautaðar amínósýrur (hér talið: þreónín-Thr, serín-Ser, glútamát-Glu, aspartat-Asp); (2) Færri prólín, en Pro gerir fjölpeptíð staðbundið stífari; (3) Fleiri glýsín, en Gly gerir fjölpeptíð staðbundið hreyfanlegri; (4) Fleiri metþíónín, en Met býður uppá fjölbreyttar stellingar hliðarhóps og aukinn innvortis sveigjanleika í próteini; (5) Lækkað hlutfall argíníns og lýsíns (Arg/Arg+Lys),

en vetnistengjum getur fækkað af þeim sökum; (6) Lækkað hlutfall ísóleusíns, leusíns á móti valíni (Ile+Leu/Ile+Leu+Val), en við það stækka holrými í innsta kjarna próteina og vatnsfælin hrif (samloðun atóma) minnka; og loks mætti nefna (7) minnkun í samloðun arómatískra hringja. Hvert einstakt kuldavirkt ensím þarf ekki að hafa öll þessi aðlögunareinkenni. Mismunandi samval þátta af ofangreindum lista dugur ólíkum próteinum.

Alkalískur fosfatasi hvatar vatnsrof fosfórsambanda og hefur bæði mjög breiða sérvirkni og mikla útbreiðslu í lífríkinu [8]. Mismunandi afbrigði ensímsins hafa mjög ólíka hvötunarvirkni, sem gerir þetta ensím gott rannsóknarefni. Alkalískir fosfatasar úr örverum hafa almennt minni virkni en samstofna ensím hryggdýra, þótt hvarfgangur allra fosfatasa sé í grunnatriðum eins [9] og amínósýruröðin lík. Þrívíddarbygging þriggja alkalískra fosfatasa hefur verið greind. Þar áttu í hlut ensím in úr örverunni *E. coli* [10], rækju [11], og manna fylgju [12]. Virkni allra ensímanna reyndist háð því að tvær eins fjölpeptíðeiningar væru samtengdar í tvennd (e. dimer). Langtímamarkmið rannsókna okkar er að finna nákvæmlega hvaða amínósýruskipti valdi þeim breytingum sem gera þessi kuldavirku ensím áhugaverð í okkar augum. Við höfum unnið samkvæmt þeirri tilgátu að amínósýrur kuldavirkra ensíma hafi með þróun breyst á fáum lykilstöðum, þannig að sameindin frjósi ekki við kælingu, heldur haldi þeim hreyfanleika, sem nauð-



Mynd 1. Skyldleikatré nokkurra alkalískra fosfatasa. Kuldavirk afbrigði ensímsins eru merkt með kassa. Ensímín eiga uppruna úr þremur örverustofnum; *Vibrio* G15-21, sem var tekin úr sjó við Gróttu á Seltjarnarnesi, og Suðheimskautsörverunum *Shewanella* sp., og TAB5, auk þorsks (*G. morhua*), og rækju (*P. borealis*). *T. rubripes* og *T. nigroviridis* eru fiskitegundir úr hlýju umhverfi, *G. gallus* er hænsnfugl, *D. melanogaster* er ávaxtaflugan, og *B. mori* silkiormur. Paraður samanburður aminósýruraða var gerður með forritinu ClustalW og notað mengið BLOSUM62 til að reikna prósentulíkindi (fjarlægðir) milli allra paraðra raða. Tréð var síðan byggt upp með því að raða klösum líkra raða innbyrðis með aðferð nágrannatengsla (neighbor-joining method). Hver tengipunktur inni í trénu á lóðréttum stikum táknar útdauðan forföður. Lengd láréttu línanna er í réttu hlutfalli við fjölda aminósýra, sem hafa breyst milli þeirra tveggja raða er marka enda þeirra [25].

synlegur er fyrir hvötunarstarfið [7, 13]. Einnig má spyrja, hvort sjá megi þess merki í heildarsamsetningu kuldavirkra próteina, að tiltekna gerðir aminósýra veljist í þessum ensímum umfram aðrar. Tilgangur greinarinnar er að svara því fyrir alkalíska fosfatasa.

Tvö fjarskyld kuldavirk ensím eru hér til umfjöllunar. Annars vegar er alkalískur fosfatasi úr íslenskri kaldsjávarörveru af *Vibrio* ættkvísl [14], en hins vegar alkalískur fosfatasi úr þorski [6]. Við höfum raðgreint aminósýrur beggja próteinanna. Þrjú aðrir kuldavirkir fosfatasar hafa verið raðgreindir af öðrum, og þannig er hægt að víkka samanburðarsafnið enn frekar. Um er að ræða tvö ensím úr örverutegundum frá Suðurheimskaütinu og eitt úr Norður-Atlantshafs rækju. Mynd 1 sýnir skyldleikatré þessara kuldavirkra fosfatasa og tengsl þeirra við valinn hóp hitaþolnari afbrigða.

Niðurstöður

(A) Aminósýrur alkalískra fosfatasa úr *Vibrio* G15 og þorski (*Gadus morhua*)

Í töflu 1 má sjá almennan samanburð á aminósýrusamsetningu milli kuldavirkra fosfatasa tveggja, sem við höfum raðgreint, og hitaþolnari afbrigða. Kuldavirkur AP ensímín hafa: (i) hlutfallslega fleiri mínushleðslur (Asp, Glu); (ii) lægra Arg/(Arg+Lys) hlutfall; (iii) herra (Leu+Ile/(Leu+Ile+Val) hlutfall; (iv) lægri vatnsfælnistuðul (GRAVY; grand average hydrophobicity), sem bendir til herra innihalds af skautuðum og hlöðnum aminósýrum á kostnað vatnsfælnna, og (v) fækkun í tvísúlfíðtengjum. Einkenni þessi gætu öll tengst kuldaaðlögun. Sú tilgáta að kuldavirk ensím hafi óvenju margar neikvæðar yfirborðshleðslur (Asp, Glu) og lágt pI-gildi [3] stenst í okkar samanburði, ef miðað er við reiknuð pI-gildi. Mælt jafnhleðslugildi fyrir AP þorsks passaði einnig vel við reiknaða gildið í töflu 1, við pI 5,7 [15]. Aftur á móti ber töluvert á milli gildisins pI 7,6 sem metið var með jafnhleðslurafdrætti (e. isoelectric focusing) fyrir *Vibrio* AP [16] og reiknaða gildisins pI 5,39 í töflu 1. Mælitæknileg atriði (svo sem hitun í rafdráttarhlaupinu eða tvígildar málmjónir sem þurftu að vera í sýninu) geta hafa truflað ákvörðun pI með jafnhleðslustillingunni. Stærð ensímanna (mólmassi og fjöldi aminósýra) er töluvert breytilegur, en svipmót þeirra í þrívídd reynist vera afar svipað samkvæmt kristallgreiningu eða líkanagerð í tölvu. Munurinn fólst aðallega í stærð yfirborðslykkja, sem eru tengisvæðin milli þeirra kafla í fjölpeptíðkeðjunni sem mynda kjarna próteinsins (Mynd 2).

Tvísúlfíðtengjum (brennisteinsbrúm) hefur fækkað úr tveimur í enga í *Vibrio* AP miðað við samstofna ensím úr *Escherichia coli*, og úr tveimur í eina í AP úr þorski í samanburði við hliðstætt ensím úr manni eða heitfengari fiski. Athygli vekur þó, að tilgátan um fækkun tvísúlfíðtengja í kuldavirkum ensímum er alls ekki algild. Í kuldaaðlöguðum AP úr rækju eru tvö tvísúlfíðtengi til staðar [11], þar sem búast hefði mátt við fækkun í eitt. Reyndar er hægt að tengja það þeirri staðreynd, að hitastöðugleiki rækjuensímsins er meiri en AP þorsks. Merklekast verður að telja í þessu samhengi, að hitakærasta samanburðarsímið úr *Thermus* örverunni er án tvísúlfíðtengja, líkt og *Vibrio* AP (Tafla 1). Það skyggir þó ekki á þá staðreynd, að innsetning nýrra tvísúlfíðtengja getur vissulega aukið stöðugleika kuldavirkra ensíma og dregið úr virkni [17]. Við höfum sömuleiðis prófað að setja annars konar víxltengi inn í byggingu *Vibrio* AP með glútaraldehyði, og séð merki um

	E. coli	X. fastidiosa	T. aquaticus	Vibrio G15	H. sapiens	F. rubripes	P. borealis	G. morhua
Fjöldi amínósýra:	449	543	475	502	507	508	475	477
Mólmassi:	47044	58123	52077	55395	55531	55710	52971	52198
Fræðilegt jafnhleðslugildi (pI):	5,44	6,38	6,47	5,39	6,29	6,4	4,68	5,78
Amínósýrusamsetning:								
Ala (A)	64 14,3%	78 14,4%	60 12,6%	46 9,2%	48 9,5%	47 9,3%	42 8,8%	48 10,1%
Arg (R)	13 2,9%	32 5,9%	38 8,0%	13 2,6%	21 4,1%	18 3,5%	23 4,8%	20 4,2%
Asn (N)	20 4,5%	18 3,3%	18 3,8%	27 5,4%	25 4,9%	34 6,7%	16 3,4%	27 5,7%
Asp (D)	28 6,2%	28 5,2%	23 4,8%	34 6,8%	29 5,7%	26 5,1%	48 10,1%	32 6,7%
Cys (C)	4 0,9%	4 0,7%	1 0,2%	1 0,2%	5 1,0%	5 1,0%	4 0,8%	4 0,8%
Gln (Q)	22 4,9%	23 4,2%	19 4,0%	26 5,2%	15 3,0%	23 4,5%	11 2,3%	18 3,8%
Glu (E)	24 5,3%	26 4,8%	32 6,7%	33 6,6%	29 5,7%	28 5,5%	34 7,2%	28 5,9%
Gly (G)	45 10,0%	50 9,2%	44 9,3%	40 8,0%	44 8,7%	44 8,7%	38 8,0%	43 9,0%
His (H)	10 2,2%	27 5,0%	11 2,3%	14 2,8%	23 4,5%	17 3,3%	16 3,4%	15 3,1%
Ile (I)	16 3,6%	20 3,7%	12 2,5%	26 5,2%	16 3,2%	22 4,3%	26 5,5%	19 4,0%
Leu (L)	39 8,7%	42 7,7%	49 10,3%	43 8,6%	46 9,1%	42 8,3%	36 7,6%	37 7,8%
Lys (K)	28 6,2%	14 2,6%	14 2,9%	38 7,6%	29 5,7%	31 6,1%	22 4,6%	29 6,1%
Met (M)	8 1,8%	9 1,7%	9 1,9%	12 2,4%	14 2,8%	13 2,6%	10 2,1%	10 2,1%
Phe (F)	8 1,8%	14 2,6%	18 3,8%	19 3,8%	14 2,8%	18 3,5%	19 4,0%	14 2,9%
Pro (P)	21 4,7%	32 5,9%	22 4,6%	19 3,8%	24 4,7%	23 4,5%	13 2,7%	23 4,8%
Ser (S)	22 4,9%	27 5,0%	21 4,4%	35 7,0%	29 5,7%	27 5,3%	22 4,6%	22 4,6%
Thr (T)	40 8,9%	49 9,0%	20 4,2%	29 5,8%	33 6,5%	31 6,1%	43 9,1%	31 6,5%
Trp (W)	3 0,7%	8 1,5%	6 1,3%	5 1,0%	5 1,0%	6 1,2%	7 1,5%	6 1,3%
Tyr (Y)	11 2,4%	14 2,6%	17 3,6%	19 3,8%	20 3,9%	17 3,3%	19 4,0%	18 3,8%
Val (V)	23 5,1%	28 5,2%	41 8,6%	23 4,6%	38 7,5%	36 7,1%	26 5,5%	33 6,9%
Súrir hlíðarhópar (Asp + Glu):	52 11,6%	54 9,9%	55 11,6%	67 13,3%	58 11,4%	54 10,6%	82 17,3%	60 12,6%
Básískir hlíðarhópar (Arg + Lys):	41 9,1%	46 8,5%	52 10,9%	51 10,2%	50 9,9%	49 9,6%	45 9,5%	49 10,3%
Arónatískir hlíðarhópar (Phe+Tyr+Trp):	22 4,9%	36 6,6%	41 8,6%	43 8,6%	39 7,7%	41 8,1%	45 9,5%	38 8,0%
Hlutfallið Arg/(Arg+Lys):	0,32	0,69	0,73	0,25	0,42	0,37	0,51	0,41
Hlutfallið (Leu+Ile)/(Leu+Ile+Val):	0,71	0,69	0,60	0,75	0,62	0,64	0,70	0,63
Stuðull meðaltalsvatnsfælni (GRAVY):	-0,36	-0,361	-0,218	-0,512	-0,367	-0,370	-0,455	-0,464
Tvisúlfíðtengi (-SS-):	2	2	0	0	2	2	2	1

Tafla 1. Samanburður á eiginleikum nokkurra alkalískra fosfatasa (AP) sem byggir á aminósýruinnihaldi. Kuldavirkir AP úr örverunni *Vibrio* G15-21 og þorski (*G. morhua*) eru bornir saman við hitaþolinari fosfatasa úr örverum, en hins vegar hitaþolinari AP úr tveimur hryggdýrum. AP úr íshafsrækju (*P. borealis*) er einnig sýndur. Dektar tölur merkja þau tilfelli þar sem kuldavirku ensím-in sem hér voru raðgreind gefa jaðargildi. Samanburður á meðaltalstölum allra þekktra kuldavirkra ensíma var gerður við tvo hópa með reikningi Z-gilda (gögn ekki sýnd); meðaltal tíu hitaþolinna örveruensíma (móti *Vibrio* AP) og tíu hitaþolinna hryggdýraensíma (móti *G. morhua* AP). Litun sýnir hvar samhljóða niðurstöður fengust í báðum tilfellum. Gulur litur táknar fjölgun en bleikt fækkun á tiltekinni gerð aminósýru. GRAVY stuðullinn er reiknað meðaltal vatnsfælni, þar sem notuð var tafla Kyte og Doolittle fyrir skautun einstakra aminósýra (sjá <http://www.expasy.org/tools/protparam.html>). Stuðlar skautuðustu og óskautuðusta aminósýrana eru: Arg (-4,5) og Ile (4,5).

aukinn stöðugleika gagnvart hitun samfara lækkun í virkni (óbirt gögn). Væntanlega er það vegna minni (staðbundins) hreyfanleika í sameindinni.

Víðtækari samanburður var næst gerður á þann hátt að meðaltalsinnihald hversrar aminósýru í þeim fimm kuldavirku AP, sem þekktir eru, var borið saman við tvo stærri viðmiðunarhópa. Reiknað var meðaltal og staðalfrávik í aminósýrusamsetningu annars vegar fyrir hóp AP úr tíu örverum (*Yersinia pestis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Xylella fastidiosa*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Bacillus halodurans*, *Xanthomonas axonopodis*, *Brucella melitensis*, *Thermus caldophilus*), en hins vegar fyrir tíu AP úr hryggdýrum (*Homo sapiens*-fjögur ólík ísó-ensím, *Gallus gallus*, *Fugu rubripes*, *Tetraodon nigroviridis*, *Bos taurus*, *Felix catus*, *Rattus norvegicus*). Tölfræðilegur samanburður reyndist erf-

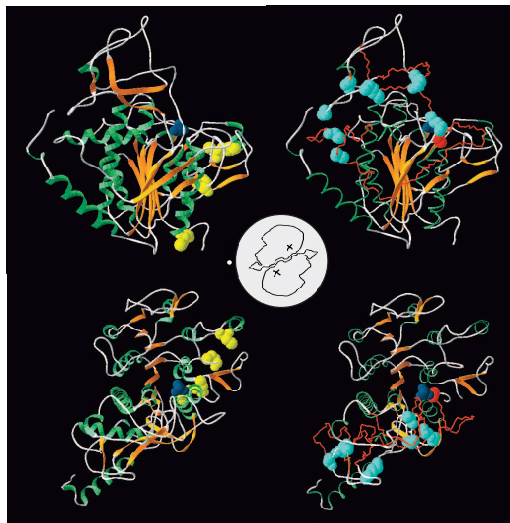
iðari fyrir AP þorsks en *Vibrio* AP, vegna þess að aminósýruraðir þekktra AP dreifast mest á örveru- tegundir og spendýr. Annað mikilvægt atriði sem vert er að hafa í huga er sú óvissa sem ríkir um eiginleika þeirra ensíma sem kerfisbundnar raðgreiningar genamengja eru að færa okkur. Ekki er hægt að fullyrða um stöðugleika eða hvötunarvirkni þeirra nema gera beinar mælingar. Sömuleiðis er ekki ljóst hvern skal telja "líkamshita" hinna ýmsu örveru- tegunda, og þar með aðlögunarhitastig þeirra ensíma sem þær bera. Loks verður að líta á tölfræðiniður- stöður okkar í ljósi þess, hversu lítil hópur þekktra kuldavirkra AP er. Í töflu 1 eru þær aminósýrur merktar með gulum eða bleikum lit, þar sem með- altalsinnihald þeirra í kuldavirku AP ensímunum vék a.m.k. sem nemur einu staðalfrávik frá með- altali beggja viðmiðunarhópanna (gögn ekki sýnd). Í kuldavirku ensímunum fimm reyndist að meðal-

tali almenn fækkun í Arg, Cys, Gly, Val, og Pro, en aukning í Asp, Glu, Ile, Lys, og Phe. Einstök ensím viku þó verulega frá þessu (miðað við þröskuld við eitt staðalfrávik). Í AP þorsks voru breytingarnar mestar í Asp (aukning), Cys (fækkun), Glu (aukning), Leu (fækkun), Ile (aukning), Met (fækkun), Ser (fækkun), Trp (aukning) í samanburði við önnur hryggdýr. Í *Vibrio* AP voru breytingarnar mestar í Ala (fækkun), Arg (fækkun), Asn (aukning), Glu (aukning), Gly (fækkun), Ile (aukning), Lys (aukning), Met (aukning), Phe (aukning), Ser (aukning), Thr (fækkun), Tyr (aukning) í samanburði við AP annarra örvera.

(B) Þrívíddarlíkan alkalísks fosfatasa úr þorski (*Gadus morhua*)

Þrívíddarlíkan var útbúið af alkalískum fosfatasa (AP) þorsks í tölvu með hermingu við samstofna ensím (e. homology modeling) [18] til frekari samanburðar. Við gerð þess var stuðst við kristallbyggingu AP úr manna fylgju [12] og nýlega greinda amínósýruröð AP þorsks [19]. Mynd 2 sýnir þrívíddarstillingu meginstofns fjölpeptíðkeðjunnar í fosfatasa þorsks. Ensímið er tvennd eða tvíliða (e. dimer), svo sem skýrt er með teikningu á miðri mynd 2. Tvenndarskipan er einkenni flestra ensímanna í fosfatasa fjölskyldunni, því sundrun eininga orsakar algert virkniþap. Eina þekkta undantekningin eru einþátta og virkir alkalískir fosfatasar úr örverum af *Vibrio* stofni [16]. Amínósýruradgreining okkar á AP úr *Vibrio* G15 stofninum leiddi í ljós, að stórra lykku er skotið inn í fjölpeptíð þessa próteins [14]. Lykkjan sest líklega fyrir á yfirborð próteinsins, þar sem systureiningin hefði ella komið. Komið hefur í ljós, að einingarnar tvær í fosfatasa þorsks detta auðveldar í sundur við álag, heldur en þær gera í AP blóðheitra dýra [20]. Það skýrist af því, að færri veikir, ósamgildir kraftar verka milli eininganna tveggja samanborið við AP úr spendýrum. Peptíðeiningarnar hvor um sig hafa auk þess óstöðugari þrívíddarbyggingu í kulda- virka afbrigðinu. Frjálsorkubreytingin við sundrun eininga í AP þorsks er 8,3 kcal/mól og afmyndun eininganna er samtals $2 \times 2,2$ kcal/mól, eða 4,4 kcal/mól. Heildarfrjálsorkan reiknast þá alls 12,7 kcal/mól fyrir afmyndun þorska AP samanborið við 17,3 kcal/mól fyrir afmyndun AP blóðheitis dýrs (kálf) [20].

Svonefndar tvísúlfiðbrýr myndast í sumum ut- anfrumpróteinum við samtengingu tveggja syste- in amínósýra með samgildu tengi. Brýrnar gera próteinsameindir stöðugri en ella. Einnig hefur verið staðfest með tilraunum, að gerð slíkra brúa leið-



Mynd 2. Þrívíddarbygging AP þorsks og athyglisverðar amínósýrur. Teikningin í miðju sýnir afstöðu eininganna í virku ensími, sem er tvíliða (e. dimer). Ljósdepill merkir eininguna sem sýnd er á neðri myndunum tveimur; hin einingin er spegilmynd hennar. Krossarnir sýna staðsetningu hvarfstöðvanna tveggja og hvernig þær sitja nálægt samskilunum. Vinstra megin efst má sjá staðsetningu allra fjögurra systeín amínósýranna í þessu ensími (gular), en aðeins tvær þeirra geta þarast í tvísúlfiðbrú. Vinstra megin neðst er sama mynd séð ofan frá. Grænt sýnir helixa, appelsínugult sýnir fleti, en hvítt sýnir tengisvæðin (lykkjur). Bláa sameindin er fosfór, og merkir staðsetningu hvarfstöðvarinnar. Hreyfingar atóma í einni hvarfstöð leiða gegnum samskilin inn í hina hvarfstöðina, og geta haft áhrif á virkni hennar. Hægra megin efst eru sýndar þær glýsín amínósýrur sem eru einstakar fyrir þetta kulda- virka ensím (ljósblátt). Svæðin í fjölpeptíðkeðjunni sem þær sitja í hafa verið lituð rauð. Einnig hefur ein sérín amínósýra verið lituð rauð, en á henni er virkni ensímsins byggð. Neðst til hægri sést betur hvernig þessar glýsín amínósýrur raðast á samskilin milli eininga.

ir af sér minnkaðan hreyfanleika í sameindunum og minnkaða virkni, svo sem áður er getið [17]. Tvísúlfiðbrýr eru almennt tvær í AP úr ylkærum lífverum og fækkun þeirra gæti verið þáttur í kulda- aðlögun almennt. Í fyrstu var talið að tvísúlfiðbrýr væru tvær í AP þorsks, þar sem ensímið greindist með fjórar systeín amínósýrur. Þrívíddarlíkanið leiddi síðar í ljós að fjarlægð leyfir aðeins myndun einnar slíkrar búar (Mynd 2).

Beinir mælikvarðar á kvikan sveigjanleika próteina eru illa skilgreindir enn sem komið er. Vitað er að hreyfanleiki á snertiflötum eininganna tveggja í AP hafa bein áhrif á virknistig hvarfstöðvanna. Samanborið við AP blóðheitra dýra fundust í AP þorsks þrjár einstakar Gly á svæðinu sem

myndar samhverfu snertifletina milli peptíðeininganna tveggja (Mynd 2). Þær gætu losað um tengsl milli eininganna vegna aukins hreyfanleika aðliggjandi svæða, og þannig stuðlað að aukningu í kvikum hreyfingum hvarfstöðvarinnar, þó ekki verði fullyrt um það án tilrauna. Einnig mátti sjá innsetningu nokkurra Gly í stað annarra aminósýra umhverfis hvarfstöðina, en allar eru þessar Gly nálægt samloðunarfleti eininganna (Mynd 2).

Umræða

Skilningur okkar á kuldaaðlögun er enn óljós, enda þótt rannsóknum hafi farið mjög fjölgandi á síðari árum. Almennt samstaða virðist vera um þá hugmynd, að bygging slíkra ensíma þurfi að vera sveigjanlegri í sér en bygging ensíma sem vinna við hærri hitastig. Hreyfigeta ensíma þarf að vera hæfileg við hvert það hitastig, sem tilteknu ensími er ætlað að vinna við í náttúrunni, því hvötunarkvinnin (k_{cat}) er háð slíkum hreyfingum með beinum hætti. Bindifastar ensíms og hvarfefna þess (K_m) eru einnig varðveittir með tilliti til hitastigs. Þannig kemur fram munur í mældum eiginleikum tveggja ensíma úr ólíku umhverfi, séu þessir eiginleikar mældir við eitt sameiginlegt hitastig. Við 25°C er sem dæmi hvötunargeta (k_{cat}/K_m) AP úr kuldaaðlöguðum lífverum 2-5 falt hærri en mælist fyrir AP blóðheitra lífvera. Hvötunargetan nálgast hins vega sambærileg gildi, sé hún mæld við hin eðlilegu starfsskilyrði hvors ensíms. Í því felst hið almennt markmið með hitastigsaðlögun ensíma.

Hvaða breytingar í aminósýruröðum kuldavirkra AP leiða til hækkaðrar hvötunargetu og minnkaðs stöðugleika? Um það er ekki vitað í smáatriðum. Víðtækur kerfisbundinn samburður á aminósýruinnihaldi í öðrum kuldavirkum ensímum gaf ýmsar vísbendingar, svo sem að Arg, Glu, og Val sé fækkað í kuldavirkum ensímum samfara fjölgun á Lys, Asp, Ala [21]. Í kuldavirkum próteinkljúfum (trypsinum) reyndist helsti markverði munurinn vera lækun í hlutfallinu (Leu+Ile)/ (Leu+Ile+Val) [3]. Erfðamengi tveggja kuldapölinna fornbaktería (archaea) voru borin saman við erfðamengi hitapölinna fornbaktería með tilliti til aminósýruvals í próteinum. Kuldakæru tegundirnar reyndust hafa herra hlutfall óhlaðinna en þó skautaðra aminósýra (svo sem Gln og Thr) en minna af vatnsfælnun aminósýrum (einkum Leu) [22]. Okkar niðurstöður hvað varðar hlutfallið (Leu+Ile)/ (Leu+Ile+Val) eru þær, að ekki sé um marktækan mun að ræða, og frekar sé tilhneiging til þess að hlutfallið hækki. Innhald Leu og Val minnkaði lítillega í báðum kuldavirku ensímum okkar, en hlutfall Ile jókst. Meðaltalsvatnsfælni aminósýra færðist þó í átt að

meira vatnsækni, og þannig má líklega ná fram þeim áhrifum að minnka þökkunarþéttu og vatnsfælnihrif í kjarna próteinanna, sem eykur hreyfanleika. Ljóst er að samburður á heildarfjölda hvarfar aminósýrugerðar í próteinum er of grófur mælikvarði. Líta þarf jafnframt til nákvæmrar staðsetningar einstakra hliðarhópa af hverri gerð.

Mælingar sýna að kuldaaðlögun í AP hefur falid í sér fækkun veikra samloðunarkrafta, bæði innan peptíðkeðjuklasa (í báðum ensímum sem við höfum kannað), og milli eininga í tvenndarforminu (á við AP þrosks). Tilgáta okkar er sú, að aukin hvötunargeta AP þrosks liggja í því að hreyfingar á mótum eininga, sem og innan eininga, sé auðveldari samborðið við þéttþakkaðri afbrigði spendýra. Vitað er að slíkar hreyfingar eru nauðsynlegar fyrir hvötunarferli AP [17]. Búast má við áhrifum á hreyfanleika á nærliggjandi svæði þar sem Gly kemur fyrir í fjölpeptíðkeðju. Því til stuðnings má nefna útskipti á tveimur aðliggjandi Gly sem gerð var með erfðatækni nálægt hvarfstöð AP úr kuldavirkri Suðurheimsskautsörveru [23]. Breyting á annarri þeirra í Ala eyðilagði alla virkni, en sams konar breyting á hinn minnkaði virkni og stöðugleika gagnvart hita verulega. Nákvæm staðsetning einstakra Gly getur því greinilega ráðið því hvaða lokaáhrif það hefur á eiginleika ensímins að breyta þeim. Nýlega var kuldavirkum esterasa breytt í virkni-minna ensím með einni stökkbreytingu á Gly í Pro, jafnframt því sem sértækni breyttist [24]. Þau kuldavirku ensímur sem við höfum raðgreint innihalda í öðru tilfallinu færri Gly en samburðarensím, en í hinu tilfallinu hlutfallslega fleiri. Sama gildir um Pro. Þetta sýnir aftur hversu skammt heildarsamburður á aminósýruinnihaldi nær. Um áhrif Gly eða Pro á virkni og stöðugleika AP úr þroski eða *Vibrio* örverunni fæst því ekki endanlega skorið fyrir en beinar tilraunir með stökkbreytingar af áður nefnum toga verða gerðar. Í AP úr *Vibrio* G15 hefur aðlögun til að losa um tengslin milli samloðandi eininga gengið út í þær öfgar, að ensímið er ekki lengur tvíliða, heldur hefur stór lykka tekið sæti hins peptíðkeðjuklasans. Þetta veldur mikilli minnkun í stöðugleika, en við teljum að það sé liður í því að auka hreyfanleika í hvarfstöðinni og þar með hvötunargetu. Þetta er mjög óvenjuleg leið til kuldaaðlögunar, og líklega einstakt dæmi.

Í náinni framtíð þarf að gera markvissar stökkbreytingar á kuldavirkum AP til að staðfesta hlutverk einstakra aminósýra í mótun eiginleika ensímanna. Slíkar athuganir eru nú þegar hafnar á *Vibrio* AP.

Þakkir

Þakkir eru færðar vísindasjóði Rannís og Rannsóknarsjóði Háskóla Íslands fyrir veittan stuðning. Rannsóknir á *Vibrio* AP voru unnar í samstarfi við Próf. Ólaf S. Andrésón, Jónas B. Hauksson, MS og Pavol Cekan, en rannsóknir á AP þorsks með aðstoð Berit N. Nielsen MS, nú hjá Íslenskri erfðagreiningu, og Dr. Peter Højrup við Háskólann í Odense.

Summary: Evolutionary pressure in psychrophilic organisms alters their enzymes in order to compensate for the effect of low temperatures on the rate of physiological processes. We have obtained the full amino acid sequences of two cold-adapted alkaline phosphatases (APs). Several sequence characteristics have been correlated with cold-adaptation. Overall hydrophobicity is reduced. This might lead to diminished packing density of the core, which together with extended surface loops and improved solvent interactions through additional surface charges promote flexibility. Contrary to expectation, the ratio (Ile+Leu)/(Ile+Leu+Val) and Gly content were similar. In both enzymes, fewer disulfide bridges were present than in most other APs. Further studies of psychrophilic APs will need to be based on the three-dimensional structure.

Heimildir

- [1] J.R. Hazel, C.L. Prosser, *Physiol. Rev.* **54**, (1974) 620.
- [2] B. Ásgeirsson, J.W. Fox, J.B. Bjarnason, *Eur. J. Biochem.* **180**, (1989) 85.
- [3] H.-K. Schröder-Leiros, N.P. Willassen, A.O. Smalås, *Eur. J. Biochem.* **267**, (2000) 1039.
- [4] T. Lonhienne, C. Gerday, G. Feller, *Biochim. Biophys. Acta* **1543**, (2000) 1.
- [5] B. Ásgeirsson, *Tímarit um raunvísindi og stærðfræði* **1**, (2003) 35.
- [6] M.M. Kristjánsson, B. Ásgeirsson, in *Handbook of food enzymology*, eds. J.R. Whitaker, A.G. Voragen, D.W.S. Wong, Marcel Dekker, Inc., New York, 2002.
- [7] P.A. Fields. *Comp. Biochem. Physiol.* **129A**, (2001) 417.
- [8] R.B. McComb, G.N. Bowers, S. Posen, *Alkaline Phosphatase*, Plenum Press, New York, 1979.
- [9] J.E. Murphy, E.R. Kantrowitz, *Molec. Microbiol.* **12**, (1994) 351.
- [10] J.M. Sowadski, M.D. Handschumacher, H.M.K. Murthy, B.A. Foster, H.W. Wyckoff, *J. Mol. Biol.* **186**, (1985) 417.
- [11] M. de Backer, S. McSweeney, H.B. Rasmussen, B.W. Riise, P. Lindley, E. Hough, *J. Mol. Biol.* **318**, (2002) 1265.
- [12] M.H. Le Du, T. Stigbrand, M.J. Taussig, A. Ménez, E.A. Stura, *J. Biol. Chem.* **276**, (2001) 9158.
- [13] C.L. Tsou, *Ann N Y Acad Sci* **864**, (1998) 1.
- [14] B. Ásgeirsson, Ó.S. Andrésón, *Biochim. Biophys. Acta* **1549**, (2001) 99.
- [15] B. Ásgeirsson, R. Hartemink, J.F. Chlebowski, *Comp. Biochem. Physiol.* **110B**, (1995) 315.
- [16] J.B. Hauksson, Ó.S. Andrésón, B. Ásgeirsson, *Enz. Microbial. Technol.* **27**, (2000) 66.
- [17] S. D'Amico, C. Gerday, G. Feller, *J. Biol. Chem.* **277**, (2002) 46110.
- [18] N. Guex, M. C. Peitsch, *Electrophoresis* **18**, (1997) 2114.
- [19] B. Ásgeirsson, B. Noesgaard Nielsen, P. Højrup, *Comp. Biochem. Physiol.* **136B**, (2003) 45.
- [20] B. Ásgeirsson, J.B. Hauksson, G.H. Gunnarsson, *Eur. J. Biochem.* **267**, (2000) 6403.
- [21] G. Gianese, P. Argos, S. Pascarella, *Protein Eng.* **14**, (2001) 141.
- [22] N.F.W. Saunders, T. Thomas, P.M.G. Curmi, J.S. Mattick, E. Kuczek, R. Slade, J. Davis, P.D. Franzmann, D. Boone, K. Rusterholtz, R. Feldman, C. Gates, S. Bench, K. Sowers, K. Kadner, A. Aerts, P. Dehal, C. Detter, T. Glavina, S. Lucas, P. Richardson, F. Larimer, L. Hauser, M. Land, R. Cavicchioli, *Genome Res.* **13**, (2003) 1580.
- [23] K. Mavromatis, I. Tsigos, M. Tzanodaskalaki, M. Kokkinidis, V. Bouriotis, *Eur. J. Biochem.* **269**, (2002) 2330.
- [24] L. Kulakova, A. Galkin, T. Nakayama, T. Nishino, N. Esaki, *Biochim. Biophys. Acta* **1696**, (2004) 59.
- [25] S.L. Baldauf, *Trends in Genetics* **19**, (2003) 345.

Um höfundinn:

Bjarni Ásgeirsson er prófessor í lífefnafræði við efnafræðiskor Háskóla Íslands.

Raunvísindastofnun Háskólans
Dunhaga 3, IS-107 Reykjavík
bjarni@raunvis.hi.is

Móttékin: 2. febrúar 2004