

Áhrif stökkbreytinga í hvarfstöð kuldavirks alkalísks fosfatasa

Katrín Guðjónsdóttir¹, Ólafur S. Andrésson² og Bjarni Ásgeirsson¹

¹Raunvísindastofnun Háskólans og ²Líffræðistofnun Háskólans,

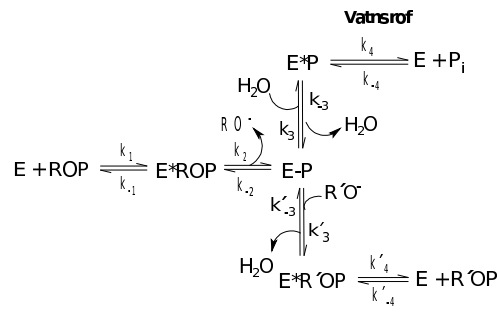
Vefútgáfa: 10. nóvember 2006

Ágrip – Kuldavirk ensím hafa þann eiginleika að geta haldið kvikum hreyfingum sínum gangandi þrátt fyrir litla varmaorku í umhverfi. Nákvæmlega hvernig slík kuldaaðlögun gerist er ekki vel skilið. Við höfum gert markvissar stökkbreytingar á kuldavirkum alkalískum fosfatasa (AP) úr *Vibrio* bakteríutegund sem hafa einkum það markmið að breyta hvötunargetu og stöðugleika ensímsins í átt að einkennum hitaþolnari afbrigða. Í hvarfstöð alkalískra fosfatasa eru þrjú málmjónabindiset; M1, M2 og M3. Algengast er að í setum M1 og M2 séu Zn^{2+} jónir sem taka þátt í hvötun. Í M3 er oftast Mg^{2+} jón sem auk þess að taka virkan þátt í hvötun hefur áhrif á stöðugleika ensímsins. Samanburður á öllum raðgreindum AP ensímum hefur sýnt að þær aminosýrur sem tengjast málmjónum í setum M1 og M2, eru í öllum tilfellum varðveittar. Tvær aminosýrur sem tengja Mg^{2+} jón í M3 set eru hinsvegar breytilegar í ólíkum AP. Asp153 / Lys328 í *E. coli* AP eru His116 / Trp274 í *Vibrio* AP og His / His í AP úr spendýraensímum. Við höfum breytt Trp 274 í *Vibrio* AP í histidín og þar með fengið ensím sem er eins og spendýraensímin hvað varðar aminosýrur sem tengja málmjónir í M3. Við þessa breytingu breyttist málmjón í M3 úr Mg^{2+} í villigerð yfir í Zn^{2+} . Hitastigsstöðugleiki virkniseta jókst ásamt því sem hvötunargeta minnkaði. Breytingin hafði ekki áhrif á hitastigsstöðugleika annars stigs bygginga en breytti sýrustigsstöðugleika umtalsvert.

1. Inngangur

Alkalískir fosfatasar, AP, finnast í lífverum úr öllum ríkjum lífsins. Þeir hvata vatnsrof mónófosfat-estertengja í basísku umhverfi. Ensím þessi hafa mjög breiða sérvirkni og hvata losun fosfathópa af ýmsum litlum sameindum sem og af stórum sameindum eins og DNA og próteinum [1].

Hvarfstöð AP er afar grunn og rúmar aðeins fosfórýlhóp hvarfefna. Hvarfgangur alkalískra fosfatasa byrjar með kjarnsækinni árás sérín alkoxíð jónar í hvarfstöð á fosfórýl hóp hvarfefnis svo til verður samgilt efnasamband. Næsta skref er svo vatnsrof þessa fosfat-serín millistigs [2]. Í nærveru fosfórviðtaka eins og Tris eða (dí)etanólamíns, hefur ensímið einnig transfosfórýlase virkni þ.e. fosfórinn er fluttur á Tris eða (dí)etanólamín-alkoxíð í stað vatns (hýdroxíðs) í seinna skrefi hvarfsins [3,4]. Hvarfganginum má lýsa með skema 1, þar sem E-P er samgilda fosfóserýl millistigið og E*P er ósamgilt efnasamband ensíms og ólífræns fosfats, P_i .

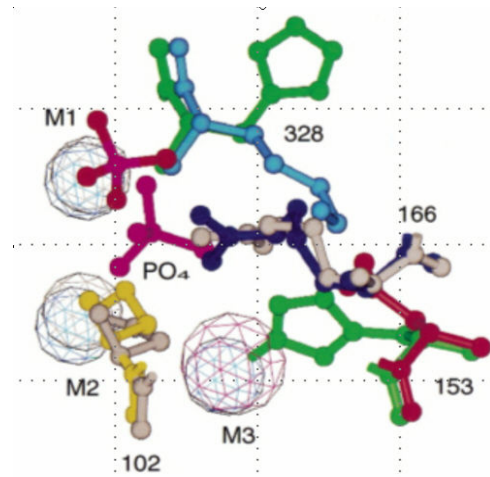


Skema 1

Í hvarfstöð AP eru þrjú málmjónabindiset, M1, M2 og M3. Í AP úr *E. coli* og úr mönnum eru Zn jónir í M1 og M2. Mg jón er í M3 í *E. coli* ensíminu [5]. Virkasta form AP úr manna fylgju hefur einnig Mg^{2+} í M3 [6] en Zn^{2+} getur þó auðveldlega bundist í M3 sem leiðir til minna virks ensíms. AP úr rækjum hefur Zn jónir í öllum málmjónabindisetum [7]. Saman mynda jónirnar þrjár hvötunarþrennd og er hver og ein

þeirra nauðsynleg fyrir hvötun. Í *E. coli* AP er Mg jónin nauðsynleg til að mynda kjarnsæknu Ser-O⁻ jónina í fyrra skrefi hvarfsins [8]. Mg jónin hefur einnig áhrif á stöðugleika ensímsins [9]. Samanburður á öllum raðgreindum AP hefur sýnt að þær amínósýrur sem tengjast jónum í M1 og M2 eru í öllum tilfellum varðveittar [10]. Tvær amínósýrur í hvarfstöð eru hinsvegar breytilegar í AP úr mismunandi lífverum; Asp153 / Lys328 í *E. coli* AP eru His116 / Trp274 í *Vibrio* G15-21 AP og His153 / His317 í AP úr spendýraensímum. Í AP úr rækju er einnig um að ræða tvær His í samsvarandi stöðum. Báðar eru þessar amínósýrur í nágrenni við M3 setið. Amínósýran í seti 153 (miðað er við *E. coli* númeringu) tengist málmjóninni, ýmist beint eða í gegnum vatn (eftir því hver amínósýran er). Af *E. coli* AP hafa verið gerð stökkbrigðin D153H, K328H og tvöfalda stökkbrigðið; D153H/K328H og hafa eiginleikar þessara afbrigða verið kannaðir og kristalsbygging þeirra greind [11–13]. Í öllum stökkbrigðunum breyttist málmjónabindiset M3 úr Mg²⁺ bindiseti í Zn²⁺ bindiset. Kristalsbygging AP úr rækju sýndi einnig tilvist þriggja Zn jóna í hvarfstöð og það ensím hefur einmitt histidín í þessum sömu stöðum [7]. Kristalsgreining tvöfalda stökkbrigðisins; D153H/K328H af *E. coli* AP sýndi einnig að staðsetning fosfats í hvarfstöð þess afbrigðis er mun utar heldur en í villigerð *E. coli* AP [13]. Á mynd 1 má sjá hvarfstöð villigerðar AP úr *E. coli* ásamt hvarfstöð tvöfalda stökkbrigðisins D153H/K328H af *E. coli* ensíminu. Myndin sýnir staðsetningu Mg²⁺ í M3 seti í hvarfstöð villigerðar en Zn²⁺ jón er í því seti þegar amínósýrunum Asp153 og Lys 328 hefur verið breytt í histidín. Myndin sýnir einnig breytta stöðu fosfats í hvarfstöð tvöfalda stökkbrigðisins miðað við villigerðina, sem og staðsetningu hinnar kjarnsæknu Ser 102 í hvarfstöðinni [14]. Það hefur því verið sýnt fram á að Lys328 í *E. coli* AP er mikilvæg fyrir fosfatbindingu í hvarfstöð [15] sem og að val amínósýru í þetta set ræður miklu um staðsetningu fosfórsins í hvarfstöð og tengsl ensímsins við hann [13]. Einnig hefur verið sýnt að tegund amínósýru í þessu seti hefur áhrif á hvaða málmjón ensímið velur í málmjónabindiset M3 [13] sem og hvaða málmjón ensímið getur notað við hvötun [16].

Ensím úr kuldakærum lífverum hafa þann eiginleika að geta haldið kvikum hreyfingum sínum (e. dynamic movements) gangandi þrátt fyrir litla varmaorku og aukna seigju í umhverfi [17, 18]. Sá sveigjan-



Mynd 1. Hvarfstöð villigerðar og tvöfalda stökkbrigðisins D153H/K328H af AP úr *E. coli*. Zn²⁺ jónir í málmjónabindisetum M1 og M2 er sýndar í gráu eða ljósbláu. Mg²⁺ jón í M3 seti er sýnd í fjólubláu en Zn²⁺ í M3 er sýnd í ljósbláu. Fosfór er sýndur í þeim tveimur mismunandi stellingum sem hann er í eftir því hverjar amínósýrur 153 og 328 eru (vínrautt fyrir stellinguna í villigerðinni og ljósrautt (bleikt) fyrir stellinguna í tvöfalda stökkbrigðinu). Amínósýrur í villigerð *E. coli* AP eru sýndar í gráu fyrir utan fosfatið (ljósrautt/bleikt, nær PO₄ merkinu) og Asp 153 og Lys 328 sem eru sýndar í rauðu og ljósbláu. Í D153H/K328H stökkbrigðinu eru His 153 og His 328 grænar, hin virka Ser 102 í gulu, Arg 166 í dökkbláu og fosfat í vínrauðu [14].

leiki sem þarf til að ensím geti framkvæmt efnahvörf við lágt hitastig næst með veikingu tengja og hrifa innan ensímbyggingarinnar. Sú veiking leiðir svo af sér ensím sem eru viðkvæm fyrir ýmsum afmyndandi efnum og hitaafmyndun. Stöðugleiki og bræðslumark (T_m) kuldavirkra ensíma eru þess vegna venjulega lægri heldur en hjá sambærilegum ensímum úr miðlungshitakærum og hitakærum lífverum. Hvort hinn aukni sveigjanleiki næst fram með staðbundinni veikingu tengja eða nær yfir alla bygginguna, er ekki fyllilega ljóst, og er líklega misjafnt eftir ensím fjölskyldum.

Kuldavirkur alkalískur fosfatasi var einangraður úr sjávarörverunni *Vibrio* G15-21 sem einangruð var úr sjó við Gróttu á Seltjarnarnesi [19]. Gen hans var síðar einangrað, klónað og raðgreint [20]. *Vibrio* AP hefur einkenni kuldaaðlögunar; aukna hvötunarvirkni miðað við AP úr bakteríum með herra starfshitastig og skert hitaþol. *Vibrio* fosfatasi er raunar einstaklega

hitaópolinn og virkni hans ekki fullkomlega stöðug fyrir en undir 24°C.

Við höfum notað markvissar stökkbreytingar til að breyta Trp274 (sem er sambærileg Lys328 í *E. coli* og His317 spendýraensímum) í His274. Með þessari breytingu eru allar aminosýrur, sem tengjast eða eru í nánasta umhverfi málmjónanna þriggja í hvarfstöð, orðnar þær sömu og aminosýrur sem finnast í spendýraensímunum (*Vibrio* AP villigerð er His116/Trp274 en stökkbrigðið er His116/His274).

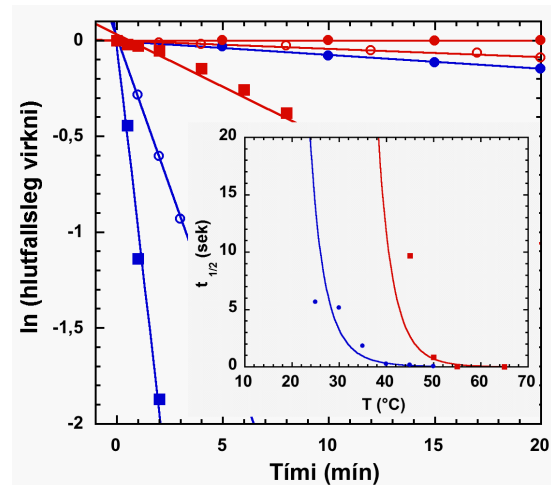
Tilraunir okkar miða að því að svara þeirri spurningu hvort val tiltekinna aminosýra í hvarfstöð ráði úrslitum um aukinn hvötunarmátt og skert hitaþol *Vibrio* fosfatasans.

2. Niðurstöður og umræða

2.1. Áhrif hitastigs á virkni

Áhrif hitastigs á virkni *Vibrio* AP afbrigðanna í nærveru fosfórviðtaka (díetanólamíns) voru könnuð. Hraði virknitaps við nokkur hitastig var mældur. Á mynd 2 má sjá þær niðurstöður. Virkni villigerðar *Vibrio* AP er mjög óstöðug og í raun ekki stöðug fyrir ofan 24°C. Hitastigsstöðugleiki virknisets His stökkbrigðisins er hinsvegar mun meiri og það afbrigði fer ekki að tapa virkni að verulegu leyti fyrir en við hitastig yfir 40°C. Hraðafastar afmyndunar við nokkur hitastig (25, 30, 35, 40, 45, 50 og 55°C) voru notaðir til að ákvarða þann tíma sem tekur ensímin að tapa 50% virkninnar ($t_{1/2}$) við hvert hitastig. Á innfeldu myndinni á mynd 2 eru $t_{1/2}$ gildin teiknuð upp á móti hitastigi. Helmingunartími afvirkjunar ($t_{1/2}$) við 45°C er 2,3 mínútur fyrir villigerðina en 161 mínúta fyrir W274H afbrigðið. Við 25°C er $t_{1/2}$ 94 mínútur fyrir villigerðina en gildið fyrir W274H afbrigðið stefnir í óendanlegt. Breytingin W274H hefur því tvímæla laust aukið hitastigsstöðugleika virknisets ensímsins umtalsvert.

Hitastigsstöðugleiki alkalísks fosfatasá úr *E. coli*, kálfum, og öðrum miðlungshitakærum lífverum er mjög mikill. *E. coli* ensímið er þó sérlega hitaþolið og er helmingunartími virkni þess 8 mínútur við 90°C. AP úr *B. subtilis* hefur helmingunartíma afvirkjunar 28 mínútur við 65°C [1]. Kálfa AP missir helming virkni sinnar á 75 mínútum við 65°C en kuldavirkur AP úr Atlantshafsporski missir sama hlutfall virkni á aðeins 1,2 mínútum við sama hitastig [21]. AP úr Suðurheimskausbakteríunni TAB5 hefur helmingunartíma 15 mínútur við 45°C [22].



Mynd 2. Áhrif hitastigs á virkni *Vibrio* AP afbrigðanna tveggja. Ensímín voru látin liggja við mismunandi hitastig í mislangan tíma og eftirlifandi virkni mæld með 5 mM *p*-nítrofenýlfosfati í 1,0 M díetanólamín stuðpúða, 1,0 mM MgSO₄, pH 9,8 við 25°C. Náttúrulegur lógaríthmi af hlutfallslegri virkni var svo teiknaður upp á móti tíma. Táknin fyrir villigerðina eru blá en fyrir W274H afbrigðið rauð. Á myndinni má sjá hitaafmyndun við 25°C (fylltir hringir), 45°C (fylltir ferningar) og 50°C (ófyllir hringir) fyrir afbrigðin. Á innfeldu myndinni eru svo $t_{1/2}$ gildi fyrir ensímín tvö teiknuð upp á móti hitastigi (fyrir 25, 30, 35, 40, 45, 50 og 55°C). $t_{1/2}$ gildin segja til um þann tíma sem það tekur ensímin að tapa 50% virkninnar við viðkomandi hitastig.

Aðrir hitaóstöðugir alkalískir fosfatasar hafa fundist í *Sphingobacterium antarcticus* [23], *Arthrobacter* tegundum [24] og *Shewanella* tegund [25]. Þessir fosfatasar hafa helmingunartíma afvirkjunar á bilinu 3–30 mínútur við 55–65°C. Við þessi hitastig er afvirkjun villigerðar *Vibrio* AP tafarlaus. W274H afbrigðið tapar helming virkni sinnar á 30 sekúndum við 55°C. Aðeins einn alkalískur fosfatasi, úr suðurheimskausörverunni HK47, hefur verið skilgreindur sem er hitaóstöðugur en *Vibrio* AP. Það ensím hefur $t_{1/2}$ 2 mínútur við 40°C samanborið við 4 mínútur fyrir *Vibrio* AP.

2.2. Málmjónainnihald *Vibrio* fosfatasanna

Málmjónainnihald villigerðar *Vibrio* AP og W274H stökkbrigðisins var kannað með málmteglinum 4-(2-pyridylazo)resorcinol (PAR), eftir fullkomna afmyndun með hita (90°C). Villigerðin reyndist innihalda tvær Zn jónir en W274H afbrigðið þrjár Zn jónir. Breytingin úr tryptófan í histidín í stöðu 274 í hvarfstöð ensíms-

Tafla 1. Hraðafraði umfosfórunar (1,0 M Tris) fyrir *Vibrio* AP afbrigðin við 25°C samanborið við AP úr öðrum lífverum. *p*-nítrofenýlfosfat var notað sem hvarfefni.

	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$) $\times 10^{-6}$	K_i (for P_i) (mM)
Villigerð <i>E. coli</i> AP	52	0,09	0,58	0,06
Villigerð <i>Vibrio</i> AP	2050	0,13	15,8	0,15
<i>Vibrio</i> W274H stökkbrigði	1250	0,19	6,6	2,53
Kálfa AP (úr þörmum) ^{a)}	4070	0,64	6,4	-
Þorska AP ^{a)}	6160	0,51	12,1	-

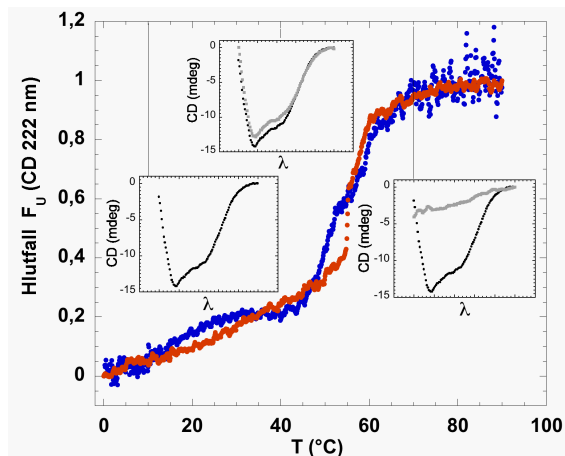
^{a)} Gildi fyrir hraðafraði í 1,0 M díetanólamín við pH 9,8 [19]

ins hefur því breytt málmjónabindiseti M3 úr Mg^{2+} bindiseti yfir í Zn^{2+} bindiset.

Í *E. coli* AP er lýsín í stöðu 328 og aspartík sýra í stöðu 153 (samsvarandi stöður í *Vibrio* AP eru 274 og 116) og þar er einnig Mg^{2+} í málmjónabindiseti M3. Eins og áður hefur komið fram hafa stökkbrigðin D153H, K328H og tvöfalda stökkbrigðið D153H/K328H af *E. coli* AP verið mæld og kristallsbygging þeirra greind [11–13]. Í öllum stökkbrigðunum breyttist málmjónabindiset M3 úr Mg^{2+} bindiseti í Zn^{2+} bindiset. Niðurstöður þær sýndu einnig að tenging Zn^{2+} í M3 er ferflötungslaga (e. tetrahedral) en tenging Mg^{2+} í sama set er átflötungslaga (e. octahedral). Kristallbygging AP úr rækju sýndi einnig tilvist þriggja Zn^{2+} jóna í hvarfstöð og það ensím hefur His í stöðum samsvarandi 274 og 116 í *Vibrio* AP.

2.3. Áhrif hitastigs á stöðugleika annars stigs byggingar

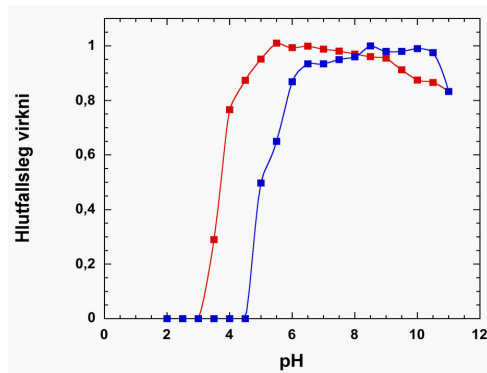
Áhrif hitastigs á stöðugleika annars stigs byggingar *Vibrio* AP afbrigðanna voru mæld með hringskautunargreiningu (e. circular dichroism, CD). Breytingar í hringskautun við 222 nm og hitun frá 0–90°C voru skoðaðar fyrir bæði ensímin og út frá þeim niðurstöðum var hlutfall afmyndaðs próteins reiknað. Þær niðurstöður gefur að líta á mynd 3. Afmyndun annars stigs byggingar er nánast samhliða í báðum afbrigðunum. Við lægri hitastig verður mælanleg breyting í



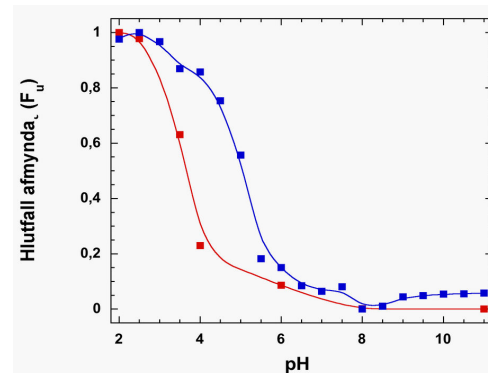
Mynd 3. Áhrif hitastigs á stöðugleika annars stigs byggingar villigerðar (blá tákn) og W274H afbrigðis (rauð tákn) *Vibrio* AP. Ensímin voru hituð frá 0–90°C og fylgst var með breytingum í hringskautun (e. circular dichroism, CD). Á myndinni hafa breytingar í hringskautun við 222 nm (en þeim valda α -helixar breytingar) verið reiknaðar yfir í hlutfall afmyndaðs próteins og það hlutfall svo teiknað upp á móti hitastigi. Hraði hitunar var 1°C/mín og punktar voru teknir á 0,1°C fresti. Einnig voru teknir róf frá 250–200 nm á 10°C fresti. Á innfelldu myndunum má sjá breytingar á rófum villigerðar *Vibrio* AP við hitun upp í viðkomandi hitastig. Svart er upphafsrófið og grátt eru rófin sem fást efir hitun upp í 40°C annarsvegar og 70°C hinsvegar.

hringskautun en eiginleg afmyndun ensímanna verður ekki fyrir en við 55–56°C.

Kuldavirk ensím hafa venjulega lægri bræðslu-hitastig (T_m) heldur en samsvarandi ensím með hærri starfshitastig. Alkalískur fosfatasi úr *E. coli* hefur $T_m=97^\circ\text{C}$ [26] en það ensím er að vísu óvenju stöðugt af ensími úr miðlungshitakærru lífveru að vera. Ekki er að finna gögn um bræðsluhitastig annarra alkalískra fosfatasa. Til samanburðar á muninum á kuldakærum, miðlungshitakærum og hitakærum ensímum má nefna DNA lígasa. DNA lígasi úr suðurheimskautsfornbakteríunni *Pyrolobus fumarii* hefur T_m 32,7°C. Sama ensím úr *E. coli* hefur T_m á bilinu 51,6–54,1°C en fyrir ensímið úr hinni ofurhitakæru bakteríu *Thermus scotoductus* er T_m gildið á bilinu 91,8–101,4°C [27]. Annað dæmi um slíka röð eru adenýlat kínasar úr kuldakærum *Bacillus globisporus*, miðlungshitakærum *Bacillus subtilis* og hitakærum *Bacillus stearothermophilus* með T_m ; 43,3, 47,6 og $>55^\circ\text{C}$ (var ekki mælt hærra fyrir hitakæra ensímið) [28].



Mynd 4. Áhrif sýrustigs á virknistöðugleika villigerðar (blá tákn) og W274H afbrigðis (rauð tákn) *Vibrio* AP. Ensímin lágu við 4°C í 20mM Tris, 20mM glýsín, 1mM MgSO₄ buffer við mismunandi sýrustig í 24 klst. Eftirlifandi virkni var mæld með 5mM *p*-nítrofenýlfosfati í 1,0M díetanólámín, 1,0mM MgSO₄, pH 9,8 buffer við 25°C. Hlutfallsleg virkni var svo teiknað upp á móti sýrustigi.



Mynd 5. Áhrif sýrustigs á annars stigs byggingu villigerðar (blá tákn) og W274H afbrigðis (rauð tákn) *Vibrio* AP. Ensímin voru látin liggja við 4°C í 20mM Tris, 20mM glýsín, 1mM MgSO₄ buffer við mismunandi sýrustig í 24 klst. Hringskautun hvers sýnis við 222 nm var mæld og reiknuð yfir í hlutfall afmyndaðs próteins. Hlutfall afmyndaðs próteins er svo teiknað upp á móti sýrustigi.

2.4. Áhrif hitastigs á flæði málmjóna út úr hvarfstöð

Losun tvígildra málmjóna úr hvarfstöð ensímanna við 37°C var könnuð með málm tenglinum 4-(2-pyridylazo)resorcinol (PAR), en hann myndar litað efnasamband með Zn²⁺, Co²⁺ og nokkrum öðrum tvígildum málmjómum (þó ekki með Mg²⁺). Gert er ráð fyrir að það séu Zn²⁺ jónir sem eru að leka út fremur en Co²⁺ eða aðrar jónir, þar sem Zn²⁺ er algengast í hvarfstöð alkalískra fosfata, og niðurstöður úr málmjónagreiningum með ICP-massagreini á villigerð gáfu ekki vísbendingu um tilvist annara jóna en Zn²⁺ og Mg²⁺.

Niðurstaðan var að hvorugt afbrigðið losar Zn²⁺ jónir við 37°C þó villigerðin tapi virkni nokkuð hratt við það hitastig. Við 60°C flæða jónirnar hinsvegar hratt út, enda afmyndast heildarbygging ensímanna beggja hratt við það hitastig. Þetta teljum við gefa til kynna að það sé ekki flæði Zn²⁺ jóna úr hvarfstöð sem veldur virknitapi hjá villigerð ensímsins. Þetta útilokar hins vegar ekki að það sé Mg²⁺ málmjónin sem flæði út úr hvarfstöðinni og það leiði til virknitapsins. Hlutverk Mg²⁺ hefur vaxið mjög mikið í nýjustu útgáfu af hvarfgangi ensímhvarfsins [8].

2.5. Áhrif sýrustigs á stöðugleika

Á mynd 4 má sjá sýrustigsstöðugleika virkniseta afbrigðanna tveggja. Ensímin voru látin liggja í 24 klst í 20mM glýsín, 20mM Tris stuðpúða við mismunandi sýrustig og eftirlifandi virkni mæld. Villigerð *Vibrio* AP byrjar að afmyndast við sýrustig fyrir neðan 6 og er fullkomlega óvirk við sýrustig fyrir neðan 4,5. W274H afbrigðið fer ekki að afvirkjast fyrr en við sýrustig undir 4,0 og er ekki fullkomlega óvirkt fyrr en við pH 3,0. Alkalískir fosfatar eru almennt viðkvæmir fyrir súru umhverfi. Við pH 4,0 leka Zn jónir út úr hvarfstöð AP úr *E. coli*, líklega vegna títrunar málmjónatengla í ensíminu. Við það tapast virknin [10]. *E. coli* ensímið helst hinsvegar á tvíliðuformi niður að pH 2,0 en fyrir neðan það sýrustig afmyndast einliðurnar. Alkalískir fosfatar úr kálfaþörmum og svínalífur missa einnig sínk jónir við lágt sýrustig og eru óafturkræft afmyndaðir við pH 4,5-5,0 [1]. AP úr Atlantshafsporski byrjaði að tapa virkni við pH undir 7,0 og var fullkomlega óvirk við pH 4,0 [19].

Bæði *Vibrio* afbrigðin eru nokkuð stöðug við basískar aðstæður en þó byrjar W274H afbrigðið að tapa virkni örlítið fyrr. Bæði ensímin hafa enn yfir 80% virkninnar við pH 11,0. *Vibrio* fosfatinn er heldur stöðugri gagnvart basískum aðstæðum heldur en samsvarandi ensím úr kálfi og þorski sem eru fullkomlega óvirk við sýrustig yfir 10 [19].

Á mynd 5 gefur að líta sýrustigsstöðugleika annars stigs byggingar. Ensímin voru látin liggja í 24 klst við mismunandi sýrustig og hringskautun þeirra mæld við 222 nm. Annars stigs bygging beggja ensímanna reyndist stöðug við basískar aðstæður. Villigerð *Vibrio* AP byrjaði að afmyndast við mun mildari aðstæður heldur en W274 afbrigðið og var nánast fullkomlega afmyndað við pH 4,0. W274H afbrigðið var ekki fullkomlega afmyndað fyrr en við pH 2,5. Samkvæmt þessu er ljóst að afmyndun annars stigs byggingar helst í hendur við virknitap í súru umhverfi.

Tryptófan hefur getur ekki myndað jónatengi. Við það að breyta Trp274 í His274 hefur hinsvegar skapast möguleiki á myndun jónatengis við einhverjar af hinum neikvætt hlöðnu amínósýrum í nágrenni amínósýru 274. Sá munur sem fram kemur í sýrustigsstöðugleika villigerðar *Vibrio* AP og W274H afbrigðis er því líklega til kominn vegna myndunar slíks jónatengis í W274H afbrigðinu.

2.6. Hvötunargeta *Vibrio* AP og W274H afbrigðis

Hraðafraði umfosforunar (1,0M Tris) við pH 8,0 og 25°C var mæld með *p*-nitrófenýlfosfat (*p*-NPP) sem hvarfefni fyrir *E. coli* AP, villigerð *Vibrio* AP og W274H stökkbrigðið. Tafla 1 er samantekt á þeim niðurstöðum samanborið við kuldavirkan AP úr Atlantshafsporski og AP úr kálfi.

W274H afbrigði *Vibrio* AP hafði minni hvötunargetu en villigerðin, og kom það fram bæði í hverfitölu ensímsins (k_{cat}) og í jafnstöðufasta fyrir ensím og hvarfefni (K_m). Villigerðin sýndi $k_{cat}=2050$ hvarfneissameindir á sekúndu en W274H afbrigðið vatnsrauf aðeins 1250 tengi á sekúndu. Villigerðin hafði örlítið lægri jafnstöðufasta (fastari bindingu við hvarfefni), $K_m=0,12$ mM, heldur en W274H afbrigðið með $K_m=0,19$ mM. Bæði *Vibrio* AP afbrigðin eru margfalt virkari heldur en ensímið úr *E. coli* sem hefur $k_{cat} 52 \text{ s}^{-1}$. *E. coli* ensímið hefur þó vinninginn varðandi jafnstöðufasta, með $K_m=0,09$ mM. AP úr Atlantshafsporski hefur $k_{cat}=6160 \text{ s}^{-1}$ og $K_m=0,51$ mM. AP úr kálfaþörmum hefur $k_{cat}=4070 \text{ s}^{-1}$ og $K_m=0,64$ mM. Taka ber fram að gildin fyrir AP úr kálfi og þorski eru mæld við pH 9,8. *Vibrio* afbrigðin eru virkari við pH 9,8 heldur en við 8,0. *E. coli* ensímið er hinsvegar virkast við pH 8,0 og á því byggist samanburðurinn þar sem það er bakteeríuensím eins og *Vibrio* fosfatasinn. Sjá má að kuldavirku ensímin tvö, úr þorski og villigerð *Vibrio* AP,

hafa hæstu hvötunargetuna (k_{cat}/K_m); $12,1 \times 10^{-6}$ og $15,8 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ og að W274H afbrigðið og kálfaensímið hafa sambærilega hvötunargetu $6,6 \times 10^{-6}$ og $6,4 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

Eins og áður hefur komið fram hefur málmjón í bindiseti M3 breyst úr Mg^{2+} í villigerð *Vibrio* AP, í Zn^{2+} í W274H afbrigðinu. Í tvöfalda stökkbrigðinu D153H/K328H af *E. coli* AP breyttist málmjónin í M3 einnig úr Mg^{2+} í Zn^{2+} samfara minni hvötunargetu. Sú áttflötungslaga bygging sem til varð við Mg^{2+} bindingu er talin opnari en sú ferflötungslaga sem til verður þegar Zn^{2+} binst. Því var talið að binding Mg^{2+} valdi mögulega meiri sveigjanleika í byggingu sem leiðir til virkara ensíms [13]. Hið sama gæti verið uppi á teningnum í *Vibrio* AP afbrigðunum sem skýrir þá muninn á hvötunargetu þeirra. Minni sveigjanleiki í hvarfstöð við breytinguna W274H gæti einnig skýrt meiri stöðugleika virknisets stökkbreytta afbrigðisins af *Vibrio* AP.

Hindrastuðullinn (K_i) fyrir *Vibrio* AP afbrigðin og samkeppnishindrann ólífrænt fosfat (P_i) var einnig skoðaður í samanburði við AP úr *E. coli*. W274H afbrigðið hafði hærri hindrastuðul fyrir fosfat (sem þýðir lausari binding) með $K_i=2,5$ mM miðað við 0,15 mM fyrir villigerðina. Ensímið úr *E. coli* hefur þó lægsta hindrastuðullinn, með $K_i=0,06$ mM. Kristalsgreining tvöfalda stökkbrigðisins D153H/K328H af *E. coli* AP sýndi að staðsetning fosfatsins í því afbrigði er mun utar heldur en í villigerð *E. coli* AP og það var talið orsaka minni sækni í hindrann (hækkaðan hindrastuðul) [13].

Líklegt er að breytingin W274H í *Vibrio* AP valdi einnig minni tengslum ensímsins við fosfathindrann og valdi staðsetningu hans utar í hvarfstöðinni, sem kemur fram í herra K_i gildi. Í *E. coli* ensíminu tengist lýsín í stöðu 328 fosfatinu í gegnum vatnssameind [29]. Þegar histidín eða tryptófan eru í sömu stöðu, eru þessi tengsl ekki til staðar. Þetta gæti skýrt hærri hindrastuðul og minni hvarfneissækni *Vibrio* afbrigðanna miðað við *E. coli* ensímið.

Þakkir

Rannsóknir okkar hafa verið styrktar af Rannsóknasjóði Háskóla Íslands, Rannsóknasjóði í umsjón Rannsóknamiðstöðvar Íslands (RANNÍS), auk framlags frá Raunvísindastofnun Háskólans.

Summary: Cold-active enzymes have the ability to maintain dynamic motions despite low thermal energy in their environment. It is not fully understood how this is achieved. We have performed site-directed mutations on an alkaline phosphatase from a *Vibrio* marine bacterial species with the aim of bringing its catalytic and stability properties to a similar level as in more heat-tolerant variants. The active site of AP has three metal binding locals; M1, M2, and M3. The metals in these sites are most commonly zinc ions in M1 and M2 involved in catalysis, and a magnesium ion in site M3 involved in catalysis and stability. Comparison of amino acids sequences in all known APs shows a complete conservation in ligands holding metals M1 and M2. Two of the residues ligating the M3 metal are, however, variable. These residues are Asp153 and Lys328 in *E. coli* AP, they are His116 and Trp274 in *Vibrio* AP, and His/His in various mammalian APs. Here we have altered the Trp274 to His274, making a variant that is the same as the mammalian APs regarding the M3 site. This changed the metal ion in M3 from a magnesium ion to a zinc ion. The stability of the active site was increased, whereas the catalytic activity was concomitantly decreased. The overall stability as monitored by CD was unchanged, but pH-stability changed.

Heimildir

- [1] McComb, R. B., Bowers, G. N., Posen, S. *Alkaline Phosphatase*, Plenum Press, New York, 1979.
- [2] Trentham, D. R., Gutfreund, H., *Biochem J.* **106**, (1968) 455.
- [3] Dayan, J., Wilson, I. B., *Biochim Biophys Acta.* **81**, (1964) 620.
- [4] Wilson, I. B., Dayan, J., Cyr, K., *J Biol Chem.* **239**, (1964) 4182.
- [5] Kim, E. E., Wyckoff, H. W., *Clin Chim Acta.* **186**, (1989) 175.
- [6] Le Du, M. H., Stigbrand, T., Taussig, M. J., Menez, A., Stura, E. A., *J Biol Chem.* **276**, (2001) 9158.
- [7] de Backer, M. (2003) in *Faculteit Scheikunde* pp. 140, Universiteit Utrecht, Utrecht.
- [8] Stec, B., Holtz, K. M., Kantrowitz, E. R., *J Mol Biol.* **299**, (2000) 1303.
- [9] Xu, X., Kantrowitz, E. R., *Biochemistry* **32**, (1993) 10683.
- [10] Coleman, J. E., *Ann Rev Biophys Biomol Struct.* **21**, (1992) 441.
- [11] Murphy, J. E., Kantrowitz, E. R., *Molec Microbiol.* **12**, (1994) 351.
- [12] Murphy, J. E., Xu, X., Kantrowitz, E. R., *J Biol Chem.* **268**, (1993) 21497.
- [13] Murphy, J. E., Tibbitts, T. T., Kantrowitz, E. R., *J Mol Biol.* **253**, (1995) 604.
- [14] Hung, H. C., Chang, G. G., *Protein Sci.* **10**, (2001) 34.
- [15] Xu, X., Kantrowitz, E. R., *Biochemistry.* **30**, (1991) 7789.
- [16] Wojciechowski, C. L., Kantrowitz, E. R., *J Biol Chem.* **277**, (2002) 50476.
- [17] Somero, G. N., *Annu Rev Physiol.* **57**, (1995) 43.
- [18] Feller, G., Arpigny, J. L., Narnix, E., and Gerday, C., *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* **118A**, (1997) 495.
- [19] Hauksson, J. B., Andrésson, Ó. S., Ásgeirsson, B., *Enz Microbial Technol.* **27**, (2000) 66.
- [20] Ásgeirsson, B., Andrésson, Ó. S., *Biochim Biophys Acta.* **1549**, (2001) 99.
- [21] Ásgeirsson, B., Hartemink, R., Chlebowski, J. F., *Comp Biochem Physiol.* **110B**, (1995) 315.
- [22] Rina, M., Pozidis, C., Mavromatis, K., Tzanodaskalaki, M., Kokkinidis, M., Bouriotis, V., *Eur J Biochem.* **267**, (2000) 1230.
- [23] Chattopadhyay, M. K., Devi Uma, K., Gopishankar, Y., Shivaji, S., *Polar Biol.* **15**, (1995) 215.
- [24] de Prada, P., Loveland-Curtze, J., Brenchley, J. E., *Appl Env Microbiol.* **62**, (1996) 3732.
- [25] Ishida, Y., Tsuruta, H., Tsuneta, S. T., Uno, T., Watanabe, K., Aizono, Y., *Biosci Biotechnol Biochem.* **62**, (1998) 2246.
- [26] Boulanger, R. R., Jr., Kantrowitz, E. R., *J Biol Chem.* **271**, (2003) 21.
- [27] Georlette, D., Damien, B., Blaise, V., Depiereux, E., Uversky, V. N., Gerday, C., Feller, G., *J Biol Chemistry.* **278**, (2003) 37015.
- [28] Bae, E., Phillips Jr., G. N., *J Biol Chemistry.* **279**, (2004) 28202.
- [29] Janeway, C. M. L., Xu, X., Murphy, J. E., Chaidaroglou, A., Kantrowitz, E. R., *Biochemistry.* **32**, (1993) 1601.

Um höfundana: Katrín Guðjónsdóttir lauk M.S. prófi í lífefnafræði frá Háskóla Íslands í febrúar 2006. Ólafur S. Andrésson er prófessor í sameindalíffræði við Raunvísindadeild Háskóla Íslands (Líffræðiskor). Bjarni Ásgeirsson er prófessor í lífefnafræði við Raunvísindadeild Háskóla Íslands (Efnafræðiskor).

Raunvísindastofnun Háskólans
Dunhaga 3
IS-107 Reykjavík
bjarni@raunvis.hi.is
Móttækin: 26. nóvember 2005