

Áhrif stökkbreytinga í hvarfstöð á hvötunarvirkni og staðbundinn hreyfanleika í stofnkeðju kuldavirks ensíms

Pétur Orri Heiðarsson og Bjarni Ásgeirsson

Raunvísindastofnun Háskólans, Háskóli Íslands

Vefútgáfa: 16. nóvember 2009

Ágrip – Kuldaaðlögun ensíma er almennt talin tengd auknum innri hreyfanleika í byggingu þeirra miðað við ensím sem starfa við hærri hitastig. Þetta stafar m.a. af auknum sveigjanleika í meginstofni fjölpeptíð-keðjunnar. Staðbundinn sveigjanleika í ensímum er hægt að skoða með rafeindaspunaómun (*e. electron paramagnetic resonance*). Í þessu verkefni voru áhrif stökkbreytinga í hvarfstöð kuldavirks fosfatasa á ensímeiginleika og sveigjanleika mæld með þessari nýstárlegu aðferð. Stöðugleiki metinn með mælingum á gleypni hringskautaðs ljóss, þar sem skautunarstefnu er víxlað milli hægri- eða vinstri-snúnings. Helixar, og í minna mæli beta-fletir, gleypa einungis annan þáttinn af ljósinu vegna hendni og má þannig fylgjast með þegar innri byggingin raknar upp. Amínósýran Trp274 er talin mikilvæg fyrir bindingu hvarfefnis. Henni var breytt í lýsín eða histidín. Báðar stökkbreytingarnar ollu minni hvötunargetu og auknum stöðugleika í hvarfstöð ensímsins. Þessar breytingar voru í samræmi við minni sveigjanleika stofnkeðjunnar nálægt hvarfstöðinni, sem mældur var beint í stökkbrigðunum. Niðurstöðurnar styðja því þá hugmynd að tengsl séu á milli hvötunar, stöðugleika og sveigjanleika.

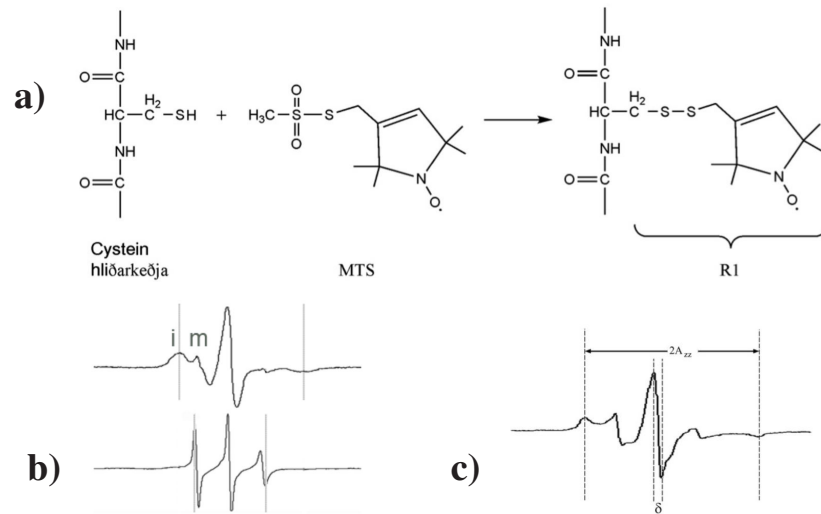
1. Inngangur

Kuldaaðlagðar lífverur hafa þurft að þróa með sér ensím sem geta starfað við aðstæður þar sem varmaorka er af skornum skammti. Þessi ensím hafa sameiginleg einkenni og má þar helst nefna meiri hvötunarvirkni og minni hitastöðugleika samanborið við ensím úr miðlungshitakærum lífverum [1, 2, 3]. Hvötun ensíma felur í sér, að fjöldamörg tengi þurfa að rofna og myndast við að binda hvarfefni og umbreyta þeim. Talið er að kuldaaðlögun ensíma felist að miklu leyti í fækkun ósamgilda tengja innan byggingar þeirra sjálfra. Þessi fækkun tengja þýðir, að þau þurfa minni varma til að hreyfast á þann hátt sem hvötunarferlið krefst. Nú er talið, að eiginleika kuldavirkra ensíma megi almennt rekja til aukins byggingarlegs sveigjanleika miðað við ensím úr miðlungshitakærum lífverum, séu þau borin saman við eitt tiltekið hitastig [4, 5]. Sveigjanleikinn er aftur á móti sambærilegur þegar hvort ensím um sig er við sitt náttúrulega umhverfishitastig. Sveigjanleiki (*e. flexibility*) er hugtak sem er ætlað að lýsa því að

mörg hreyfiform á mismunandi tímaskölum finnast í ensímum, allt frá hröðu flökki tengja (10^{-12} - 10^{-15} sek.) til hægari hreyfinga stórra samliggjandi atómhópa (10^{-1} - 10^{-3} sek.) [6]. Ensímhvötun á sér stað á breiðum tímaskala og er alltaf tengd þessum innri hreyfanleika próteina með einhverjum hætti, sem á þessari stundu er ekki mikið vitað um í smáatriðum.

Innri hreyfanleika í ensímum [7, 8] má skoða með rafeindaspunaómun (*e. electron paramagnetic resonance, EPR*). Þessi tækni mælir hreyfingar á nanósekúndna tímakvarða sem samsvarar sumum af þeim hreyfingum sem eiga sér stað við hvötun ensíma. Áður en mæling getur farið fram, er cystein amínósýru í próteininu breytt með því að hvarfa við hana nítroxíð spunamerkisameind (MTS), sem myndar hliðarkeðju sem kölluð er R1 (mynd 1a). Mögulegt er að nota cystein hliðarkeðju sem er þegar til staðar, en yfirleitt þarf fyrst að innleiða hana í amínósýruröðina með markvissum stökkbreytingum á þann stað þar sem mæla á hreyfanleika.

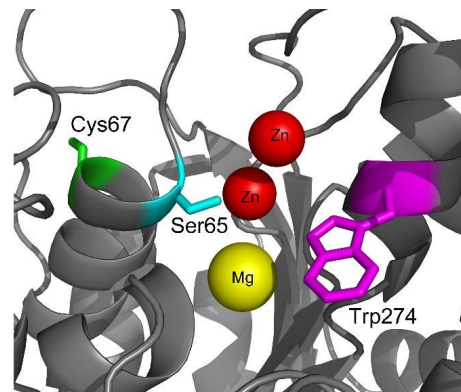
R1 hliðarkeðjan hefur óparaða rafeind, sem er sá eiginleiki sem þarf til að mæla rafeindaspunaómun.



Mynd 1. (a) Hvarf þíól-hóps cysteins við MTS spunamerki. Við hvarfið myndast breytt nítroxíð hliðarkeðja, R1. (b) Rafeindaspunaróf alkalísks fosfatasa úr *Vibrio* sp. kaldsjávarörveru eftir merkingu á Cys67, við kjör- aðstæður (efra róf) og eftir afmyndun með þvagefni (neðra róf). Breidd efra rófsins er sýnd með lóðréttum línnum. Breidd rófs og toppa eykst miðað við neðra rófið, sem gefur til kynna heftan hreyfanleika spunamerkis vegna hluta próteinsins í nágrenni þess. Form rófsins breytist úr þremur skörpum toppum, sem einkenna frjálsan snúning spunamerkis (neðri mynd), í gleiðan miðjutopp og lægri hliðartoppa. Vinstri toppurinn færast utar og klofnar. Hvor hluti gefur upplýsingar um tvö möguleg ástönd spunamerkisins; óhreyfanlegan þátt (i) og hreyfanlegan þátt (m), og er jafnvægi þar á milli eftir aðstæðum. (c) Stuðullinn Ms (*e. scaled mobility factor*) tengist breidd miðlínutoppans í rafeindaspunarófinu δ eins og lýst er í aðferðakafli. Jaðarvidd rófsins er kölluð $2A_{zz}$. Hún er minnst fyrir laust spunamerki (sjá 1b).

R1 hliðarkeðjan er mjög viðkvæm fyrir breytingum í umhverfi sínu og því inniheldur rafeindaspunaróf R1 nákvæmar og staðbundnar upplýsingar um sveigjanleika og byggingu á spunamerktum staðnum [9]. Með því að greina línulögun rafeindaspunarófsins má fá einfaldan mælikvarða á hreyfanleika spunamerkisins. Sýnt hefur verið fram á, að spunamerki sem tengt hefur verið á yfirborðshelix próteins endurspeglar aðallega sveigjanleika í stofnkeðju ensímsins.

Alkalískur fosfatasi (AP) úr kaldsjávarörverunni *Vibrio* sp. er ensím sem hvatar vatnsrof fosfatæstera og sýnir eiginleika kuldaaðlögunar, þ.e. aukna hvötunarvirkni og hita-óstöðugleika. Amínósýruröð alkalískra fosfatasa er vel varðveitt og raðir AP úr þarmagerlinum *Escherichia coli*, spendýrum og sveppum sýna yfirleitt um 25-30% samröðun [10,11]. Í *Vibrio* AP er ein náttúruleg cystein leif (nefnd Cys67) sem staðsett er á afar áhugaverðum stað nálægt hvarfstöðinni, og er hún notuð í þessu verki [15, 16, 17]. Mynd 1b sýnir þann mun í EPR rófi sem fæst við fullkomna afmynd-



Mynd 2. Hvarfstöð *Vibrio* AP. Sýndar eru málmjónirnir þrjár, kjarnsækirinn Ser65, Cys67 og Trp274 (fjólublá). Trp274 var skipt út fyrir bæði lýsín og histidín.

un *Vibrio* AP með þvagefni (urea) og hvernig mismunandi umhverfi spunamerkis R1 áföstu við Cys67 veldur breytingum í formgerð rófsins yst til vinstri.

Í þessu verkefni var mælt hvaða áhrif sæjust í hreyfanleika kringum áður nefnda cysteinleif, spunamerktá með R1, ef tryptófani númer 274 (táknúð með W274) væri skipt út fyrir annað hvort lýsín (táknúð með K) eða histidín (táknúð með H). Þannig fengjust ensímafríðir sem væru í öðru tilfellinu eins og AP úr spendýrum en í hinu tilfellinu eins og *E. coli* AP með tilliti til þessarar staðsetningar. Áhrif stökkbreytinganna á hvötunareiginleika, stöðugleika og sveigjanleika nálægt hvarfstöð voru skoðuð. Markmiðið var að svara spurningunni um hvort stökkbreytingarnar myndu breyta ensímeiginleikum *Vibrio* AP og hvort að hægt væri að tengja breytingarnar við sveigjanleika nálægt hvarfstöðinni.

2. Efniviður og aðferðir

Tjáning og hreinsun ensíma fór fram eins og lýst er í [17]. Ensímín voru tjáð með StrepTag peptíði á C-enda sem leiðir til auðveldrar hreinsunar í einu skrefi með gripgreiningarskilju. Ensímvirkni *Vibrio* AP afbríðanna var mæld við pH 9,8 og 405 nm, þar sem fylgst var með vatnsrofi *p*-nítrofenýl fosfats í *p*-nítrofenól og fosfatjón.

Stöðugleiki hvarfstöðvar var kannaður með því að mæla virknitap í viðurvist afmyndara. Þvagefni er þekktur afmyndari próteina og voru ensímafríðin látin liggja í dúalausnum með mismunandi styrk þvagefnis við pH 9,8 í fjórar klukkustundir til þess að ná jafnvægi. Að því loknu var virkni ensímanna mæld líkt og að ofan, og frjálsorka afmyndunar ($\Delta G_u(H_2O)$) reiknuð fyrir afbríðin út frá niðurstöðunum [18].

Til þess að reikna varmafræðilega stuðla sem tengjast hvötun, var virkni *Vibrio* AP afbríðanna mæld við umfosfórunaraðstæður í díetanóláminlausn við pH 9,8 í viðurvist ofgnóttar af hvarfefni á hitastigsbilinu 5-25°C. Út frá breytileika hvötunarfastans (k_{cat}) með hitastigi var hægt að reikna Arrheniusargrófin á mynd 3. Arrheniusargrófin voru notuð til þess að reikna varmafræðilegu stuðlana ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger og ΔS^\ddagger sem eru sýndir í töflu 2 ásamt hvötunarfastanum (k_{cat}) og virkjunarorku (E_a). Að þessu sinni var mældur umfosfórunarhraði, þ.e. ensímið látið flytja fosfórhópinn af hvarfefni á viðtökusameind í stað vatns, sem í þessu tilfelli var díetanólámin. Þannig fæst mun hraðara hvarf en ella.

Hitastöðugleiki annars stigs byggingar (α -helixar og β -fletir) *Vibrio* AP afbríðanna var metinn með því að mæla breytingu í hringskautunareiginleikum.

Breyting í hringskautun ensímanna var mæld við 222 nm á hitastigssviðinu 20-90°C.

Spunamerking ensíma var framkvæmd eins og lýst er í [17]. Rafeindaspunaróf voru mæld með MiniScope MS-200 tæki frá Magnettech (Þýskaland) við 25°C á 10 μ L ensímausnum í 20 mM Tris, 10 mM MgCl₂, pH 8,0. Stuðullinn M_s (*e. scaled mobility factor*) er reiknaður út frá breidd miðlnutoppis í rafeindaspunarfófinu:

$$M_s = \frac{(\delta_{exp}^{-1} - \delta_i^{-1})}{(\delta_m^{-1} - \delta_i^{-1})} \quad (1)$$

þar sem δ_{exp} er mæld breidd miðlnutoppis (mynd 1c), og δ_m og δ_i eru gildi út frá rófum spunamerkis með óheftan og heftan snúning [19]. Þessi stuðull er talinn endurspegla vel hreyfanleika stofnkeðju á þeim stað sem spunamerkið er tengt [19].

3. Niðurstöður og umræða

3.1. Stökkbreytingar

Á mynd 2 sést hvarfstöð AP með Trp274 (þ.e. óbreytt villigerð) á þeim stað sem var stökkbreytt í lýsín eða histidín. Myndin var gerð út frá kristalsbyggingu ensímisins sem nýverið var leyst [16]. Myndin sýnir einnig staðsetningu einu cystein amínósýrunnar í ensíminu (sem spunamerkið var fest við) og nálægð hennar við kjarnsækna serínhópinn, sem tekur virkan þátt í upphafi efnahvarfsins.

3.2. Hvötunareiginleikar

Hvötunarfastinn k_{cat} er mældur í s⁻¹ og endurspeglar hversu hratt ensímið breytir hvarfefni í myndefni við mettandi aðstæður, en K_M (Michaelis fasti) er mældur í mólstyrk hvarfefnis (t.d. mM) og endurspeglar sækni ensímis í hvarfefni. Hlutfallið k_{cat}/K_M , oft nefnt hvötunargeta, tengir hraða efnahvarfs við styrk hvarfefnis og tekur til greina báða þættina. Þannig fæst heildarmælikvarði á hvötunargetu ensímisins við eðlilegar aðstæður, þar sem hvarfnefnistyrkur er ekki nægilega háur til að mettun náist.

Niðurstöður virknimælinga fyrir villigerðar-ensímið og afbríðin má sjá í töflu 1. Villigerðar-ensímið sýndi hæstan hvötunarfasta með $k_{cat} = 775$ s⁻¹. Báðar stökkbreytingarnar leiddu til lækkunar hvötunarfastans, án þess að breyta mikið sækni í hvarfefni, þar sem öll K_M gildi voru innan skekkjumar. W274K afbríðið sýndi mesta lækkun í

Tafla 1. Hvötunareiginleikar og stöðugleiki *Vibrio* AP afbrigðanna. Hraðafastar voru mældir við 25°C við vatnsrofsaðstæður með hvarfefninu *p*-nítrofenýlfosfati. Hitastöðugleiki (miðgildi afmyndunar, T_m) var mældur með hringskautun við 222 nm á hitastigsbilinu 20-90°C. Gildi fyrir AP úr *E. coli* eru til samanburðar [15].

Ensím	k_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)	k_{cat}/K_M ($s^{-1}M^{-1}$)* 10^{-6}	T_m °C	$\Delta G_u(H_2O)$ (kcal/mól)
Villigerð	775 ± 42	0,043 ± 0,008	18,0	50,5 ± 0,1	5,6
W274K	242 ± 45	0,041 ± 0,009	5,9	52,5 ± 0,1	9,1
W274H	368 ± 30	0,049 ± 0,004	7,5	49,7 ± 0,1	6,7
<i>E. coli</i> AP	38 ± 3	0,021 ± 0,002	1,9	98,5	–

hvötunarfasta, eða 242 s^{-1} miðað við 368 s^{-1} fyrir W274H afbrigðið. Við sambærilegar vatnsrofsaðstæður og sama hitastig (25°C) hefur AP úr *E. coli* $k_{cat} = 38 s^{-1}$ og $K_M = 0,02$ mM. Bæði villigerð *Vibrio* AP og stökkbrigðin hafa því mun hærra k_{cat} heldur en *E. coli* AP, sem er viðbúið þar sem síðarnefnda lífveran lifir við u.þ.b. 37°C í þörmum spendýra. Gjarnan dregur verulega úr hreyfanleika ensíma við kælingu sem birtist í minni starfsgetu. En annað kemur einnig til. Rannsóknir á hvötunareiginleikum *E. coli* AP hafa sýnt að hraðatakmarkandi skrefið í hvarfferlinu er losun ólífræns fosfats í lok hvarfsins, sem er annað tveggja myndefna. Það endurspeglast í hvötunarfastanum (k_{cat}) [20]. Í *E. coli* AP víxlverkar Lys274 (sem er tölusetning Lys328 í *E. coli* AP) við fosfat hóp hvarfnefnisins í gegnum vatnssameind. Búist var við að stökkbreytingin W274K myndi breyta eiginleikum *Vibrio* AP í átt að eiginleikum *E. coli* AP, og vissulega lækkaði hvötunarfastinn. Sæknin í hvarfnefnið (K_M) breyttist hins vegar ekki, sem styður þá niðurstöðu að jákvæð hleðsla amínósýru númer 274 tefji hvötunarferlið. Hún hlýtur þá að hafa aðra kosti, eins og vikið er að síðar. Í öðrum kuldavirkum alkalískum fosfatasa, úr kaldsjávarörveru frá Suðurheimskautinu, var breytingin W274K einnig innleidd í amínósýruröðina [21]. Niðurstöðurnar voru í samræmi við okkar, þ.e. breytingin olli 50% minni hvarfhraða (60% í *Vibrio* AP). Breytingin W274H hafði mjög svipuð áhrif og W274K á hvötunareiginleika. Í báðum tilfellum gæti jákvæð hluthleðsla á amínósýrunum tafið brotthvarf myndefnis sem er mínushlaðið.

3.3. Heildarstöðugleiki

Reiknað var hlutfall afmyndaðs ensíms við hvert hitastig og þannig fengið mat á bræðslumark (T_m). Bræðslumörk ensímanna má sjá í töflu 1. W274K breytingin jók hitastigsstöðugleika en W274H spillti hitastigsstöðugleika *Vibrio* AP.

3.4. Stöðugleiki hvarfstöðvar

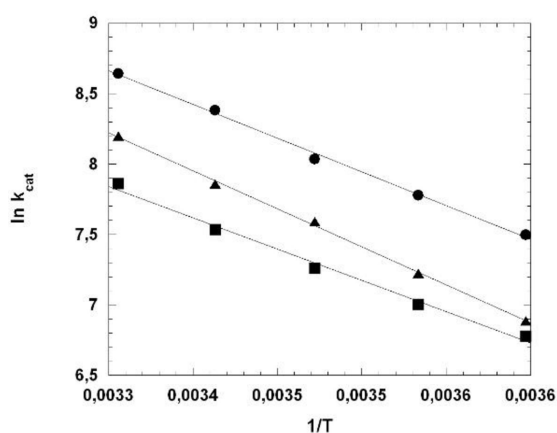
Mikill munur var á stöðugleika hvarfstöðvar í afbrigðunum eins og sjá má í töflu 1. Virkniþap hjá villigerðinni átti sér stað við lágan styrk þvagefnis (<1 M) en W274H afbrigðið hélt virkni að 2-3 M styrk og W274K afbrigðið að 3-4 M styrk. Þessi aukni stöðugleiki gæti verið tilkominn vegna langdrægra hleðsluhrifa. Lýsín hefur jákvæða hleðslu sem getur einnig víxlverkað við nærliggjandi hleðslur. Histidín er hins vegar óhlaðið við það sýrustigi sem notað var hér. Ef umhverfið inni í hvarfstöðinni skapar hins vegar neikvætt rafsvið nálægt histidíni, eða vetnistengjakerfi fyrirfinnst í hvarfstöðinni sem getur stutt við prótóneringu, þá gæti histidín einnig borið jákvæða hleðslu.

3.5. Varmafræði hvötunar

Hvötun kuldaaðlagðra ensíma byggist á hæfileika þeirra til þess að lækka virkjunarfjárorku (ΔG^\ddagger) í því efnahvarfi sem við á. Stuðullinn ΔG^\ddagger er svo samansettur af tveimur öðrum stuðlum, virkjunarvarma (ΔH^\ddagger) og virkjunaróreiðu (ΔS^\ddagger). Sýnt hefur verið fram á að meginleið ensíma til kuldaaðlögunar felst í að lækka ΔH^\ddagger miðað við sambærileg ensím úr miðlungshitakærum lífverum [22]. Þeirri lækun fylgir hins vegar alltaf hækkun í ΔS^\ddagger . Þetta kallast varma-óreiðu uppbotaráhrif [1]. Ef ekki

Tafla 2. Varmafræðilegir stuðlar fyrir *Vibrio* afbrigðin. Gildin voru reiknuð við 10°C. Virkjunarorka (E_a) var ákvörðuð út frá Arrheniusargröfunum á mynd 3. Varmafræðilegir stuðlar voru reiknaðir samkvæmt aðferð Lonhienne et al. [22]. Mismunargildin sýna mælingar fyrir villigerð (v) mínus stökkbrigðimælingar (s).

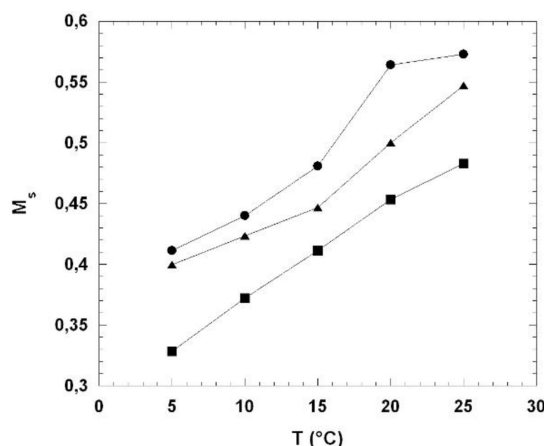
Afbrigði	k_{cat} (s^{-1})	E_a (kJ/mól)	ΔG^\ddagger (kJ/mól)	ΔH^\ddagger (kJ/mól)	$T\Delta S^\ddagger$ (kJ/mól)	$\Delta(\Delta G^\ddagger)_{v-s}$ (kJ/mól)	$\Delta(\Delta H^\ddagger)_{v-s}$ (kJ/mól)	$T\Delta(\Delta S^\ddagger)_{v-s}$ (kJ/mól)
Villigerð	2389	39,8	50,9	37,4	-13,5	Viðmið	Viðmið	Viðmið
W274K	1102	37,0	52,7	34,6	-18,1	-1,8	2,8	-4,5
W274H	1372	44,9	52,2	42,6	-9,6	-1,3	-5,1	3,9



Mynd 3. Arrheniusargröf fyrir *Vibrio* afbrigðin. Breytileiki k_{cat} með hitastigi fyrir *Vibrio* afbrigðin var mældur með *p*-nítrofenýlfosfati á hitastigsbilinu 5-25°C. Villigerð (●), W274H (▲) og W274K (■). Óvissa gilda er undir 8%.

væri fyrir þessi áhrif, myndi lækkun í ΔH^\ddagger um aðeins 20 kJmól⁻¹ leiða til þess að hraði efnahvarfsins myndi aukast um fjórar stærðargráður (gefið að ΔS^\ddagger sé óbreytt), sem er gjörsamlega óraunhæft. Einn besti mælikvarði á kuldaaðlögun ensíms er ΔH^\ddagger , því kuldavirk ensím leitast alltaf við að framkvæma hvörfin með sem lægstum ΔH^\ddagger kostnaði.

Í töflu 2 sést að W274K og W274H höfðu sambærileg áhrif á ΔG^\ddagger gildi til hækkunar, sem lækkaði k_{cat} umtalsvert svo sem áður var nefnt. Hins vegar kom í ljós, að stökkbrigðin höfðu breytt ΔG^\ddagger eftir mismunandi leiðum. W274H afbrigðið hafði hærra ΔH^\ddagger en villigerðin, en lægra ΔS^\ddagger . W274K stökkbrigðið hafði aftur á móti lækkað ΔH^\ddagger miðað við villigerð á kostnað byggingarlegs stöðugleika, sem sést á auknu óreiðugildi (ΔS^\ddagger). Því má segja að þetta afbrigði hafi þau einkenni sem búast má við að gefi aukna kulda-



Mynd 4. Áhrif hitastigs á M_s hreyfanleikastuðulinn fyrir 67R1 í *Vibrio* afbrigðunum. EPR róf spunamerkra afbrigða voru mæld við 5-25 °C. Villigerð (●), W274H (▲) og W274K (■).

eiginleika, þótt hvötunarfastinn sé lægri en í villigerðinni. (Aðrir þættir skipta einnig máli, þó að þeir séu ekki ljósir nú).

3.6. Spunamerking og hreyfanleiki 67R1

Til þess að athuga hvort tengsl væru á milli breytinga í virkni og hreyfanleika nálægt hvarfstöðinni, spunamerktum við Cys67 (sjá mynd 2) með MTS spunamerkisameindinni og mynduðum þannig hliðarkeðjuna 67R1. Hliðarkeðjan er staðsett á sama helix og virka amínósýran í *Vibrio* AP, Ser65 (mynd 2). Hún er því á ákjósanlegum stað til þess að nema hugsanlegar breytingar í hreyfanleika sem verða af völdum stökkbreytinganna. Líkanið sýnir að staðsetning hennar er á yfirborðshelix og því ættu breytingar í hreyfanleika spunamerkisins að endurspeglar breytingar í sveigjanleika stofnkeðju. Eftir spunamerkingu,

hélt ensímið eftir 95% af ensímivirkni og áhrifin á stöðugleika annars stigs byggingar voru hverfandi [17]. Rafeindaspunaróf *Vibrio* AP afbrigðanna voru mæld og notuð til þess að meta hreyfanleika spunamerkisins. Gróflega má segja að meiri breidd í rafeindaspunarófum endurspeglir minni hreyfanleika spunamerkisins (mynd 1b). Sýnt hefur verið fram á að einfaldur mælikvarði á hreyfanleika R1 hópans, sem kallast M_s stuðullinn (*e. scaled mobility factor*), endurspeglir vel staðbundinn sveigjanleika stofnkeðjunnar í aðgengilegum yfirborðshelixum [19]. M_s stuðullinn er reiknaður út frá miðlínubreidd rafeindaspunarófsins og tekur hann gildi á bilinu 0-1, þar sem núll táknar mjög heftan hreyfanleika og einn táknar mikinn hreyfanleika. Kristalsbygging *Vibrio* AP sýnir að Cys67 er á aðgengilegum helix og því má gera ráð fyrir að M_s stuðullinn fyrir 67R1 sýni vel breytingar í sveigjanleika stofnkeðju. Mynd 4 sýnir breytileika M_s stuðulsins með hitastigi frá 5-25°C fyrir *Vibrio* afbrigðin.

Mjög ólíklegt er að hliðarkeðjan í stöðu 274 geti heft hreyfanleika spunamerkisins 67R1 með beinni víxlverkun, t.d. í formi vetnistengja, bæði vegna fjarlægðar og vegna rúmlægrar afstöðu R1 og hliðarkeðjunnar. Sá hefti hreyfanleiki sem kemur fram í lægri M_s stuðli (og lengri snúningstíma) fyrir bæði stökkbreyttu afbrigðin er því líklega tilkominn vegna hefts hreyfanleika stofnkeðjunnar. Þó ekki sé hægt að útiloka einhvers konar langdræg hrif, t.d. vegna skautunar eða hleðsluvíxlverkana, er líklegast að stökkbreytingarnar valdi breyttri uppröðun á tenglaneti málmjónanna, sem hafi áhrif á hreyfanleika 67R1 á einhvern hátt og þar með helixsins sem ber kjarnsækna hópinn, Ser65.

Niðurstöðurnar sýndu, að markvissar stökkbreytingar geta valdið breytingum á eiginleikum AP ensímsins með ákveðnu mynstri. Bæði W274K og W274H stökkbrigðin sýndu mikla lækkun á hvötunarfastanum miðað við villigerðina og jafnframt mátti sjá aukinn stöðugleika í hvarfstöð í báðum tilfellum. Þær niðurstöður eru í samræmi við mat á minnkuðum sveigjanleika nálægt hvarfstöð, sem við framkvæmdum hér í fyrsta skipti við H.Í. með beinum mælingum á rafeindaspunaómun. Mælingar okkar voru mjög staðbundnar og gefa því góða vísbendingu um nán tengsl milli sveigjanleika, virkni og stöðugleika. Ætlunin er að nota þessa tækni til þess varpa betra ljósi á tengsl sveigjanleika og kuldaaðlögunar ensíma

í náinni framtíð. Segja má, að niðurstöður okkar hafi styrkt stoðir kenningarinnar um aukinn sveigjanleika kuldavirkra ensíma.

Þakkir

Höfundar þakka Rannsóknasjóði Háskóla Íslands og Rannsóknasjóði í umsjá Rannsóknamiðstöðvar Íslands fyrir fjárhagslegan stuðning við verkefnið. Prófessor Snorra Þór Sigurðssyni er þakkaður aðgangur að mælitæki fyrir rafeindaspunaómun (*e. electron paramagnetic resonance*).

Heimildir

- [1] Siddiqui, K.S., Cavicchioli, R. Cold-adapted enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, (2006) 403.
- [2] D'Amico, S., Claverie, P., Collins, T., Georgette, D., Gratia, E., Hoyoux, A., Meuwis, M.A., Feller, G., Gerday, C. Molecular basis of cold adaptation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **357**, (2002) 917.
- [3] Hochachka, P.W., Somero, G.N. The adaptation of enzymes to temperature. *Comp. Biochem. Physiol.* **27**, (1968) 659.
- [4] Marx, J.C., Collins, T., D'Amico, S., Feller, G., Gerday, C. Cold-adapted enzymes from marine Antarctic microorganisms *Mar. Biotechnol. (NY)*. **9**, (2007) 293.
- [5] Brandsdal, B.O., Heimstad, E.S., Sylte, I., Smalås, A.O. Comparative molecular dynamics of mesophilic and psychrophilic protein homologues studied by 1.2 ns simulations. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **17**, (1999) 493.
- [6] Agarwal P.K. Enzymes: An integrated view of structure, dynamics and function. *Microb. Cell Fact.* **5**, (2006) 2.
- [7] Hubbell, W.L., Mchaourab, H.S., Altenbach, C., Lietzow, M.A. Watching proteins move using site-directed spin labeling. *Structure* **4**, (1996) 779.
- [8] Fanucci, G.E., Cafiso, D.S. Recent advances and applications of site-directed spin labeling. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**, (2006) 644.
- [9] McHaourab, H.S., Lietzow, M.A., Hideg, K., Hubbell, W.L. Motion of spin-labeled side chains in T4 lysozyme. Correlation with protein structure and dynamics. *Biochemistry* **35**, (1996) 7692.
- [10] Weiss, M.J., Henthorn, P.S., Lafferty, M.A., Slaughter, C., Raducha, M., Harris, H. Isolation and characterization of a cDNA encoding a human liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, (1986) 7182.
- [11] Kam, W., Clauser, E., Kim, Y.S., Kan, Y.W., Rutter, W.J. Cloning, sequencing, and chromosomal localization of human term placental alkaline phosphatase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, (1985) 8715.

- [12] Coleman J.E. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**, (1992) 441.
- [13] Murphy, J.E., Tibbitts, T.T., Kantrowitz, E.R. Mutations at positions 153 and 328 in *Escherichia coli* alkaline phosphatase provide insight towards the structure and function of mammalian and yeast alkaline phosphatases. *J. Mol. Biol.* **253**, (1995) 604.
- [14] Sun, L., Martin, D.C., Kantrowitz, E.R. Rate-determining step of *Escherichia coli* alkaline phosphatase altered by the removal of a positive charge at the active center. *Biochemistry* **38**, (1999) 2842.
- [15] Guðjónsdóttir, K., Ásgeirsson, B. Effects of replacing active site residues in a cold-active alkaline phosphatase with those found in its mesophilic counterpart from *Escherichia coli*. *FEBS J.* **275**, (2008) 117.
- [16] Helland, R., Larsen, R.L., Ásgeirsson, B. The 1.4 Å crystal structure of the large and cold-active *Vibrio* sp. alkaline phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* **1794**, (2009) 297.
- [17] Heiðarsson, P.O., Sigurðsson, S. Th. & Ásgeirsson, B. Structural features and dynamics of a cold-adapted alkaline phosphatase studied by EPR spectroscopy. *FEBS J.* **276**, (2009) 2725.
- [18] Pace, C.N. Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol.* **131**, (1986) 266.
- [19] Columbus, L., Hubbell, W.L. Mapping backbone dynamics in solution with site-directed spin labeling: GCN4-58 bZip free and bound to DNA. *Biochemistry* **43**, (2004) 7273.
- [20] Holtz, K.M., Kantrowitz, E.R. The mechanism of the alkaline phosphatase reaction: insights from NMR, crystallography and site-specific mutagenesis. *FEBS Lett.* **462**, (1999) 7.
- [21] Tsigos, I., Mavromatis, K., Tzanodaskalaki, M., Pozidis, C., Kokkinidis, M., Bouriotis, V. Engineering the properties of a cold active enzyme through rational redesign of the active site. *Eur. J. Biochem.* **268**, (2001) 5074.
- [22] Lonhienne, T., Gerday, C., Feller, G. Psychrophilic enzymes: revisiting the thermodynamic parameters of activation may explain local flexibility. *Biochim. Biophys. Acta* **1543**, (2000) 1.

Summary: The adaptation of enzymes to low temperature is believed to be coupled to structural dynamics when compared to enzymes from mesophilic organisms. This is in part due to increased flexibility along the polypeptide backbone. Electron paramagnetic resonance (EPR) spec-

troscopy can be used in conjunction with site-directed spin-labelling to report on local dynamics in proteins. The effects of mutation in the active site of a cold-adapted alkaline phosphatase were measured using this novel method. The residue Trp274, which has been shown to be important for substrate binding, was substituted with a lysine or histidine. Both mutations caused decreased catalytic efficiency and increased stability in the enzyme's active site. These changes correlated with decreased backbone flexibility close to the active site in both variants. The results support the notion that catalysis, stability, and backbone flexibility are interconnected

Raunvísindastofnun Háskólans
Dunhaga 3, 107 Reykjavík

bjarni@raunvis.hi.is

Móttekið: 30. september 2009

Um höfundana: Pétur Orri Heiðarsson lauk M.S. prófi í lífefnafræði frá Háskóla Íslands í febrúar 2008 og stundar nú doktorsnám í lífefnafræði við Kaupmannahafnarháskóla. Bjarni Ásgeirsson er prófessor í lífefnafræði við Raunvísindadeild Háskóla Íslands, Verkfræði- og náttúruvísindasvið.