

Áhrif markvissra stökkbreytinga á hitastigaðlögun VPR; subtilísín-líks serín próteinasa úr kuldakærri *Vibrio*-tegund.

Sigurðardóttir, A. G.^{1,*}, Arnórsdóttir, J.^{1,3}, Helgadóttir, S.^{1,2}, Þorbjarnardóttir, S. H.², Eggertsson, G.² og Kristjánsson, M. M.¹

¹Raunvísindastofnun Háskólans, ²Líffræðistofnun Háskólans, ³Department of Molecular Structural Biology, University of Goettingen.

*annai@hi.is

Kuldaaðlöguð ensím hafa mjög líka myndbyggingu og samstofna ensím úr miðlungshitakærum og hitakærum lífverum. Þau einkennast þó af hærri hvötunargetu (k_{cat}/K_m) við lægri hitastig og minni hitastöðugleika, en bæði þessi einkenni hafa verið tengd auknum byggingarlegum sveigjanleika. Sýnt hefur verið að subtilísín-líkur serín próteinasi úr kuldakærri *Vibrio*-tegund (VPR) sýnir slík einkenni kuldaaðlögunar í samanburði við samstofna ensím úr miðlungshitakærum og hitakærum örverum (Kristjánsson et al., 1999). Gen VPR var klónað, raðgreint og tjáð í *E. coli* (Arnórsdóttir et al., 2002). Nýlega hefur röntgenkristalbygging VPR verið ákvörðuð að 1,84 Å upplausn (Arnórsdóttir et al., 2005). Samanburður á byggingu ensímsins og skyldra ensíma úr lífverum sem aðlagast hafa hærri hitastigum hefur leitt til tilgátna um byggingarþætti sem skýrt gætu mismunandi hitastigaðlögun þeirra. Þessar tilgátur hafa verið prófaðar með því að framkvæma markvissar stökkbreytingar á geni VPR próteinans og rannsóknum á bæði stöðugleika og ensímfræðilegum eiginleikum stökkbrigðanna. Stökkbreytingarnar eru framkvæmdar með það í huga að innleiða stöðgandi víxlverkanir inn í byggingu kuldaaðlagða ensímsins sem taldar eru vera til staðar í skyldari hitastöðugri ensímunum. Þessar breytingar fela m.a. í sér innlimum prólína í lykkjur, nýjar hugsanlegar saltbrýr, sem og breytingar sem ætlað er að stuðla að betri þökkun í vatnsfælin kjarna próteinsins (Ala → Val) og minnkun óskautaðs yfirborðs. Auk þess höfum við framkvæmt Ser → Ala stökkbreytingar á þeimur mismunandi stöðum í kuldaaðlagða ensíminu, en mest áberandi aminósýrubreytingar milli VPR og hitastöðugri samanburðarensíma reyndust vera Ser→Ala breytingar. Hér lýsum við áhrifum valinna stökkbreytinga á stöðugleika og hvötunareiginleika VPR.

Tilvitnanir:

Kristjánsson, M. M., Magnusson, Ó. Th., Magnússon, H. M., Alfreðsson, G. Á. & Matsuzawa, H. (1999) Properties of a subtilisin-like proteinase from a psychrotrophic *Vibrio*-species. Comparison to proteinase K and aqualysin I. *Eur. J. Biochem.* **260**, 752-760.

Arnórsdóttir, J., Smáradóttir, R. B., Magnússon, Ó. Th., Thorbjarnardóttir, S. H., Eggertsson, G. & Kristjánsson, M. M. (2002) Characterization of a cloned subtilisin-like serine proteinase from a psychrotrophic *Vibrio*-species. *Eur. J. Biochem.* **269**, 5536-5546.

Arnórsdóttir, J., Kristjánsson, M. M. & Ficner, R. (2005) Crystal structure of a subtilisin-like serine proteinase from a psychrotrophic *Vibrio* species reveals structural aspects of cold adaptation. *FEBS Journal.* **272**, 832-845.