

# Kuldaaðlögun próteina - Nokkrar staðreyndir og vangaveltur

Magnús Már Kristjánsson

Raunvísindastofnun Háskólans

Vefútgáfa: 19. október 2006

**Ágrip** – Þekking á eiginleikum og byggingarþáttum sem gera ensímum kuldakærra lífvera mögulegt að starfa við lágt hitastig hefur aukist umtalsvert hin síðari ár. Kuldaaðlöguð ensím búa yfirleitt yfir meiri hvötunargetu en samsvarandi ensím lífvera sem aðlöguð eru hærra hitastigi, en eru jafnframt næmari gagnvart hita-afmyndun. Talið er að sveigjanleiki í byggingu þeirra gegni lykilhlutverki í aukinni virkni þeirra og skýri einnig minni stöðugleika. Þó skortir enn töluvert á skilning á eðli sveigjanleika kuldavirkra ensíma og tengslum við byggingarform. Nokkur ný þrívíddarform kuldaaðlagðra próteina hafa verið kortlögð undanfarin ár. Samanburður á þessum formum við samsvarandi ensím úr lífverum sem aðlöguð eru hærra hitastigi hefur veitt innsýn í þá byggingarþætti sem stuðlað gætu að kuldaaðlögun. Í þessari grein verður greint frá helstu niðurstöðum nýlegra rannsókna á þessu sviði.

## 1. Inngangur

Jaðarlífverur (e. extremophiles) eru örverur sem hafa aðlagast umhverfisaðstæðum í hitastigi, þrýstingi, sýrustigi og seltu, sem eru öfgakenndar miðað við þær aðstæður sem blóðheit dýr og maðurinn þrífast við. Örverur hafa fundist og dafna við hitastig allt að 113 °C [1] og lifandi bakteríur hafa fundist í sýnum sem safnað var við -20 °C [2]. Þessar lífverur hafa þurft að aðlaga alla lífsstarfssemi sína að slíkum “ólífvænlegum” umhverfisaðstæðum, þar með talið líffræðilega virkni ensíma og annarra próteina. Þrýstingur þróunar til aðlögunar byggingareiginleika próteina að jaðaraðstæðum í hitastigi er mismunandi. Aðlögun að háu hitastigi felur í sér að styrkja þarf virka byggingu próteinanna svo þau standist álag hás hitastigs sem annars gæti leitt til rofs tengja sem viðhalda virkri byggingu þeirra. Við lágt hitastig kann hins vegar lág varmaorka í umhverfinu að valda því að prótein sem stýra margvíslegum ferlum í lífverum nái ekki að sinna lífsnauðsynlegu hlutverki sínum með nægum hraða.

Prótein eru fjarri því að hafa fasta eða stífa sameindabyggingu, eins og glæsilegar myndir af líkön-um af þrívíddarbyggingu þeirra gætu gefið tilefni til að ætla. Þvert á móti er talið að hreyfanleiki eða sveigjanleiki gegni lykilhlutverki í líffræðilegri virkni

próteina hvort sem um er að ræða hvötun efnahvarfa, genastjórnun, bindingu eða flutning sameinda og boðefna innan fruma eða yfir himnur. Tilgátur hafa verið settar fram um lykilhlutverk sameindasveigjanleika í hitastigsaðlögun próteina. Þessar tilgátur fela í sér að þrýstingur þróunar miði að því að tryggja samsvarandi sveigjanleika í byggingu próteinanna svo þau hafi nægjanlega líffræðilega virkni við mismunandi hitastig sem lífverur hafa aðlagast [3–5]. Prótein hitakærra lífvera hafa því þróast að miklum stöðugleika, en jafnframt stífri myndbyggingu sem nær ekki “nauðsynlegum” sveigjanleika fyrr en við hátt hitastig [5, 6]. Kuldaaðlöguð prótein hafi hins vegar próteinbyggingu sem nær viðlíka sveigjanleika við mun lægra hitastig en samsvarandi ensím úr lífverum sem eru aðlöguð hærra hitastigi. Þessar tilgátur gera því ráð fyrir að prótein séu í “samsvarandi ástandi” (e. “corresponding states”) m.t.t. sveigjanleika í nálægð kjörhitastigs fyrir virkni viðkomandi próteina [3–5].

Sérstakir eiginleikar próteina úr jaðarlífverum hafa vakið áhuga bæði hvað hagnýtingu og grunnvísindi varðar. Samband milli byggingar próteina og líffræðilegrar virkni þeirra og stöðugleika er eitt af meginviðfangsefnum prótein rannsókna. Vel skilgreind samstofna ensím úr mismunandi hitastigsaðlöguðum líf-

verum eru ákjósanleg líkön til slíkra rannsókna. Mikil hvötunargeta og hitastöðugleiki eru einnig afar æskilegir eiginleikar fyrir iðnaðarensím, og af þeim ástæðum hafa ensím jaðarlífvera notið mikillar athygli undanfarna áratugi [6–10]. Framan af beindist athyglin að ensímum úr hitakærum eða ofurhitakærum örverum vegna mikils stöðugleika sem þau ráða yfirleitt yfir, en hin síðari ár hafa rannsóknir á ensímum kuldakærra lífvera einnig aukist mikið. Þrívíddarbygging margra hitakærra próteina hefur verið kortlögð [5, 9] og undanfarið hefur þrívíddarbygging kuldakærra ensíma einnig komið fram og verið borin saman við samstofna ensím úr lífverum sem aðlöguð eru hærra hitastigi í þeim tilgangi að leita svara við spurningum um byggingarþætti sem ákvarða hitastigsaðlögun þeirra [11–19].

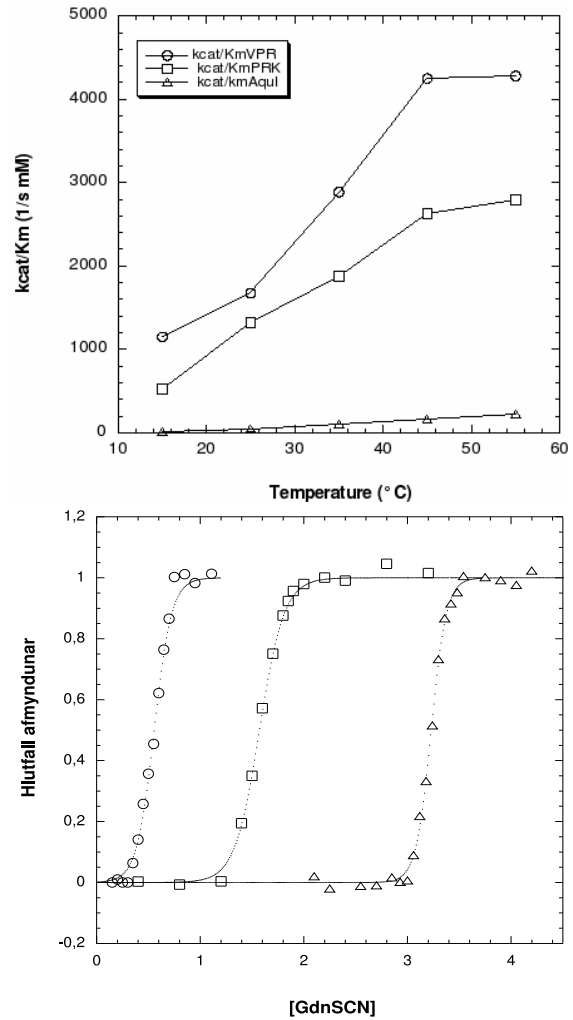
Í þessari stuttu yfirlitsgrein verða helstu niðurstöður þessara rannsókna á byggingu kuldaaðlagðra próteina dregnar saman, jafnframt því sem velt verður vöngum yfir mikilvægi nokkurra þessara byggingarþátta í kuldaaðlögun próteina. Ítarlegri umfjöllun um kuldaaðlögun próteina má finna í yfirlitsgreinum sem birtar hafa verið á undanförunum árum [20–24].

## 2. Samband byggingar og hvötunareiginleika

Aðlögun próteina að mismunandi hitastigi hlýtur að fela í sér málamiðlun milli þátta sem stuðla að nægilegum hreyfanleika fyrir virkni annars vegar, en stöðugleika myndbyggingar hins vegar. Hitakær ensím eru undir þrýstingi þróunar að hámarka stöðugleika myndbyggingarinnar, og í raun að halda aftur af sveigjanleika fyrr en við það háa hitastig sem þau hvata efna-hvörf við. Við aðlögun ensím virkni að kulda þarf hins vegar að tryggja nægjanlegan sveigjanleika til hvötunar við aðstæður þar sem varmaflæði er takmarkandi úr umhverfinu.

Niðurstöður rannsókna á samstofna ensímum úr kuldakærum og hitakærum lífverum hafa verið í samræmi við þessa tilgátu sem felur í sér öfugt samband hvötunargetu ( $k_{cat}/K_m$ ) og stöðugleika (mynd 1). Hins vegar hefur reynst erfiðara að sýna fram á meint hlutverk “sveigjanleika” í þessu orsakasambandi með rannsóknaniðurstöðum, enda ekki alltaf einhlítt hvað átt er við með hugtakinu.

*Sveigjanleiki* tekur til allra hreyfinga í sameindum sem eru mjög mismunandi t.d hvað varðar tímakvarða, sem getur verið í picosekúndum (psek) og tekur til orkuminna “varmaflökts” (e. “thermal fluctuations”),



**Mynd 1. Efri hluti** Áhrif hitastigs á hvötunargetu ( $k_{cat}/K_m$ ) samstofna subtilísín-likra próteinasna úr kuldakærra *Vibrio*-tegund (VPR) (o), próteinasna K (PRK) úr sveppnum *Tritirachium album* (miðlungshitakær) (□) og aqualýsins I (AQUI) úr hitakæru bakteríunni *Thermus aquaticus* (Δ) [25].

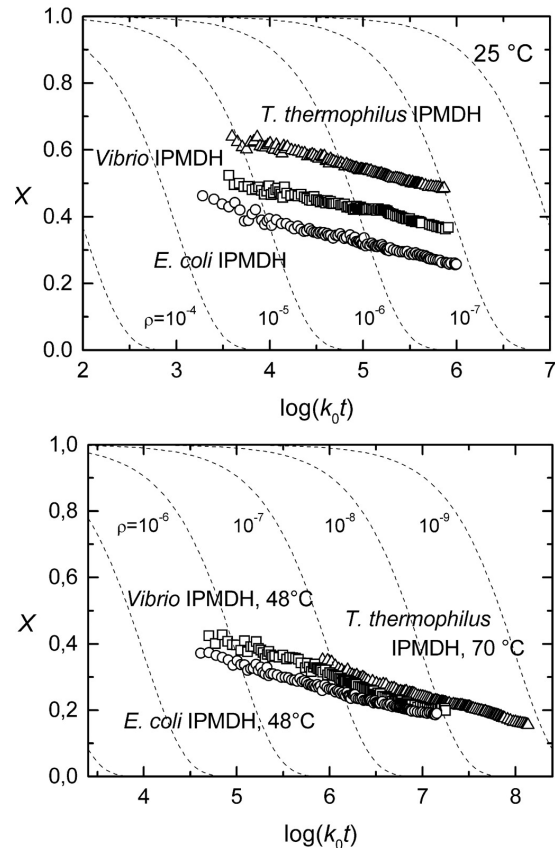
**Neðri hluti** Staðlaðir afmyndunarferlar fyrir VPR (o), PRK (□) og AQU1 (Δ) sem fall af styrk afmyndarans guanidíníum thiócýanats (GdmSCN) við 25°C. Afmyndun var fylgt með breytingum í flúrljómunarrófum próteinasanna á bilinu 320–355 nm [26].

til víðtækari hreyfinga 2. stigs byggingahluta próteina eða klasa (e. domains) sem eiga sér stað á millisekúndna (msek) kvarða eða hægar [27]. Hreyfingar sem mikilvægar eru í hvötun ensíma eru líklega á  $\mu$ sek–msek bilinu og má því ætla að viðeigandi tímakvarði

fyrir hreyfingar sem mikilvægar eru í hitastigsaðlögun séu á þeim tímakvarða fremur en psek [28]. Jafnframt er alls ekki ljóst hvort staðbundinn (e. local) hreyfanleiki innan sameindar, t.d. í eða við hvarfstöðvar ensímanna, gegni meginhlutverki, eða hvort til komi heildarhreyfanleiki (e. global) allrar próteinsameindarinnar. Erfitt er að meta sveigjanleika próteinsameinda með mælingum, og það sem mælt er sem “sveigjanleiki” er háð því hvaða aðferðum er beitt. Með nifteindatvístrun (e. neutron scattering) má nema mjög hraðar varmahreyfingar (e. thermal motions) á psek til nanosek kvarða. Þessar hreyfingar taka til breytinga í afstöðu atóma um  $\sim 1 \text{ \AA}$ , með orku  $\sim 1 \text{ kcal/mol}$  sem svarar til þeirra ósamgildu hrifa eða víxlverkana (saltbrýr, vetnistengi, vötnun, van der Waals, vatnsfælin hrif) sem viðhalda byggingu próteina [27, 29–31].

Mælingar á vetnis/deuteríum (H/D) útskiptum á amíð-hópum, yfirleitt með FTIR litrófsgreiningu (Fourier transform infrared spectroscopy), eða NMR aðferðum, eru hins vegar mælikvarði á hreyfingar í sameindum á msek kvarðanum. Mælingar á H/D útskiptihvörfum með þessum aðferðum hafa þann annmarka að mæld eru meðalútskipti fyrir alla amíð-hópa fjölpeptíðkeðjunnar, en ekki eru greindar staðbundnar breytingar innan hennar, sem kunna að vera mikilvægar fyrir hitastigsaðlögun [32]. H/D útskiptitilraunir sem fylgt var eftir með próteinrofi og massagreiningu hafa þó nýlega verið notaðar til að sýna fram á mismun í staðbundnum hreyfingum í alkóhól dehydrogenasa úr kuldakærum og hitakærum bakteríum [33].

Þótt niðurstöður ýmissa rannsókna styðji tilgátur um tengsl sveigjanleika og hitastigsaðlögunar í samræmi við kenningarnar um “samsvarandi ástönd”, hafa einnig verið birtar niðurstöður sem benda til hins gagnstæða. Rannsókn þar sem bæði H/D útskiptihvörf (FTIR) og nifteindatvístrun voru notuð til bera saman sveigjanleika  $\alpha$ -amylasa úr miðlungshita- og hitakærri bakteríu, leiddi í ljós að lítil munur reyndist vera á hraða útskiptihvarfa amíð prótóna í ensímunum tveimur. Hins vegar reyndist hitaþolna ensímið ráða yfir meiri sveigjanleika í hreyfingum á skemmri tímakvarða (psek) [34]. Ályktað var að þessi aukni sveigjanleiki hitaþolna  $\alpha$ -amylasans kynni að stuðla að meiri stöðugleika ensímsins, því með aukinni óreiðu hins svipmótaða ástands próteinsins drægi úr heildaróreiðu í afmyndunarferlinu, sem varmafræðilega er vissulega megindrifkraftur þess. Jafnframt var sýnt að afmynduð form miðlungshitakæra og hitakæra  $\alpha$ -amylasans



**Mynd 2.** Niðurstöður H/D útskiptihvarfa mæld með FTIR fyrir ensímið isoprópýl malat dehydrogenasa (IPMDM) úr þremur mismunandi hitastigsaðlöguðum bakteríum; *Vibrio*-teg. 15 ( $\square$ ), *E. coli* ( $\circ$ ) og *Thermus thermophilus* ( $\Delta$ ). Efri mynd við 25°C og neðri mynd við hitastig nálægt kjöraðstæðum fyrir ensímin (48°C fyrir *Vibrio* IPMDM og *E. coli* IPMDM og 70°C fyrir *T. thermophilus* IPMDM. Hærrí gildi fyrir  $\chi$  (hlutfall prótóna sem ekki er útskipt) gefur vísbendingu um aukna stífni myndbyggingar.  $k_0$  er hraðafasti útskiptihvarfs og  $t$  stundur fyrir tíma [38]. Efri myndin sýnir því meiri stífni hitaþolna *T. thermophilus* ensímsins í samanburði við hin ensímin, en mestan sveigjanleika *E. coli* ensímsins við 25°C. Ferlar á neðri myndinni sýna hins vegar mjög svipaðan sveigjanleika ensímanna þriggja í námunda við kjörhitastig þeirra fyrir virkni.

réðu yfir sama sveigjanleika sem styður enn fremur tilgátuna um að varmafræðilegur ávinningur felist í auknum sveigjanleika svipmótaða forms hitaþolna ensímsins fyrir stöðugleika þess [34, 35]. Slík lækkingun í óreiðu afmyndunar leiddi jafnframt til að stöðugleikaferill ( $\Delta G$  vs.  $T$ ) hitaþolna próteinsins yrði flatari

þar sem halla slíkra ferla er lýst með óreiðubreytingunni ( $\delta\Delta G/\delta T = -\Delta S$ ) og bræðslumark ( $T_m$ ) próteinsins (skurðpunktur við hitastigsásinn, þar sem  $\Delta G=0$ ) mundi því hækka með lækkun óreiðubreytingarinnar [6]. Niðurstöður nokkurra nýlegra rannsókna styðja þessar tilgátur um að aukinn sveigjanleiki á picosekúndu tímakvarðanum kunni í raun að auka stöðugleika hitaþolinna próteina [36,37].

En eru þessar niðurstöður ekki í hrópandi mótsögn við tilgátur um samband sveigjanleika og hitastigsadlögunar sem ræddar voru fyrr? Ekki endilega, en hins vegar benda þær á þörfina á að skilgreina betur hvað við er átt þegar rætt er um "sameindasveigjanleika" útfrá sjónarhóli hitastigsadlögunar. Það er því líklega nauðsynlegt að skilgreina tímakvarða, útslag (stærð) og staðsetningu þessara hreyfinga í próteinum eigi þær að hjálpa okkur að skilja tengsl við hitastigsadlögun [27,36].

Til að tryggja stöðugleika hitaþolinna próteina þarf að hefta ákveðnar hreyfingar, sérstaklega þær hreyfingar í sameindunum sem kunna að leiða til afmyndunar. Of kröftugar hreyfingar á ákveðnum svæðum, t.d. á lykkjum, gætu opnað gáttir fyrir vatn að vatnsfælnum kjarna próteinanna sem leiddi til afmyndunar þeirra. Einnig má ætla að þeir hlutar sameindanna sem bera hópa sem nauðsynlegir eru fyrir líffræðilega virkni, t.d. í hvarfstöðvum ensíma, séu á tiltölulega stífum svæðum sem ná ekki réttum hreyfingum til hvötunar fyrr en við hátt hitastig. Ætla má að aðferðir sem mæla H/D útskipti geti numið mun í þessum stærri og hægari hreyfingum í próteinum sem aðlagast hafa mismunandi hitastigi. Slíkar mælingar hafa verið framkvæmdar fyrir ensímið 3-isopropylmalat dehydrogenasa úr miðlungshitakærru og hitakærru bakteríu og sýndu öfugt samband milli hitastigs adlögunar og hraða H/D útskipta amíðhópa próteinanna (mynd 2) [38]. Samsvarandi mælingar fyrir ensím úr kuldakærru *Vibrio*-tegund voru þó ekki í samræmi við þetta samband hitastigsadlögunar og sveigjanleika [39]. Ensímið sýnir öll einkenni hitastigsadlögunar, m.t.t. hvötunareiginleika og stöðugleika, en sveigjanleiki þess mældist minni en fyrir miðlungshitakært ensím úr *E. coli* samkvæmt H/D útskiptimælingum (mynd 2) [39].

FTIR H/D útskiptimælingar á ensíminu alkóhól dehydrogenasa úr kuldakærru, miðlungshitakærru og hitakærru örveru sýndu svipaðar niðurstöður, á þann hátt að miðlungshitakæra og hitakæra ensímið

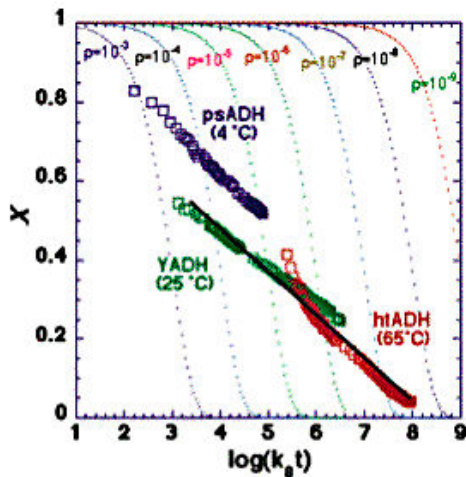
höfðu samsvarandi heildarsveigjanleika við kjörhitastig þeirra (25 og 65°C). Í reynd mældist sveigjanleiki kuldaaðlagða ensímsins minni við 4°C (mynd 3) [33]. Kuldaaðlagða ensímið virðist því eins og í tilfelli isoprópylmalat dehydrogenasa skera sig úr hvað varðar hegðun m.t.t. "samsvarandi ástands"-kenningarinnar. Auk þess að mæla heildarsveigjanleika próteinanna með FTIR, var í sömu rannsókn metið hvaða svæði innan fjölpeptíðkeðjunnar innihéldu mest deuterium á ákveðnum tímapunktum í H/D skiptihvarfinu. Þetta gæti gefið vísbendingu um hvaða svæði hefðu mestan staðbundinn sveigjanleika [33]. Þetta var gert með massagreiningu á peptíðum af próteinunum eftir útskiptihvarfið sem mynduð voru með próteasa niðurbroti. Á þennan hátt tókst að kortleggja þau svæði í próteinunum þar sem H/D-útskipti voru í mestum mæli og var þannig sýnt fram á að kuldavirki alkóhól dehydrogenasinn innihélt ákveðin svæði innan byggingar sinnar sem voru mun sveigjanlegri en samsvarandi svæði í hitaþolna samstofna ensíminu. Kom í ljós að þessi svæði voru einmitt þeir hlutar sameindabyggingarinnar sem taka þátt í bindingu bæði hvarfefnis og hjálparþáttar og eru því mjög mikilvæg fyrir virkni ensímsins [33]. Þessar niðurstöður benda því til að adlögun ensíma að kulda geti falið í sér staðbundna aukningu sveigjanleika á byggingarlega mikilvægum svæðum innan sameindanna án þess að heildarsveigjanleiki (mældur sem hlutfall og hraði H/D útskipta) þeirra aukist. Það að staðbundin aukning sveigjanleika, fremur en heildarsveigjanleiki sameindarinnar, gegni meginhlutverki í kuldaadlögum er í samræmi við tilgátur sem áður höfðu verið settar fram og byggðar voru á rannsóknum á ensíminu laktat dehydrogenasa úr mismunandi fisktegundum sem aðlagðar voru mismunandi hitastigi [40,41].

### 3. Samband byggingar og kuldaadlögunar

#### 3.1. Samanburðarrannsóknir

Hin síðari ár hafa birtst upplýsingar um þrívíddarbyggingu kuldavirkra próteina. Um tylft kuldaaðlagðra próteina hafa verið kristölluð og bygging þeirra greind [11–19] og einnig liggur fyrir allnokkur fjöldi tölvugerðra sameindalíkana (e. homology models) sem hönnuð hafa verið útfrá þekktri kristalbyggingu samstofna próteina. Flestar þessar þrívíddarbyggingar hafa verið bornar saman við þekkta byggingu samstofna ensíma með það að markmiði að skýra tengsl sameindabyggingar og kuldaadlögunar. Helstu niðurstöð-





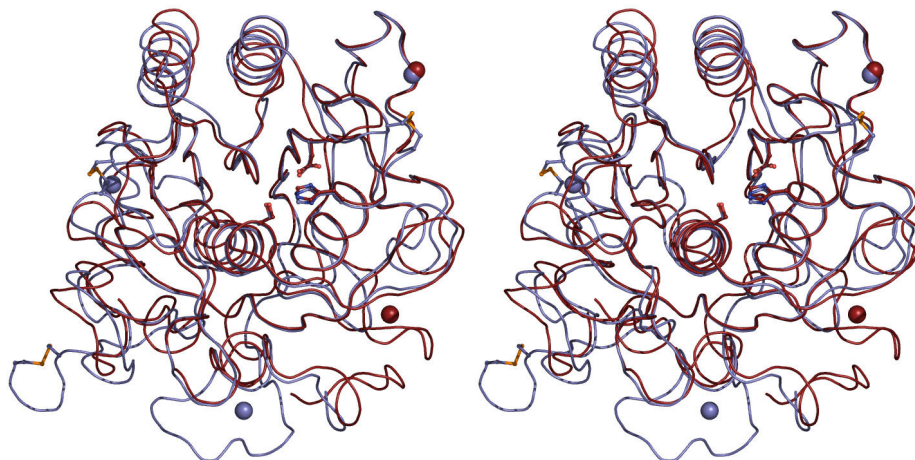
Mynd 3. H/D útskiptaferlar fyrir ensímið alkóhól dehydrogenasa einangrað úr kuldakærri *Moraxella* tegund (psADH), úr gersvepp (YADH) og hitakæru bakteríu *Bacillus stearothermophilus* (htADH). Mælingar voru í hverju tilfelli framkvæmdar við vaxtarhitastig viðkomandi örvera, eins og merkt er á mynd [32]. Merkingar á gröfum eru eins og lýst var með mynd 2.

ur slíkra samanburðarrannsókna á ensímum úr kuldaaðlöguðum bakteríum eru dregnar saman í töflu 1. Í þessum rannsóknum hefur verið litið eftir mismun í byggingarþáttum sem skýrt gæti mismunandi stöðugleika próteinanna, eða reynt hefur verið að skýra mismuninn í ljósi hugsanlegra áhrifa á sveigjanleika. Allar þessar samanburðarránsóknir sýna að bygging ensímanna er keimlík. Því er ljóst að mismunandi hitastigsaðlögun próteinanna er ekki hægt að skýra með breyttri 2. stigs og 3. stigs byggingu þeirra (mynd 4). Jafnframt virðast niðurstöður samanburðarrannsókna ekki benda til þess að ákveðnar leiðir séu farnar í aðlögun byggingar próteina að kulda. Ýmsir byggingarþættir hafa verið tilgreindir sem ástæður aukinnar hvötunargetu, minni stöðugleika og hugsanlegrar aukningar í sveigjanleika. Helstu áhrifaþættir sem tilgreindir hafa verið eru, færri saltbrýr (sérstaklega milli klasa eða á milli undireininga í samsettum próteinum), fækkun arómatískra víxlverkana, stækkun yfirborðslykkja og færri prólín í slíkum lykkjum, minni vatnsfælni, veikari binding kalsíum í bindiset, hagstæðari víxlverkanir við leysi vegna aukins fjölda yfirborðshleðslna (einkum neikvæðra), minna grafið óskautað yfirborð, og betra aðgengi óskautaðra hópa á yfirborði [6, 20, 22–24].

Prófun er hafin á nokkrum þessara tilgátna sem settar hafa verið fram um aðlögun sameindabyggingar að kulda með því að beita markvissum stökkbreytingum á ensímum [42–47].

### 3.2. Mikilvægi yfirborðs próteina

Þeir byggingarþættir sem hvað oftast eru nefndir til og taldir eru stuðla að kuldaaðlögun eru tengdir yfirborði próteinanna (tafla 1). Efnafraðilegir eiginleikar þeirra hópa sem mynda yfirborð próteina *hljóta* að vera mikilvægir fyrir hitastigsaðlögun próteina, hvort sem er að háu eða lágu hitastigi, því þessir hópar eiga samskipti við vatn, með víxlverkunum sem eru mjög hitastigsháðar, vegna breytinga í byggingu vatnsins [48–50]. Þannig virðist oft á tíðum stærra hlutfall aðgengilegs yfirborðs (e. accessible surface) kuldaaðlagðra próteina vera óskautað [11, 14–16, 19] og jafnframt hærra hlutfall yfirborðs hitapólinna próteina vera skautað [51, 52]. Hitakær, og þó sérstaklega ofurhitakær prótein, reynast einnig oft pakka hliðarkeðjum þéttar í kjarna bygginga sinna og hafa jafnframt færri og smærri holurúm, en þetta eru byggingarþættir sem að öllum líkindum leitast við að gera byggingar þeirra stífari [53]. Sum kuldaaðlöguð prótein reynast hins vegar hafa minni óskautuð (vatnsfælin) grafin svæði, eða að grafnir hlutar eru skautaðri [14, 19]. Subtilísín-líkur sérin próteinasi úr kuldakærri *Vibrio*-tegund (tafla 1) hefur svipað grafið yfirborð og samstofna ensím úr miðlungshitakærri (próteinasi K) og hitakærri örveru (thermitasi). Hins vegar er mun stærri hluti þessa grafna yfirborðs (e. buried surface) skautað í samanburði við viðmiðunarensím. Stærra grafið óskautað yfirborð eykur vatnsfælnihrif og ætti því að stuðla að meiri stöðugleika próteinanna. Í tilfelli próteinasa K og thermitasa var þessi stöðugleikaaukning metin á bilinu 5,3 til 15,6 kcal/mol [19]. Á sama hátt var metið fyrir kuldavirkan adenýlat kínasa að minna grafið óskautað yfirborð gæti numið um 4,0–10,8 kcal/mol í veikingu vatnsfælnihrifa í samanburði við hitapólið ensím [14]. Jafnframt reyndist stærri hluti yfirborðs kuldakæra próteinsins sem aðgengilegt er leysi vera óskautað, í samanburði við miðlungshitakæra og hitakæra ensímið [14]. Stöðugleiki kuldavirku ensímanna virðist því minna háður vatnsfælnihrifum en samstofna ensímanna sem aðlöguð eru hærra hitastigi. Hvort minni vatnsfælnihrif er leið til að aðlaga byggingu próteina að kulda er þó ekki hægt að fullyrða um, því í raun dregur úr drifkrafti



**Mynd 4.** Samanburður á þrívíddarbyggingu kuldavirka *Vibrio*-próteinasans (blátt) (pdb (Protein Data Bank) tákni: 1SH7) og samstofna hitaþolna ensímsins *thermitasa* (rautt) (pdb tákni: 1THM) (19). Einslitaðar kúlur tákna kalsíum jónir bundnar ensímunum.

**Tafla 1.** Áhrifaþættir kuldaaðlögunar meðal próteina úr kuldakærum örverum samkvæmt samanburði á þrívíddarmyndbyggingu (kristalbyggingu) þeirra og samstofna próteina aðlöguðum hærra hitastigi.

Prótein	Líklegar ástæður kuldaaðlögunar
<b><math>\alpha</math>-amýlasi</b>	Hærra hlutfall vatnsfælinna hópa og lægra hlutfall hlaðinna amínósýra (sérstaklega Arg) á yfirborði. Lægra hlutfall Pro í lykkjum/beygjum. Veikari hrif milli klasa (domains), ekki síst vegna færri Arg í slíkum stöðum. Veikari Ca-binding. Dísúlfíð-tengi milli undireininga ekki til staðar í kuldakæra ensíminu [11]
<b>Tríósa-fosfat isómerasi</b>	Ein breyting Ala238 (í kuldakæra) $\rightarrow$ Ser (í <i>E. coli</i> ) í lykkju, eykur hitastöðugleika um 5°C (2x2 H-tengi), en lækkar $k_{cat}/K_m$ 3-8-falt [13]
<b>Malat dehydrógenasi</b>	Færri/veikari jóna-pör (salt-brýr) á milli fjölpeptíðeininga (intersubunit) tvíliðunnar. Aukinn sveigjanleiki hliðarhópa við hvarfstöð (meðaltal B-gilda). Hagstæðir hleðslueiginleikar yfirborðs, m.t.t. bindingar hvarfefnis og hjálparþáttar (NADH). Stærri ógrafið yfirborðsflatarmál. Grafið yfirborð meira skautað [15]
<b>Sítrat synthasi</b>	Opnari eða aðgengilegri hvarfstöð. Veikari hrif í snertiflötum undireininga (e. subunits) tvíliðunnar (jónapör). Lengri lykkjur, með meiri hleðslu og færri Pro. Hærra hlutfall vatnsfælinna amínósýra aðgengilegar leysi á yfirborði. Meiri rafneikvæðni yfirborðs (?). Aukinn sveigjanleiki smærri undireiningar í samanburði við þá stærri [16]
<b>Adenýlat kinasi</b>	Minna grafið óskautað (vatnsfælið) yfirborðsflatarmál, en stærri óskautað yfirborð aðgenglegt leysi [14]
<b>Xýlanasi</b>	Færri saltbrýr. Hærra hlutfall vatnsfælinna amínósýra aðgengilegar leysi á yfirborði. Aukinn sveigjanleiki amínósýra í hvarfstöð (hlutfallsleg B-gildi). Minni rafneikvæðni við bindiset ( $\rightarrow$ ↓Km) [18]
<b>Subtilísín-líkur próteinasí</b>	Minna grafið óskautað (vatnsfælið) yfirborðsflatarmál, en stærri óskautað yfirborð aðgenglegt leysi. Aukin rafneikvæðni á yfirborði [19]
<b>Alkalískur málmpróteasi</b>	Hærra hlutfall vatnsfælinna amínósýra á yfirborði aðgengilegar leysi þrátt fyrir lægra hlutfall slíkra amínósýra í heildarsamsetningu próteinsins. Eitt kalsíum bindiset ekki til staðar. Betra aðgengi í hvarfstöð [11]

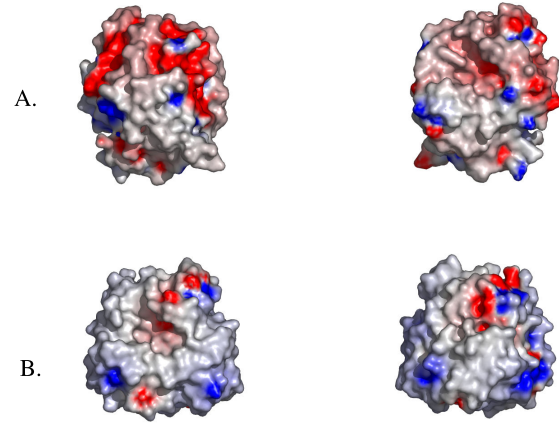
Tafla 2. Áhrif hitastigs á nokkra valda eðliseiginleika vatns

Eiginleiki	0 °C	20 °C	40 °C	100 °C
Dílelektrískur fasti	87.90	80.20	73.17	55.51
Seigja (mPa s)	1793	1002	653.2	281.8
Eðlismassi (g cm <sup>-3</sup> )	0.9998	0.9982	0.9922	0.9584
Yfirborðsspenna (mN m <sup>-1</sup> )	75.64	72.75	69.60	58.91

óreiðudrifinna vatnsfælnihrifa með lökkun hitastigs. Minni vatnsfælnihrif stafa einkum af aukinni reglufestu í byggingu vatns við lágt hitastig [50]. Meiri regla í byggingu vatns við lágt hitastig hefur þau áhrif að það er varmafræðilega “síður óhagstætt” fyrir óskautaða hópa að eiga samskipti við vatn, hvort sem er á yfirborði svipmótaðs (þ.e. stærra óskautað yfirborð) eða afmyndaðs forms (minna grafið óskautað yfirborð). Með öðrum orðum, með meiri reglufestu í byggingu vatns við lágt hitastig dregur hvort sem er úr vatnsfælnihrifum og því eru þessir byggingareiginleikar fremur hlutlaus afleiðing kuldaaðlögunar, en orsök að breyttum eiginleika kuldaaðlöguðu próteinanna. Á hvorn veginn sem er, má ætla að óreiðudrifin vatnsfælnihrif gegni minna hlutverki fyrir stöðugleika próteinanna við lágt hitastig, sem gæti stuðlað að opnari og e.t.v. hreyfanlegri myndbyggingu þeirra [19].

Annar eiginleiki sem virðist einkenna mörg kuldaaðlöguð prótein er aukin rafneikvæðni á yfirborði þeirra (tafla 1). Í samanburði við samstofna ensím úr lífverum sem aðlagðar eru hærra hitastigi eru kuldaaðlöguð prótein yfirleitt anjónísk [6]. Í samanburði við viðmiðunarensímín próteinasna K og thermitasa er yfirborð kuldavirka *Vibrio*-próteinasans t.a.m. mun rafneikvæðara (mynd 5). Hvort, eða hvernig, aukin yfirborðsrafneikvæðni hefur áhrif á kuldaaðlögun próteina er ekki vitað. Hins vegar hefur verið bent á að aukin hleðsla á yfirborði stuðli að kuldaaðlögun með því að auka styrk víxlverkana próteinyfirborðsins við vatnsleysinn [53]. Eins og áður var nefnt á sér að öllum líkindum stað meiri reglufesta í vetnistengjabyggingu vatns með lægra hitastigi. Endurspeglast þetta m.a. í hærri yfirborðsspennu og seigju vatnslausna með lökkandi hitastigi (tafla 2).

Til að leysa prótein í slíkum leysi þarf að beita orku sem að stórum hluta felst í því að rjúfa hina reglubundnu vetnistengja-byggingu í vatninu. Hvort eða hversu óhagstætt þetta ferli er varmafræðilega, ræðst af því hversu mikið af hinni töpuðu tengjaorku endur-



Mynd 5. Samanburður á yfirborðsrafmætti (e. electrostatic surface potential) fyrir kuldavirka *Vibrio*-próteinasann (A) og hitaþolna samstofna ensímið thermitasa (B). Myndir til hægri sýna sameindina eftir 180° snúning um lóðréttan ás miðað við vinstri mynd. Jákvætt rafmætti er tjáð með bláum lit, en rafneikvæðni með rauðum lit [19].

heimtist innan vatnsfasans og í víxlverkun við hópa á próteininu. Hagstæð rafhrif við hlaðna hópa á yfirborði próteinsins gætu því verið mikilvæg í að vega upp tapaða tengjaorku í þéttriðnu vetnistengjakerfi vatnsfasans, sérstaklega við lágt hitastig [53]. Meiri fjöldi stakra hleðsla á yfirborði próteinanna kunna því að hluta að skýrast með aðlögun sameindanna að breyttum eiginleikum vatns við lægra hitastig. Í raun má einnig að hluta skýra aukna tíðni jónapara sem oft reynast vera til staðar í byggingu hitakærra próteina sem aðlögun að breyttum eiginleikum vatns með hitastigi. Lökkun dielektríks fasta vatns með hærra hitastigi leiðir til þess að myndun jónapara (saltbrúa) verður varmafræðilega hagstæðara ferli, gagnstætt því sem kann að eiga sér stað við lægra hitastig, þar sem kostnaðurinn við að brjóta upp hrif stakra hleðslna við tvískaut vatnssameinda (e. desolvation penalty) væri meiri, en ávinningurinn af myndun saltbrúar milli gagnstæðra hleðslna [54,55].

Lögun og gerð yfirborðs próteina gegna lykilhlutverki í eiginleikum þeirra. Þar fara fram samskipti eða víxlverkun við aðrar sameindir, hvort sem þær eru hvarfefni ensíma, boðefni af ýmsum toga, önnur prótein eða vatn. Í öllum samskiptum próteina við aðrar sameindir gegnir vatn meginhlutverki, ef ekki sem beinn áhrifavaldur, þá með því að vera útilokað. Byggingareiginleikar vatns og víxlverkun við óskaut-

aða hópa próteina er grundvöllur vatnsfælnihrifa, sem er megindrifkraftur svipmótunar próteina og stöðugleika þeirra. Vatn hefur einnig áhrif á styrk tvískauta og hleðsluhrifa, sem og bindingu t.a.m. málmjóna sem auka stöðugleika byggingar próteina. Bygging vatns og eiginleikar þess eru mjög breytilegir með hitastigi (tafla 2). Í þeirri viðleitni að leita aukins skilnings á sameindafræðilegum forsendum hitastigsaðlögunar próteina hljótum við að þurfa að taka mið af þessum breytilegu eiginleikum vatns. Líklegt er að stór hluti aðlögunar byggingar próteina (ekki síst sveigjanleiki) að mismunandi hitastigi felist í aðlögun þeirra að þessum hitastigsháðu breytingum í byggingu og eiginleikum vatns. Aukinn skilningur (þekking) á vatnsbyggingu og samskiptum þess við prótein er því að öllum líkindum forsenda aukins skilnings á kuldaaðlögunar próteina.

**Summary:** Our knowledge of the properties and the structural factors involved in cold-adaptation of enzymes from psychrophilic organisms have increased considerably during the last years. Cold-adapted enzymes usually have a higher catalytic efficiency as compared to homologous enzymes from organisms adapted to higher temperatures, but are also more thermolabile. It has been suggested that increased molecular flexibility of the these enzymes plays a central role in their enhanced activity and also explains their diminished thermal stability. Relatively little is known however about the nature of such proposed enhanced molecular movements in cold-adaptation of enzymes. An increased number of known three-dimensional structures of cold-adapted proteins have been published during the last years. Comparisons of these structures to those of available structures of homologous enzymes from organisms adapted to higher temperatures have provided valuable insights into the structural principles which contribute to cold-adaptation. In this article results from recent research in this area will be discussed.

### Heimildir

- [1] Blochl, E, Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbradl, D., Jannasch, H.W., and Stetter, K.O. (1997). *Pyrolobus fumarii*, general and sp. Nov., represents a novel group of archaea, extending the upper limit for life to 113 degrees C. *Extremophiles* **1**, 14-21.
- [2] Deming, J.W. (2002). Psychrophiles in polar regions. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 301-309.
- [3] Hochachka, P.W. and Somero, G. (1984). *Biochemical Adaptation*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- [4] Somero, G.N. (1995). Proteins and temperature. *Annu. Rev. Physiol.* **57**, 43-68.
- [5] Jaenicke, R. and Böhm, G. (1998). The stability of proteins in extreme environments. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 738-748.
- [6] Kristjánsson, M.M. and Ásgeirsson, B. (2002). Properties of extremophilic enzymes and their importance in food science and technology. Í *Handbook of Food Enzymology* (Whitaker, J.R., Voragen, A.G.J., and Wong, D.W.S., ritstj.) bls. 77-100, Marcel Decker, Inc., New York.
- [7] Haki, G.D. and Rakshit, S.K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour Technol* **89**, 17-34.
- [8] van den Burg, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 213-218.
- [9] Vieille, C. and Zeikus, G.J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 1-43.
- [10] Gerday, C., Attalieb, M.M., Bentahir, M., Chessa, J.P., Claverie, P., Collins, T., D'Amico, S., Dumont, J. Garsoux, G., Georgette, D., Hoyoux, A., Lonhienne, T., Meuwis, M.A., and Feller, G. (2000). Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *TIBTECH* **18**, 103-107.
- [11] Aghajari, N., Feller, G., Gerday, C., and Haser, R. (1998). Structures of the psychrophilic *Alteromonas haloplanctis*  $\alpha$ -amylase give insights into cold adaptation at a molecular level. *Structure* **6**, 1503-1516.
- [12] Aghajari, N., Van Petegem, F., Villeret, V., Chessa, J.P., Gerday, C., Haser, R., and Van Beeumen, J. (2003). Crystal structures of a psychrophilic metalloprotease reveal new insights into catalysis by cold-adapted proteases. *Proteins* **50**, 636-647.
- [13] Alvarez, M., Zeelens, J.P., Mainfroid, V., Rentier-Delrue, F., Martial, J.A., Wyns, L., Wierenga, R.K., and Maes, D. (1998). Triose-phosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. *J. Biol. Chem.* **273**, 2199-2206.
- [14] Bae, E. and Phillips, G.N., Jr. (2004). Structures and analysis of highly homologous psychrophilic, mesophilic and thermophilic adenylate kinases. *J. Biol. Chem.* **279**, 28202-28208.
- [15] Kim, S.Y., Hwang, K.Y., Kim, S.H., Sung, H.C., Han, Y.S., and Cho, Y. (1999). Structural basis for cold adaptation. Sequence, biochemical properties, and crystal structure of malate dehydrogenase from a psychrophile *Aquaspirillum arcticum*. *J. Biol. Chem.* **274**, 11761-11767.
- [16] Russel, R.J.M., Gerike, U., Danson, M.J., Hough, D.W., and Taylor, G.L. (1998). Structural adaptations of the cold active citrate-synthetase from an Antarctic bacterium. *Structure* **6**, 351-361.



- [17] Smalås, A.O., Heimstad, E.S., Hordvik, A., Willasen, N.P., and Male, R. (1994). Cold adaptation of enzymes: structural comparison between salmon and bovine trypsins. *Proteins* **20**, 149-166.
- [18] Van Petegem, F., Collins, T., Meuwis, M.A., Gerday, C., Feller, G., and Van Beeumen, J. (2003). The structure of a cold-adapted family 8 xylanase at 1.3 Å resolution. Structural adaptations to cold and investigation of the active site. *J. Biol. Chem.* **278**, 7531-7539.
- [19] Arnórsdóttir, J., Kristjánsson, M.M., and 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.
- [20] Gerday, C., Aittaleb, M., Arpigny, J.L., Baise, E., Chessa, J.P., Garsoux, G., Petrescu, I., and Feller, G. (1997). Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. *Biochim. Biophys. Acta* **1342**, 119-31.
- [21] Feller, G. and Gerday, C. (2003). Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**, 200-208.
- [22] Feller, G. (2003). Molecular adaptation to cold in psychrophilic enzymes. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 648-662.
- [23] Smalås, A.O., Leiros, H.K., Os, V., and Willassen, N.P. (2000). Cold adapted enzymes. *Biotechnol. Annu. Rev.* **6**, 1-57.
- [24] Siddiqui, K.S. and Cavicchioli (2006). Cold-adapted enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 403-433.
- [25] Kristjánsson, M.M., Magnússon, Ó.Þ. Guðmundsson, H., Alfredsson, G.Á., and 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.
- [26] Arnórsdóttir, J., Smáradóttir, R.B., Magnússon, Ó.Þ., Þorbjarnardóttir, S.H., Eggertsson, G., and Kristjánsson, M.M. (2002). Characterization of a cloned subtilisin-like serine proteinase from a psychrotrophic *Vibrio*-species. *Eur. J. Biochem.* **269**, 5536-5546.
- [27] Zaccai, G. (2000). How soft is a protein? A protein dynamics force constant measured by neutron scattering. *Science* **288**, 1604-1607.
- [28] Fields, P.A. (2001). Review: Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. *Comp. Biochem. Physiol.* **129A**, 417-431.
- [29] Bicout, D.J., and Zaccai, G. (2001.) Protein flexibility from the dynamical: A force constant analysis. *Biophys. J.* **80**, 1115-1123.
- [30] Tehei, M., Madern, D., Pfister, C., and Zaccai, G. (2001). Fast dynamics of halophilic malate dehydrogenase and BSA measured by neutron scattering under various solvent conditions influencing protein stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 14356-14361.
- [31] Tehei, M., Franzetti, B., Madern, D., Ginzburg, M., Ginzburg, B.Z., Guidici-Ortoniconi, M.T., Bruschi, M., and Zaccai, G. (2004.) Adaptation to extreme environments: macromolecular dynamics in bacteria compared in vivo by neutron scattering. *EMBO reports* **5**, 66-70.
- [32] Marx, J.C., Blaise, V., Collins, T., D'Amico, S., Delille, D., Gratia, E., Hoyoux, A., Huston, A.L., Sonan, G., Feller, G., and Gerday, C. (2004). A perspective on cold enzymes: Current knowledge and frequently asked questions. *Cell. Mol. Biol.* **50**, 643-655.
- [33] Liang, Z.-X., Tsigos, I., Lee, T., Bouriotis, V., Resing, K.A., Ahn, N.G., and Klinman, J.P. (2004.) Evidence for increased local flexibility in psychrophilic alcohol dehydrogenase relative to its thermophilic homologue. *Biochemistry* **43**, 14676-14683.
- [34] Fitter, J. and Heberle, J. (2000). Structural equilibrium fluctuations in mesophilic and thermophilic alpha-amylase. *Biophys. J.* **79**, 1629-1636.
- [35] Fitter, J., Herrman, R., Haub, T., Lecher, R.E., and Dencher, N.A. (2001). Dynamical properties of alpha-amylase in the folded and unfolded state: the role of thermal equilibrium fluctuations for the conformational entropy and protein stabilization. *Physica B*, **301**, 1-7.
- [36] Wintrode, P.L., Zhang, D., Vaidehi, N., Arnold, F.H., and Goodard III, W.A. (2003). Protein dynamics in a family of laboratory evolved thermophilic enzymes. *J. Mol. Biol.* **327**, 745-757.
- [37] Hernandez, G., Jenney, F.E., Adams, M.W., and Lemaster, D.M. (2000). Millisecond time scale conformational flexibility in a hyperthermophilic protein at ambient temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 3166-3179.
- [38] Zavodsky, P., Kardos, J., Svingor, A., and Petsko, G.A. (1998). Adjustment of conformational flexibility is a key event in the thermal adaptation of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 7406-7411.
- [39] Svingor, A., Kardos, J., Hajdu, I., Nemeth, A., and Zavodsky, P. (2001). A better enzyme to cope with cold. Comparative flexibility studies on psychrophilic, mesophilic and thermophilic IPMDHs. *J. Biol. Chem.* **276**, 28121-28125.
- [40] Holland, L.Z., McFall-Ngai, M., and Somero, G.N. (1997). Evolution of lactate dehydrogenase-A homologs of barracuda fishes (genus *Sphyræna*) from different thermal environments: Differences in kinetic properties and thermal stability are due to amino acid substitutions outside the active site. *Biochemistry* **36**, 3207-3215.
- [41] Fields, P.A. and Somero G.N. (1998). Hot spots in cold adaptation: localized increases in conformational

- flexibility in lactate dehydrogenase A(4) orthologs of Antarctic notothenoid fishes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 11476-11481.
- [42] D'Amico, S., Gerday, C., and Feller, G. (2001). Structural determinants of cold adaptation and stability in a large protein. *J. Biol. Chem.* **276**, 25791-25796.
- [43] Gerike, U., Danson, M., and Hough, D.W. (2001). Cold-active citrate synthase: mutagenesis of active site residues. *Protein Eng.* **14**, 655-661.
- [44] Mavromatis, K., Feller, G., Kokkinidis, M., and Bouritotis, V. (2003). Cold adaptation of a psychrophilic chitinase: a mutagenic study. *Protein Eng.* **16**, 497-503.
- [45] Tindback, N., Svendsen, A., Oestergaard, P.R. and Draborg, H. (2004). Engineering a substrate-specific cold-adapted subtilisin. *Protein Eng.* **17**, 149-156.
- [46] Arnórsdóttir, J. (2001). Byggingarlegar forsendur kuldaaðlögunar subtilísín-líks serín próteinasa úr *Vibrio*-tegund. M.S. ritgerð, Háskóli Íslands.
- [47] Helgadóttir, S. (2003). Áhrif markvissra stökkbreytinga á eiginleika subtilísín-líks serín próteinasa úr kuldakærri *Vibrio*-tegund. 4. árs lokaritgerð, Háskóli Íslands.
- [48] Privalov, P.L. and Makhatadze, G.I. (1993). Contribution of hydration to protein folding thermodynamics. I. The enthalpy of hydration. *J. Mol. Biol.* **232**, 639-659.
- [49] Makhatadze, G.I. and Privalov, P.L. (1993). Contribution of hydration to protein folding thermodynamics. II. The entropy and Gibbs energy of hydration. *J. Mol. Biol.* **232**, 660-679.
- [50] Tsai, C.J., Maizel Jr., J.V., and Nussinov, R. (2002). The hydrophobic effect: a new insight from cold denaturation and a two state water structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **37**, 55-69.
- [51] Haney, P.J., Badger, J.H., Buldak, G.L., Reich, C.I., Woese, C.R., and Olsen, G.J. (1999). Thermal adaptation analyzed by comparison of protein sequences from mesophilic and extremely thermophilic methanococcus species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3578-3583.
- [52] Szilagyi, A. and Zavodsky, P. (2000). Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: result of a comprehensive survey. *Structure* **8**, 493-504.
- [53] Kumar, S. and Nussinov, R. (2004). Different roles of electrostatics in heat and in cold: adaptation by citrate synthase. *ChemBioChem* **5**, 280-290.
- [54] Elcock, A.H. (1998). The stability of salt bridges at high temperatures: Implications for hyperthermophilic proteins. *J. Mol. Biol.* **284**, 489-502.
- [55] Kumar, S. and Nussinov, R. (1999). Salt bridge stability in monomeric proteins. *J. Mol. Biol.* **293**, 1241-1255.

**Um höfundinn:** Magnús Már Kristjánsson er dósent í matvælaefnafræði við Háskóla Íslands.

---

Raunvísindastofnun Háskólans  
Dunhaga 3  
IS-107 Reykjavík  
mmk@raunvis.hi.is  
Móttekin: 26. ágúst 2005