

Ensím aðlöguð kulda

Bjarni Ásgeirsson

Raunvísindastofnun Háskólans

Vefútgáfa: 22. september 2003

Ágrip – Kuldaþolnar lífverur hafa náð að dreifa sér um flest búsvæði á jörðinni. Þær finnast í ríkum mæli við ystu landfræðilegu mörk lífs, svo sem á efstu fjallstoppum, í dýpstu hafdjúpum og á heimskautasvæðunum. Ensím þessara lífvera hafa þróast gegnum tíðina til að takast á við þessi öfgafullu lífsskilyrði. Hvötunargeta kuldavirkra ensíma er gjarna 2–5 falt meiri við staðalhitastig í samanburði við ensím blóðheitra lífvera, en hitastöðugleiki þeirra er aftur á móti minni. Samloðunarkraftarnir sem viðhalda þrívíddarbyggingu próteina eru mjög veikir, en jafnframt afar margir í hverri sameind. Þessir kraftar togast á við hitastigsháðar varmahreyfingar atómklasa um að viðhalda réttu svipmóti hvers próteins. Hvötunarknir ensíma er háð þessum innri hreyfingum. Ef ensím er kælt nægilega mikið, hættir það að starfa, því hreyfingar þess stöðvast. Í kuldavirkum ensímum er samloðunarkröftum fækkað með sérvali á amínósýrum, sem gerir þeim kleift að ganga gegnum hvikular hreyfingar við mjög lág hitastig. Hér er fjallað nánar um grundvöll kuldaaðlögunar með tilvísun í rannsóknir við Háskóla Íslands og víðar.

1. Inngangur

Ýmsar forvitnilegar spurningar tengjast rannsóknum á hitastigsaðlögun lífvera. Leitað er m.a. svara við því hvert sé kjörhitastig tiltekins dýrs, plöntu, eða örveru, og ekki síst, hvers vegna. Einnig þykir áhugavert að vita hvaða lágmarksbreyting í hitastigi mun til langs tíma hrinda af stað aðlögunarferlum í lífverunni, og hversu nálægt þölmörkum í hita núlifandi lífverur búa á hverjum stað. Eina leiðin til að finna svörin við þessum spurningum er samanburður samstofna (e. homologous) lífvera sem hafa aðlagast ólíku hitastigi. Við slíka skoðun verður fljótlega nauðsynlegt að leita dýpra, þ.e. freista þess að tengja áhrif hitastigs á mismunandi efnisþætti í samsetningu lífverunnar. Framfarir síðustu áratuga hafa m.a. byggst á tilraunastofuvinnu með einangraðar sameindir, þar sem mögulegt er að gera markvissar stökkbreytingar í tilteknum arfbera, og komast þannig að hlutverki einstakra þáttakenda í þeim sameindadansi sem nauðsynlegur er. Þetta á einkum við um samband byggingar og virkni í ensímum og öðrum próteinum. Sama hugmynd liggur að baki rannsóknum sem fela í sér samanburð á náttúrulegum afbrigðum sama próteins úr ólíkum lífverum. Sú nálgun hefur þann kost að nátt-

úran hefur þegar gert stökkbreytingartilraunina með sannanlegum árangri hvað varðar breytingar á mælanlegum eiginleikum próteinsins. Ókostur er að jafnframt hafa safnast upp ýmsar breytingar í amínósýruröð próteina sem eru þöglar hvað varðar þann tiltekna eiginleika sem er til athugunar. Það getur verið afar erfitt að grisja þær burt úr stóru safni breytinga. Báðar leiðirnar hafa verið farnar við rannsóknir á kuldavirkum ensímum sem m.a. hafa verið stundaðar á Raunvísindastofnun Háskólans um alllangt skeið [1–8]. Við munum koma að þeim síðar í þessari grein þar sem við á. Fyrst er viðeigandi að ræða um aðlögun að hitastigi á almennari nótum svo lesandanum gefist tækifæri til að átta sig á heildarmynd slíkra rannsókna.

2. Aðlögun lífvera að misheitu umhverfi

Að því gefnu að tíminn geti aðlagast lífveru að breytingum á aðstæðum (með „þróun“), þarf í hverju tilfelli að skoða þá áskorun sem lífveran stendur frammi fyrir. Sérhverjar aðstæður kalla á sértæka aðlögun í byggingu stórsameinda og efnahvörfum lífverunnar svo lífsglíman vinnist, hvort sem lífveran lifir í vatni eða á landi, í háum saltstyrk, í miklum hita, eða í miklum kulda o.s.frv. Álagið sem lífvera verður fyrir frá umhverfi sínu er aðallega af tvennum

toga. Í fyrsta lagi eru grunnefnin (t.d. ensím, burðarprótein, kjarnsýrur, fituefni og frumuhimnur) og samskiptin milli þeirra næm fyrir ýmsum umhverfisþáttum. Þar má nefna hitastig, þrýsting, geislun, návist vatns, súrefnisstakeindir og styrk uppleystra efna. Það flækir málið enn fremur að prótein verða að viðhalda réttu starfsástandi þar sem togast á viðkvæmt jafnvægi milli sameinda með rétt svipmót og þeirra sem flosna upp tímabundið. Það þarf lítið til að færa jafnvægisstöðuna frá fyrrnefnda ástandinu sem gerir lífkerfin berskjölduð gagnvart eðlis- og efnabreytingum í umhverfinu og verður vikið nánar að því síðar. Hinn þáttur aðlögunar snýr að frumunni sem heild og þeirri grundvallarkröfu að hún ráði við nægilega orkuframleiðslu (ATP og NADH), en á því byggir allt annað [9]. Aðlögun þarf þannig að tryggja þol gagnvart áhrifum umhverfisþátta á hraða efnaskipta almennt. Þar gegna ensímín lykilhlutverki.

3. Áhrif hitastigs á lífverur

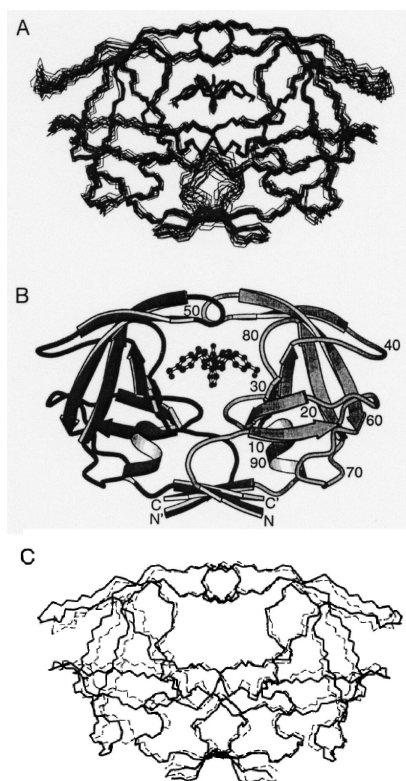
Einn mælikvarði á áhrif hitastigs á lífverur er sú staðreynd að engin tegund getur þolað allan hitastigsskalann í lífheiminum, frá -80°C á hæstu fjöllum og á pólunum, til vel yfir 100°C í hverum í sjó og á landi. Með þróunarvali hefur hver tegund haslað sér völl innan hitastigssviðs sem leyfir henni að virka vel, en utan þess sviðs virkar hún illa eða drepst. Ef innri hiti lífveru þarf að aðlagast hitastigi umhverfisins, hvort sem það er loft eða vatn, kallast lífveran umhverfisheit (e. ectothermic). Á þurru landi geta slíkar lífverur, eins og skriðdýr eða skordýr, þó haft líkamshita sem er töluvert frábrugðinn lofthitanum, vegna hegðunarmynsturs sem skapar varma. Auk spendýra og fugla eru aðeins mjög fá skordýr sem ná að halda jöfnum líkamshita (e. homeothermic) með samstillingu innri hitamyndunar og stýringu á hitaskiptum við umhverfið. Flest landdýr eru sem næst umhverfisheit. Slík dýr eru oft jafnframt með breytilegan líkamshita (e. poikilothermic) háðan umhverfishitastigi. Sama gildir augljóslega um plöntur og örverur. Tegundir lífvera eru afar mismunandi hvað viðkemur því hitastigssviði sem þau þola, og því hitastigi sem þau búa við að öllu jöfnu. Fiskar við Suðurheimskautslandið (*Notothernioidei*) lifa á mjög þröngu hitastigsbili (e. stenothermic) frá $-1,86^{\circ}\text{C}$ til 2°C , en drepast við 4°C . Tíu til tuttuga milljón ára þróunarsaga í umhverfi sem er nánast ísbað hefur leitt til missis á aðlögunarhæfni, sem jafnvel langvarandi aðlögun getur ekki snúið til baka. Önnur sjávardýr, t.d. dýr í flæðarmálinu, sem

eru á kafi eða á þurru á víxl, geta þurft að þola mikinn hitastigsmun upp á $20\text{--}30^{\circ}\text{C}$ á hverjum sólarhring (e. eurythermic). Viðvermishryggleysingjar og fiskar frá tempruðu beltunum geta haldið líkamstarfseminni gangandi í lágum hita sem samsvarar Suðurheimskautakulda, en jafnframt þolað sambærilegt hitastig og ríkir í líkómum fugla og spendýra. Þetta felur stundum í sér umpólun í genastýringu á tjáningu ensíma með hæfandi virkni [9–11].

4. Hitastig, hvarfhraði og hreyfingar ensíma

Efnahvörf eru sterklega háð hitastigi. Hvarfhraði gróflaga tvöfaldast við 10°C hækkun á hitastigi. Þetta helgast af hvarfgirni efna, sem á upptök sín að stórum hluta í hreyfiorku þeirra. Hraði umbreytingar í myndefni vex með fjölda hvarfefnaeininga sem ná tiltekinni lágmarksorku (virkjunarorku; E_a). Hitastigið ákvarðar hlutfall sameinda í sameindasafni sem nær upp fyrir þetta orkulágmark, en ensím ákveða hversu hátt þetta lágmark er sett. Hlutverk ensíma er því m.a. að stýra flæðihraða um hina ýmsu ferla. Við tiltekið hitastig hvarfast fleiri sameindir þegar ensímið lækkar orkuþröskuldinn E_a (eða nákvæmar sagt virkjunarfrjálsorkuna ΔG^{\neq}).

Hvers vegna eru ensím svona góðir hvatar og hvers vegna er hraði ensímhvataðra hvarfa svona háður hitastigi? Bæði atriðin eiga rætur í sama fyrirbrigðinu. Nauðsynlegar skammtímabreytingar þurfa að verða á byggingarástandi ensíma meðan á hverju einstöku ferli efnahvarfs stendur. Þótt svipmót hvers ensíms birtist með röntgengreiningu á kristöllum sem stöðug mynd, þá er í reynd um safn mismunandi stellinga að ræða í lausn, þ.e. myndin er hreyfð. Í grunnástandi er sífellt flökt eða tíf í innri afstöðu atóma próteinsins, mismikið eftir staðsetningu þeirra. Mestar hreyfingar eru gjarna í lykkjum á yfirborðinu en minnstar hreyfingar dýpst í kjarnanum. Þótt hvarfstöðin sé oft grafin í djúpum lægðum, er hreyfingum einkum beint að henni. Mynd 1 sýnir dæmi til glöggvunar um hreyfingar í próteinasa úr eyðni-veirunni, þar sem borin er saman sú bygging sem fæst við kjarnspunasegulgreiningu í lausn (NMR) annars vegar, og hins vegar bygging fengin með kristalls- greiningu [12]. NMR tæknin gefur fjölda lausna (hér eru 23 mismunandi stellingar sýndar), en kristalla- greining aðeins eina stellingu. Fjölbreytnin í NMR lausnunum er mest á lykkjusvæðum, eins og búast mátti við. Þau svæði mynda lamir og enda á flipa sem leggst yfir hvarfstöðina í virku ástandi ensímsins. Þau



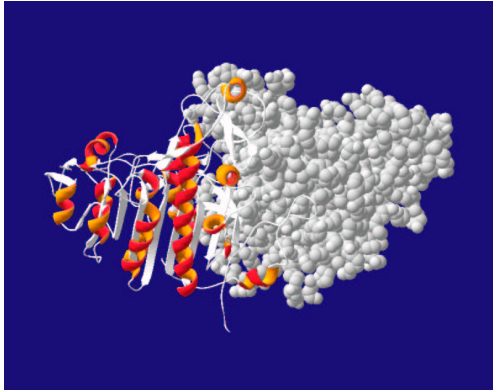
Mynd 1. Próteinasinn úr eyðniveirunni (HIV veiru) með lyf (DMP323) í hvarfstöð. (A) Greining á svipmóti ensímsins í lausn með kjarnspunaaðferð (NMR). Sýndar eru 23 mismunandi útgáfur sem tæknin gaf. (B) Mynd fengin með kristallagreiningu. Ensímið er tvennd (e. dimer) og leggjast tvær eins peptíðkeðjur saman eins og tvíbaka til að mynda hvarfstöðina í miðju. Kringum amínósýru 50 eru endarnir á flípum sem leggjast yfir hvarfstöðina þegar hvarfefnið binst, en hjarinar kringum amínósýru 40 eru staðir sem hreyfast mikið. Hreyfigetan í peptíðkeðjunni er greinilega mismikil eftir staðsetningu innan heildarinnar. Aðeins er meginkeðja próteinsins sýnd (N, C α , CO), en hliðarhópum sleppt. (C) Samanburður á meðaltals NMR byggingu (óslitin lína) og röntgenkristallabyggingu (brotalína). Tekið frá [12].

eru einnig mikilvæg við að binda og losa hvarf- og myndefnin. Meðaltalsmyndin (mynd 1C) sem fékkst úr öllum 23 lausnum NMR greiningar var ekki eins og kristallsmyndin, sem er mjög eftirtektarvert, því lyfjafyrirtæki nota oft kristallagreiningu próteina sem útgangspunkt við hönnun lyfja. Reynolds hefur kennt að ekki eru öll efni góð lyf, sem hafa verið hönnuð til að smella þétt inn í hvarfstöðvar slíkra líkana.

Sá atburður í runuferli efnahvarfs í ensím-hvarfstöð sem er hraðatakmarkandi er í fæstum tilfellum bundinn við sjálft efnahvarfið, þ.e. hreyfingar rafeinda innan efnanna við breytingar á samgildum tengjum. Heldur ræður ferð sá hraði sem ensím nær við að breyta byggingu sinni kringum hvarfstöðina til að starfa í takt við tengingu, umbreytingu og losun tengiefna. Slíkar hreyfingar hafa virkjunarástandsþröskulda, líkt og rof og nýmyndun samgildu tengjanna. Það kallast að ensím hafi náð þróunarlegri fullkomnun þegar nauðsynlegar breytingar á byggingu ensíms með hreyfingum, sem ná að mynda rétt örumhverfi fyrir hvarfið, geta gengið á sama hraða og hámarks hraði sjálfs hvarfskrefsins. Hvarfhraðinn er þá einungis háður flæðihraða hvarfefna að ensíminu og flæðihraða myndefna frá hvarfstöðinni. Þar sem mjög sterkt samband myndast augljóslega milli hreyfigetu byggingarinnar og virkni ensíms, gefst svigrúm til að stilla hvarfhraða ensíma að aðstæðum með þróun á vali amínósýra við byggingu þeirra.

5. Almenn bygging próteina

Fyrir þá lesendur sem ekki eru vanir tungutaki líf-ejnafræðinnar um stig próteinbyggingar má vísa í mynd 2 af alkalískum fosfatasa. Rannsóknir á þessu ensími úr þorski og kaldsjávarörveru standa yfir á Raunvísindastofnun Háskólans nú um stundir. Fyrsta stigs bygging próteins felst í tiltekinni og einstakri amínósýruröð þess próteins. Fullkomin lýsing á þrívíddarstaðsetningu allra atóma og aukapátta innan hvarrar fjölpeptíðkeðju kallast síðan þriðja stigs bygging. Þar á milli eru annars stigs myndform, sem gróflega flokkast í alfa-helixa, beta-fleti, stuttar beygjur, og stærri lykkjur. Tvö síðastnefndu formin eru gjarna tengisvæði milli þeirra tveggja fyrirnefndu. Alkalískur fosfatasi hefur tíu þátta beta-flöt í kjarna sínum, en utan á hann beggja vegna raðast helixar. Mynd 2 sýnir einnig að náttúrulegt form ensímsins samanstendur af tveimur eins peptíðkeðjum, sem límast saman í tvennd (e. dimer) með ósamgildum samloðunarkröftum. Slík samröðun sjálfstæðra peptíðkeðja kallast fjórða stigs bygging. Önnur einingin hefur verið teiknuð með van der Waals rúmtakskúlum allra atóma, en í hinni einingunni sjást annars stigs myndformin sem liggja þar að baki. Samloðun atóma er ekki einsleit í próteinum, heldur myndast sjálfstæðir atómklasar. Má þannig líkja próteinum við vínberjaklasa, þar sem ber á sömu grein hreyfast samtaka, en einstakar greinar geta svo hreyfst ósamtaka.

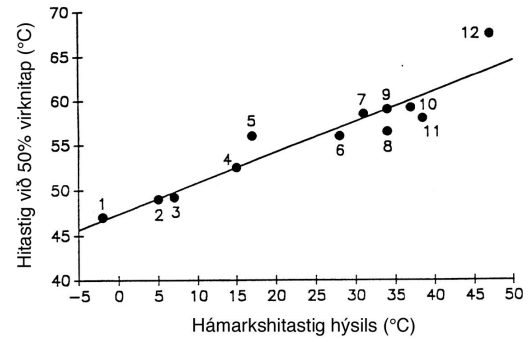


Mynd 2. Líkan af ensími sem skýrir mun á fyrsta stigs, annars stigs, þriðja stigs og fjórða stigs byggingu. Alkalískur fosfatasi hefur tvenndskipulag þar sem tvær eins u.þ.b. hnattlaga peptíðeiningar tengjast samhverft. Slík samröðun eininga er fjórða og efsta stig próteinbyggingar. Hér er hægri einingin sýnd þannig að öll atómin hafa verið teiknuð með van der Waals umfang sitt sýnilegt, en slík lýsing telst vera þriðja stigs bygging próteins. Vinstri einingin er einungis teiknuð sem skematísk lýsing á ferli meginstofns peptíðkeðjunnar gegnum sameindina, og sýnir hún vel deilingu keðjunnar í annars stigs myndform. Hver einstök amínósýruröð telst fyrsta stigs bygging hvers próteins. Hvarfstöðvarnar tvær eru í laut að ofanverðu, u.þ.b. þar sem tvær örvar sjást krossast í vinstri einingunni.

6. Stöðugleiki próteina samsvarar aðlögunarhitastigi

Almennt breytist hreyfigeta próteinsameinda og heildarstöðugleiki í takt. Ástæðan er sú, að prótein eru á mörkum þess að halda myndbyggingu sinni réttri. Munur á orku afmyndaða formsins (þar sem keðjan danglar um sviplaus í lausn) og svipmótaða ástandsins samsvarar einungis örfáum veikum tengjum, þótt þúsundir slíkra tengja finnist í sérhverju fullbyggðu próteini. Hér er átt við krafta sem mynda ósamgild tengi milli atóma, ýmist samdrátt gagnstæðra jónahleðslna, vetnistengi, eða van der Waals samloðunarkrafta. Þetta losaralega samband er nauðsynleg forsenda fyrir virkni ensíma [13] og því er þessu ástandi viðhaldið. Þar sem aukinn hiti mun ætíð þrýsta á afmyndun próteins, kemur ekki á óvart að mældur heildarstöðugleiki próteins fylgir hitastigi hýsilsins eins og mynd 3 sýnir dæmi um [10, 14].

Það verður ljóst út frá því sem á undan er sagt um þann litla mun sem er í frjálssorku svipmótaðs próteins samanborið við frjálssorku sviplausa ástands sama



Mynd 3. Sterk samsvörun er milli heildarstöðugleika próteina og aðlögunarhitastigs. Prótein úr augasteini (crystallin) var einangrað úr ýmsum hryggdýrum og það hitastig sem dugði til að valda tapi á byggingu í helmingi sameindanna eftir 10 mínútur ákvarðað í hverju tilfelli (50%). Samanburður er svo gerður við hæsta hitastigið sem hýsillinn upplifir. Sem dæmi má nefna fisk frá Suðurheimskautinu (punktur 1), tvo djúpsjárvarfiska (punktur 2 og 3), regnbogasilung (punktur 4), tvo froska (punktur 6 og 8), rottu (punktur 10), og hitabeltiseðlu (punktur 12). Upprunið frá [14].

próteins, að stöðugleiki er undir mjög stífum valþrýstingi meðan á þróunaraðlögun stendur við tiltekið hitastig. Mælingar með hringskautuðu ljósi (e. circular dichroism) hafa sýnt að annars stigs bygging skyldra próteinanna er vel varðveitt. Það eru því einkum þau veiku tengsl sem skapast við mótun þriðja stigs og fjórða stig myndbyggingar próteina, sem ráða stöðugleikanum. Þá er átt við að með vali á amínósýrum með tiltekna gerðir hliðarhópa á einstökum stöðum, má stýra heildarstöðugleikanum og einnig stöðugleika tiltekinnna smásvæða í próteininu. Hið síðarnefnda reynist mun nátengdara umræðu um grundvöll hitastigs-aðlögunar á virkni ensíma [13]. Staðbundin losun á samloðun milli atómklasa í ensímum getur leitt til aukinnar hvötunarvirkni, án þess að heildarstöðugleiki ensímans þurfi að breytist á afgerandi hátt [11]. Tilraunir með stökkbreytingar á náttúrulegum ensímum hafa staðfest að mögulegt er að auka stöðugleika ensíms og hvötunarvirknina samstiga [15], þó náttúran hafi ekki séð þörf á slíku við kuldaðlögun.

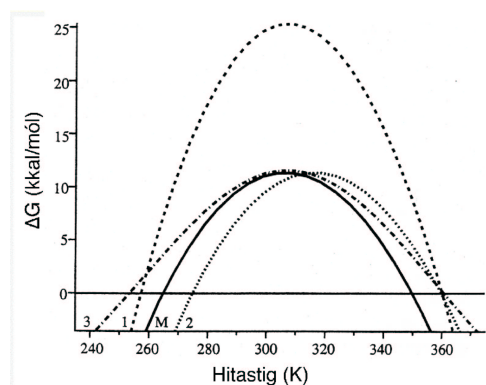
7. Vatnslausnir og vatnsfælni

Eiginleikar þeirra stórsameinda og smásameinda sem finnast í lífverum hafa valist vegna þeirra áhrifa sem vatn hefur á leysanleika þeirra og hvarfgirni.

Mismunandi leysanleiki þeirra 20 ólíku amínósýra, sem nýttar eru við smíði próteina, ákvarðar svipmótun, stöðugleika, og staðsetningu próteina innan frumna. Án vatns hefur amínósýrufjölliða enga tilhneigingu til að þjappast í þetta og starfshæfa byggingu [16]. Í vatni leita fitusæknar (vatnsfælnar) hliðarkeðjur á amínósýrunum saman inn að miðju próteinsins, en skautaðar og hlaðnar hliðarkeðjur (vatnssæknar) una sér vel á yfirborðinu í snertingu við vatnssameindir og setjast því gjarnan þar. Vatnsfælin svæði sem finnast á yfirborði próteina leitast við að sameinast, en þar ræður varmafræði sem tengist að stórum hluta vatninu sjálfu. Vatnssameindir sem liggja að óskautuðum fleti neyðast ella til að mynda reglubundna skel þar sem hreyfingar þeirra „frjósa“. Þetta felur í sér óhagstæða minnkun í óreiðu (e. entropy) og reynt er að losa vatnið úr þessum viðjum með því að minnka heildarflatarmál óskautaðra snertiflata. Vatnsfælni er því sterkur og almennur drifkraftur ýmissa ferla og atburða lifandi kerfa. Peptíðstofninn, þar sem peptíðtengin sjálf liggja saman runutengd í keðju, er einnig vatnssækin. Í hnattlaga próteinum er um helmingur peptíðtengjanna í snertingu við vatnið umhverfis. Ásókn peptíðtengja og hinna ýmsu hliðarhópa á amínósýrunum til að snerta vatnslausnina, eða grafast inn í vatnsfælna miðju próteina, er einnig mjög háð öðrum upplausnarefnum í vatninu. Einstakir hópar atóma í stórsameindum upplifa flóttapörf frá vatnslausninni af tveimur orsökum. Annars vegar er vatnsfælnin (e. hydrophobic interactions) [17], sem er vegna snertingar óskautaðra hópa við vatnssameindir. Hins vegar upplausnarefnisfælni (e. osmophobia), sem stafar af tilvist og gerð uppleystra efna af tiltekinni gerð í vatninu [18].

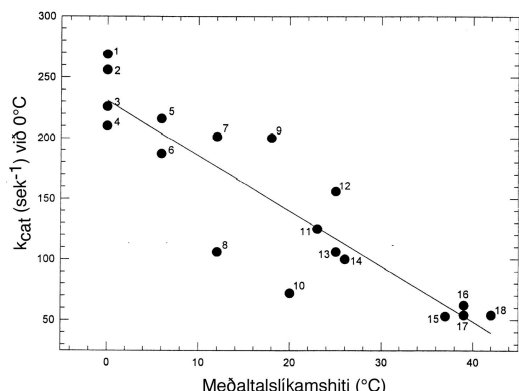
8. Hitastig og stöðugleiki próteina

Líkan sem nær að lýsa stöðugleika margra próteina gerir ráð fyrir aðeins tveimur langlífum ástöndum. Annað er fullkomlega sviplaust ástand en hitt fullkomlega svipmótuð peptíðkeðjan. Ríkir jafnvægisástand þar á milli. Millistig eru ekki einangranleg, því ferlið í báðar áttir er samvirkt (e. cooperative). Það þýðir að ef afmyndun fer af stað á annað borð, fer hún alla leið. Og öfugt. Gibbs-Helmholtz jafna lýsir sambandi hitastigs og virkjunarfrjálsorku afmyndunar (ΔG_u ; u = unfolding). Hún teiknast sem parabóla eins og sýnt er á mynd 4, [19–21]. Hallatalan er $\frac{d\Delta G}{dT} = -\Delta S$ og sýnir ferillinn að hámarksstöðugleikinn (ΔG_{max}) er við hitastigið T_{max} þeg-



Mynd 4. Samband hitastigs og frjálsorkubreytingar samkvæmt Gibbs-Helmholtz jöfnu. Þættir sem kom við sögu í henni eru: $\Delta G = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ + \Delta C_p[T - T^\circ - T \ln(\frac{T}{T^\circ})]$, þar sem T° er viðmiðunarhitastig (oftast T_m , hitastigið sem veldur 50% afmyndun) og ΔH° ásamt ΔS° staðgildi við það hitastig. ΔC_p er munurinn í varmarýmd lausnar með afmynduðum keðjum og rétt svipmótuðum keðjum. Myndin skýrir þrjá möguleika ensíms til aðlögunar að hærra hitastig miðað við miðlungshitakært prótein (ferill M). (1) stöðugleiki hitakæra próteinsins eykst yfir allt hitastigssviðið; (2) Samband ΔG_u og hitastigs gefur sama feril og í M , en T_{max} hliðrast til hærra hitastigs, og (3) ΔG_u er minna háð breytingum í hitastigi og ferillinn verður því flatarari kringum T_{max} og nær hærra. Þannig verður afmyndun ofar og neðar á kvarðanum ($\Delta G = 0$). Upprunið frá [21].

ar $\Delta S = 0$. Síðan minnkar stöðugleikinn við hitastigin báðum megin við T_{max} og fer tvívegis gegnum $\Delta G = 0$ í átt að afmyndun (þegar ΔG_u verður neikvætt gildi). Prótein verða því ekki einungis fyrir afmyndun af ofhitun, heldur afmyndast þau einnig við ofkælingu. Tilraunir styðja þessa niðurstöðu, en vandi er að finna ensímkerfi þar sem afmyndun er fullkomlega afturkræf (e. reversible). Hitun hefur því miður oft þær afleiðingar að afmynduðu keðjurnar kekkjast og eiga þannig ekki afturkvæmt í upprunalegt svipmót. Í fyrstu tilraunum var um samanburð á hitakærum og miðlungshitakærum ensímum að ræða [22], en síðar hefur bæst við dæmi um samanburð á kuldakæru og miðlungshitakæru ensími [23]. Þrjár leiðir bjóðast fyrir ensím til aðlögunar að mjög háum hita samanborið við miðlungshitakært ensím (merkt M á mynd 4). Ferillinn mætti teygja almennt yfir víðara svið (ferill 1), það mætti hliðra T_{max} hámarki ferilsins að hærra hitastigi (ferill 2), eða fletja ferillinn út (ferill 3). Í öllum tilfellum færast afmyndunarhitastigið (T_m



Mynd 5. Samband líkamshita og hraðafastans k_{cat} fyrir laktatdehydrogenasa úr mismunandi hryggdýrum. Tegundirnar eru: fjórar tegundir fiska frá Suðurheimskautilslandi (1-4), tvær fisktegundir frá Suður-Ameríku (5-6); fiskar úr tempraða beltinu (7-10), fiskar úr heittempraða eða hitabeltinu (11-13), nautpeningur (15), hænsnfuglar (16-17) og iguana (græneðla) úr eyðimörk (18). Myndin er upprunin frá [25].

þar sem $\Delta G = 0$) ofar. Mismunandi áhrif á grunnþætti Gibbs jöfnunnar (ΔH_u og ΔS_u) liggja að baki þessum möguleikum [20, 21]. Í hitakærum ensímum koma lausnir 1 og 3 fram í því takmarkaða gagnasafni sem til er [8]. Fyrir kuldavirka ensímið alfa-amýlasi úr *Alteromonas haloplanktis* mældist lækkun í T_m og ΔH_u samanborið við ensím úr miðlungshitakærum og hitakærum örverum, og þar með lækkun í ΔG_u . Ferill 1 reyndist því virka í þessu ensími, en auðvitað á gagnstæðan hátt miðað við áhrif á hitakær ensím (ΔG_u minnkaði yfir allt hitasviðið). Ástæða kuldaafmyndunar er væntanlega minnkun í vatnsfælnum hrifum, sem gagnstætt við hleðslusamdrátt, styrkjast með auknum varma en veikjast við kælingu. Við hátt hitastig hefur aukin entrópíubreyting vatnsfælninnar því meira vægi sem samloðunarkraftur en hagstæðar enthalpíubreytingar við myndun jónískra tengja. Vatnsfælin hrif eru reyndar almennt aðaldrifkraftur rétrar myndbyggingar próteina [24].

9. Breytileiki í hraðaföstum milli tegunda lífvera

Ensímhvötuð hvörf lúta Michaelis-Menten jöfnu, hraðajöfnu fyrir hvarf við mettandi aðstæður sem tengir hvarfhraðann og hvarfefnistyrkinn gegnum tvo fasta. Fyrri mælikvarðinn sem notaður er til að lýsa

hvötunarmætti ensíms er stuðullinn k_{cat} , sem er hraðafasti fyrir umbreytingu hvarfefnis í myndefni í einni hvarfstöð, þegar ensímið vinnur við mettandi styrk hvarfefna. Fastinn mælir því hægasta skrefið í hvarfferlinum. Enda þótt ensím vinni sjaldnast við mettandi aðstæður í frumum, er nytsamlegt að hafa mælikvarða á fræðilegan hámarkshraða þeirra við bestu aðstæður. Mynd 5 sýnir samband meðaltalslíkamshitastigs allmarga lífvera (frá -1,86 til 42°C) og fastans k_{cat} fyrir ensímið laktatdehydrogenasa [25]. Ensímvirkin var mæld í öllum tilfellum við eitt hitastig (0°C) til að fá fram beinan samanburð. Stór hitastigsháður munur kemur fram í k_{cat} gildum, þrátt fyrir að „vélbúnaður“ hvarfstöðvanna sé nákvæmlega eins. Laktatdehydrogenasi úr áður nefndum fiskum frá Suðurheimskautilslandi (*Nototheniae*) hefur t.d. 4–5 falt stærra k_{cat} gildi en sama ensím úr blóðheitum dýrum. Þessi munur kemur einnig fram innan fiskafjölskyldunnar, og er því ekki vegna mismunandi þróunarleiða innan lægri og hærri hryggdýrahópa. Samband milli aðlögunarhitastigs og k_{cat} finnst í öllu þróunartrénu. Sem dæmi eru ensím úr ofurhitakærum (e. hyperthermophilic) örverum nánast óvirk þegar virkin er mæld við hitastig þar sem sambærileg ensím ylkerra (e. mesophilic) örvera er fullvirk [20, 26]. Á Raunvísindastofnun Háskólans hafa hraðafastar verið mældir í gegnum tíðina fyrir allmörg ensím úr meltingarfærum þorsks [1, 27–31], auk ensíma úr kaldsjávarörverum [3, 4]. Þar hafa greinilega komið í ljós þau megineinkenni að hvötunarfastinn (k_{cat}) er að jafnaði 2–5 falt stærri en í sambærilegum ensímum lífvera, sem búa við þrjátíu gráða herra hitastig. Seinni mælikvarðinn sem notaður er til að lýsa hvötunareiginleikum ensíms er K_M . Gróft séð má setja jafnaðarmerki milli K_M og K_s , þar sem K_s er jafnvægisfastinn fyrir tengsl hvarfefnis og ensíms. K_M mælir því sækni ensíms í hvarfefnið. Hátt tölugildi K_M merkir lága sækni. Heildar-hvötunargetan, sem er skilgreind sem k_{cat}/K_M , er því yfirleitt 2–3 falt hærri fyrir kuldaaðlöguðu ensímin, þegar beinn samanburður eru gerður með mælingum við 25°C. Hvötunargetan er besti mælikvarðinn á afkastagetu ensíma við aðstæður þar sem hvarfstyrkurinn er langt fyrir neðan mettunarmörk. Þannig eru raunverulegar starfsaðstæður flestra ensíma. Tilraunir hafa sýnt að K_M stækkar fyrir hvert einstakt ensím, með hækkandi hitastigi. Það er fyllilega í samræmi við það sem áður var sagt um áhrif hitastigs á sveiflur í byggingu

próteina. Það er einnig eftirtektarvert, að K_M gildin eru mjög vel varðveitt þegar K_M gildi tiltekinnar ensím fjölskyldu eru ákvörðuð við líkamshitastig hýsilsins í hverju tilfelli. Það er því ljóst að lífverur reyna allar að viðhalda sama tiltekna K_M sæknigildinu fyrir sérhvert hvarf, þrátt fyrir þær hitastigbreytingar sem orðið hafa í tímans rás í umhverfi þeirra. Það er vissulega skiljanlegt í ljósi þess, að styrkur hinna ýmsu hvarfefna og hjálparefna í frumunum hefur haldist hinn sami í þróunarsögunni (en hefði ella þurft að breytast stórlega). Þessi munur í K_M skýrist út frá mismunandi getu til innri hreyfanleika meðal ensímafríðanna, frekar en breytingum í virkum amínósýrum hvarfstöðvarinnar. Hærra hitastig fjölgar þeim ástöndum sem peptíðkeðja ensíms getur sveiflast á milli og þar af leiðir að fleiri stellingar skapast sem ekki tengja hvarfefnið vel.

Af þeirri staðreynd að í safni ensíma eru sameindirnar með dreifð í byggingu sinni leiðir, að virknin ætti ekki að vera nákvæmlega eins fyrir hverja einstaka sameind. Svo reynist vera. Þar sem mælingum hefur verið við komið, m.a. fyrir alkalískan fosfatasa, kemur í ljós mismunur í hvarfgetu milli ensímsameinda innan safns virkra ensímsameinda [32]. Benda má á smáfirlit eftir undirritaðan um það efni [33].

10. Byggingarlegar ástæður kuldavirkni

Aðlögun próteina að kulda verður með markvissu vali á amínósýrum [34–36]. Hinn aukni sveigjanleiki, sem er nauðsynlegur svo kuldaaðlöguð prótein vinni vel við lágt hitastig, er fenginn með vali amínósýra, sem er að ýmsu leyti andstætt þeim breytingum sem hitakær prótein verða fyrir. Kuldaaðlögun felur í sér hlutfallslega minnkun í umfangi og yfirborði vatnsfælinna amínósýra hið innra, og þar með fækkun van der Waals samloðunarkrafta. Einnig fækkar jónapörum almennt. Á yfirborði kuldavirkra próteina greinist aukning í skautun og hleðslum. Jafnframt er greinileg tilhneyging að sértæku vali. Plúshlöðnum hliðarhópum argíníns fækkar meðan plúshlöðnum lýsínhliðarhópum fjölgar og sömuleiðis fækkar mínushlöðnum glútamiksírum meðan mínushlöðnum aspargínihliðarhópum fjölgar. Vatnsfælum hliðarhópum alaníns fjölgar einnig á yfirborði [35]. Skýringa er enn vant um ástæður þessara skipta. Auðveldara er að skilja fjölgun glýsína á virkum og hreyfanlegum svæðum, sem virðist einkenna öll kuldavirk ensím (meira síðar). Auk þess má greina fækkun í fjölda prólínhliðarhópa, einkum í lykkjum sem tengjast inn á hreyf-

anlega annars stigs byggingarluta próteinsins. Prólín heftir mjög hreyfigetu í næsta nágrenni [1, 8, 25, 34, 37]. Loks má oft merkja að lykkjur kuldavirkra ensíma verði lengri og óskipulegri, sem eykur samskipti próteinsins við leysinn, og losar þannig um innri bygginguna um leið og yfirborðið leitast við að stækka [38]. Vert er að nefna að hvert prótein velur sér sína tilteknu leið við kuldaaðlögun eða hita-aðlögun [20, 36]. Vetriskiptatilraunir (e. hydrogen exchange) sýndu, að innri tengjastyrking í hitakæru ensími var alls ekki staðbundin, heldur dreifð um alla byggingu próteinsins. Þannig sést, að þótt auka megi stöðugleika ensíms með því að hafa staðbundin skipti á einni amínósýru, mun þróun að bestu eiginleikum hugsanlega stýra því þannig, að stöðugleikanum sé náð með dreifðum en smágerðum ávinningi á hverjum stað [39, 40]. Það myndi minnka viðkvæmni gagnvart náttúrulegum stökkbreytingum.

11. Trypsin sem líkan fyrir kuldavirkni

Ensímið trypsin hefur orðið mjög útbreitt líkan fyrir kuldavirkni [2]. Þessi meltingarpróteinasi er í miklu magni í meltingarfærum hryggdýra, og því er auðvelt að nálgast ensímið. Fjölskylda sérínpróteinasa er mjög stór og mörg ensímanna þátttakendur í ferlum sem lyfjafyrirtæki og annar iðnaður hafa áhuga á. Auk þess voru trypsin og aðrir sérínpróteinasar snemma teknir til kristallagreiningar, og þrívíddarbygging ensímanna lengi verið þekkt. Margar stökkbreytingar hafa verið gerðar á þessum ensímunum með það að markmiði að auka skilning á starfsemi þeirra. Kuldavirkni varð snemma einn þeirra þátta sem athyglin beindist að, og varð trypsin úr ýmsum fiskum í brennidepli þessara rannsókna. Nefna má trypsin úr suðurheimskautsfiski [41], Grænlandsporski [42], Atlantshafsporski [1], regnbogasilungi [43], og Atlantshafslaxi [44]. Stórt skref var stigið þegar fyrsta kristallamyndin var leyst fyrir kuldavirkt trypsin úr Atlantshafslaxi [44] og nýlega var ensím úr silungi þrívíddargreint [45]. Jafnframt hafa farið fram ítarlegar rannsóknir á innri mun á amínósýruröðum [37], þrívíddarbyggingu [38], og hæfileika til kvikra hreyfinga [46]. Eins og oft vill verða, má segja að niðurstöðurnar hafi valdið dálitlum vonbrigðum, því séreinkenni kuldavirknu ensímanna koma ekki fram einföld og skýr. Samanburður 27 afbrigða trypsína sýndi að u.þ.b. 50 amínósýrur eru óbreytanlegar af u.þ.b. 245 alls. Megineinkennin sem kuldavirkni afbrigðin höfðu sameiginleg voru þau, að

innvortis þéttni í þökkun atóma og stærð vatnsfælinna hópa minnkaði, og einnig fækkaði prólín hliðarhópum. Breytileiki greindist auk þess í auknum hleðslum á yfirborði og sveigjanleika lykkjusvæða sem liggja út frá hvarfstöðinni. Mismunandi stellingar atóma í tiltekinni lykkju sem kallast „sjálfmeltulykkjan“ greinast í þorskatrypsininu með hliðsjón af nautatrypsini. Hún tekur óbeinan þátt í tengingu hvarfefna og veldur því að aðgengi inn í hvarfstöðina er opnara í kuldavirka ensíminu [45]. C-endinn á trypsini er mótaður í alfa-helix, sem tengir saman tvo klasa ensímsins yfir tengigjá sem hýsir hvarfstöðina. Vetrustengjum milli klasanna tveggja hafði fækkað og einnig vetrustengjum innan hvarfstöðvarinnar. Stöðugleiki og stífleiki þessa C-helixa er minni í kuldavirkum afbrigðum, og viðloðun hans við kjarna ensímsins minni. Þetta gæti ráðið miklu um frjálshreyfingar í sameindunum [38, 46, 47]. Arfberar trypsina eru í nokkrum útgáfum í hryggdýrum og hafa a.m.k. þrjú þorskatrypsin verið einangruð og mæld [4]. Aðrir fiskar og spendýr hafa einnig mörg ísóensím, og enn önnur trypsín leynast greinilega í erfðamengi þorsksins [48, 49]. Sum þessara ensíma virðast vera sérhæfðir bandvefskljúfar (kollagenasar), sem er mjög áhugavert með iðnaðarnot í huga [50].

12. Lokaorð

Í þessu stutta yfirliti hefur ekki verið hægt að greina í smáatriðum frá öllum þeim tilraunum, sem gerðar hafa verið til að afhjúpa einstakar lykilbreytingar í amínósýruröð ensíma, og leitt geta til aukinnar hvötunarvirkni þeirra. Út frá þróunarfræðilegum vangaveltum verður ljóst að stökkbreyting í einu kirni í DNA, og þar með ein amínósýruskipti, ættu að nægja til að kalla fram breytingar á virkni ensíms við hitastigsadlögun. Ef fleiri breytinga væri krafist samtímis minnkuðu líkurnar fyrir slíkum atburðum verulega. Við kuldaadlögun er amínósýran glýsín oft í lykilhlutverki. Hliðarhópur hennar er aðeins eitt vetnisatóm, sem gefur nærliggjandi svæði fjölpeptíðkeðjunnar bæði rými og sveigjanleika. Nýleg dæmi sýna að stökkbreytingar á glýsín á viðkvæmum stað í ensími getur haft áhrif á k_{cat} , K_M , eða á hina réttu svipmótunarleið og þar með haft áhrif á stöðugleika [51, 52]. Tekist hefur að umbreyta hitaþolnu ensími í kuldavirkt með þessum hætti. Þróun ensímsins xylósaísómerasa fór fram í tilraunaglassi (e. directed evolution), þar sem leitast var við að ná fram kuldavirkum eiginleikum inn í hitakært afbrigði

ensímsins úr örverunni *Thermus thermophilus* [52]. Í kuldavirkum afbrigðum fannst alltaf sama stökkbreytingin, glútamíksýru var skipt út fyrir glýsín. Eftirtektarvert var að allar breytingarnar voru á yfirborði sameindarinnar, fjarri hvarfstöðinni, og að þessi eina breyting nægði til að valda fimmföldun í k_{cat} gildi hvarfsins. Fastinn K_M stækkaði líka, sem bar þess vitni að aukinn hreyfanleiki væri orðinn í hvarfstöðinni [52]. Sömu varmafræðilegu kraftar ríkja og stýra svipmótun próteina yfir allt hitastigsbilið sem líf getur þrífist á. Með því að fínstilla þessi áhrif með breytingum í amínósýruröðum próteina hafa sömu ensímhvötuðu ferlin haldist í eðli sín óbreytt í öllu lífríkinu. Þrátt fyrir það, og reyndar þess vegna, hefur lífverum gefist tími og verið gert kleift að finna sér búsvæði á hitastigsbili sem nemur 115°C, allt frá ofurkældum sjó við Suðurheimskautslandið að lífi á ofurheitum hverasvæðum hafsbotns og lands. Hversu mikil þarf breyting á hitastigi að verða til að knýja fram adlögun í lífverunni? Umræða af þessum toga er viðeigandi nú á tímum hækkandi hitastigs á jörðinni. Þegar eru vísbendingar um að dreifing lífvera hafi breyst í kjölfar hitastigsbreytinga á síðustu áratugum [53]. Búast má við að viðbrögð lífvera við breytingum á hitastigi vistkerfisins verði blanda af beinum áhrifum hitastigs á próteinin í henni og hæfni þeirra til að flytja sig um set til hentugra hitastigs. Óvissa getur því ríkt um ástæður flutnings lífvera milli misheitra búsvæða. Þó er vitað að hitastigsmunur upp á fáeinar gráður nægir í sumum tilfellum til að hvetja til adlögunarviðbragða í amínósýruröð próteina [9]. Samanburður á staðsetningu einstakra amínósýra og tengslum þeirra við umhverfið gefur tilefni til að ætla að munur milli ensíma ólíkra hitastigsheima sé dreifður víða um byggingu þeirra, og því oft það fingerður að hann verður næsta óljós með samanburði á þeim kyrrmyndum sem bjóðast. Sem dæmi hafa tölvureikningar (e. molecular dynamics simulations) sýnt að trypsin laxfiska virðist ekkert sveigjanlegra eða hreyfanlegra í heildina séð í samanburði við trypsin nautpenings [46]. Ef hvarfstöðin er greind sérstaklega kemur í ljós, að hún er bjaganlegri og ætti að bjóða upp á meiri og örari hreyfanleika. Það myndi greinilega nægja til að lækka orkuþörf við tengingu hvarfefnis og eftirfarandi hvötun. Eitt meginatriði sem talið er stýra vali á amínósýrum í próteini til langs tíma, auk áhrifa á virkni og stöðugleika, er það hversu auðveldlega próteininu tekst að svipmótast með skilvirk-

um hætti, þ.e. fléttast úr langri keðju amínósýra í aðeins eitt tiltekið þrívíddarástand. Þótt hagstæð varmafræðileg breyting þurfi að vera til staðar *a priori* sem aðaldrífkraftur svípmótunarferlisins, nægir það ekki. Auk þess verður að vera til hröð svípmótunarleið (kínétískt fær leið), sem ekki felur í sér langar tafir þar sem keðjan „festist“ í flæktu formi millistiga, sem e.t.v. eru „öngstræti“ út frá réttri slóð. Ýmis hjálparprótein eru til staðar í frumum til að styðja þetta ferli, en grunngetan þarf að vera til staðar í próteininu sjálfu, fólgin í amínósýruröð þess.

Notagildi ensíma í iðnaði hefur oft verið rakið í ræðu og riti [55-57]. Megineiginleiki slíkra ensíma ætti að vera há hvötunargeta við miðlungsháan hita. Sá eiginleiki einkennir kuldaaðlöguð ensím umfram hitaþolin ensím. Á síðustu árum hefur jafnframt orðið ljóst, að það er mögulegt að auka stöðugleika kuldavirkra ensíma mjög mikið umfram náttúrulegan stöðugleika, án þess að það komi niður á virkni þeirra. Það krefst þó þess að fyrir sé skilningur á innstu gerð ensímanna, sem einungis verður aflað með grunnrannsóknunum. Óskandi er að viðleitni okkar til að vita meira um þessi sérhæfðu ensím muni styrkjast í náninni framtíð með efdum rannsóknum á íslenskum stofnunum. Það er að lokum áhugavert að íhuga hvort kuldavirk ensím séu nálægt uppruna lífs eða hafi þurft að þróast lengst frá þeim lífverum sem e.t.v. urðu fyrstar til í heitum neðansjávarhverum. Enn eru ekki allir sammála um líklegt umhverfi við myndun lífvera í árdaga, ef því er trúað að uppruni þeirra sé yfirleitt á þessum hnetti. Þótt ættartré lífsins virðist eiga sér rætur í hitaþolinum fornörverum (*Archea*), segir það ekki alla söguna, því það tekur ekki til útdauðra tegunda. Ef tekið er mið af mikilvægi veikra krafta við að móta byggingu og samskipti sameinda, er líklegra að fyrstu lífverurnar hafi dafnað við lágt hitastig [54]. Það gerir kuldavirk ensím formæður allra annarra ensíma, og því áhugaverð viðmiðunarensím rannsókna.

Þakkir Rannsóknir okkar hafa verið styrktar fé úr Rannsóknarsjóði Háskóla Íslands og Vísindasjóði Rannsóknarmiðstöðvar Íslands (RANNÍS), auk framlags frá Háskóla Íslands.

Summary Cold-adapted organisms live in all the most extreme locations on earth, both in the oceans and on dry land. Enzymes from such organisms have evolved through the millennia to create sufficient metabolic rates for the maintenance of life. Compared with their counterparts from warm temperature organisms, including thermophilic

bacteria, the catalytic efficiency of cold-active enzymes is generally 2–5 times higher when measured at a suitable common temperature. The basic structural difference is believed to entail a reduction in the number and strength of weak, non-covalent interactions that maintain the three-dimensional structure of all proteins. Also, the selection of specific amino acids, such as glycines in favour of prolines, creates structures with higher inherent flexibility that allows more dynamic movement at low temperatures. The vibrant interchange of similar conformations is an absolute necessity in directing reactants a facile route to products. At the same time these enzymes are not as heat-tolerant as enzymes adapted to higher temperature. This review summarizes these concepts with reference to research done at the University of Iceland and elsewhere.

Heimildir

- [1] Ásgeirsson, B., Fox, J.W. and Bjarnason, J.B. (1989) *Eur J Biochem* **180**, 85-94
- [2] Kristjánsson, M.M., Ásgeirsson, B. and Bjarnason, J.B. (1997) *Adv Exp Med Biol* **415**, 27-46
- [3] Kristjánsson, M.M., Magnússon, Ó.T., Gudmundsson, H.M., Alfredsson, G.A. and Matsuzawa, H. (1999) *Eur J Biochem* **260**, 752-760
- [4] Hauksson, J.B., Andrésson, Ó.S. and Ásgeirsson, B. (2000) *Enz Microbial Technol* **27**, 66-73
- [5] Ásgeirsson, B., Hauksson, J.B. and Gunnarsson, G.H. (2000) *Eur J Biochem* **267**, 6403-6412
- [6] Benjamin, D.C., Kristjansdóttir, S. and Gudmundsdóttir, A. (2001) *Eur J Biochem* **268**, 127-131
- [7] Irwin, J.A., Gudmundsson, H.M., Marteinsson, V.T., Hreggvidsson, G.O., Lanzetti, A.J., Alfredsson, G.A. and Engel, P.C. (2001) *Extremophiles* **5**, 199-211
- [8] Kristjánsson, M.M. and Ásgeirsson, B. (2002) *Properties of extremophilic enzymes and their importance in food science and technology*, Marcel Dekker, Inc., New York pp. 77-100
- [9] Hochachka, P.W. and Somero, G.N. (2002) *Biochemical Adaptation*, Oxford University Press, New York
- [10] Somero, G.N. (1995) *Ann Rev Physiol* **57**, 43-68
- [11] Fields, P.A. (2001) *Comp Biochem Physiol* **129A**, 417-431
- [12] Yamazaki, T., Hinck, A.P., Wang, Y.X., Nicholson, L.K., Torchia, D.A., Wingfield, P., Stahl, S.J., Kaufman, J.D., Chang, C.H., Domaille, P.J. and Lam, P.Y. (1996) *Protein Sci* **5**, 495-506
- [13] Závodszy, P., Kardos, J., Svingor, Á. and Petsko, G.A. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 7406-7411
- [14] McFall-Ngai, M.J. and Horwitz, J. (1990) *Exp Eye Res* **50**, 703-709

- [15] Miyazaki, K., Wintrode, P.L., Grayling, R.A., Rubingh, D.N. and Arnold, F.H. (2000) *J Mol Biol* **297**, 1015-26
- [16] Schellman, J.A. (2002) *Biophys Chem* **96**, 91-101
- [17] Chandler, D. (2002) *Nature* **417**, 491
- [18] Timasheff, S.N. (1992) in *Stability of Protein Pharmaceuticals*, Pt B, vol. 3 (Ahern, T.J. and Manning, M.C., eds), pp. 265-285, Plenum Publishing Corp, New York
- [19] Becktel, W.J. and Schellman, J.A. *Biopolymers* **26**, 1859-1877
- [20] Jaenicke, R. and Böhm, G. (1998) *Curr Opin Struct Biol* **8**, 738-748
- [21] Beadle, B.M., Baase, W.A., Wilson, D.B., Gilkes, N.R. and Shoichet, B.K. (1999) *Biochemistry* **38**, 2570-2576
- [22] Nojima, H., Hon-Nami, K., Oshima, T. and Noda, H. (1978) *J Mol Biol* **122**, 33-42
- [23] Feller, G., d'Amico, D. and Gerday, C. (1999) *Biochemistry* **38**, 4613-4619
- [24] Franks, F. (1995) *Adv Protein Chemistry* **46**, 105-139
- [25] Fields, P.A. and Somero, G.N. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 11476-11481
- [26] Jaenicke, R. (1991) *Eur J Biochem* **202**, 715-728
- [27] Ásgeirsson, B. and Bjarnason, J.B. (1991) *Comp Biochem Physiol* **99B**, 327-335
- [28] Ásgeirsson, B. and Bjarnason, J.B. (1993) *Biochim Biophys Acta* **1164**, 91-100
- [29] Kristjánsson, M.M., Gudmundsdóttir, S., Fox, J.W. and Bjarnason, J.B. (1995) *Comp Biochem Physiol* **110B**, 707-717
- [30] Ásgeirsson, B., Hartemink, R. and Chlebowski, J.F. (1995) *Comp Biochem Physiol* **110B**, 315-329
- [31] Ásgeirsson, B., Thórolfsson, M., Leth-Larsen, R. and Højrup, P. (1998) *Eur J Biochem* **255**, 638-646
- [32] Xue, Q. and Yeung, E.S. (1995) *Nature* **373**, 681-683
- [33] Ásgeirsson, B. (1998) *Snefill, blað efnafræðinema við Háskóla Íslands* **5**, 14-17
- [34] Feller, G. and Gerday, C. (1997) *Cell Mol Life Sci* **53**, 830-841
- [35] Gianese, G., Argos, P. and Pascarella, S. (2001) *Protein Eng* **14**, 141-148
- [36] Gianese, G., Bossa, F. and Pascarella, S. (2002) *Proteins* **47**, 236-249
- [37] Leiros, H.K., Willassen, N.P. and Smalås, A.O. (1999) *Extremophiles* **3**, 205-219
- [38] Leiros, S., H.-K., Willassen, N.P. and Smalås, A.O. (2000) *Eur J Biochem* **267**, 1039-1049
- [39] Hollien, J. and Marqusee, S. (2002) *J Mol Biol* **316**, 327-340
- [40] Taverna, D.M. and Goldstein, R.A. (2002) *J Mol Biol* **315**, 479-484
- [41] Genicot, S., Feller, G. and Gerday, C.H. (1988) *Comp Biochem Physiol* **90B**, 601-609
- [42] Simpson, B.K. and Haard, N.F. (1984) *Comp Biochem Physiol* **79B**, 613-622.
- [43] Kristjánsson, M.M. (1991) *J Agric Food Chem* **39**, 1738-1742
- [44] Smalås, A., Hordvik, H., Hansen, L.K.R., Hough, E. and Jynge, K. (1990) *J Mol Biol* **214**, 355-358
- [45] Toyota, E., Ng, K.K., Kuninaga, S., Sekizaki, H., Itoh, K., Tanizawa, K. and James, M.N. (2002) *J Mol Biol* **324**, 391-397
- [46] Brandsdal, B.O., Heimstad, E.S., Sylte, I. and Smalås, A.O. (1999) *J Biomol Struct Dyn* **17**, 493-506
- [47] Heimstad, E.S., Hansen, L.K. and Smalås, A.O. (1995) *Protein Eng* **8**, 379-388
- [48] Gudmundsdóttir, A., Gudmundsdóttir, E., Oskarsson, S., Bjarnason, J.B., Eakin, A.K. and Craik, C.S. (1993) *Eur J Biochem* **217**, 1091-1097
- [49] Spillaert, R. and Gudmundsdóttir, A. (2000) *Mar Biotechnol* **1**, 598-697
- [50] Briem, E., Ólafsdóttir, S., Fox, J.W. and Bjarnason, J.B. (1999), Abstract in: *Proteolytic processing and physiological regulation* Arnold and Mabel Beckman Centre of the National Academies of Sciences and Engineering, Irvine, California
- [51] Hornby, J.A., Luo, J.K., Stevens, J.M., Wallace, L.A., Kaplan, W., Armstrong, R.N. and Dirr, H.W. (2000) *Biochemistry* **39**, 12336-12344
- [52] Lonn, A., Gardonyi, M., van Zyl, W., Hahn-Hagerdal, B. and Otero, R.C. (2002) *Eur J Biochem* **269**, 157-63
- [53] Hughes, L. (2000) *Trends Ecol Evolut* **15**, 56-61
- [54] Bada, J.L. and Lazcano, A. (2002) *Science* **296**, 1982-1983
- [55] Madigan, M.T. and Mairs, B.L. (1997) *Scientific American* **April 1997**, 66-71
- [56] Gerday, C., Aittaleb, 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) *TIBTECH* **18**, 103-107
- [57] Schmid, A., Hollmann, F., Park, J.B. and Buhler, B. (2002) *Curr Opin Biotechnol* **13**, 359-366

Um höfundinn: Bjarni Ásgeirsson er dósent í líffefnafræði við Háskóla Íslands.

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

Móttekin: 18. mars 2003