



Niektóre przyczyny unikatowej oporności cieplnej hipertermofili

Beata Grzybowska, Józef Synowiecki

Katedra Chemii i Technologii Żywności, Wydział Chemiczny
Politechnika Gdańska, Gdańsk

Some factors affecting the unique thermotolerance of hyperthermophiles

Summary

The unique thermotolerance of hyperthermophiles, suitable as valuable sources of thermostable enzymes, is a result of various minor changes which led to the restriction of protein flexibility and modifications of nucleic acids and membrane lipids. Furthermore, all hyperthermophiles produce a number of heat shock proteins and thermoprotectants. Thermal resistance of these microorganisms is also enhanced by rapid resynthesis of thermolabile compounds and by elimination of such intermediates from cell metabolism.

Key words:

hyperthermophiles, archae, protein thermostability, biotechnology.

1. Wstęp

Hipertermofile opanowały niedostępne dla innych drobnoustrojów biotopy o temperaturze przekraczającej 80°C, w której następuje drastyczne zmniejszenie stabilności pochodzących z mezofili białek, kwasów nukleinowych, koenzymów, błon biologicznych i wielu innych istotnych składników komórek. Nie wyklucza to jednak możliwości rozwoju niektórych hipertermofilnych archeonów rodzaju *Pyrolobus*, *Pyrodictum*, *Hyperthermus*, *Pyrobaculum* i *Pyrococcus* nawet w temperaturach 102-113°C (1-3). Tak duża oporność cieplna tych mikroorganizmów jest możliwa z powodu ograniczenia metabolizmu tlenowego, zwiększenia stabilności elementów budulcowych komórek poprzez udosko-

Adres do korespondencji

Józef Synowiecki,
Katedra Chemii
i Technologii Żywności,
Wydział Chemiczny,
Politechnika Gdańska,
ul. Gabriela Narutowicza
11/12,
80-952 Gdańsk.

biotechnologia

2 (61) 192-205 2003

nalanie ich struktury lub oddziaływanie substancji zabezpieczających, wyeliminowania szlaków metabolicznych przebiegających z udziałem szczególnie termolabilnych intermedatów lub koenzymów oraz przyspieszenia przemian termolabilnych związków pośrednich.

Zwiększenie ciśnienia hydrostatycznego nie tylko zapobiega wrzeniu znajdujących się w komórkach roztworów, ale też stabilizuje strukturę białek i kwasów nukleinowych. Jest to zapewne przyczyną zaobserwowanego pod ciśnieniem 22 MPa wzrostu o 2°C optymalnej temperatury rozwoju *Pyrococcus furiosus* (4). Beztlenowy rozwój większości hipertermofili wynika m.in. ze zmniejszenia rozpuszczalności, a w konsekwencji dostępności tlenu w podwyższonej temperaturze. Ogranicza to możliwość przystosowania się aerobowych hipertermofili do temperatur przekraczających 85-90°C. Niewykorzystywanie tlenu jest prawdopodobnie zakonserwowaną cechą pochodzącą od pierwotnych drobnoustrojów żyjących w czasie, gdy atmosfera Ziemi nie zawierała jeszcze tego pierwiastka i dopiero później do środowiska tlenowego przystosowały się kwasolubne archeony rodzaju *Sulfolobus*, *Stygiolobus*, *Metallosphaera* i *Acidianus* (5,6).

Molekularne mechanizmy zapewnienia oporności cieplnej białek, kwasów nukleinowych, lipidów i innych istotnych substancji są dość zróżnicowane i zależą zarówno od filogenezy mikroorganizmu jak też od rodzaju stabilizowanego składnika (tab. 1).

Tabela 1

Niektóre sposoby adaptacji termofili do środowiska o podwyższonej temperaturze

Sposób adaptacji	Literatura
wytwarzanie białek szoku cieplnego wiążących zdenaturowane termicznie białka, zabezpieczając je przed agregacją oraz przywracając im aktywną fizjologiczną strukturę	(7,8)
stabilizacja cząsteczek DNA wskutek wyższego niż w komórkach mezofili stężenia K ⁺	(6)
zabezpieczenie dwuniciowej helisy DNA przed rozpleceniem w podwyższonej temperaturze za pomocą rozmaitych histonopodobnych białek	(9)
ukształtowanie dodatniego superskręcenia helisy katalizowanego odwrotną gyrzą DNA	(10)
występowanie specyficznych białek zabezpieczających prawidłową transkrypcję w podwyższonej temperaturze	(13)
szybka resynteza ATP, reszt niektórych aminokwasów oraz innych termolabilnych składników komórki	(6)
zastąpienie estrów kwasów tłuszczowych i glicerolu, występujących w błonach cytoplazmatycznych mezofili, eterami glicerolowymi izoprenoidów alkilowych z resztami C ₂₀ -fitanyłowymi lub C ₂₀ -bifitanyłowymi oraz „wprowadzenie” lipidów zawierających węglowodory izoprenoidowe C ₁₅ i C ₁₆	(11,12)
zastąpienie peptydoglikanu występującego w ścianach komórkowych mezofili pseudomureiną, białkami lub polisacharydami	(11,12)
modyfikacje niektórych grup prostetycznych i koenzymów	
synteza trehalozy i innych stabilizatorów cząsteczek	(14,15)

Obecnie prowadzone są dość intensywne badania przydatności niektórych hipertermofili jako źródła termostabilnych enzymów użytecznych, np. w przetwórstwie polisacharydów, białek, amplifikacji DNA i w kilku innych dziedzinach. Produ-

kowane obecnie preparaty termostabilnych α -amylaz stosuje się m.in. do upłynnienia skrobi oraz do usuwania apretur z tkanin i zagęstników skrobiowych z płuczek wiertniczych. Termostabilne proteazy są natomiast składnikiem niektórych środków piorących i płynów do zmywania naczyń, służą do upłynniania żelatynowego nośnika podczas odzyskiwania bromku srebra ze zużytych emulsji fotograficznych oraz katalizują syntezę aspartamu. Utrudnieniem wytwarzania termostabilnych enzymów jest niewielka wydajność hodowli i konieczność jej prowadzenia zazwyczaj w beztlenowych warunkach, nakłady energii na ogrzanie pożywki oraz częste wydzielanie szkodliwych lub działających korozyjnie metabolitów. Ponadto produkty reakcji Maillarda, gromadzące się w pożywce w podwyższonej temperaturze, hamują rozwój drobnoustrojów i zmniejszają wydajność hodowli. Dlatego hipertermofile wykorzystuje się najczęściej tylko jako źródło genu kodującego wytwarzanie stabilnych cieplnie białek, klonowanego do komórek mezofilnego gospodarza. Zastąpienie dotychczas stosowanych enzymów ich termostabilnymi odpowiednikami zapobiega niepożądanemu zanieczyszczeniu mikrobiologicznemu reaktora, zwiększa szybkość i wydajność reakcji, wydłuża okres połowicznej inaktywacji enzymu oraz zmniejsza lepkość roztworów substratu umożliwiając zwiększenie ich stężenia, a w konsekwencji obniżenie kosztu procesu. Duże stężenie substratu jest też korzystne, np. w reakcjach transglikozylacji oraz przy wytwarzaniu plastein. Ponadto mała aktywność termostabilnych enzymów w obniżonej temperaturze umożliwia zakończenie procesu poprzez oziębienie środowiska reakcji. Aktualnie najlepiej poznano przyczyny termostabilności białek enzymatycznych, natomiast mechanizmy wzrostu oporności cieplnej kwasów nukleinowych, błon biologicznych i innych substancji znajdujących się w komórkach termofili są dotychczas mniej zbadane.

2. Kwasy nukleinowe

W temperaturze rozwoju hipertermofili nasila się możliwość topnienia helikalnej struktury DNA i powstania licznych uszkodzeń jego cząsteczek. Polegają one głównie na rozszczepieniu wiązań N-glikozydowych łączących zasady purynowe i pirymidynowe z fosforanowo-cukrowym rdzeniem oraz na deaminacji tych zasad, powodującej zakłócenia kodu genetycznego. Najłatwiej przebiega deaminacja cytozyny prowadząca do wytworzenia nietypowego dla DNA uracylu i występującej u prokariotów 5-metylocytozyny, przekształcającej się w tyminę (16). Wymienione uszkodzenia są przypuszczalnie usuwane przez podobny jak u mezofili, ale aktywniej działający, układ endonukleazy, glikozydazy uracylowej oraz polimerazy i ligazy DNA.

Niepożądanemu rozpleceniu dwuniciowego DNA zapobiega zwiększenie udziału par guanina-cytosyna w cząsteczce, tworzenie się superhelikalnej struktury DNA oraz oddziaływania z histonopodobnymi białkami. Duże znaczenie ma też stabilizacja struktury DNA jonami K^+ , których źródłem jest 2,3-dwufosfoglicerynian potasu

(K₃cDPG). Stężenie tych kationów w komórkach rozmaitych termofili różni się dość znacznie, zależnie od rodzaju mikroorganizmu i największą wartość (2,3 M) osiąga przypuszczalnie u *Methanopyrus kandleri* (17). Żaden z wymienionych mechanizmów nie jest jednak dominujący i zwiększenie oporności cieplnej DNA jest najczęściej efektem współdziałania wielu różnych czynników. Przyczyną większej stabilności par GC jest tworzenie się m.in. aż trzech wiązań wodorowych, podczas gdy tymina i adenina łączą się za pośrednictwem tylko dwóch wiązań. Wzrost zawartości guaniny i cytozyny jest przyczyną zwiększenia temperatury topnienia dwuniciowej helisy DNA do 100°C w przypadku około 78% udziału par wymienionych zasad (16). Tak duża ilość par GC jest jednak rzadko spotykana i u większości hipertermofili wynosi od 33 do 66% (10). Do zabezpieczenia DNA przed denaturacją przyczynia się też wytwarzanie dodatniego superskręcenia, zwiększającego liczbę oddziaływań stabilizujących podwójną helisę (10,16). Zainicjowanie wytworzenia takiej struktury plazmidowego DNA (pBR 322) w reakcji katalizowanej odwrotną gyrazą (topoizomerazą I) z *Methanopyrus kandleri* nie dopuszczało do rozplecenia podwójnej helisy nawet w 122°C (18). Występowanie odwrotnej gyrazy u wszystkich hipertermofili świadczy o skuteczności i rozpowszechnieniu wymienionego sposobu stabilizowania ich materiału genetycznego.

Wytwarzane przez termofilne archeony i bakterie białka stabilizujące superheliczną strukturę DNA charakteryzują się, podobnie jak histony z komórek eukariotycznych, niewielką masą cząsteczkową, przejawianym w środowisku obojętnym dodatnim ładunkiem powierzchni cząsteczek oraz dużym powinowactwem do DNA. Białka te cechuje dość duża oporność cieplna zapewniająca trwałość ich kompleksów z DNA w temperaturze rozwoju mikroorganizmu, z którego pochodzą (19). W przeciwieństwie do histonów eukariotycznych głównym zadaniem wymienionych białek jest zabezpieczenie DNA przed cieplną denaturacją, a nie zwiększenie stopnia jego upakowania.

Niewiele jeszcze wiadomo o mechanizmach zapewniających wzrost oporności cieplnej RNA z hipertermofili. Cząsteczki tej substancji są mniej odporne od DNA na działanie podwyższonej temperatury ze względu na występowanie w nich rybozy zamiast bardziej termostabilnej deoksyrybozy. Dotychczas wykazano, że dość duże znaczenie ma metylacja reszt rybozy oraz inne modyfikacje nukleotydów (20). W komórkach *Sulfolobus* strukturę rybosomów i dwuniciowej helisy DNA stabilizują spermina, putrescyna, spermidyna, norspermidyna i ewentualnie inne poliaminy (10).

3. Mechanizmy naprawcze i substancje ochronne

Po przekroczeniu optymalnej temperatury rozwoju hipertermofili znacznie intensyfikuje się w ich komórkach wytwarzanie białek szoku cieplnego (HSP). Chaperony te rekonstruują pierwotną strukturę częściowo rozfałdowanych w podwyższonej temperaturze białek i zabezpieczają je przed agregacją (21,22). Cząsteczki

o zbyt dużej ilości uszkodzeń są naznaczone przez związanie z ewolucyjnie bardzo konserwatywnymi białkami o masie 8,5 kDa, a następnie hydrolizowane (16,23). Pewna ilość HSP jest jednak wytwarzana konstytutywnie, co jak się zdaje, potwierdza ich udział w prawidłowym zwijaniu wytworzonych w rybosomach polipeptydów (24). W przeciwieństwie do innych organizmów syntetyzujących wiele różnych białek szoku cieplnego, u hipertermofili dominuje wytwarzanie dwóch form HSP o masie cząsteczkowej 60 kDa (21,22). Ich zawartość u *Sulfolobus shibatae* oraz w komórkach jednego z najbardziej termofilnych archeonów *Pyrodictium occultum* wzrasta wskutek szoku cieplnego odpowiednio do 12 lub 76% ogólnej ilości białek (25). Nagromadzenie się HSP wywołane podwyższeniem temperatury hodowli archeona *Sulfolobus shibatae* z 70 do 88°C wydłuża życie mikroorganizmu w temperaturze letalnej (92°C) o około 2 h (21). Znaczna część HSP gromadzi się na błonach biologicznych. W badaniach przeprowadzonych w NASA Ames Research Center wykazano, że HSP zapobiegają letalnemu dla komórek wzrostowi przepuszczalności tych błon dla protonów oraz rozmaitych jonów (26). Przyczyną nadmiernego „przecieku” jonów jest prawdopodobnie wbudowywanie się w warstwę lipidowe błony hydrofobowych fragmentów białek wyeksponowanych wskutek rozfałdowania ich cząsteczek podczas termicznej denaturacji. Tworzą się w ten sposób w błonie nowe kanały pozbawione zdolności do selektywnego transportu jonów. Wzrost przepuszczalności błon lipidowo-białkowych powoduje zmiany gradientu protonowego inicjujące syntezę HSP, które wiążąc zdenaturowane białka zapobiegają ich niepożądanemu wnikaniu w strukturę błon (13,27). Szybkie zwiększenie ilości białek szoku cieplnego umożliwia w ten sposób przeżycie komórkom przez czas niezbędny do uruchomienia innych mechanizmów adaptacyjnych.

Hipertermofile wytwarzają rozmaite substancje zabezpieczające ich elementy budulcowe przed oddziaływaniem podwyższonej temperatury. Jedną z nich jest trehaloza, nieredukujący α -D-glukopiranozylo-1- α -glukopiranozyd syntetyzowany pod wpływem szoku cieplnego w komórkach wielu mikroorganizmów. Trehaloza podobnie jak chaperony HSP zabezpiecza białka przed agregacją oraz stabilizuje rozmaite błony biologiczne. Przyczyną oddziaływania stabilizującego jest asocjacja cząsteczek cukru na białkach lub błonach za pośrednictwem wiązań wodorowych, utworzonych pomiędzy grupami hydroksylowymi trehalozy a resztami aminokwasowymi białek lub fosfolipidów błonowych (28). Syntezę trehalozy stwierdzono, np. u hipertermofilnych archeonów *Sulfolobus shibatae* i *Sulfolobus solfataricus* (29,30) i w kilku gatunkach *Thermus* (31,32). Podobnie jak w przypadku innych mikroorganizmów, po zaniku stresu następuje jednak szybkie i znaczne zmniejszenie zawartości trehalozy w cytozolu. Wiele substancji stabilizujących charakteryzuje się dużą specyficznością, zabezpieczając tylko niektóre rodzaje ważnych fizjologicznie białek. Takie oddziaływanie wykazuje m.in. występujący u *Methanothermus fervidus* i *Methanopyrus kandleri* cykliczny 2,3-dwufosfoglicerynian (cDPG) lub dwu-inozytylo-1,1'-fosforan (DIP) wytwarzany np. przez *Pyrococcus woesei*, *Archeoglobus fulgidus* oraz *Thermotoga maritima* (33-35). Zarówno cDPG, jak i DIP opóźniają ciepłą denaturację oksydoreduktazy

aldehydu 3-fosfoglicerynowego, a cDPG stabilizuje ponadto dehydrogenazę jabłczanową. Wzrost stężenia cDPG i DIP pod wpływem szoku cieplnego zaobserwowano np. w komórkach *Methanothermus fervidus* i *Pyrococcus furiosus* (33,36).

4. Modyfikacje metabolizmu

Szlaki metaboliczne hipertermofili charakteryzują się ograniczeniem wykorzystania szczególnie termolabilnych związków pośrednich oraz wyeliminowaniem uczestniczących w ich przemianach enzymów. W komórkach *Pyrococcus*, *Sulfolobus* i *Thermoplasma* glukoza jest utleniana do pirogronianu bez fosforylowania (37,41), natomiast konwersja acetylokoenzymu A do octanu przebiega z pominięciem tworzenia termolabilnego acetylofosforanu. Zmniejszony jest także udział nukleotydów nikotynamidoadeninowych zastąpionych w wielu reakcjach ferredoksyną. Białko to, pełniące funkcję przenośnika oksydoredukcyjnego jest bardziej termostabilne od NADH i NADPH i prawie nie zmienia się po 12 h inkubacji w temperaturze 95°C (38). Ferredoksyna wytwarzana przez hipertermofile różni się od analogicznej substancji z innych organizmów większą liczbą wiązań wodorowych, zmianami rozmieszczenia i udziału niektórych reszt argininy, histydy, lizyny i metioniny oraz długością domen o strukturze łańcuchowej i α -helisy (39). Pomimo dość dużej termolabilności w temperaturach około 100°C nie nastąpiło jednak zupełne wyeliminowanie nukleotydów nikotynamidoadeninowych ze szlaków metabolicznych hipertermofili, co sugeruje, że w ich komórkach istnieją niezbyt jeszcze dokładnie rozpoznane mechanizmy stabilizacji tych związków.

Poza zwiększeniem oporności cieplnej nie stwierdzono w większości przypadków różnic molekularnego mechanizmu katalizy pomiędzy enzymami z hipertermofili i mezofili (40,41). Pewnym wyjątkiem są zawierające wolfram enzymy utleniające aldehydy wytwarzane w końcowym etapie katabolizmu peptydów oraz uczestnicząca w glikolizie oksydoreduktaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, występująca w komórkach *Pyrococcus furiosus* i przypuszczalnie innych hipertermofilnych archeonów (41). Zastąpienie molibdenu prawie nie spotykanym w innych organizmach wolframem umożliwia utlenianie aldehydów w temperaturze około 100°C, które ze względu na jeden z najniższych spotykanych w układach biologicznych potencjałów oksydoredukcyjnych nie jest katalizowane w podwyższonej temperaturze enzymami zawierającymi molibden (41). Przenośnikiem elektronów współdziałającym z wymienionymi oksydoreduktazami jest ferredoksyna. Charakterystyczną cechą wszystkich zawierających wolfram enzymów jest ich całkowita inaktywacja w środowisku tlenowym.

Cieplnej degradacji substancji pośrednich zapobiega też występowanie w cytozolu mikrostruktur umożliwiających szybkie przekazywanie intermediatów pomiędzy cząsteczkami enzymów uczestniczących w szlaku metabolicznym (13). Końcowymi produktami hydrolizy oligosacharydów lub peptydów, katalizowanej wydzie-

lanymi przez hipertermofile pozakomórkowymi glikozydazami i proteazami są dwusacharydy oraz małowcząsteczkowe peptydy. Związki te są mniej termolabilne od glukozy i niektórych aminokwasów uwalnianych dopiero wewnątrz komórek w środowisku zabezpieczającym przed wytwarzaniem rozmaitych produktów ich cieplnej degradacji, które hamują rozwój drobnoustrojów (42).

5. Termostabilne białka

Hipertermofile występują w odrębnych domenach bakterii i archeonów, i dlatego przyczyny zwiększonej oporności cieplnej ich białek są różne i zależą od filogenezy mikroorganizmu (43). Stabilność białka zależy od różnicy energii swobodnej ΔG_D^N pomiędzy jego formą rozfałdowaną G_D a natywną G_N . Aktywna fizjologicznie struktura nieskomplikowanych białek tworzy się podczas spontanicznego zwijania łańcucha polipeptydowego, który uzyskuje w ten sposób możliwie najmniejszą energię swobodną (44,45). Wzrost ΔG_D^N wskazuje na coraz większe nakłady energii niezbędne do przekształcenia formy natywnej w rozfałdowaną. Dla większości białek pochodzących z mezofili ΔG_D^N w temperaturze 25°C przyjmuje się wartość 5-17 kcal/mol niezależnie od ich struktury i rozmiaru cząsteczek. Natomiast w przypadku białek z termofili różnica ta jest większa jedynie o 5-15 kcal/mol (46-48). Osiągnięcie tak niewielkiego wzrostu ΔG_D^N jest możliwe poprzez wytworzenie zaledwie kilku nowych oddziaływań. Do dość znacznego zwiększenia termostabilności wystarczają zatem niewielkie modyfikacje budowy białka, polegające na wytworzeniu nowych wiązań stabilizujących strukturę cząsteczek, wyeliminowaniu oddziaływań destabilizujących, ograniczeniu stopnia swobody fragmentów łańcucha polipeptydowego lub poszczególnych grup funkcyjnych oraz usunięciu aminokwasów wywołujących naprężenia przestrzenne. Duże znaczenie mają też zmiany hydrofobowości powierzchniowej oraz zmniejszenie powierzchni oddziaływania cząsteczek ze środowiskiem (40,49,50). Zbyt duży wzrost stabilności formy natywnej jest często niekorzystny ze względu na wywołane nim ograniczenie niewielkich fluktuacji struktury cząsteczek niezbędnych dla zapewnienia katalitycznych i funkcjonalnych właściwości białek. Zjawisko to jest przyczyną prawie całkowitego zaniku aktywności katalitycznej termostabilnych enzymów w temperaturach 25-35°C (47). Uaktywnienie termostabilnych enzymów w obniżonej temperaturze następuje niekiedy pod wpływem detergentów, rozpuszczalników organicznych lub innych czynników rozszczepiających wiązania stabilizujące strukturę cząsteczek (51-53). Niektóre termostabilne enzymy wykazują jednak aktywność nawet w dość niskiej temperaturze, prawdopodobnie z powodu zachowania dużej swobody zmian konformacji centrum katalitycznego, przy jednoczesnym ograniczeniu jej zmian w pozostałych częściach cząsteczki.

W wielu przeprowadzonych badaniach wykazano, że białka termofilnych mikroorganizmów są zbudowane z takich samych rodzajów aminokwasów, jakie występują w mezofilach i innych organizmach (40). W białkach termofili obserwuje się

niekiedy zastąpienie niektórych reszt glicyny i seryny alaniną, lizyny argininą, seryny treoniną, waliny izoleucyną i kwasu asparaginowego kwasem glutaminowym (40). Do porównania termostabilności białek stosowano początkowo indeks alifatyczny (I_a) obliczany na podstawie molowego udziału alaniny (Ala), waliny (Wal), izoleucyny (Ileu) oraz leucyny (Leu) za pomocą wzoru: $I_a = Ala + 2,9Wal + 3,9(Ileu + Leu)$. Dokładność takiej oceny nie jest jednak zbyt wielka z powodu zróżnicowanego oddziaływania reszt aminokwasowych tego samego rodzaju na stabilność białek w zależności od ich lokalizacji w cząsteczce i konformacji domen, w których występują (54).

Wzrost stabilności obszarów o strukturze α -helisy następuje po zmniejszeniu ilości reszt aminokwasowych wprowadzających naprężenia przestrzenne. Najczęstszą przyczyną destabilizacji α -helisy jest izoleucyna i walina, w których występują rozgałęzienia na węglu β (55). Do aminokwasów stabilizujących wymienioną strukturę należy natomiast alanina zawierająca grupę metylową, nie wywierającą żadnych niekorzystnych oddziaływań na łańcuch polipeptydowy (56). Zastąpienie alaniną czterech β -rozgałęzionych aminokwasów w α -helisie lizozymu faga T4 zwiększało ΔG_D^N o 1,01 kcal/mol, a w konsekwencji podwyższało stabilność białka (46). Wzrost oporności cieplnej następuje także wskutek zwiększenia zawartości alaniny kosztem zmniejszenia ilości glicyny i lizyny (46). W porównaniu z białkami izolowanymi z mezofili ich termostabilne odpowiedniki zawierają w obrębie α -helisy mniejszą liczbę reszt cysteiny, histydyny i proliny (46). Przykładem aminokwasu o zróżnicowanym oddziaływaniu na stabilność białek jest prolina. Zwiększenie jej udziału w niehelikalnych fragmentach cząsteczek obniża entropię stanu rozfałdowanego i jest przyczyną stabilizacji białka wywołanej usztywnieniem fragmentów łańcucha polipeptydowego i ograniczeniem swobody zmian ich położenia. W N-końcowej domenie polimerazy DNA z *Thermus aquaticus* znajduje się 13 reszt proliny stanowiących około 10% całkowitej liczby aminokwasów w tym obszarze. Natomiast analogiczny enzym z *Escherichia coli* ma w tym regionie tylko 6 reszt proliny (57). Po zastąpieniu prolina argininy w α -amylazie z alkalofila rodzaju *Bacillus* lub alaniny w lizozymie następowało wyraźne zwiększenie oporności cieplnej wymienionych białek (58,59). Zawartość tego aminokwasu w strukturze α -helisy jest jednak ograniczona z powodu destabilizującego oddziaływania zawady przestrzennej, wytwarzanej przez pierścień pirolidynowy (16). W przeciwieństwie do proliny, stwarzającej zawadę przestrzenną, glicyna nie formuje ugrupowań atomów wyeksponowanych z łańcucha polipeptydowego. Obszary cząsteczek zawierające reszty glicyny mają zatem zbyt duży stopień swobody i są wskutek tego podatne na nadmierne fluktuacje struktury, grożące rozfałdowaniem białka (40).

Duży wpływ na termostabilność ma zwiększenie udziału domen hydrofobowych w rdzeniu cząsteczki oraz zmniejszenie w nim liczby i rozmiaru pustych, dostępnych dla wody przestrzeni dość często spotykanych w białkach mezofili. Zabezpieczenie zaledwie jednej grupy hydrofobowej w cząsteczce przed oddziaływaniem środowiska wodnego zwiększa energię stabilizacji białka o około 1,3 kcal/mol (60,61).

Zastąpienie Glu 246 i Met 249 w wyizolowanej z *Escherichia coli* dehydrogenazie 3-izopropylolabłczanowej bardziej hydrofobowymi resztami leucyny i waliny spowodowało wyraźny wzrost oporności cieplnej wymienionego białka (61). W termostabilnych białkach zaobserwowano też zmniejszenie hydrofilowości powierzchni cząsteczek ograniczające ich destabilizujące oddziaływanie z rozpuszczalnikiem (40).

Jedną z istotnych przyczyn wzrostu oporności cieplnej białek jest tworzenie nowych par jonowych. Uczestniczą w nich np. lizyna lub arginina oddziałujące elektrostatycznie z resztami kwasów glutaminowego lub asparaginowego z jednoczesnym generowaniem wiązania wodorowego (62). Zależnie od zwrotu wektorów sił wzajemnego oddziaływania, pary jonowe mogą stabilizować albo destabilizować strukturę białek. Wpływ oddziaływań jonowych w dużym stopniu zależy od ich rozmieszczenia. Wiązania znajdujące się na powierzchni cząsteczek mają, wskutek hydratacji grup funkcyjnych, mniejszą energię od umiejscowionych w rdzeniu. Pary jonowe skutecznie zwiększają termostabilność wielu enzymów (63,64). Przykładem jest zmiana czasu połowicznej inaktywacji oksygenazy monofenolowej z *Neurospora crassa*, który w 61°C wzrasta z 4 do 70 min po substytucji tylko jednego aminokwasu resztą zdolną do wygenerowania w enzymie nowego wiązania jonowego (54). Stabilizujące oddziaływanie par jonowych zależy od pK_a uczestniczących w wiązaniu grup funkcyjnych i maleje, lub nawet zanika, w kwaśnym środowisku wskutek protonowania reszt kwasów karboksylowych prowadzącego do likwidacji oddziaływań elektrostatycznych. Zastąpienie reszt lizyny arginina jest korzystne ze względu na zdolność grupy guanidylowej argininy do jednoczesnego oddziaływania z dwiema resztami kwasu asparaginowego lub/i glutaminowego, co w konsekwencji usztywnia łańcuch polipeptydowy (57). Molowy stosunek reszt aminokwasów zasadowych (Arg/Lys) w białkach hipertermofili zmienia się jednak w dość szerokich granicach przyjmując wartości od 0,5 do około 2,2 (65). W badaniach wielu enzymów wykazano, że duży wpływ na zwiększenie ich termostabilności mają wiązania jonowe pomiędzy grupami funkcyjnymi, dość znacznie oddalonymi od siebie w łańcuchu polipeptydowym. Ich wzajemne oddziaływanie tworzy wtedy „klamry” spinające i stabilizujące strukturę dużych fragmentów cząsteczek (66,67).

Zwiększanie termostabilności wielu białek powodują też jony Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} lub inne kationy. Ferredoksyna termofilnych archeonów *Sulfolobus* zawiera jony cynku związane koordynacyjnie z trzema resztami histydyny i resztą argininy. Kationy Zn^{2+} nie występują natomiast w analogicznym białku pochodzącym z mezofili (68). Przykładem enzymów stabilizowanych jonami metalu (Ca^{2+}) są α -amylazy. Kationy Ca^{2+} są związane koordynacyjnie z ligandami należącymi do struktury $(\beta/\alpha)_8$ -beczki i domeny o kształcie pętli, w okolicy której jest umiejscowione centrum katalityczne enzymu. Silne wiązanie Ca^{2+} doprowadziło początkowo do nieuzasadnionego wniosku, że aktywność i stabilność α -amylaz z hipertermofili (*Thermococcus profundus*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus woesei*) nie zależy od udziału jonów wapnia. Wniosek ten sformułowano na podstawie braku wpływu EDTA i innych chelatorów na aktywność i termostabilność wymienionych enzymów. Dopiero

po długotrwałym oddziaływaniu EDTA w 90°C udało się uwolnić jony Ca^{2+} , co spowodowało inaktywację wymienionych α -amylaz (62,69).

Niektórzy autorzy kwestionują znaczenie dodatkowych wiązań wodorowych w zwiększaniu termostabilności białek (43). Z prac Vogta i wsp. (70) wynika jednak, że wiązania wodorowe są najważniejszymi czynnikami stabilizującymi cząsteczki. W szesnastu badanych rodzinach termofilnych mikroorganizmów aż w trzynastu przypadkach wzrost termostabilności białek był skorelowany ze wzrastającą liczbą wiązań wodorowych w ich cząsteczkach (16).

Oprócz wiązań jonowych funkcje spinania i stabilizacji fragmentów łańcucha polipeptydowego spełniają mostki dwusulfidowe. Z powodu termolabilności cysteiny i mostków dwusulfidowych spodziewano się, że w temperaturach powyżej 80°C nastąpi destabilizacja białek zawierających wymienione wiązania (71). W przeprowadzonych badaniach enzymów z hipertermofili wykazano jednak, że mostki dwusulfidowe zachowują zdolność stabilizacji ich struktury nawet w temperaturach ponad 100°C (62). Przykładem jest zawierająca osiem cystein serynowa proteaza z *Aquifex pyrophilus*, której czas połowicznej inaktywacji w 85°C maleje z 90 do około 2 h pod wpływem rozszczepiającego wiązania dwusulfidowe dwutiotreitolu (72). Sugeruje to, że wymieniony enzym zawiera stabilizujące cząsteczkę mostki dwusulfidowe. W niektórych termofilnych białkach, jak np. w syntazie cytrynianowej z *Pyrococcus furiosus* zaobserwowano jednak ograniczenie liczby reszt cysteiny w porównaniu z mezofilnymi odpowiednikami tego enzymu (73). Oprócz cysteiny występują w białkach także inne termolabilne aminokwasy, które w podwyższonej temperaturze ulegają deaminacji (asparagina i w mniejszym stopniu glutamina) lub oksydacji, następującej np. w przypadku metioniny (74). Możliwość fragmentacji łańcucha polipeptydowego w sąsiedztwie reszt asparaginy lub glutaminy jest w termostabilnych enzymach ograniczona poprzez zmniejszenie zawartości Asn lub lokalizację tych reszt w takich miejscach cząsteczki, w których są one mniej reaktywne. Niekiedy termostabilność białek zwiększa metylacja reszt lizyny spotykana w niektórych enzymach z archeonów *Sulfolobus* lub inne posttranslacyjne modyfikacje (62). Przyczyną zwiększenia oporności cieplnej niektórych enzymów i innych białek jest ich wbudowanie w strukturę błon biologicznych, gdzie są stabilizowane oddziaływaniami hydrofobowymi i wiązaniami z cząsteczkami lipidów. Energia tych oddziaływań zależy m.in. od stopnia nasylenia i długości łańcucha alifatycznego kwasów tłuszczowych.

6. Błony biologiczne

Możliwość rozwoju drobnoustrojów w podwyższonej temperaturze jest w dużym stopniu uwarunkowana zachowaniem integralności błon biologicznych, która szybko zanika po przekroczeniu temperatury topnienia, likwidującej w dwuwarstwie lipidowej uporządkowane rozmieszczenie alkilowych łańcuchów kwasów tłuszczowych. Mezofile i umiarkowane termofile dostosowują się do podwyższonej

temperatury środowiska poprzez wbudowywanie w błony lipidów zawierających kwasy tłuszczowe o dłuższych, często rozgałęzionych łańcuchach lub kwasy o większym stopniu nasycenia (75,76). Inną budowę ma natomiast błona cytoplazmatyczna archeonów, która jest prawie w całości zbudowana z dwu- lub tetraeterów glicerolowych izoprenoidów alkilowych zawierających zazwyczaj 20 lub 40 atomów węgla (12). Zmniejsza to znacznie termolabilność błony ze względu na większą odporność wiązań eterowych na oksydację i podwyższenie temperatury od wiązań estrowych, występujących np. w lipidach bakteryjnych (77). Dwueter y glicerolowe występują głównie w termofilnych i metanogennych archeonach, a także w hipertermofilnych bakteriach rodzaju *Thermotoga* i *Aquifex* (78). Natomiast w błonach cytoplazmatycznych hipertermofilnych archeonów dominują tetraeter y glicerolowe, których udział zależy od temperatury i innych warunków rozwoju mikroorganizmu (78). Długie łańcuchy alifatyczne eterów glicerolowych tworzą często cykliczne struktury zespalające poszczególne warstwy błony w jedną całość, co znacznie zwiększa jej termostabilność (12).

7. Podsumowanie

W prowadzonych obecnie badaniach hipertermofili zmierza się do lepszego poznania ich metabolizmu i mechanizmów zapewniających zwiększenie oporności cieplnej enzymów i innych biocząsteczek oraz do określenia nie znanej jeszcze maksymalnej temperatury rozwoju żywych organizmów. Badania te mają duże znaczenie praktyczne, głównie ze względu na możliwość wykorzystania hipertermofili oraz ich enzymów do utylizacji uciążliwych produktów ubocznych, jak też usprawnienia i zwiększenia wydajności niektórych procesów. Stosowanie enzymów hipertermofili jest m.in. korzystne ze względu na możliwość uniknięcia mikrobiologicznego zanieczyszczenia środowiska reakcji, dość często spotykanego podczas katalizy w temperaturach optymalnych dla rozwoju mezofili. Inną zaletą enzymów hipertermofili jest duża stabilność zapobiegająca ich inaktywacji w środowisku zawierającym rozpuszczalniki organiczne. Mieszające się z wodą rozpuszczalniki zmniejszają jej stężenie w środowisku, co powoduje niekiedy zmianę kierunku przebiegu reakcji, umożliwiającą np. zastosowanie hydrolaz jako katalizatorów syntezy plastein, oligosacharydów i innych makrocząsteczek. Wprowadzenie do środowiska reakcji rozpuszczalników organicznych poprawia rozpuszczalność niektórych substratów oraz zapobiega w niektórych przypadkach tworzeniu się niepożądanych produktów ubocznych. Zastosowanie enzymów z hipertermofili utrudnia niekiedy ich niewielka aktywność w obniżonej temperaturze. Prowadzone są aktualnie prace zmierzające do zaprojektowania enzymów stabilnych i aktywnych w szerokim zakresie temperatur, przydatnych np. w medycynie farmacji i w przetwórstwie żywności. Wyniki niektórych badań sugerują też możliwość dość znacznego zwiększenia aktywności termostabilnych enzymów poprzez wprowadzenie odpowiednich zmian rodzaju i se-

kwencji reszt aminokwasowych w ich cząsteczkach (62). Naturalna selekcja najdoskonalszych katalitycznie form enzymów nie nastąpiła przypuszczalnie z powodu termolabilności przetwarzanych substratów, występujących w środowisku rozwoju hipertermofili.

Koszty publikacji tego artykułu dofinansowano z funduszu grantu KBN nr PBZ-KBN/021/PO6/32.

Literatura

1. Blöchl E., Rachel R., Burggraf S., Hafenbrandl D., Jannasch H. W., Stetter K. O., (1997), *Extremophiles*, 1, 14-21.
2. Baross J. A., Holden J. F., (1996), *Adv. Protein Chem.*, 48, 1-34.
3. Stetter K. O., (1996), *FEMS Microbiol. Rev.*, 18, 149-158.
4. Summit M., Scott B., Nielson K., Mathur E., (1998), *Extremophiles*, 2, 339-345.
5. Adams M. W. W., Kelly R. M., (1998), *TIBTECH*, 16, 329-332.
6. Stetter K. O., (1999), *FEBS Lett.*, 452, 22-25.
7. Trent J. D., Osipiuk J., Pinkau T., (1990), *J. Bacteriol.*, 172, 1478-1484.
8. Trent J. D., Nimmesger E., Wall J. S., Horwich A., (1991), *Nature*, 354, 490-493.
9. di Ruggiero J., Brown J. R., Bogert A. P., Robb F. T., J., (1999), *J. Mol. Evol.*, 49, 474-484.
10. Grayling R. A., Sandman K., Reeve J. N., (1996), *Adv. Protein Chem.*, 48, 437-467.
11. Tolner B., Poolman B., Königs W. N., (1997), *Comp. Biochem. Physiol.*, 118A, 423-428.
12. Gambacorta A., Gliozzi A., de Rosa M., (1995), *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 11, 115-119.
13. Trent J. D., (2000), *Gravitational and Space Biol. Bull.*, 13(2), 5-11.
14. Attfield P.V., (1987), *FEBS Lett.*, 255, 159-163.
15. Gueguen Y., Rolland J. L., Schroeck S., Flament D., Defretin S., Saniez M. H., Dietrich J., (2001), *FEMS Microbiol. Lett.*, 194, 201-206.
16. Stryer L., (1999), *Biochemia*, 77-95, PWN SA, Warszawa.
17. Huber R., Stetter K. O., (1992), in: *Thermophilic Bacteria*, Ed. Kristjansson J. K., CRC Press, Boca Raton, 185-194.
18. Kozyavkin S. A., Krah R., Gellert M., Stetter K. O., Lake J. A., Slesarev A. I., (1994), *J. Biol. Chem.*, 269, 11081-11089.
19. Grayling R. A., Sandman K., Reeve J. N., (1994), *Syst. Appl. Microbiol.*, 16, 582-590.
20. Kawai G., Hushizume T., Yasuda M., Miyazawa T., McCloskey J. A., Yokoyama S., (1992), *Nucleoside Nucleotides*, 11, 759-771.
21. Trent J. D., (1996), *FEMS Microbiol. Rev.*, 18, 249-258.
22. Holden J. F., Adams M. W. W., Barros J. A., (1999), *Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*, Eds. Bell C. R., Brylinsky M., Johnson-Green P., Halifax, Canada, 1-8.
23. Hightower L. E., (1991), *Cell*, 69, 191-197.
24. Pelham H., (1986), *Cell*, 46, 959-961.
25. Phipps B. M., Hoffmann A., Stetter K. O., Baumeister W., (1991), *EMBO Journal*, 10(7), 1711-1722.
26. Peoples T. L., Kelly R. M., (1995), *Appl. Environ. Biol.*, 61, 2314-2321.
27. Driessen A. J. M., van de Vossen J. L. C. M., Königs W. N., (1996), *FEMS Microbiol. Rev.*, 18, 139-148.
28. Wolska-Mitaszko B., (2001), *Biotechnologia*, 2(53), 36-53.
29. di Lernia I., Morana A., Ottombrino A., Fusco S., Rossi M., de Rosa M., (1998), *Extremophiles*, 2, 409-416.
30. Mukai K., Tabuchi A., Nakada T., Shibuya T., Chaen H., Fukuda S., Kurimoto M., Tsujisaka Y., (1997), *Starch/Stärke*, 49, 26-30.

31. Koh S., Shin H. J., Kim J. S., Lee D. S., Lee S., (1998), *Biotechnol. Lett.*, 20, 757-761.
32. Nishimoto T., Nakada T., Chaen H., Fukuda S., Sugimoto T., Kurimoto M., Tsujisaka Y., (1997), *Bio-sci. Biotech. Biochem.*, 61, 898-899.
33. Hensel R., König H., (1988), *FEMS Microbiol. Lett.*, 49, 75-79.
34. Kurr M., Huber R., König H., Jannasch H. W., Fricke H., Trincone A., Kristjansson J. K., (1991), *Arch. Microbiol.*, 156, 239-247.
35. Martins L. O., Huber R., Huber H., Stetter K. O., da Costa M. S., Santos H., (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 896-902.
36. Martins L. O., Santos H., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3299-3303.
37. Danson M. J., (1988), *Adv. Microbiol. Phys.*, 29, 165-169.
38. Aono S., Bryant F. O., Adams M. W. W., (1989), *J. Bacteriol.*, 171, 3433-3439.
39. Leuschner C., Antranikian G., (1995), *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 11, 95-114.
40. Daniel R. M., (1996), *Enzyme Microbiol. Technol.*, 19, 74-79.
41. Adams M. W. W., Kletzin A., (1996), *Adv. Protein Chem.*, 48, 101-141.
42. Adams M. W. W., Kelly R. M., (1994), *Bioorganic Medicinal Chem.*, 2, 659-667.
43. Szilagyi A., Zavodsky P., (2000), *Structure*, 8, 493-504.
44. Czuryło E. D., (2002), *Post. Biochemii*, 48(2), 101-109.
45. Dinner A. R., Salí A., Smith L. J., Dobson C. M., Karplus M., (2000), *Trends Biochem. Sci.*, 25, 331-339.
46. Vieille C., Zeikus J. G., (1996), *TIBTECH*, 14, 183-190.
47. Scandurra R., Consalvi C., Chiaraluce R., Politi L., Engel P. C., (1998), *Biochimie*, 80, 933-941.
48. Jaenicke R., (1991), *Eur. J. Biochem.*, 202, 715-728.
49. Gromiha M. M., (2001), *Biophys. Chem.*, 91, 71-77.
50. Fitter J., Heberie J., (2000), *Biophys. J.*, 79, 1629-1636.
51. Kujo C., Oshima T., (1998), *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2152-2157.
52. Rüdiger A. P., Jorgensen L., Antranikian G., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 567-575.
53. Sako Y., Croecker P. C., Ishida Y., (1997), *FEBS Lett.*, 415, 329-334.
54. Bednarski W., Kowalewska-Piontas J., (1986), *Post. Biochemii*, 32, 469-484.
55. Facchiano A. M., Colonna M. G., Ragone R., (1998), *Protein Eng.*, 11, 753-760.
56. Argos P., Rossman M. G., Grau U. M., Zuber H., Frank G., Tratschin J. D., (1979), *Biochemistry*, 18, 5698-5703.
57. Kumar S., Tsai J., Nussinov R., (2000), *Protein Eng.*, 13, 179-191.
58. Herning T., Yutani K., Inaka K., Kuroki R., Matsushima M., Kikuchi M., (1992), *Biochemistry*, 31, 7077-7085.
59. van der Maarel M. J. E. C., van der Veen B., Uitdehaag J. C. M., Leemhuis H., Dijkhuizen L., (2002), *J. Biotechnol.*, 94, 127-135.
60. Russel R. J. M., Taylor G., (1995), *Curr. Opin. Biol.*, 6, 370-374.
61. Jae-Hvan L., Yeon G. Y., Ye S. H., Seung-Je C., Byung-Yoon A., Sung-Hou K., Yunje C., (1997), *J. Mol. Biol.*, 270, 259-274.
62. Vieille C., Zeikus G. J., (2001), *Microbiol. Molecular Biol. Rev.*, 65, 1-43.
63. Hendsch Z. S., Tidor B., (1994), *Protein Sci.*, 3, 211-226.
64. Honig B., Nicholls A., (1995), *Science*, 268, 1144-1149.
65. Fields P. A., (2001), *Compar. Biochem. Physiol.*, (A), 129, 417-431.
66. Perutz M. F., Raitd H., (1975), *Nature*, 255, 256-259.
67. Merz A., Knöchel J., Jansonius N., Kirschner K., (1999), *J. Mol. Biol.*, 288, 753-763.
68. Fujii T., Hata Y., Oozeki M., Miriyama H., Wakagi T., Tanaka N., Oshima T., (1997), *Biochemistry*, 36, 1505-1513.
69. Chung Y. C., Kobayashi T., Kanai H., Akiba T., Kudo T., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 1502-1506.
70. Voght G., Woell S., Argos P., (1997), *J. Mol. Biol.*, 269, 631-643.
71. Volkin D. B., Klivanov A. M., (1987), *J. Biol. Chem.*, 262, 2945-2950.
72. Choi I. G., Bang W. G., Kim S. H., Yu Y. G., (1999), *J. Biol. Chem.*, 274, 881-888.

73. Danson M. J., Hough D. W., (1998), *Trends Microbiol.*, 6, 307-314.
74. Cambillau C., Claverie J. M., (2000), *J. Biol. Chem.*, 275, 32383-32386.
75. de Mendoza D., Cronan J. E., (1983), *Trends Biochem. Sci.*, 8, 49-52.
76. Prado A., da Costa M. S., Madeira V. M. C., (1988), *J. General Microbiol.*, 143, 1653-1660.
77. van de Vossenberg J. L. C. M., Driessen A. J. M., Konings W. N., (1998), *Extremophiles*, 2, 163-170.
78. Majer R. J., (1996), *Adv. Protein Chem.*, 48, 86-87.