

УДК 577.112.3:57.043.017.3

А.К. Гулевский, Д.В. Третьяк\*

## Молекулярные особенности белков про- и эукариот, обладающих естественной адаптацией к низким температурам

UDC 577.112.3:57.043.017.3

A.K. Gulevsky, D.V. Tretiak\*

## Molecular Peculiarities of Pro- and Eukaryotic Proteins Possessing Natural Adaptation to Low Temperatures

**Реферат:** В работе освещены результаты исследований молекулярных модификаций белков холодоадаптированных организмов. Согласно имеющимся данным такие модификации достигаются путем замены аминокислотных остатков в белковой молекуле, сокращения числа водородных связей и солевых мостиков, уменьшения гидрофобности. Указанные модификации увеличивают гибкость макромолекул, что обеспечивает их функциональность. Обсуждается роль внутри-молекулярных взаимодействий в стабилизации белков и их функциональном состоянии в диапазоне низких температур.

**Ключевые слова:** холодовая адаптация, низкие температуры, ферменты, структурные белки, аминокислоты, полярность, гидрофобность.

**Реферат:** У роботі висвітлено результати досліджень молекулярних модифікацій білків холодоадаптованих організмів. Згідно з існуючими даними такі модифікації досягаються шляхом заміни амінокислотних залишків у білковій молекулі, скорочення числа водневих зв'язків та солевих містків, зменшення гідрофобності. Зазначені модифікації збільшують гнучкість макромолекул, що забезпечує їх функціональність. Обговорюється роль внутрішньомолекулярних взаємодій у стабілізації білків та їх функціональному стані в діапазоні низьких температур.

**Ключові слова:** холодова адаптація, низькі температури, ферменти, структурні білки, амінокислоти, полярність, гідрофобність.

**Abstract:** The review covers the findings in molecular modifications of proteins in cold-adapted organisms. According to the current data such modifications are attained via amino acid residue substitutions in a protein molecule, reduction of hydrogen bonds and salt bridges, hydrophobicity decrease. The specified modifications augment the flexibility of macromolecules thereby providing their functionality. The role of molecule-to-molecule interactions in protein stabilisation and their functional state within low temperature range is discussed.

**Key words:** cold adaptation, low temperatures, enzymes, structural proteins, amino acids, polarity, hydrophobicity.

Холодоадаптированные организмы способны обитать при низких температурах благодаря генетически детерминированным механизмам, реализующимся на разных уровнях организации и, прежде всего, на молекулярном. Если анализировать адаптационные изменения на молекулярном уровне, то имеющиеся данные свидетельствуют об изменении состава белков и их структурных модификациях.

Главной особенностью эволюционных изменений белков холодоадаптированных организмов является сохранение и оптимизация функционального состояния макромолекул при разных физических условиях среды, т. е. поддержание «соответствующего состояния», обеспечивающего холодовую адаптацию и выживание организма [22, 28].

Существует предположение, что для поддержания эффективной биологической функции макромо-

Cold-adapted organisms are capable to inhabit at low temperatures due to genetically determined mechanisms implemented at different organisation levels and, first of all, at molecular one. Analysis of adaptive changes at a molecular level gives the data about occurring changes in proteins composition and their structural modifications.

The main feature of evolutionary changes in cold-adapted organism proteins is the preservation and optimisation of functional state in macromolecules in different physical environmental conditions, *i. e.* the maintenance of a 'proper state', providing cold adaptation and organism survival [19, 27].

There is a suggestion that the cold-adapted proteins should possess a high conformational flexibility to maintain an efficient biological function of macromolecules at low temperatures [5, 23, 27, 49].

Отдел биохимии холодовой адаптации, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Department of Biochemistry of Cold Adaptation, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

\*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-41-35, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта: tretiak\_diana@mail.ua

\*To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 4135, fax: +380 57 373 3084, e-mail: tretiak\_diana@mail.ua

Поступила 05.08.2014  
Принята в печать 19.05.2015

Received August, 05, 2014  
Accepted May, 19, 2015

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, №3. – С. 219–234.  
© 2015 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2015. 25 (3): 219–234.  
© 2015 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

лекул при низких температурах холодоадаптированные белки должны обладать высокой конформационной гибкостью [8, 26, 28, 49].

В настоящее время основным направлением исследований молекулярных механизмов криорезистентности холодоустойчивых организмов является изучение первичной структуры белков и ферментов, в частности активного центра энзима. Для понимания механизма сохранения молекулярной гибкости белков в условиях низких температур необходимо исследование особенностей пространственных конфигураций и упаковки белковой молекулы, т. е. их вторичная, третичная и четвертичная структуры. Главная роль в конформационных изменениях протеинов отводится солевым мостикам, водородным связям, соотношению полярных и неполярных областей, которые экспонированы в наружную среду.

В настоящем обзоре на примере белков отдельных представителей холодоустойчивых про- и эукариот показано значение этих факторов в механизме их криоустойчивости.

### **Сравнительные исследования молекулярной организации ферментов прокариот**

Наиболее продуктивными для понимания молекулярных основ холодовых адаптаций на уровне белковых молекул были сравнительные исследования ферментов и структурных белков психро-, мезо- и термофильных бактерий, обитающих при температурах  $-10...20$ ;  $3...40$  и  $10...110^{\circ}\text{C}$  соответственно [3].

Известно, что влияние температурного фактора среды на функцию фермента связано с балансом между гибкостью и стабильностью подвижных областей полипептидов, участвующих в катализе. Высокие температуры могут способствовать избыточной гибкости белка, уменьшая средство к субстрату путем нарушения активного центра и, в конечном итоге, приводя к денатурации молекулы. Низкие температуры могут влиять на фермент, делая его избыточно стабильным, снижая каталитические скорости до значений, необходимых для поддержания метаболического гомеостаза в клетке [20, 21].

Для преодоления такого функционального блока в ходе эволюции организмы прокариот приобрели ряд универсальных механизмов модификации структурных белков и белков-ферментов. В частности это достигается за счет генетических адаптаций макромолекул к субнулевым температурам в виде односайтных аминокислотных замен в первичной аминокислотной последовательности некоторых белков. В случае триоз-фосфат-изомеразы психрофильной бактерии *Vibrio marinus*, опти-

Currently, the main research area in molecular mechanisms of cryoresistance in cold-tolerant organisms is the study of primary structure of proteins and enzymes, in particular the enzyme active site. The studies of peculiarities of spatial configurations and packing of protein molecule, *i. e.* their secondary, tertiary and quaternary structures greatly contribute to understanding the mechanism of molecular flexibility preservation in proteins at low temperatures. A significant part in conformational changes of proteins belongs to salt bridges, hydrogen bonds, ratio of polar and non-polar areas, exposed to external medium.

In this review we demonstrated the importance of mentioned factors in the mechanism of cryoresistance using as an example the proteins of some cold-resistant pro- and eukaryotic representatives.

### **Comparative study of molecular organisation in prokaryotic enzymes**

Comparative studies of enzymes and structural proteins of psychro-, meso and thermophilic bacteria inhabiting at temperatures of  $-10...20$ ;  $3...40$  and  $10...110^{\circ}\text{C}$ , respectively, were the most efficient to understand molecular basis of cold adaptations at the level of protein molecules [38].

The impact of environmental temperature on the enzyme function is known as associated with the balance between flexibility and stability of motile regions of catalysis involved polypeptides. High temperatures may contribute to an excessive flexibility of protein by decreasing the affinity to substrate via disorder in an active site, which eventually leads to molecular denaturation. Low temperatures may affect the enzyme, making it excessively stable, by reducing catalytic rates down to the values necessary to maintain metabolic homeostasis in cell [17, 18].

To overcome such a functional block during evolution the prokaryotic organisms have acquired some universal mechanisms to modify structural proteins and enzyme proteins. In particular this is achieved by genetic adaptations of macromolecules to subzero temperatures such as one-site amino acid substitutions in the primary amino acid sequence of some proteins. In case of triose-phosphate isomerase from the psychrophilic bacteria *Vibrio marinus*, which optimal growth temperature is  $15^{\circ}\text{C}$ , substitution of one serine (*Ser*) amino acid for alanine (*Ala*) (*Ser*<sub>238</sub> → *Ala*) resulted in disappearance of two hydrogen bonds in the loop region of the molecule, that in turn greatly affected catalytic activity and thermostability [4].

Analysis of bacterial DNA ligase sequences revealed that a decreased number of amino acid residues of arginine (*Arg*) and proline (*Pro*) was



мальная температура роста которой составляет 15°C, при замене одной аминокислоты серина (*Ser*) на аланин (*Ala*) (*Ser*238 → *Ala*) устраняются две во-дородные связи в области петли молекулы, а это в значительной степени влияет на каталитическую активность и термостабильность [7].

При анализе последовательностей ДНК-лигаз бактерий было установлено, что для фермента психрофильной бактерии *Pseudoalteromonas haloplanktis* характерно уменьшение количества аминокислотных остатков аргинина (*Arg*) и пролина (*Pro*) [25]. Трехмерное моделирование N-концевого домена ДНК-лигазы холодоустойчивой бактерии показало, что этот домен дестабилизируется по сравнению с его термофильным гомологом. Сравнение кинетических параметров ДНК-лигаз *P. haloplanktis*, *Escherichia coli* и *Thermus scotoductus*, адаптированных к различным температурам, показало, что увеличение константы скорости ( $k_{cat}$ ) является наиболее важным адаптивным параметром ферментативной активности при низких температурах.

Холодоадаптированные ДНК-лигазы характеризуются повышением активности при низких и умеренных температурах, общей дестабилизацией молекулярного каркаса (особенно в активном центре) и высокой конформационной гибкостью. Противоположная тенденция выявлена в мезо- и термофильном аналогах. При низкой температуре для последнего характерны снижение активности и гибкости, а также высокая стабильность [24]. Ферменты холодоадаптированных организмов обладают высокой каталитической эффективностью при низких температурах за счет большей гибкости их структурных компонентов, участвующих в каталитическом цикле, тогда как области, которые не участвуют в катализе, могут быть более жесткими, чем их мезофильные аналоги. Следовательно, повышение гибкости приводит к снижению стабильности психрофильных ферментов.

Таким образом, термокомпенсация таких ферментов, в частности ДНК-лигазы, обусловлена высокой каталитической эффективностью при низких и средних температурах. При увеличении данного показателя повышается гибкость определенных структурных компонентов, в результате чего компенсируется снижение тепловой энергии, обусловленное низкой температурой среды обитания.

Arnorsdottir J. и соавт. [8] охарактеризовали клонированную субтилизин-подобную сериновую протеиназу психротропа из семейства *Vibrio*. Анализ аминокислотной последовательности показал, что холодоадаптированная протеиназа имеет большее количество полярных/незаряженных аминокислот, а также остатков аспарагиновой кислоты (*Asp*), чем ее термофильный гомолог. Термофильные ферменты

characteristic for the enzyme of psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* [22]. Three-dimensional simulation of the N-terminal domain of DNA ligase of cold-resistant bacterium showed this domain as unstable if compared with its thermophilic homologue. The comparison of kinetic parameters of DNA ligases from *P. haloplanktis*, *Escherichia coli* and *Thermus scotoductus*, adapted to various temperatures, demonstrated an increase in the rate constant ( $k_{cat}$ ) to be the most important adaptive parameter of enzymatic activity at low temperatures.

The cold-adapted DNA ligases were characterised by an increased activity at low and moderate temperatures, total destabilisation of molecular scaffold (especially in active site) and a high conformational flexibility. An opposite tendency was revealed in the meso- and thermophilic analogues. At low temperatures the latter was characterised by the decreased activity and flexibility, as well as a high stability [21]. Enzymes of cold-adapted organisms have a high catalytic efficiency at low temperatures due to the higher flexibility of their structural components involved into catalytic cycle, whereas the areas not involved into catalysis may be more rigid than their mesophilic analogues. Therefore, an increased flexibility results in a decrease in psychrophilic enzyme stability.

Thus, the thermal compensation of such enzymes, in particular DNA ligase, is stipulated by a high catalytic efficiency at low and moderate temperatures. With an increase in this index the flexibility of certain structural components rises, whereby a decreased thermal energy is compensated due to a low environmental temperature.

J. Arnorsdottir *et al.* characterized the cloned subtilisin-like serine proteinase from a psychrotrophic *Vibrio* species [5]. The analysis of amino acid sequence showed the cold-adapted proteinase to have a greater number of polar/non-charged amino acids, as well as aspartic acid (*Asp*) residues, than its thermophilic homologue. Thermophilic enzymes had an increased content of arginine, hydrophobic amino acids and a higher aliphatic index.

Results of a comparative analysis of the amino acid sequence and conformational changes of proteins, underlying the cold adaptation of the enzyme of the thermolysin family were used to identify molecular characteristics of cold adaptation of vibriolysin from Antarctic bacterium strain 643 (VAB) [1]. The amino acid analysis of the sequence of 44 thermolysin enzymes showed VAB as differing by lysine (*Lys*), isoleucine (*Ile*), leucine (*Leu*), valine (*Val*), methionine (*Met*), asparagine (*Asn*) content and other amino acids, *i. e.* it had less *Arg* residues; low *Arg*/



содержали большее количество аргинина, гидрофобных аминокислот и имели более высокий алифатический индекс.

Результаты сравнительного анализа аминокислотной последовательности и конформационных изменений белков, лежащих в основе холодовой адаптации ферментов семейства термолизинов, были использованы для выявления молекулярных особенностей холодовой адаптации вибриолизина (штамм 643) антарктической бактерии (ВАБ) [4]. Аминокислотный анализ последовательности 44 термолизиновых ферментов показал, что ВАБ отличается содержанием лизина (*Lys*), изолейцина (*Ile*), лейцина (*Leu*), валина (*Val*), метионинов (*Met*), аспарагина (*Asn*) и других аминокислот, а именно: имеет меньше остатков *Arg*; низкий коэффициент  $Arg/(Lys + Arg)$ ; низкое содержание больших алифатических боковых цепей, выраженных отношением  $(Ile + Leu)/(Ile + Leu + Val)$ ; большее количество *Met*; больше остатков *Ser* и больше – термолабильной аминокислоты *Asn*. С помощью моделирования молекулярной динамики ВАБ, псевдо- и термолизина подтверждено предположение, что у холодоадаптированных ферментов более гибкая трехмерная структура, чем у их термо- и мезофильных аналогов, особенно в некоторых областях витка. Структурный анализ показал, что ВАБ имеет меньше внутримолекулярных катион- $\pi$  – электронных взаимодействий и водородных связей, чем его мезо- (псевдолизин) и термофильный (термолизин) аналоги. Лизин является доминирующей катионной аминокислотой, участвующей в солевых мостиках ВАБ, в то время как *Arg* – доминирующим в термо- и псевдолизине. Для ВАБ характерен большой объем недоступных полостей, чем для псевдолизина и термолизина. Электростатический потенциал на поверхности каталитического домена более отрицателен для ВАБ, чем для термо- и псевдолизина.

Результаты сравнительного анализа холодоадаптированной липазы психротрофа Аляски вида *Pseudomonas* (штамм B11-1) с кристаллической структурой липазы термофила *Bacillus stearothermophilus* подтверждают предположение о том, что адаптированные к холоду ферменты имеют более гибкую трехмерную структуру, чем их термофильные аналоги [42]. На конформационную гибкость моделируемой холодоадаптированной липазы при низкой температуре влияют такие факторы, как небольшое количество солевых мостиков и катион- $\pi$  – взаимодействий, увеличение площади неполярной поверхности, экспонированной в растворитель.

Холодоактивная рекомбинантная  $\beta$ -глюкозидаза симбиота TN49 вида *Serratia* содержит меньшее количество водородных связей, солевых мостиков и остатков *Pro* [52]. Вследствие этих особенностей

(*Lys + Arg*) коэффициент; low content of large aliphatic side chains, expressed by the ratio  $(Ile + Leu)/(Ile + Leu + Val)$ ; higher number of *Met*; more residues of *Ser* and more thermolabile *Asn* amino acid residues. Using molecular dynamics simulation of VAB, pseudo- and thermolysin the assumption was confirmed that the cold-adapted enzymes had more flexible three-dimensional structure, than their thermo- and mesophilic analogues, especially in some loop regions. Structural analysis showed VAB as possessing less intramolecular cation- $\pi$  electron interactions and hydrogen bonds, than its meso- (pseudolysin) and thermophilic (thermolysin) analogues. Lysine is the predominant cationic amino acid, involved into salt bridges of VAB, while *Arg* dominates in thermo- and pseudolysin. The VAB is characterised by a larger amount of inaccessible cavities than pseudolysin and thermolysin. Electrostatic potential on catalytic domain surface is more negative for VAB, than for thermo- and pseudolysin.

The results of a comparative analysis of cold-adapted Alaskan psychrotroph of *Pseudomonas* species (strain B11-1) lipase with the crystal structure of a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* lipase confirmed the assumption that the cold-adapted enzymes have a more flexible three-dimensional structure than their thermophilic analogues [42]. Conformation flexibility of the simulated cold-adapted lipase at low temperatures is affected by such factors as small amount of salt bridges and cation- $\pi$  interactions, and an increased area of non-polar surface exposed to the solvent.

A cold-active recombinant  $\beta$ -glucosidase from symbiotic *Serratia* species TN49 contained less hydrogen bonds, salt bridges and *Pro* residues [52]. Due to these features the structure became more flexible and, in its turn, a catalytic activity of the enzyme increased at low temperatures.

Temperature dependence of alkaline phosphatase from the Antarctic strain TAB5 was studied by selecting the thermo-stable and thermo-labile specimens. Under low temperatures, changes in protein activity were established to depend on the modification of protein sequence, particularly in amino acid residues, located either within or near the active site of the enzyme [29].

S. D'Amico *et al.* studied the psychro-, meso- and thermophilic  $\alpha$ -amylase in terms of conformational stability, thermal inactivation and irreversible unfolding of enzyme using fluorescence spectroscopy and differential scanning calorimetry [13]. The activity of psychrophilic  $\alpha$ -amylase from *Pseudoalteromonas haloplanktis* at low temperatures was achieved by reducing the activation energy, and destabilising the active site domain, thereby contributing to





увеличивается гибкость структуры и, в свою очередь, повышается каталитическая активность фермента при низких температурах.

Путем подбора термостойких и термолабильных вариантов была изучена температурная зависимость щелочной фосфатазы штамма ТАВ5, обитающего в Антарктике. Установлено, что в условиях низких температур модификация белковой последовательности, особенно в аминокислотных остатках, которые расположены в пределах или вблизи активного центра фермента, приводит к изменению активности белка [30].

S. D'Amico и соавт. [16] с помощью флуоресцентной спектроскопии и дифференциальной сканирующей калориметрии изучили психро-, мезо- и термофильную  $\alpha$ -амилазы с точки зрения конформационной стабильности, тепловой инактивации, необратимого анфолдинга фермента [16]. Активность психрофильной  $\alpha$ -амилазы *Pseudoalteromonas haloplanktis* при низких температурах достигается за счет уменьшения энергии активации, дестабилизации домена активного центра, что способствует увеличению конформационной гибкости молекулы фермента.

Аналогичные результаты получены при изучении кристаллической структуры  $\alpha$ -амилазы *Alteromonas haloplanctis* и  $\beta$ -лактамазы *Pseudomonas fluorescens* [5, 37]. Установлено, что снижение количества водородных связей способствует большей гибкости этих активных на холоде ферментов.

Y. Sato и соавт. [45] провели клонирование генов изоцитратлиазы (ИЦЛ) психрофильной бактерии *Colwellia psychrerythraea* и анализ аминокислотных остатков, участвующих в холодовой адаптации этого фермента. Расшифрованная аминокислотная последовательность клона показала высокую гомологию с холодоадаптированной ИЦЛ другой психрофильной бактерии *Colwellia maris* (88% идентичности), а последовательная гомология с ИЦЛ *Escherichia coli* была низкой (28% идентичности). Вызванная точечной мутацией аминокислотная замена (*Ala214* → *Ser*) в ИЦЛ *C. psychrerythraea* привела к повышению термостабильности и уменьшению удельной активности энзима при действии низкой температуры, что свидетельствует о важности *Ala214* в молекулярном механизме холодовой адаптации данного фермента.

Установлена кристаллическая структура холодоактивного фермента цитратсинтазы штамма DS2-3R антарктической бактерии [43]. При ее сравнении с цитратсинтазой гипертермофила *Pyrococcus furiosus* были получены данные о большей доступности активного центра холодоактивного фермента и увеличении относительной гибкости малого домена по сравнению с большим. Для

conformational flexibility increase in the enzyme molecule.

Similar results were obtained in studies of crystal structure of  $\alpha$ -amylase from *Alteromonas haloplanctis* and  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas fluorescens* [2, 36]. A decreased number of hydrogen bonds was established as contributing to higher flexibility of these cold-active enzymes.

Y. Sato *et al.* cloned the isocitrate lyase (ICL) genes from the psychrophilic bacterium *Colwellia psychrerythraea* and analyzed the amino acid residues involved in cold adaptation of this enzyme [45]. The decoded amino acid sequence of the clone showed a high homology with cold-adapted ICL of other psychrophilic bacterium *Colwellia maris* (88% identity), whereas the sequential homology with ICL from *Escherichia coli* was low (28% of identity). The substitution of *Ala214* for *Ser* in ICL from *C. psychrerythraea*, introduced by point mutation resulted in the increased thermal stability and lowering of the specific activity of the enzyme at low temperature, testifying to the importance of *Ala214* in molecular mechanism of cold adaptation of this enzyme.

A crystal structure of a cold-active enzyme citrate synthase, isolated from an Antarctic bacterium strain DS2-3R was established [43]. Comparing this with the citrate synthase of a hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* showed that the cold-active enzyme had a much more accessible active site, and an increased relative flexibility of the small domain compared to the large one. A psychrophilic enzyme was characterised by a decrease in a number of *Pro* residues as compared to hyperthermophile citrate synthase, as well as an increase in solvent-exposed hydrophobic residues.

It was demonstrated that 3D-structure of mesophilic bacterium chitobiase had two tryptophan residues (*Trp*), being the main substrate-binding ligands and participating in hydrophobic interactions with the substrate [36]. Moreover, these two *Trp* residues were not revealed in the chitobiase of psychrophilic bacterium, since they were substituted by polar residues, capable to provide stronger interactions during temperature decrease.

The primary and secondary structures of the  $\beta$ -galactosidase enzyme from psychro-, meso- and thermophilic microorganisms [33] were investigated. The composition of 18 protein sequences was analysed by some amino acid residues (*Ala*, *Val*, *Arg*, *Ser*, glutamine (*Gln*), glutamic acid (*Glu*), glycine (*Gly*), phenylalanine (*Phe*), threonine (*Thr*) and tyrosine (*Tyr*)). The content of *Ala*, *Gly*, *Ser*, *Arg* was higher in primary structure of psychrophilic  $\beta$ -galactosidases, whereas the content of *Val*, *Gln*, *Glu*, *Phe*,



психрофильного фермента характерно уменьшение количества аминокислотных остатков *Pro* по сравнению с цитратсинтазой гипертермофила, а также увеличение содержания гидрофобных остатков, которые подвергаются воздействию растворителя.

Показано, что в 3D-структуре хитобиазы мезофильной бактерии имеются два остатка триптофана (*Trp*), которые являются основными субстрат-связывающими лигандами и участвуют в гидрофобных взаимодействиях с субстратом [36]. При этом в хитобиазе психрофильной бактерии не выявлено двух остатков *Trp*, поскольку они заменены полярными остатками, которые в состоянии обеспечивать более сильные взаимодействия при понижении температуры.

Изучены первичная и вторичная структуры фермента  $\beta$ -галактозидаза психро-, мезо- и термофильных микроорганизмов [33]. Состав 18 белковых последовательностей проанализировали по отдельным аминокислотным остаткам (*Ala*, *Val*, *Arg*, *Ser*, глутамин (*Gln*), глутаминовая кислота (*Glu*), глицин (*Gly*), фенилаланин (*Phe*), треонин (*Thr*) и тирозин (*Tyr*)). Содержание *Ala*, *Gly*, *Ser*, *Arg* выше у первичной структуры психрофильных  $\beta$ -галактозидаз, в то время как содержание *Val*, *Gln*, *Glu*, *Phe*, *Thr*, *Tyr* обнаружены статистически значимыми в термофильных  $\beta$ -галактозидазах. Была спрогнозирована вторичная структура  $\beta$ -галактозидаз вышеуказанных микроорганизмов. Установлены незначительные изменения во вторичной структуре в процентном соотношении лист:спираль:виток психрофилов (32:14:54), мезофилов (29:15:56) и термофилов (26:20:54). Термофильная  $\beta$ -галактозидаза содержала больше  $\alpha$ -спиральных областей, а  $\beta$ -галактозидаза холодоустойчивых микроорганизмов имела более высокое содержание областей  $\beta$ -листов по сравнению с другими аналогами.

Исследованы субтилизин-подобная сериновая протеиназа (VPR) психротрофного вида *Vibrio* и аквализин I (AQUI) термофила *Thermus aquaticus*, которые являются структурными гомологами, но значительно отличаются в отношении стабильности и каталитических свойств [48]. Для оценки разницы молекулярной гибкости двух гомологичных протеиназ измеряли тушение их флуоресценции по *Trp* с помощью акриламида при различных температурах. Исследована динамика белков VPR и AQUI на атомном уровне с помощью молекулярно-динамического моделирования. Установлено, что VPR содержит четыре аминокислотных остатка *Trp*, три из которых присутствуют в соответствующих сайтах структуры AQUI. Холодоадаптированный VPR имеет большую гибкость в большинстве участков белковой структуры. Некоторые

*Thr*, *Tyr* was revealed to be statistically significant in thermophilic  $\beta$ -galactosidases. The secondary structure of  $\beta$ -galactosidases of the mentioned above microorganisms was predicted. Insignificant changes were established in the secondary structure in terms of sheet:helix:loop ratio between psychrophiles (32:14:54), mesophiles (29:15:56) and thermophiles (26:20:54). The thermophilic  $\beta$ -galactosidase contained bigger amount of  $\alpha$ -helical regions, and the  $\beta$ -galactosidase from cold-resistant microorganisms had a higher content of  $\beta$ -sheet areas as compared to the other analogues.

There were investigated the subtilisin-like serine protease (VPR) from psychrotrophic *Vibrio* species and the aqualysine I (AQUI) from thermophile *Thermus aquaticus*, being structural homologues, but significantly differing in terms of stability and catalytic properties [48]. In order to evaluate the difference in molecular flexibility of two homologous proteinases there was measured the quenching of their *Trp* fluorescence using acrylamide at different temperatures. The dynamics of VPR and AQUI proteins at atomic level was studied using molecular dynamic simulation. The VPR was established to comprise four amino acid residues *Trp*, three of which were present in the corresponding sites of AQUI structure. A cold-adapted VPR had a higher flexibility in most sites of protein structure. Some of these areas contained *Trp* or were in vicinity of some its residues (*Trp6*, *Trp114* and *Trp208*) in proteins.

The above changes in molecular structures of the enzymes were also found in structural proteins. For example, there was an analysis comparing amino acid composition of homologous membrane proteins of sequences from psychrophiles and their mesophilic homologues from *Vibrionaceae* family [28]. All the statistically significant ( $p < 0.01$ ) changes in the amino acid composition of proteins were found for either a complete sequence or a part of the sequence located outside membranes. The main amino acid residues participating in composition changes of proteins were the amino acids *Ala* and *Ile*, since there were the significant differences in their occurrence for general amino acid sequences, as well as for the parts of sequences of amino acid residues located outside membrane in all the studied proteins. Psychrophiles were characterised by much lower quantitative content of *Ala* and significantly higher one for *Ile*, if compared with mesophiles. In addition, the content of amino acids *Lys*, *Asp* and *Thr* was shown to be statistically higher than in all 66 psychrophilic membrane proteins as compared with mesophilic ones. A low content of such amino acid residues as



из этих областей содержат *Trp* или размещены вблизи с некоторыми его остатками (*Trp6*, *Trp114* и *Trp208*) в белках.

Описанные выше изменения молекулярных структур ферментов также обнаружены в структурных белках. Так, был проведен сравнительный анализ аминокислотного состава последовательностей гомологичных мембранных белков психрофилов и их мезофильных гомологов из семейства *Vibrionaceae* [29]. Все статистически значимые ( $p < 0,01$ ) изменения в аминокислотном составе белков были обнаружены либо для полной последовательности, либо для части последовательности за пределами мембран. Основными аминокислотными остатками в композиционных изменениях белков являются аминокислоты *Ala* и *Ile*, поскольку выявлены значительные различия в их повторяемости для общих аминокислотных последовательностей, а также для частей последовательностей аминокислотных остатков за пределами мембраны во всех исследованных белках. Характерно, что у психрофилов количественное содержание *Ala* существенно ниже, а *Ile* значительно выше, чем у мезофилов. Кроме того, показано, что содержание аминокислот *Lys*, *Asp* и *Thr* статистически больше у всех 66 психрофильных мембранных белков по сравнению с мезофильными. Установлено, что для 52-х последовательностей трансмембранных белков психрофилов характерно низкое содержание таких аминокислотных остатков, как *Arg* и *Glu*.

Таким образом, анализ физико-химических свойств мембранных белков показал более низкую гидрофобность последовательностей психрофилов [29], т. е. повышенное количество аминокислоты *Ile* в части последовательности мембранных белков, которые находятся за пределами липидного бислоя. Благодаря гидрофобности белков и дестабилизации их спиралей увеличение содержания *Ile* приводит к снижению структурной стабильности белковой молекулы, вследствие чего увеличивается гибкость областей петель холодаадаптированных белков.

S. DasSarma и соавт. [17], сравнивая последовательности аминокислот биомакромолекул холодоустойчивой бактерии *Halorubrum lacusprofundi* с еще двенадцатью *Haloarchaea*, обитающими в условиях умеренного климата, установили особенности аминокислотных замен. Для белковых последовательностей холодаадаптированной *H. lacusprofundi* характерны замены *Glu* (13,43% от общего количества замен) на *Asp* (4,35%) или *Ala* (2,36%). В большинстве случаев полярные остатки (*Thr* – 8,36% от общего количества замен и *Ser* – 6,21% от общего количества замен) и небольшие остатки (*Gly* и *Ala*) были заменены аналогичными полярными или неполярными аминокислотами, в первую

*Arg* and *Glu* was established to be typical for 52 sequences of psychrophilic transmembrane proteins.

Thus, the analysis of physical and chemical properties of membrane proteins showed a lower hydrophobicity of psychrophilic sequences [28], i. e. an increased amount of amino acid *Ile* in a part of the sequence of membrane proteins, being outside the lipid bilayer. Due to protein hydrophobicity and destabilisation of their helices an increased *Ile* content reduces a structural stability of protein molecule, thereby increasing the flexibility of loop regions of cold-adapted proteins.

S. DasSarma *et al.* compared the amino acid sequences of biomacromolecules from cold-resistant bacterium *Halorubrum lacusprofundi* with another twelve *Haloarchaea*, inhabiting in temperate climate, and established the peculiarities of amino acid substitutions. Protein sequences of cold-adapted *H. lacusprofundi* were characterised by substitutions of *Glu* (13.43% of the total number of substitutions) for *Asp* (4.35%) or *Ala* (2.36%). In most cases the polar residues (*Thr* – 8.36% and *Ser* – 6.21% of the total number of substitutions) and small residues (*Gly* and *Ala*) were substituted by similar polar or non-polar amino acids, primarily *Ser*, *Thr*, *Gly*, *Ala* or *Val*, and sometimes acid residues [14]. Non-polar *Val*, *Ile* and *Leu*, were usually substituted by the same non-polar residue or in some cases with *Met*. Aromatic amino acids, especially *Trp*, were substituted by other aromatic residues, in particular *Phe*.

In addition, the authors found the differences in 29 of 321 invariant amino acid positions (9.03%) of cold-active  $\beta$ -galactosidase of *Halorubrum lacusprofundi* from mesophilic homologues of *Haloarchaea* [14]. Five amino acid residues (*Asp* and *Glu*), located on the surface of mesophilic proteins in a modelled structure were substituted either by polar residues (*Ser*, *Gln*, *Asn*), or *Pro*, which increased hydrophobicity and reduced negative charges on protein surface. Other four substitutions observed on protein surface also increased the hydrophobicity, particularly *Thr*  $\rightarrow$  *Ala*, *Val*  $\rightarrow$  *Ile* and *Leu*  $\rightarrow$  *Phe*. There were found only three substitutions, reducing hydrophobicity of surface residues, namely *Ala* for *Ser* and *Thr* or *Gly* for *Arg*.

Basing on the results of a comparative analysis of sequences and the study of structural features of proteins there have been revealed some mechanisms of cold adaptation in macromolecules of biological objects, however, the existing data are insufficient to define a general theory of protein cold adaptation. Nevertheless, there were established certain general patterns for cold-resistant species, particularly at the level of primary protein organisation: a decrease in





очередь, *Ser*, *Thr*, *Gly*, *Ala* или *Val*, а иногда кислотными остатками. Неполлярные остатки *Val*, *Ile* и *Leu*, как правило, замещены одним и тем же неполярным остатком или в некоторых случаях *Met*. Ароматические аминокислоты, особенно *Trp*, были заменены другими ароматическими остатками, в частности *Phe*.

Кроме того, авторы установили отличия у 29 из 321 инвариантной аминокислотной позиции (9,03%) холодоактивной  $\beta$ -галактозидазы *Halorubrum lacusprofundi* от мезофильных гомологов *Haloarchaea* [17]. Пять аминокислотных остатков (*Asp* и *Glu*), находившихся на поверхности мезофильных белков в моделируемой структуре, были заменены либо на полярные остатки (*Ser*, *Gln*, *Asn*), либо на *Pro*, который увеличивает гидрофобность и уменьшает отрицательные заряды на поверхности белка. Четыре другие замены, наблюдаемые на поверхности белка, также увеличивали гидрофобность, в частности *Thr*  $\rightarrow$  *Ala*, *Val*  $\rightarrow$  *Ile* и *Leu*  $\rightarrow$  *Phe*. Были найдены только три замены, приводящие к уменьшению гидрофобности поверхностных остатков, а именно: *Ala* на *Ser* и *Thr* или *Gly* на *Arg*.

На основании результатов сравнительного анализа последовательностей и исследования структурных особенностей белков были выявлены некоторые механизмы холодовой адаптации макромолекул биологических объектов, однако данных для создания общей теории холодовой адаптации белков недостаточно. Тем не менее, установлены некоторые общие закономерности для холодоустойчивых видов, в частности на уровне первичной организации белков – снижение гидрофобности молекулярной структуры за счет замен неполярных аминокислотных остатков на полярные; для вторичной и третичной структур адаптированных к холоду протеинов характерно увеличение молекулярной гибкости вследствие уменьшения количества солевых мостиков и водородных связей, а также увеличение гидрофобных участков, взаимодействующих с растворителем.

### Исследования молекулярных особенностей белков эукариот

Для изучения молекулярных механизмов холодовой адаптации фермента печени антарктической рыбы *Chaenocephalus aceratus* (подотряд: *Notothenioidei*) были исследованы аминокислотная последовательность, каталитические характеристики, термостабильность и термодинамика реакции и тепловой инактивации *L*-глутаматдегидрогеназы (ГДГ). Впервые установлена и описана полная первичная структура ГДГ *C. aceratus*. Показано, что аминокислотные замены холодаадаптированной ГДГ приводят к менее компактной структуре бел-

молекулярной структуры гидрофобности *via* substituting non-polar amino acid residues by polar ones; in case of secondary and tertiary structures of cold-adapted proteins an increase of molecular flexibility due to a decreased number of salt bridges and hydrogen bonds, as well as the augmentation of hydrophobic sites, exposed to a solvent.

### Studies of molecular features of eukaryotic proteins

Amino acid sequence, catalytic characteristics, thermal stability, thermodynamics of reactions and heat inactivation of *L*-glutamate dehydrogenase (GDH) were investigated to elucidate molecular mechanisms of cold adaptation of liver enzyme in Antarctic fish *Chaenocephalus aceratus* (*Notothenioidei* suborder). Firstly there was established and described a complete primary structure of GDH of *C. aceratus*. It has been shown that amino acid substitutions of cold-adapted GDH resulted to less compact structure of protein molecule with a small number of salt bridges if compared with homologous mesophilic enzymes. Functional assessment denoted effective compensation of the temperature coefficient ( $Q_{10}$ ), achieved by increasing  $k_{cat}$  and changing substrate concentration providing a rate of half the maximum reaction ( $S_{0.5}$ ), which allowed to reach such a catalytic efficiency at low temperatures, as found in bovine GDH at physiological temperature. Structural and functional characteristics of the enzyme testified to a high degree of macromolecule flexibility [10].

Stability of cold-adapted trypsin of *Paranotothenia magellanica* Antarctic fish and *Gadus morhua* Atlantic cod was reduced with the decrease of packing density in two areas of protein molecule core, diminishing of number of intra-domain hydrogen bonds, and rise in destabilization of  $\alpha$ -helix C-terminal [33]. Cold-adapted enzyme molecule helices lacked four hydrogen bonds and two salt bridges, and the whole protein molecule had weaker van-der-Waals interactions if compared to mesophilic analogues.

A comparative study using MD-modeling of cold-adapted enzyme (uracil-DNA-glycosylase of *Gadus morhua* Atlantic cod) and human thermoactive enzyme analogue showed that the first had greater structural flexibility, resulting in an increase of catalytic activity at low temperatures [39]. Loop *Leu272*, involved in DNA-recognition, was the most flexible part of the Atlantic cod protein structure if compared with the human enzyme.

Lactate dehydrogenase (LDH) is a classical model for studying the structural basis of enzyme adaptation. Its catalytic mechanism and three-





ковой молекулы с меньшим количеством солевых мостиков по сравнению с гомологичными мезофильными ферментами. Функциональная характеристика указывает на эффективную компенсацию температурного коэффициента ( $Q_{10}$ ), достигнутую за счет увеличения  $k_{cat}$  и изменения концентрации субстрата, при которой достигается половина максимальной скорости реакции ( $S_{0,5}$ ), что дает каталитическую эффективность в условиях низкой температуры, подобную бычьей ГДГ при физиологической температуре. Структурные и функциональные характеристики свидетельствуют о высокой степени гибкости макромолекулы [13].

Снижение стабильности холодоадаптированного трипсина антарктической рыбы *Paranotothenia magellanica* и атлантической трески *Gadus morhua* возникает в результате уменьшения плотности упаковки в двух областях ядра белковой молекулы и количества внутридоменных водородных связей, дестабилизации С-конца  $\alpha$ -спирали [34]. В спиральных молекулах холодоадаптированного фермента отсутствовали четыре водородные связи и два солевых мостика, и в белковой молекуле ван-дер-ваальсовы взаимодействия были слабыми по сравнению с мезофильными аналогами.

В результате сравнительного исследования посредством MD-моделирования холодоадаптированного фермента (урацил-ДНК-гликозилаза атлантической трески *G. morhua*) и его аналога – теплоактивного фермента человека – установлено, что первый обладал большей структурной гибкостью, что выражалось в увеличении каталитической активности при низких температурах [39]. Петля *Leu272*, участвующая в ДНК-узнавании, – наиболее гибкая часть белковой структуры атлантической трески по сравнению с ферментом человека.

Классической моделью для изучения структурной основы ферментативной адаптации является лактатдегидрогеназа (ЛДГ), каталитический механизм и трехмерная структура которой были детально исследованы.

N. Coquelle и соавт. [14] представили сравнительный биохимический и структурный анализ различных ЛДГ (антарктической рыбы *Champsocephalus gunnari*, мезофильной бактерии *Deinococcus radiodurans* и гипертермофильной бактерии *Thermus thermophilus*), функционально адаптированных к широкому диапазону температур. Исходя из термодинамических параметров активации ЛДГ, авторами было показано, что температурная адаптация от горячих к холодным условиям обусловлена уменьшением энтальпии активации и увеличением энтропии активации. Структурные сравнения (гипертермофильной ЛДГ с мезофильной и мезофильной ЛДГ с психрофильной) показали, что температурная адаптация обусловлена несколькими аминокислот-

dimensional structure had been studied in detail by many scholars.

N. Coquelle *et al.* [11] conducted a comparative biochemical and structural analysis of different LDHs (from Antarctic fish *Champsocephalus gunnari*, mesophilic bacteria *Deinococcus radiodurans* and hyperthermophilic bacterium *Thermus thermophilus*), functionally adapted to a wide range of temperatures. Based on thermodynamic parameters of LDH activation, the authors showed that the temperature adaptation from hot to cold conditions was due to a decrease in activation enthalpy and an increase of its entropy. Structure comparisons (hyperthermophilic LDH vs. mesophilic one and mesophilic LDH vs. psychrophilic) demonstrated the fact that the temperature adaptation was stipulated by several amino acid substitutions, which were located in critical areas of the enzyme. These substitutions were important in conformational stability and/or local flexibility.

P.A. Fields and D.E. Houseman [18] used site-directed mutagenesis to determine the differences in amino acid composition of A4-lactate dehydrogenase (A4-LDH) from Nototheniids fish *Chaenocephalus aceratus*, inhabiting in low temperature conditions ( $-1.86 \pm 2^\circ\text{C}$ ), and its ortholog from warm-adapted bony fish. The aim was to reveal the mechanisms of temperature adaptations of biological objects at molecular level. Amino acid substitutions, associated with motility of helices  $\alpha 1\text{G}-2\text{G}$  and  $\alpha\text{H}$  were responsible for cold-adaptive changes in kinetics of A4-LDH in Nototheniids. In particular, 14 residues of the loop  $\beta\text{J}-\alpha 1\text{G}$  in the N-terminus of helix  $\alpha 1\text{G}-2\text{G}$  comprised five differences between the two consensus sequences (36% if compared with 7% in the whole molecule). Two of them, *Gly213Thr* and *Gly224Ser*, were involved in the replacement of the polar residues in warm-adapted forms for glycine ones in Nototheniid orthologs. These results confirmed that the adaptive substitutions, which occurred relatively far from the active site and were associated with the structure motility (*Gly213Thr*, *Gly224Ser* and *Ala310Pro*), affected the catalysis activation energy barriers. Cold-adaptive orthologs had lower activation energy values ( $E_a$ ) and did not affect the affinity of the substrate. In contrast, the substitutions associated with structure motility, located relatively close to the active site (*Glu233Met* (nototheniids  $\rightarrow$  non-nototheniids) and *Gln317Val*), affected both the Michaelis constant for pyruvate substrate ( $K_m^{\text{PYR}}$ ) and the  $E_a$ .

Structures of two homologous families of psychrophilic (*Euplotes nobilii*) and mesophilic (*Euplotes raikovi*) signal proteins of protozoan ciliates *Euplotes* were comparatively analyzed by  $^1\text{H}$  NMR homonuclear method [3]. The differences in the total

ными заменами, которые локализованы в критических областях фермента. Эти замены играют важную роль в конформационной стабильности и/или локальной гибкости.

P.A. Fields и D.E. Houseman [21] посредством сайт-направленного мутагенеза определяли отличия в аминокислотном составе А4-лактатдегидрогеназы (А4-ЛДГ) нототениевой рыбы *Chaenosephalus aceratus*, обитающей в низкотемпературных условиях ( $-1,86 \pm 2^\circ\text{C}$ ), и ортолога теплоадаптированной костистой рыбы с целью изучения механизмов температурных адаптаций биообъектов на молекулярном уровне. Аминокислотные замены, связанные с подвижностью спиралей  $\alpha 1\text{G}-2\text{G}$  и  $\alpha\text{H}$ , отвечают за холодадаптивные изменения в кинетике А4-ЛДГ в нототениевых. В частности 14 остатков петли  $\beta\text{J}-\alpha 1\text{G}$  непосредственно на N-конце спирали  $\alpha 1\text{G}-2\text{G}$  содержат пять отличий между двумя консенсусными последовательностями (36% по сравнению с 7% во всей молекуле). Из них два *Gly213Thr* и *Gly224Ser* участвуют в замене полярных остатков в теплоадаптированных формах на остатки глицина в нототениевых ортологах. Кроме того, эти результаты подтверждают, что адаптивные замены, происходящие относительно далеко от активного центра и связанные с подвижностью структур (*Gly213Thr*, *Gly224Ser* и *Ala310Pro*), влияют на активацию энергетических барьеров катализа. Холодадаптированные ортологи имеют более низкие значения энергии активации ( $E_a$ ) и не влияют на сродство субстрата. Напротив, замены, связанные с подвижностью структур и находящиеся относительно близко к активному центру (*Glu233Met* (нототениевые  $\rightarrow$  ненототениевые), *Gln317Val*), влияют как на константу Михаэлиса для субстрата пирувата ( $K_m^{PYR}$ ), так и на  $E_a$ .

Сравнительный анализ структур двух гомологичных семейств психрофильных (*Euplotes nobilii*) и мезофильных (*Euplotes raikovi*) сигнальных белков простейшей инфузории *Euplotes* проведен с помощью метода гомоядерного  $^1\text{H}$  ЯМР [6]. В этих белковых семействах были установлены различия в общем содержании полярных и гидрофобных аминокислот. Феромоны *E. nobilii* имеют более высокое содержание полярных аминокислот, чем феромоны *E. raikovi* (45 и 30% соответственно) и более низкое содержание гидрофобных остатков (44 и 57% соответственно). Среди полярных остатков наибольшие различия между феромонами *E. nobilii* и *E. raikovi* отмечены для *Thr* (11,7 и 5,7% соответственно), *Asn* (7,7 и 4,2% соответственно) и *Ser* (8,6 и 5,7% соответственно), а среди гидрофобных – для *Leu* (1,1 и 7,3% соответственно), *Pro* (4,7 и 8,9% соответственно), *Ile* (1,6 и 5,7% соответственно) и *Met* (1,2 и 3,6% соответственно). Различия в общей гид-

content of the polar and hydrophobic amino acids were revealed in these protein families. Pheromones from *E. nobilii* had a higher content of polar amino acids than the ones of *E. raikovi* (45 and 30%, respectively) and a lower content of hydrophobic residues (44 and 57%, respectively). Among polar residues the highest differences between pheromones from *E. nobilii* and *E. raikovi* were found for *Thr* (11.7% and 5.7, respectively), *Asn* (7.7 and 4.2%, respectively) and *Ser* (8.6 and 5.7% respectively), and among hydrophobic ones they were revealed for *Leu* (1.1 and 7.3%, respectively), *Pro* (4.7 and 8.9%, respectively), *Ile* (1.6 and 5.7%, respectively) and *Met* (1.2 and 3.6%, respectively). The differences in the hydrophilic and hydrophobic properties were manifested in the GRAVY and aliphatic indices, which testified to occurred interactions with the solvent and low stabilizing hydrophobic effects in protein core, respectively [46]. Both indices have lower values of proteins from *E. nobilii*, than the ones from *E. raikovi* ( $-0.49$  vs. to  $0.01$  and  $25.90$  vs.  $65.51$ , respectively), what was consistent with previous comparisons of cold-adapted enzymes with their mesophilic and/or thermophilic homologues [5]. In terms of the charged amino acid residues, pheromones from *E. nobilii* and *E. raikovi* had similar amounts of arginine, aspartate, glutamate, histidine, and lysine (16 vs. 17%). However, there was a significant difference between the two protein families by the content of *Asp* and *Glu*. The amount of *Glu* in pheromones from *E. nobilii* was about 50% of that from *E. raikovi* (4.8 vs. 9.6%), and for *Asp* these was 9.6 and 5.2%, respectively.

Another report dealt with comparative analysis of the primary sequence and enzymatic properties of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of sarcoplasmic reticulum of skeletal muscles (SERCA1) from freeze-tolerant frog *Rana sylvatica* and cold-intolerant frog *Rana clamitans* [15]. It was found using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis that the molecular weight of SERCA1 of *R. sylvatica* was 115 kDa, and in *R. clamitans* it was 105 kDa. The comparison of the primary sequence showed that SERCA1 of *R. sylvatica* contained seven unique amino acid substitutions, three of which were in the ATP-binding region. Comparing the temperature dependence of both ATP hydrolysis and  $\text{Ca}^{2+}$  transport established that SERCA1 of *R. sylvatica* had a significantly lower activation energy below  $20^\circ\text{C}$  and approx. 2 times higher ATPase activity of  $\text{Ca}^{2+}$  at about  $0^\circ\text{C}$ . Thus, the differences in kinetic properties of SERCA1 of these two species were essential, including the temperature dependence of ATP hydrolysis and transport of  $\text{Ca}^{2+}$ , ATP kinetics and kinetics cooperativity of  $\text{Ca}^{2+}$ .

A. Rizzello *et al.* [41] determined the domain of seven amino acid residues (VDMSRKS) of COOH-



рофильности и гидрофобности проявляются в индексе GRAVY и алифатическом индексе, которые свидетельствуют о совершенных взаимодействиях с растворителем и низких стабилизирующих гидрофобных эффектах в сердцевине белка, соответственно [46]. Оба индекса имеют более низкие значения для белков *E. nobilii*, чем для белков *E. raikovi* (−0,49 против 0,01 и 25,90 против 65,51 соответственно), что согласуется с предыдущими данными сравнения холодаадаптированных ферментов с их мезофильными и/или термофильными гомологами [8]. Что касается заряженных аминокислотных остатков, то феромоны *E. nobilii* и *E. raikovi* имеют аналогичные количества аргинина, аспарагиновой и глутаминовой кислоты, гистидина и лизина (16 против 17%). Однако существует значительное расхождение между двумя семействами белков в содержании *Asp* и *Glu*. Количество *Glu* в феромонах *E. nobilii* составляет около 50% от содержащейся в феромонах *E. raikovi* (4,8 против 9,6%), а для *Asp* – 9,6 и 5,2% соответственно.

Также был проведен сравнительный анализ первичной последовательности и ферментативных свойств  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы саркоплазматического ретикулума скелетных мышц (SERCA1) холодоустойчивой лягушки *Rana sylvatica* с холодоустойчивой лягушкой *Rana clamitans* [18]. Методом SDS-электрофореза в полиакриламидном геле было установлено, что молекулярная масса SERCA1 *R. sylvatica* составила 115 кДа, а у *R. clamitans* – 105 кДа. Сравнение первичной последовательности показало, что в SERCA1 *R. sylvatica* обнаружено семь уникальных аминокислотных замен, три из которых находятся в АТФ-связывающей области. При сравнении температурной зависимости как гидролиза АТФ, так и транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  установлено, что SERCA1 *R. sylvatica* обладает значительно меньшей энергией активации ниже 20°C и приблизительно в 2 раза большей активностью  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы около 0°C. Таким образом, различия в кинетических свойствах SERCA1 этих двух видов существенны, включая температурную зависимость гидролиза АТФ и транспорта  $\text{Ca}^{2+}$ , кинетику АТФ и кооперативность кинетики  $\text{Ca}^{2+}$ .

А. Rizzello и соавт. [41] определили домен из семи аминокислотных остатков (VDMSRKS) COOH-конца белкового переносчика белокровной рыбы *Chionodraco hamatus*, обитающей в холодных водах Антарктики при −1,9°C, который участвует в холодной адаптации мембранных белков. Именно этот домен белкового переносчика *C. hamatus* позволяет интегральному трансмембранному белку функционировать при отрицательных температурах.

На основании приведенных данных можно прийти к заключению, что модификации белков эукариот, как и прокариот, сводятся к замене неполярных

terminal of protein carrier of icefish *Chionodraco hamatus*, inhabiting in Antarctic cold waters at −1.9°C, involved in cold adaptation of membrane proteins. Namely this domain of protein carrier *C. hamatus* allows functioning of integral transmembrane protein at low temperatures.

Based on the above data it can be concluded that modification of both eukaryotic and prokaryotic proteins results in the substitution of non-polar amino acids to polar ones, reduced number of hydrogen bonds and salt bridges. In particular, cold-adapted eukaryotic enzymes have more structural flexibility if compared with warm-adapted ones. Temperature adaptation of enzymes may be stipulated by amino acid substitutions, localized in certain areas of an enzyme that promotes its conformational stability.

It is known that under low temperature conditions the cold-resistant organisms are able to synthesize the families of specific proteins (antifreeze proteins [6, 8, 20, 38, 47], nucleator proteins [16, 30, 37, 51], cold shock proteins [12, 40]), contributing to their survival under unfavourable factors.

L.I. Relina investigated the molecular mechanisms of protein cold acclimation of mealworm *Tenebrio molitor* [26] and described several qualitative and quantitative changes in spectrum of its proteins after 2-week adaptation. A band with molecular weight of 65 kDa and changes in fractions with 30, 16–18 and 5–10 kDa were revealed using SDS-electrophoresis in PAAG. The Arrhenius temperature dependencies of *de novo* synthesis of protein and RNA in acclimated and non-acclimated larvae were established.

E.G. Pogozykh demonstrated that during winter the red muscle and myocardium of *Carassius auratus* acquired the proteins with molecular weight of 205 kDa, and liver did with 172 kDa [25]. It has been found that after two-week acclimation at 20...22°C in winter the protein spectra of red muscles, myocardium and liver of fish of this species did not differ from these in the summer, whereas in spring at 4...5°C, the protein with molecular weight of 205 kDa, characteristic for winter conditions, remained only in red muscles.

Whereas hydrophobic interactions in protein core play an important role in folding and stabilization of the biomacromolecule [7], the more hydrophobic core of protein can make it more resistant (stable) to high temperatures. Salt bridges are an important factor in thermal stabilization of protein as well [31, 34, 50]. Amino acid *Cys* is capable of forming disulfide bonds with such residues.

The length of amino acid chain could also affect the thermal stability of protein. Long-chain amino acid provides a protein thermostability, since it could form more Van-der-Waals interactions with other amino





аминокислот на полярные, уменьшению количества водородных связей и солевых мостиков. В частности холодоадаптированные ферменты эукариот обладают большей структурной гибкостью по сравнению с их теплоактивными аналогами. Температурная адаптация энзимов может быть обусловлена аминокислотными заменами, локализованными в определенных областях фермента, что способствует его конформационной стабильности.

Известно, что при низкотемпературных условиях среды холодоустойчивые организмы способны синтезировать семейства специфических белков (антифризные белки [3, 9, 11, 23, 47], белки-нуклеаторы [19, 31, 38, 51], белки холодового шока [15, 40]), которые способствуют их выживаемости при действии неблагоприятных факторов.

Так, Л.И. Релиной были исследованы молекулярные механизмы холодовой акклимации белков большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* [2], описаны качественные и количественные изменения спектра его белков после 2-недельной адаптации. С помощью SDS-электрофореза в ПААГ были выявлены полосы с м. м. 65 кДа и изменения во фракциях 30, 16–18 и 5–10 кДа. Установлены температурные зависимости Аррениуса синтеза *de novo* белка и РНК у акклимированных и неакклимированных личинок.

Е.Г. Погожих [1] было показано, что в зимний период в красных мышцах и миокарде у *Carassius auratus* появляются белки с м. м. 205 кДа, а в печени – 172 кДа. Установлено, что зимой при 20...22°C после 2-недельной акклимации белковые спектры красных мышц, миокарда и печени рыб этого вида не отличаются от таковых летом, а весной при 4...5°C белок с м. м. 205 кДа, который характерен для зимних условий, сохраняется только в красных мышцах.

Поскольку гидрофобные взаимодействия в ядре белка играют важную роль в процессе фолдинга и стабилизации биомолекулы [10], то более гидрофобная сердцевина белка может сделать его более устойчивым (стабильным) к высоким температурам. Также важный фактор в термостабилизации протеина – солевые мостики [32, 35, 50]. Именно аминокислота *Sus* способна формировать дисульфидные связи с подобными остатками.

На термостабильность белка может оказывать влияние и длина аминокислотной цепи. Длинноцепочечная аминокислота обеспечивает термоустойчивость белка, так как она может образовывать больше ван-дер-ваальсовых взаимодействий с другими боковыми цепями аминокислот. G. Saelensminde и соавт. [44] выявили большое количество контактов с длинноцепочечными аминокислотами как на поверхности, так и в ядре белка. Уста-

acid side chains. G. Saelensminde *et al.* revealed in thermophiles a large number of contacts with long-chain amino acids both on surface and in core of the protein [44].

It has been found that the hydrophobic amino acid residue Pro, is usually contained in proteins adapted to the high temperatures. Presumably, this amino acid is more rigid than the other amino acid residues, which reduces the entropy of the main chain, therefore unfolding is less probable than at high temperatures. A number of *Pro* residues increases from psychrophiles to mesophiles, in thermophiles the contacts between Pro and hydrophobic residues rise both in core and on protein surface as well.

A cation- $\pi$ -bonds and contacts between the positively charged residues of *Arg* and *Lys* with aromatic residues *Trp* or *Tyr* play an important role in thermal stabilization of protein molecules [9, 24].

Based on the above data it can be concluded that the main feature of proteins in cold-adapted pro- and eukaryotes is the cold-resistance, *i. e.* preservation of their native conformation and function under low temperatures. The mechanisms of molecular adaptations of proteins within the low temperature range are associated with the weakening of several intramolecular interactions, reduction of the number of hydrogen bonds and salt bridges, which, as a rule, contribute to increase of overall flexibility of protein molecule or its certain parts.

## References

1. Adekoya O.A., Helland R., Willassen N.P. et al. Comparative sequence and structure analysis reveal features of cold adaptation of an enzyme in the thermolysin family. *Proteins* 2006; 62(2): 435–449.
2. Aghajari N., Feller G., Gerday C. et al. Structures of the psychrophilic *Alteromonas haloplanctis*  $\alpha$ -amylase give insights into cold adaptation at a molecular level. *Structure* 1998; 6(12): 1503–1516.
3. Alimenti C., Vallesi A., Pedrini B. et al. Molecular cold-adaptation: comparative analysis of two homologous families of psychrophilic and mesophilic signal proteins of the orotzoan ciliate, *Euplotes*. *IUBMB Life* 2009; 61(8): 838–845.
4. Alvarez M., Zeelen J.P., Mainfroid V. et al. Triose-phosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. *J Biol Chem* 1998; 273(4): 2199–2206.
5. Arnorsdottir J., Smaradottir R.B., Magnusson O. et al. Characterization of a cloned subtilisin-like serine proteinase from a psychrotrophic *Vibrio* species. *Eur J Biochem* 2002; 269(22): 5536–5546.
6. Bar-Dolev M., Celik Y., Wettlaufer J.S. et al. New insights into ice growth and melting modifications by antifreeze proteins. *J R Soc Interface* 2012; 9(77): 3249–3259.



новлено, что гидрофобный аминокислотный остаток *Pro*, как правило, содержится в белках, адаптированных к высоким температурам. Предположительно, данная аминокислота является более жесткой, чем другие аминокислотные остатки, что уменьшает энтропию основной цепи, поэтому анфолдинг менее вероятен при высоких температурах. Количество остатков *Pro* увеличивается от психрокок мезофилам, в случае термофилов контакты между *Pro* и гидрофобными остатками увеличиваются как в ядре, так и на поверхности белка.

Важную роль в термостабилизации белковых молекул играют катион- $\pi$ -связь и контакты между положительно заряженными остатками *Arg* и *Lys* с ароматическими остатками *Trp* или *Tyr* [12, 27].

На основании изложенных выше данных можно заключить, что главным свойством белков холодоадаптированных про- и эукариот является холодоустойчивость, т. е. сохранение их нативной конформации и функции в условиях низких температур. Механизмы молекулярных адаптаций белков в низкотемпературном диапазоне связаны с ослаблением некоторых внутримолекулярных взаимодействий, уменьшением числа водородных связей и солевых мостиков, которые, как правило, способствуют увеличению общей гибкости белковой молекулы или ее отдельных областей.

## Литература

1. Гулевский А.К., Релина Л.И., Погожих Е.Г. Влияние времени года и температурного режима на спектр белков тканей карася серебряного *Carassius auratus* // Гидробиологический журнал. – 2010. – Т. 46, №3. – С. 79–85.
2. Гулевский А.К., Рязанцев В.В., Грищенко Е.А., Релина Л.И. Изменения в спектре белков личинок большого мучного хрущака (*Tenebrio molitor*) в период холодовой акклимации // Проблемы криобиологии. – 1995. – №4. – С. 29–32.
3. Никитин Е.Б. Микробиология с основами иммунологии. – Павлодар, 2004. – 180 с.
4. Adekoya O.A., Helland R., Willassen N.P. et al. Comparative sequence and structure analysis reveal features of cold adaptation of an enzyme in the thermolysin family // Proteins. – 2006. – Vol. 62, №2. – P. 435–449.
5. Aghajari N., Feller G., Gerday C. et al. Structures of the psychrophilic *Alteromonas haloplanctis*  $\alpha$ -amylase give insights into cold adaptation at a molecular level // Structure. – 1998. – Vol. 6, №12. – P. 1503–1516.
6. Alimenti C., Vallesi A., Pedrini B. et al. Molecular cold-adaptation: comparative analysis of two homologous families of psychrophilic and mesophilic signal proteins of the protozoan ciliate, *Euplotes* // IUBMB Life. – 2009. – Vol. 61, №8. – P. 838–845.
7. Alvarez M., Zeelen J.P., Mainfroid V. et al. Triose-phosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. Kinetic and structural properties // J. Biol. Chem. – 1998. – Vol. 273, №4. – P. 2199–2206.
8. Arnorsdottir J., Smaradottir R.B., Magnusson O. et al. Characterization of a cloned subtilisin-like serine proteinase from a
9. Branden C., Tooze J. Introduction to protein structure. New York: Garland; 1999.
10. Celika Y., Drorib R., Pertaya-Brauna N. et al. Microfluidic experiments reveal that antifreeze proteins bound to ice crystals suffice to prevent their growth. PNAS 2013; 110(4): 1309–1314.
11. Chakravarty S., Varadarajan R. Elucidation of factors responsible for enhanced thermal stability of proteins: a structural genomics based study. Biochemistry 2002; 41(25): 8152–8161.
12. Ciardiello M.A., Camardella L., Carratore V. et al. L-glutamate dehydrogenase from the antarctic fish *Chaenocephalus aceratus*. Primary structure, function and thermodynamic characterisation: relationship with cold adaptation. Biochim Biophys Acta 2000; 1543(1): 11–23.
13. Coquelle N., Fioravanti E., Weik M. et al. Activity, stability and structural studies of lactate dehydrogenases adapted to extreme thermal environments. J Mol Biol 2007; 374(2): 547–562.
14. Craig E.A., Gambill B.D., Nelson R.J. Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. Microbiol Rev 1993; 57(2): 402–414.
15. D'Amico S., Gerday C., Feller G. Activity stability relationships in extremophilic enzymes. J Biol Chem 2003; 278(10): 7891–7896.
16. DasSarma S., Capes M.D., Karan R. et al. Amino acid substitutions in cold-adapted proteins from *Halorubrum lacusprofundi*, an extremely halophilic microbe from Antarctica. PLoS ONE 2013; 8(3): e58587.
17. Dode L., Baelen K.V., Wuytack F. et al. Low temperature molecular adaptation of the skeletal muscle sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 1 (SERCA 1) in the wood frog (*Rana sylvatica*). J Biol Chem 2001; 276(6): 3911–3919.
18. Duman J.G. Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods. Annu Rev Physiol 2001; 63: 327–357.
19. Fields P.A. Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. Comp Biochem Physiol A 2001; 129(2–3): 417–431.
20. Fields P.A., Houseman D.E. Decreases in activation energy and substrate affinity in cold-adapted A4-lactate dehydrogenase: evidence from the Antarctic notothenioid fish *Chaenocephalus aceratus*. Mol Biol Evol 2004; 21(12): 2246–2255.
21. Franks F. Protein destabilization at low temperatures. Adv Prot Chem 1995; 46: 105–139.
22. Garnham C.P., Natarajan A., Middleton A.J. et al. Compound ice-binding site of an antifreeze protein revealed by mutagenesis and fluorescent tagging. Biochemistry 2010; 49(42): 9063–9071.
23. Georlette D., Damien B., Blaise V. et al. Structural and functional adaptations to extreme temperatures in psychrophilic, mesophilic, and thermophilic DNA ligases. J Biol Chem 2003; 278(39): 37015–37023.
24. Georlette D., Jonsson Z.O., Van Petegem F. et al. A DNA ligase from the psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanctis* gives insights into the adaptation of proteins to low temperatures. Eur J Biochem 2000; 267(12): 3502–3512.
25. Gianese G., Bossa F., Pascarella S. Comparative structural analysis of psychrophilic and meso- and thermophilic enzymes. Proteins 2002; 47(2): 236–249.
26. Gromiha M.M., Thomas S., Santhosh C. Role of cation- $\pi$  interactions to the stability of thermophilic proteins. Prep Biochem Biotechnol 2002; 32(4): 355–362.
27. Gulevsky A.K., Relina L.I., Pogozychik Ye.G. Influence of season and temperature regimen on tissue proteins spectrum in the goldfish *Carassius auratus*. Hidrobiologicheskii Zhurnal 2010; 46(3): 79–85.
28. Gulevsky A.K., Ryazantsev V.V., Grishchenkova Ye.A., Relina L.I. Changes in protein composition of mealworms (*Tenebrio molitor*) during cold acclimation. Problems of Cryobiology 1995; (4): 29–32.



- psychrotrophic *Vibrio* species // *Eur. J. Biochem.* – 2002. – Vol. 269, №22. – P. 5536–5546.
9. Bar-Dolev M., Celik Y., Wettlaufer J.S. et al. New insights into ice growth and melting modifications by antifreeze proteins // *J. R. Soc. Interface.* – 2012. – Vol. 9, №77. – P. 3249–3259.
  10. Branden C., Tooze J. Introduction to protein structure. – New York: Garland Publishing, 1999. – 426 p.
  11. Celika Y., Drorib R., Pertaya-Brauna N. et al. Microfluidic experiments reveal that antifreeze proteins bound to ice crystals suffice to prevent their growth // *PNAS.* – 2013. – Vol. 110, №4. – P. 1309–1314.
  12. Chakravarty S., Varadarajan R. Elucidation of factors responsible for enhanced thermal stability of proteins: a structural genomics based study // *Biochemistry.* – 2002. – Vol. 41, №25. – P. 8152–8161.
  13. Ciardiello M.A., Camardella L., Carratore V. et al. L-glutamate dehydrogenase from the antarctic fish *Chaenocephalus aceratus*. Primary structure, function and thermodynamic characterisation: relationship with cold adaptation // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol. 1543, №1. – P. 11–23.
  14. Coquelle N., Fioravanti E., Weik M. et al. Activity, stability and structural studies of lactate dehydrogenases adapted to extreme thermal environments // *J. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 374, №2. – P. 547–562.
  15. Craig E.A., Gambill B.D., Nelson R.J. Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis // *Microbiol. Rev.* – 1993. – Vol. 57, №2. – P. 402–414.
  16. D'Amico S., Marx J.C., Gerday C. et al. Activity-stability relationships in extremophilic enzymes // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, №10. – P. 7891–7896.
  17. DasSarma S., Capes M.D., Karan R. et al. Amino acid substitutions in cold-adapted proteins from *Halorubrum lacusprofundi*, an extremely halophilic microbe from Antarctica // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8, №3. – e58587.
  18. Dode L., Baelen K.V., Wuytack F. et al. Low temperature molecular adaptation of the skeletal muscle sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 1 (SERCA 1) in the wood frog (*Rana sylvatica*) // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, №6. – P. 3911–3919.
  19. Duman J.G. Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods // *Annu. Rev. Physiol.* – 2001. – Vol. 63. – P. 327–357.
  20. Fields P.A. Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility // *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* – 2001. – Vol. 129, №2, 3. – P. 417–431.
  21. Fields P.A., Houseman D.E. Decreases in activation energy and substrate affinity in cold-adapted A4-lactate dehydrogenase: evidence from the Antarctic notothenioid fish *Chaenocephalus aceratus* // *Mol. Biol. Evol.* – 2004. – Vol. 21, №12. – P. 2246–2255.
  22. Franks F. Protein destabilization at low temperatures // *Adv. Prot. Chem.* – 1995. – Vol. 46. – P. 105–139.
  23. Garnham C.P., Natarajan A., Middleton A.J. et al. Compound ice-binding site of an antifreeze protein revealed by mutagenesis and fluorescent tagging // *Biochemistry.* – 2010. – Vol. 49, №42. – P. 9063–9071.
  24. Georlette D., Damien B., Blaise V. et al. Structural and functional adaptations to extreme temperatures in psychrophilic, mesophilic, and thermophilic DNA ligases // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, №39. – P. 37015–37023.
  25. Georlette D., Jonsson Z.O., Van Petegem F. et al. A DNA ligase from the psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis* gives insights into the adaptation of proteins to low temperatures // *Eur. J. Biochem.* – 2000. – Vol. 267, №12. – P. 3502–3512.
  26. Gianese G., Bossa F., Pascarella S. Comparative structural analysis of psychrophilic and meso- and thermophilic enzymes // *Proteins.* – 2002. – Vol. 47, №2. – P. 236–249.
  27. Gromiha M.M., Thomas S., Santhosh C. Role of cation- $\pi$  interactions to the stability of thermophilic proteins // *Prep. Biochem. Biotechnol.* – 2002. – Vol. 32, №4. – P. 355–362.
  27. Jaenicke R., Bohm G. The stability of proteins in extreme environments. *Curr Opin Struct Biol* 1998; 8(6): 738–748.
  28. Kahlke T., Thorvaldsen S. Molecular characterization of cold adaptation of membrane proteins in the *Vibrionaceae* core-genome. *PLOS ONE* 2012; 7(12): 1–9.
  29. Koutsoulis D., Wang E., Tzanodaskalaki M. et al. Directed evolution on the cold adapted properties of TAB5 alkaline phosphatase. *Protein Eng Des Sel* 2008; 21(5): 319–327.
  30. Kumaki Y., Kawano K., Hikichi K. et al. A circular loop of the 16-residue repeating unit in ice nucleation protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 371(1): 5–9.
  31. Kumar S., Ma B., Tsai C.J. et al. Electrostatic strengths of salt bridges in thermophilic and mesophilic glutamate dehydrogenase monomers. *Proteins* 2000; 38(4): 368–383.
  32. Kumar V., Sharma N., Bhalla T.C. In Silico analysis of  $\alpha$ -galactosidases primary and secondary structure in relation to temperature adaptation. *J Amino Acids* 2014; 24: 475839.
  33. Leiros H.K., Willassen N.P., Smalås A.O. Structural comparison of psychrophilic and mesophilic trypsin. Elucidating the molecular basis of cold-adaptation. *Eur J Biochem* 2000; 267(4): 1039–1049.
  34. Li W., Godzik A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 2006; 22(13): 1658–1659.
  35. Lonhienne T., Zoidakis J., Vorgias C.E. et al. Modular structure, local flexibility and cold-activity of a novel chitinase from a psychrophilic Antarctic bacterium. *J Mol Biol* 2001; 310: 291–297.
  36. Michaux C., Massant J., Kerff F. et al. Crystal structure of a cold-adapted class C beta-lactamase. *FEBS J* 2008; 275(8): 1687–1697.
  37. Muryoi N., Matsukawa K., Yamade K. et al. Purification and properties of an ice-nucleating protein from an ice-nucleating bacterium, *Pantheoa ananatis* KUIN-3. *J Biosci Bioeng* 2003; 95(2): 157–163.
  38. Nikitin E.B. Microbiology of the basics of immunology. Pavlodar: Arman-PV; 2004.
  39. Olufsen M., Smalås A.O., Moe E. et al. Increased flexibility as a strategy for cold adaptation: a comparative molecular dynamics study of cold- and warm-active uracil DNA glycosylase. *J Biol Chem* 2005; 280(18): 18042–18048.
  40. Posner M., Kiss A.J., Skiba J. et al. Functional validation of hydrophobic adaptation to physiological temperature in the small heat shock protein  $\alpha$ A-crystallin. *PLoS One* 2012; 7(3): e34438.
  41. Rizzello A., Romano A., Kottrab G. et al. Protein cold adaptation strategy via a unique seven-amino acid domain in the icefish (*Chionodraco hamatus*) PEPT1 transporter. *PNAS* 2013; 110(17): 7068–7073.
  42. Roy D., Sengupta S. Structural features of a cold-adapted Alaskan bacterial lipase. *J Biomol Struct Dyn* 2007; 24(5): 463–470.
  43. Russell R.J., Gerike U., Danson M.J. et al. Structural adaptations of the cold-active citrate synthase from an Antarctic bacterium. *Structure* 1998; 6(3): 351–361.
  44. Saelensminde G., Halskau O.Jr., Jonassen I. Amino acid contacts in proteins adapted to different temperatures: hydrophobic interactions and surface charges play a key role. *Extremophiles* 2009; 13(1): 11–20.
  45. Sato Y., Watanabe S., Yamaoka N. et al. Gene cloning of cold-adapted isocitrate lyase from a psychrophilic bacterium, *Colwellia psychrerythraea*, and analysis of amino acid residues involved in cold adaptation of this enzyme. *Extremophiles* 2008; 12(1): 107–117.
  46. Schiffer C.A., Dotsch V. The role of protein-solvent interactions in protein unfolding. *Curr Opin Biotechnol* 1996; 7(4): 428–432.
  47. Scotter A.J., Marshall C.B., Graham L.A. et al. The basis for hyperactivity of antifreeze proteins. *Cryobiology* 2006; 53(2): 229–239.





28. Jaenicke R., Bohm G. The stability of proteins in extreme environments // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 1998. – Vol. 8, №6. – P. 738–748.
29. Kahlke T., Thorvaldsen S. Molecular characterization of cold adaptation of membrane proteins in the *Vibrionaceae* core-genome // *PLOS ONE*. – 2012. – Vol. 7, №12. – e51761.
30. Koutsioulis D., Wang E., Tzanodaskalaki M. et al. Directed evolution on the cold adapted properties of TAB5 alkaline phosphatase // *Protein Eng. Des. Sel.* – 2008. – Vol. 21, №5. – P. 319–327.
31. Kumaki Y., Kawano K., Hikichi K. et al. A circular loop of the 16-residue repeating unit in ice nucleation protein // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2008. – Vol. 371, №1. – P. 5–9.
32. Kumar S., Ma B., Tsai C.J. et al. Electrostatic strengths of salt bridges in thermophilic and mesophilic glutamate dehydrogenase monomers // *Proteins*. – 2000. – Vol. 38, №4. – P. 368–383.
33. Kumar V., Sharma N., Bhalla T.C. In Silico analysis of  $\alpha$ -galactosidases primary and secondary structure in relation to temperature adaptation // *J. Amino Acids* – 2014. – Vol. 24. – 475839.
34. Leiros H.K., Willassen N.P., Smalas A.O. Structural comparison of psychrophilic and mesophilic trypsins. Elucidating the molecular basis of cold-adaptation // *Eur. J. Biochem.* – 2000. – Vol. 267, №4. – P. 1039–1049.
35. Li W., Godzik A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences // *Bioinformatics*. – 2006. – Vol. 22, №13. – P. 1658–1659.
36. Lonhienne T., Zoidakis J., Vorgias C.E. et al. Modular structure, local flexibility and cold-activity of a novel chitobiase from a psychrophilic Antarctic bacterium // *J. Mol. Biol.* – 2001. – Vol. 310. – P. 291–297.
37. Michaux C., Massant J., Kerff F. et al. Crystal structure of a cold-adapted class C beta-lactamase // *FEBS J.* – 2008. – Vol. 275, № 8. – P. 1687–1697.
38. Muryoi N., Matsukawa K., Yamade K. et al. Purification and properties of an ice-nucleating protein from an ice-nucleating bacterium, *Pantothoa ananatis* KUIN-3 // *J. Biosci. Bioeng.* – 2003. – Vol. 95, №2. – P. 157–163.
39. Olufsen M., Smalas A.O., Moe E. et al. Increased flexibility as a strategy for cold adaptation: a comparative molecular dynamics study of cold- and warm-active uracil DNA glycosylase // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280, №18. – P. 18042–18048.
40. Posner M., Kiss A.J., Skiba J. et al. Functional validation of hydrophobic adaptation to physiological temperature in the small heat shock protein  $\alpha$ A-crystallin // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, №3. – e34438.
41. Rizzello A., Romano A., Kottrab G. et al. Protein cold adaptation strategy via a unique seven-amino acid domain in the icefish (*Chionodraco hamatus*) PEPT1 transporter // *PNAS*. – 2013. – Vol. 110, №17. – P. 7068–7073.
42. Roy D., Sengupta S. Structural features of a cold-adapted Alaskan bacterial lipase // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2007. – Vol. 24, №5. – P. 463–470.
43. Russell R.J.M., Gerike U., Danson M.J. et al. Structural adaptations of the cold-active citrate synthase from an Antarctic bacterium // *Structure*. – 1998. – Vol. 6, №3. – P. 351–361.
44. Saelensminde G., Halskau O.Jr., Jonassen I. Amino acid contacts in proteins adapted to different temperatures: hydrophobic interactions and surface charges play a key role // *Extremophiles*. – 2009. – Vol. 13, №1. – P. 11–20.
45. Sato Y., Watanabe S., Yamaoka N. et al. Gene cloning of cold-adapted isocitrate lyase from a psychrophilic bacterium, *Colwellia psychrerythraea*, and analysis of amino acid residues involved in cold adaptation of this enzyme // *Extremophiles*. – 2008. – Vol. 12, №1. – P. 107–117.
46. Schiffer C.A., Dotsch V. The role of protein-solvent interactions in protein unfolding // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 1996. – Vol. 7, №4. – P. 428–432.
47. Scotter A.J., Marshall C.B., Graham L.A. et al. The basis for hyperactivity of antifreeze proteins // *Cryobiology*. – 2006. – Vol. 53, №2. – P. 229–239.
48. Sigtryggsdottir A.R., Papaleo E., Thorbjarnardottir S.H. et al. Flexibility of cold- and heat-adapted subtilisin-like serine proteinases evaluated with fluorescence quenching and molecular dynamics. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1844(4): 705–712.
49. Smalas A.O., Leiros H.K., Os V. et al. Cold adapted enzymes. *Biotechnol Ann Rev* 2000; 6: 1–57.
50. Thomas A.S., Elcock A.H. Molecular simulations suggest protein salt bridges are uniquely suited to life at high temperatures. *J Am Chem Soc* 2004; 126(7): 2208–2214.
51. Wu Z., Qin L., Walker V.K. Characterization and recombinant expression of a divergent ice nucleation protein from *Pseudomonas borealis*. *Microbiology* 2009; 155(4): 1164–1169.
52. Zhou J., Zhang R., Shi P. et al. A novel low-temperature-active beta-glucosidase from symbiotic *Serratia* sp. TN49 reveals four essential positions for substrate accommodation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011; 92(2): 305–315.

48. Sigtryggisdottir A.R., Papaleo E., Thorbjarnardottir S.H. et al. Flexibility of cold- and heat-adapted subtilisin-like serine proteinases evaluated with fluorescence quenching and molecular dynamics // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – Vol. 1844, №4. – P. 705–712.
49. Smalas A.O., Leiros H.K., Os V. et al. Cold adapted enzymes // *Biotechnol. Ann. Rev.* – 2000. – Vol. 6. – P. 1–57.
50. Thomas A.S., Elcock A.H. Molecular simulations suggest protein salt bridges are uniquely suited to life at high temperatures // *J. Am. Chem. Soc.* – 2004. – Vol. 126, №7. – P. 2208–2214.
51. Wu Z., Qin L., Walker V.K. Characterization and recombinant expression of a divergent ice nucleation protein from *Pseudomonas borealis* // *Microbiology.* – 2009. – Vol. 155, №4. – P. 1164–1169.
52. Zhou J., Zhang R., Shi P. et al. A novel low-temperature-active beta-glucosidase from symbiotic *Serratia* sp. TN49 reveals four essential positions for substrate accommodation // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 92, №2. – P. 305–315.

