



HÁSKÓLI ÍSLANDS

Hitastigmaðlögun aqualysins I, subtilisín-líks serín
próteínasa úr hitakæru bakteríunni *Thermus aquaticus*.

Júní 2009.

Brynjar Örn Ellertsson

8 (16 ECTS) eininga sérverkefni í lífefnafræði

Leiðbeinandi: Magnús Már Kristjánsson, Dósent

Meðleiðbeinandi: Bjarni Ásgeirsson, Prófessor

Verkfræði- og náttúruvísindasvið, Raunvísindadeild

Yfirlýsing

Hér með lýsi ég því yfir að ritgerð þessi er samin af mér og að hún hefur hvorki að hluta né í heild verið lögð fram áður til hærri prófgráðu.

Brynjar Örn Ellertsson

Reykjavík, 4.júní 2009.

Ágrip

Byggingarlegar forsendur hitastigsaðlögunar próteina jaðarlífvera hafa verið mikið rannsakaðar undanfarna áratugi. Þetta verkefni er hluti af stærra rannsóknarverkefni þar sem er gerður samanburður á eiginleikum og byggingu samstofna ensíma, sem til heyra subtilisin-líkra seríne próteinasa nánar til tekið subtilösom. Beitt er markvissum stökkbreytingum til að svara spurningum um hitastigsaðlögum ensíma. Í þessu verkefni var framkvæmd þrefalda stökkbreytingin H119A/R120S/R121G á hitakæra ensíminu aqualysini I. Var þessi stökkbreyting valin með tilliti til samsvarandi amínósýruraðar í samstofna ensími úr kuldakærri *Vibrio*-tegund (VPR). Til að meta áhrif stökkbreytingarinnar var stökkbreytta ensímið borið saman við villigerð þess, með mælingum á hraðafræði og stöðugleika próteinsins. Einnig var notast við flúrljómunarbælingu með akrýlamíði til að meta hvort að einhver breyting hefði verið á heildarsveigjanleika stökkbrigðisins. Niðurstöðurnar gefa til kynna að ekki er marktækur munur á stökkbreytta ensíminu og villigerðinni.

Abstract

Structural basis of temperature adaptation of proteins from extremophiles have been extensively studied during the last decades. This study is a part of a larger research project, which involves comparisons of structure and characteristics of homologous enzymes, belonging to the subtilisin-like serine proteinases, i.e. subtilases. In this project site-directed mutagenesis was used in an attempt to answer questions about temperature adaption of the enzymes. In this part of the study a triple mutation, H119A/R120S/R121G, was carried out on the thermophilic protein aqualysin I. This mutation was chosen by comparison to the amino acid sequence of homologous enzyme from a psychrophilic *Vibrio*-species (VPR). To estimate the effect of the mutation the characteristics of the mutant was compared to that of the wild type enzyme, with measurements on kinetics and thermal stability of the proteins. Furthermore, measurements were carried fluorescence quenching of both mutant and wild type with acrylamide in order to estimate if there was difference in global flexibility as a results of the mutation. The results indicated that there was not a significant difference between the mutant and the wild type of the enzyme in any of those properties.

Þakkir

Ég vill þakka leiðbeinanda mínum Magnúsi Má Kristjánssyni fyrir leiðsögnina og aðstoðina. Jóhonna Arnórsóttir og Ásta Rós Sigtryggisdóttir fá sérstaklega þakkir fyrir alla hjálpina í vetur. Einnig fær Bjarni Ásgeirsson þakkir fyrir yfirlestur á ritgerðinni.

Efnisyfirlit:

1. Inngangur.....	1
1.1 Hitastigsaðlögun próteina.....	1
1.2 Serín próteasar.....	3
1.3 Markmið rannsóknar.....	7
2. Efni og aðferðir.....	10
2.1 Próteinhreinsun.....	10
2.2 Virknimælingar.....	12
2.3 Áhrif hitastigs á stöðuleika.....	12
2.4 Michaelis Menten hraðafræði.....	13
2.5 Flúrljómunar bæling með akrýlamíði.....	13
3. Niðurstöður og umræður.....	14
3.1 Hreinsun.....	14
3.2 Stöðuleikamælingar - Ákvörðun á $T_{50\%}$	15
3.3 Hraðafræðilegar mælingar.....	16
3.4 Flúormælingar.....	17
4. Umræða.....	19
5. Heimildaskrá.....	21

Myndaskrá

Mynd 1. Stöðuleikaferlar sem sýna mismunandi leiðir til að ná hærri T_m	2
Mynd 2. Skýringarmynd af hvarfgangi vatnsrofs peptíðtengis hjá serín próteinasa	3
Mynd 3. Samanburður á þrívíddarbyggingu chymotrypsins og subtilasa	4
Mynd 4. Skematísk mynd af hvarfefnis/hindra bindingu við subtilisín-líkan serín próteinasa	5
Mynd 5. Þrívíddarbygging VPR	6
Mynd 6. Sameindarlíkan af aqualysin I.	9
Mynd 7. Keyrsla á phenyl-sepaharósa súlu við hreinsun á stökkbrigðinu.....	14
Mynd 8. Keyrsla katjónasúlu.....	15
Mynd 9. Arrheníusargraf af niðurstöðum mælinga á hraða virknetaps við mismunandi hitastig	16
Mynd 10. Eadie-Hofstee graf af niðurstöðum fyrir villigerð og stökkbrigði.....	17
Mynd 11. Flúrljómunarbæling á stökkbrigðinu með akrýlamíði við 25°C	18
Mynd 12. Stern Volmer graf af mælingum með akrýlamíð bælingu.....	19

Töfluskrá

Tafla 1. Stökkbreytingarvísar fyrir AQUI og bræðslustig	10
Tafla 2. Bufferar sem notaðir voru í hreinsunarferlinu.....	12
Tafla 3. Niðurstöður mælinga á $T_{50\%}$ fyrir stökkbrigðið og villigerð	16
Tafla 4. Niðurstöður mælinga á k_{cat} , K_m og k_{cat}/K_m fyrir stökkbrigðið	17
Tafla 5. Samanburður á stöðuleika og hraðafræðilegum stærðum fyrir villigerð og stökkbrigði aqualysin I.	19

1. Inngangur

1.1 Hitastigsaðlögun próteina

Á síðustu áratugum hefur áhugi á lífverum sem lifa við öfgafullar jaðaraðstæður aukist til muna. Mörkin fyrir tilvist lífs eru mjög breið eða -40 til +115 °C, yfir 120 MPa þrýstingsbil, mjög háan salt styrk (vatnsvirkni um 0,6) og pH frá 1 eða til 11 [1]. Það sem lífverur við þessar öfgafullu aðstæður geta gert er annað hvort að forðast þær eða aðlagast þeim [1]. Í því verkefni sem þessi ritgerð lýsir er hitastigsaðlögun ensíma rannsökuð með það að markmiði að varpa ljósi á það hvernig ensím halda virkni við öfgafullar aðstæður m.t.t. hitastigs.

Til að bera saman stöðuleika prótein við mismunandi aðstæður er oft notast við varmafræði afmyndunar. Sú mælistærð sem nota má til að lýsa breytingunni frá svipmótuðu formi próteins til afmyndaðs form þess er fríorkubreytingin (ΔG) í þessu ferli og er hún því mælikvarði á stöðuleika próteinsins. Hægt er að nota umritaða gerð af Gibbs-Helmholtz jöfnunni til að finna mikilvægar varmafræðilegar stærðir (jafna 1).

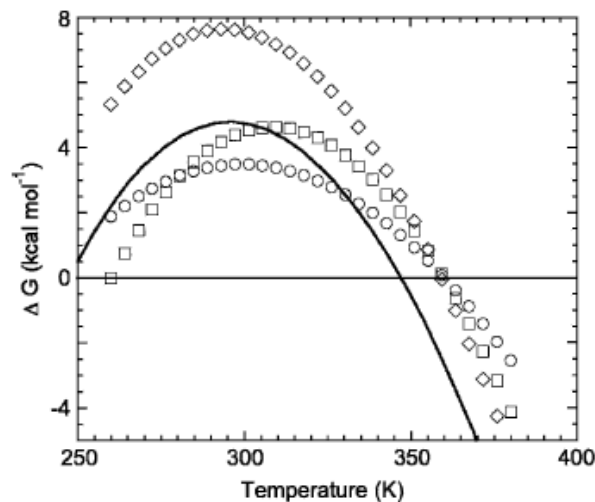
$$\Delta G(T) = \Delta H_m \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) - \Delta C_p \times \left[(T_m - T) + T \ln\left(\frac{T}{T_m}\right) \right]$$

(jafna 1)

Í jöfnu 1 er $\Delta G(T)$ fríorkan við hitastigið T , ΔH_m er enþalpiúbreyting við T_m , ΔC_p er breytingin á varmarýmd við afmyndun próteinsins og T_m er bræðslumark próteinsins. Hægt er að teikna upp ΔG sem fall af hitastigi (T) og fá út þessar stærðir ef ΔC_p er þekkt [2].

Gerðar hafa verið margar rannsóknir hannaðar til að skilja varmafræðilegar leiðir sem prótein í hitakærum örverum geta notað til að viðhalda réttri svipmótun við hátt hitastig. Hitakær prótein hafa með þróun breytt fyrsta stigs byggingu sinni til að hámarka innansameindarvxlverkunaráhrif sem viðhalda réttri svipmótun próteinsins. Þessar breytingar á innansameindarkröftum hafa áhrif á mikilvægar varmafræðilegar stærðir eins og ΔC_p , ΔG og ΔH . Hægt er að ákvarða þessar stærðir með mælingum og setja upp í stöðuleikaferil (ΔG vs. T , skv. jöfnu 1) sem má nota til að skilja hitastigsaðlögun út frá varmafræði. Sett hefur verið fram tilgáta um þrjár mismunandi leiðir sem breyta stöðuleika hjá próteini til að öðlast meiri hitastöðuleika (hærra T_m : sjá mynd 1). Leið meðalhitakærs próteins að hitakæru umhverfi getur verið að hækka stöðuleikaferilinn í átt til herra ΔG sem hækkar þá einnig T_m

(leið I). Einnig væri hægt að fletja ferilinn út og þannig hækka T_m (leið II), eða hliðra ferlinum í átt að herra hitastigi (leið III) [2] (sjá mynd 1).



Mynd 1. Stöðuleikaferlar sem sýna mismunandi leiðir til að ná hærri T_m . Heila línana táknar dæmigert miðlungshitakært prótein, próteinið getur hækkað T_m með því að hliðra ferlinum upp á við (leið I [tíglar]), með því að fletja ferilinn (leið II [hringir]), eða með því að hliðra honum til hægri (leið III [kassar]) [2].

Önnur leið sem farin hefur verið til að skilja hitaaðlögun próteina er að skoða mismunandi byggingarstig og bera saman við kuldakær og miðlungshitakær prótein. Slíkur samanburður hefur leitt í ljós að prótein úr hitakærum örverum eru með herra hlutfall vatnssækinnna amínósýra á yfirborði, minni sveigjanleika og aukna vatnsfælni í kjarna próteina [3].

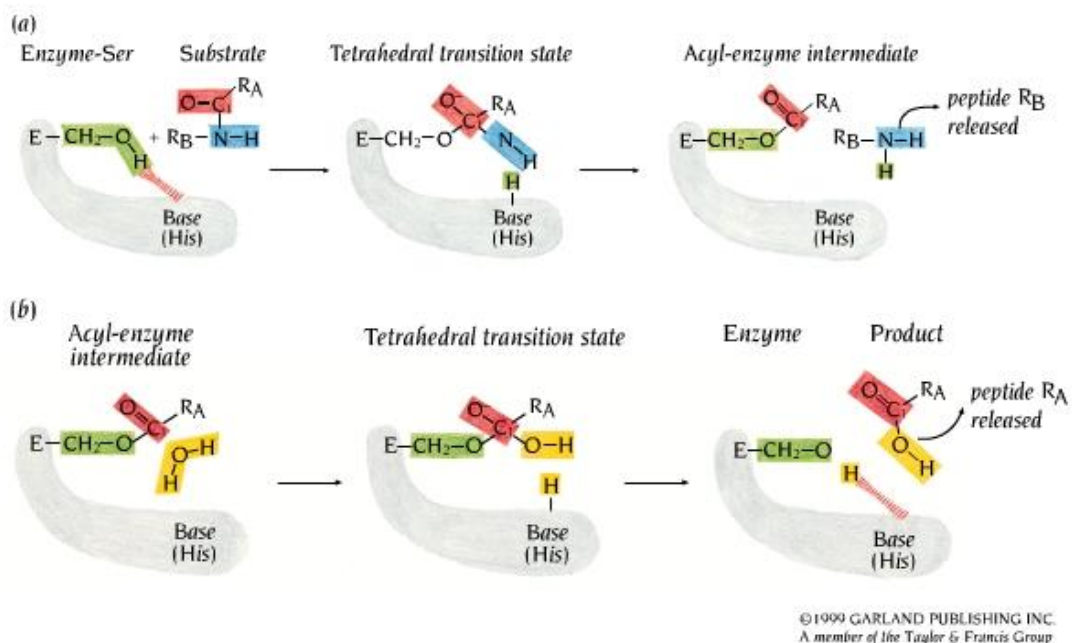
Samanburðarrannsóknir á amínósýrusamsetningu hitakærra og meðalhitakærra próteina m.a. hafa leitt í ljós aukningu á hlöðnum a.s. (helst þá Arg og Glu) og færri skautuðum óhlöðnum a.s. í hitakærum próteinum (Ser, Thr, Asn og Gln) [3]. Einnig hefur er vísbendingar að færri Cys séu til staðar í hitakærum próteinum [3]. Gæti það verið vegna eyðileggingar þessara amínósýra sem getur gerst við hátt hitastig. Heilt á litið virðist þróunarleg breyting á amínósýrum milli kulda- og miðlungslungskærra próteina og svo hitakærra vera aukinn fjöldi stærra og vatnsfælnari a.s. í kjarna hitakærra próteina. Aukin vatnsfælnihrif og aukin þökkun í kjarna próteina er því talin skipta miklu máli í stöðugleika próteina [3]

Annar þáttur sem er talinn hafa mikilvæg áhrif á hitastigsaðlögun ensíma er sveigjanleiki í byggingu þeirra. Talið er að hreyfanleiki eða sveigjanleiki gegni mikilvægu hlutverki í hvötunargetu ensíma. Hafa verið settar fram tilgátur um hlutverk sveigjanleika í hitastigsaðlögun ensíma, sem felur í sér að ensím hafi mismunandi sveigjanleika við

mismunandi hitastig til að viðhalda líffræðilegri virkni. Felur sú tilgáta einnig í sér að hitakær prótein hafi þróað með sér mikinn stöðugleika með stífri myndbyggingu og nái ekki fullri virkni nema við hátt hitastig. Almennt hafi kuldakær prótein meiri sveigjanleika og minni hitastöðuleika heldur en hitakær prótein [4].

1.2 Serín próteasar

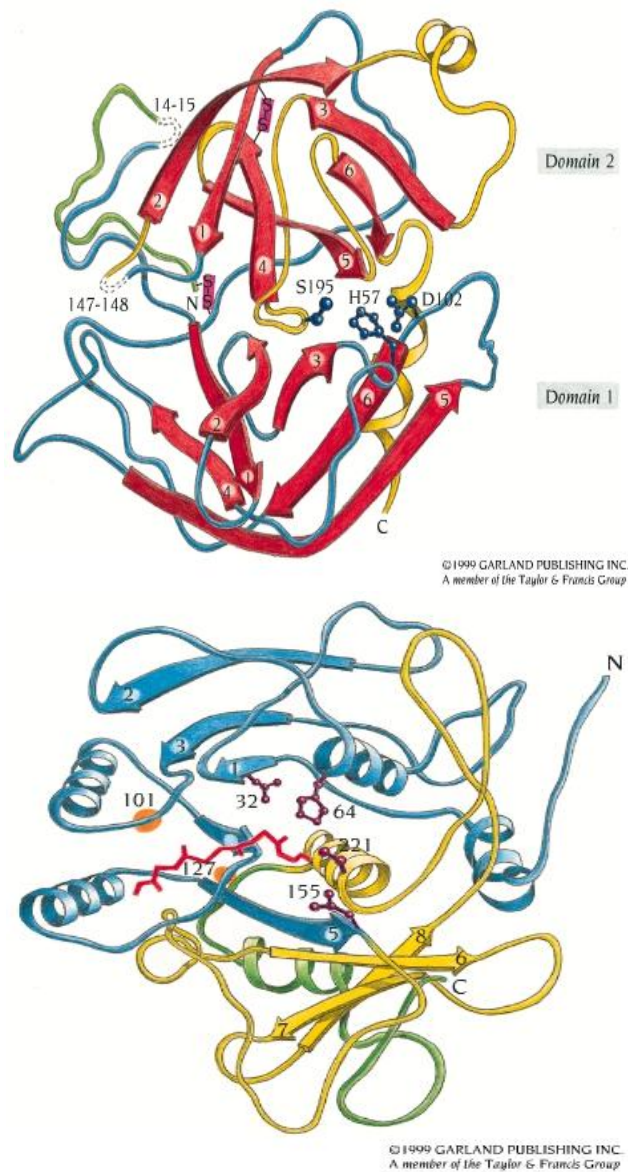
Próteinasar eru mjög fjölbreyttur hópur ensíma í lífríkinu og finnast í allt frá bakteríum til flókinna fjölfrumunga. Próteinasar draga nafn sitt af því að þeir hvata vatnsrof á peptíðtengjum próteina. Próteinasar má flokka til fjögurra megin flokka: Serín -, aspartíksýru-, cystín-, og málmpróteinasar á grundvelli gerðar hvarfstöðva þeirra. Serín próteinasar hafa einkennandi hvötunarþrennd sem samanstendur af aspartíksýru, seríni og histidíni [5]. Hvarfgangur serín próteinasar er sýndur í mynd 2.



Mynd 2. Skýringarmynd af hvarfgangi vatnsrofs peptíðtengis hjá serín próteinasar. A) Myndun acyl-ensíms milliefnis (acyl-enzyme intermediate). Fyrsta skerfið er myndað þegar peptíðtengi er rofið við C1 kolefninu. C1 kolefnið er tengt fjórum mismunandi hópum og myndar þannig ferflötungslaga millistig (tetrahedral transition state) með tengjum við fjóra hópa, þar með talið við serín amínósýruna og neikvætt hlaðið súrefnisatóm. B) Afacylering á acyl-ensíms millistiginu er annað skref í vatnsrofinu. Þetta skref er eins og fyrra skrefið bara öfugt og með vatnssameind í hlutverki kjarnsækis. [5]

Serín peptíðasar skiptast í tvær yfirjölskyldur, (chymo)-trypsin- og subtilisín-líka serín próteinasar. Þessar yfirjölskyldur hafa svipaða afstöðu amínósýra í hvötunarþrenndinni, His,

Asp og Ser. Þær hafa hins vegar ólíka próteinbyggingu, chymotrypsin-lík ensím einkennast af β/β -byggingum og subtilisin-lík ensím hafa α/β -byggingu [6] (sjá mynd 3).



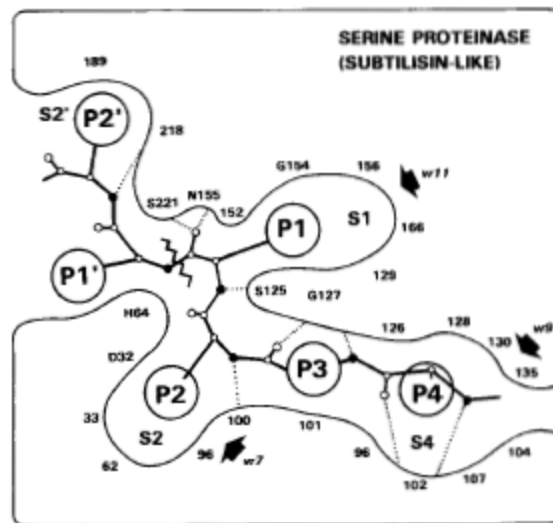
Mynd 3. Samanburður á þrívíddarbyggingu chymotrypsins (efri mynd) og subtilasa (neðri mynd).

Chymotrypsin hefur β byggingu og hvötunarþrenndin er á milli tveggja β -tunna. Þrenndin er merkt sem S195, H57 og D102. Subtilasinn hefur α/β byggingu og hefur hvötunarþrenndina Asp32, His64 og Ser221 [5].

Subtilisin-líkir sérín próteinasar eru oft kallaðir subtilasar og finnast þeir í t.d. fornbakteríum, sveppum, gersveppum og þróaðri fjölfrumungum. Út frá samanburði á amínósýruröðum þessara ensíma hefur subtilasa yfirfjölskyldunni verið flokkað í sex fjölskyldur þ.e. subtilisin, thermitase, próteinase K, lantibiotic peptíðase, kexin og pyrolysín fjölskyldurnar. Nöfnin á fjölskyldunum eru komin frá fulltrúa ensím hverjar fjölskyldu [6].

Meirihluti ensíma í subtilasa fjölskyldunni eru framleidd sem forveraensím innan frumunnar, en forvera raðirnar taka þátt í flutningi ensímanna yfir frumuhimnu og hjálpa við rétta svipmótun próteinsins. Forveraraðirnar eru svo klipptar af með sjálfmeltingu [6].

Bindiseti subtilasa mætti lýsa sem gjá sem bindur minnsta kosti sex amínósýrur hvarfefnis (P4-P2'). Bæði hliðarhópar og fjölpeptíðgrind amínósýranna í P4-P2' bindast með vetnistengjum í S4-S2' sem mynda þrefaldan mótlægan β -flöt með tveim β -strendingum ensímsins. Vatnsrof peptíðstengisins verður á milli P1' og P1 [6] (Sjá mynd 4).



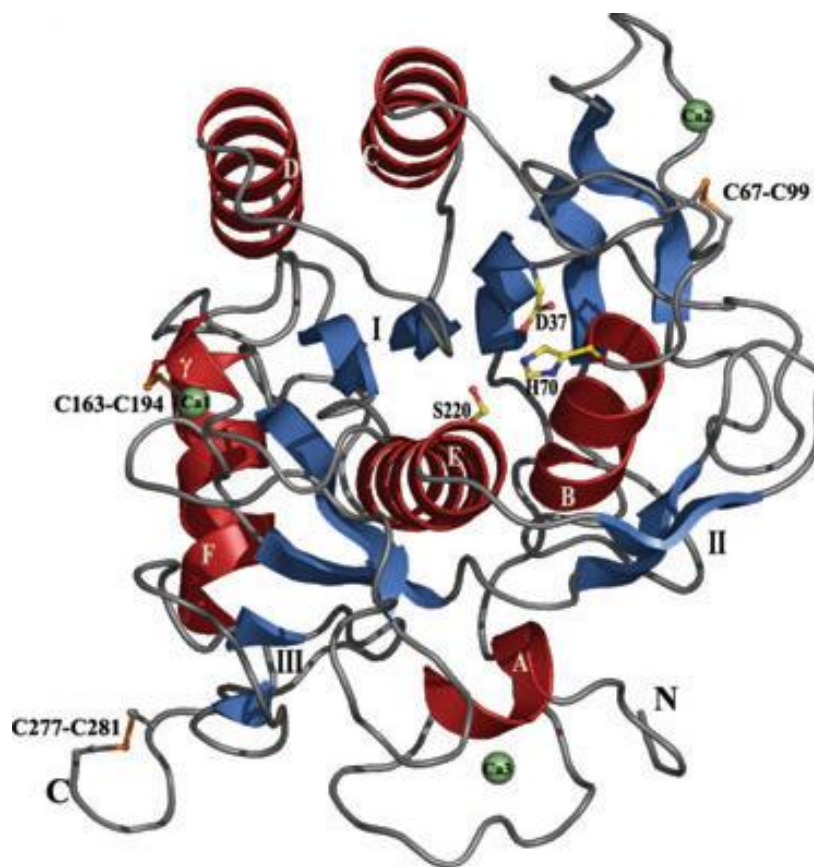
Mynd 4. Skematísk mynd af hvarfefnis/hindra (feitletruð lína) bindingu við subtilisín-líkan serín próteínasa. Hliðarkeðjur P4-P2' amínósýranna eru sýndar sem stórar kúlur; staðsetning amínósýra ensímsins sem víxlverka við þessar P4-P2' í kringum bindisetið (S1, S2, o.s.frv.). Númerun á amínósýruröð ensímsins miðast við subtilisín BPN'. Vetnistengi á milli ensímsins og hvarfefnis/hindra eru sýnd sem punktalínur og tengið sem klippt er á er sýnt sem bugðótt lína. Amínósýrurnar í hvötunarþrenndinni, D32, H64 og S221, eru einnig á myndinni [6].

Eins og minnst var á að ofan tilheyrir próteínasa K fjölskyldan subtilisín-líkum serín próteínösum. Próteínasa K fjölskyldan er stór fjölskylda af ensímum sem er seytt sem endopeptíðösum og hafa fundist í sveppum, gersveppum og gram-neikvæðum bakteríum. Bakteríuensímín sýna mikla samsvörun í amínósýruröðum eða yfir 55% [7].

Innan próteínasa K fjölskyldunnar eru mörg vel rannsökuð og skilgreind ensím. Til dæmis er einkennisensím fjölskyldunnar, próteínasi K úr sveppinum *Tirachium album* Limber (PRK), mjög vel skilgreint ensím. Til að mynda hefur kristalsbyggingu ensímsins verið lýst í atóm upplausn (0,98 Å) þekkt [7,8]. Einnig hafa eiginleikar, þ.m.t bygging peptíðasa úr kuldakæru bakteríunni *Vibrio sp.* PA44 (VPR), peptíðasi úr kuldakæru bakteríunni *Serratia sp* (SPRK)

og hitaþolna ensímið aqualysin I úr *Thermus aquaticus* (AQUI) verið vel skilgreind. Þrívíddarbygging PRK, VPR og SPRK hefur verið skilgreind. Þrívíddarbygging próteinanna hefur reynst vera mjög lík og hafa þau marga aðra svipaða eðliseiginleika. Bæði PRK og AQUI hafa tvær brennisteinsbýr en ekki á sömu stöðum, VPR hefur svo þrjár brennisteinsbrýr og eru tvær fyrstu á sama stað og í AQUI [7]. PRK hefur eins og AQUI tvo Ca^{2+} bindistaði en VPR hefur þrjá Ca^{2+} bindistaði [7, 9] (mynd 5).

Meginviðfangsefni þessa rannsóknaverkefnis var hitakæra ensímið AQUI og hafa eiginleikar þess verið bornir saman við kuldakæra ensímið VPR. Á mynd 5 má sjá mynd af byggingu VPR.



Mynd 5. Þrívíddarbygging VPR (PDB tákn: 1SH7). Amínósýrurnar í hvötunarþrenndinni, D37, H70 og S220, eru sýndar í gulu. Tvísúlfiðbrýrnar eru appelsínugular. Kalsíum jónirnar eru sýndar sem grænar kúlur og merktar með Ca1, Ca2 og Ca3. AQUI hefur samsvarandi Ca1 og Ca3 bindiset [10].

Vegna líkinda með amínósýruröðum ensímanna hefur einnig verið hægt að hanna sameindalíkan að byggingu hitaþolna ensímsins aqualysin I. Aqualysin I er alkalískur serín próteinasi sem er seytt ef hitakæru bakteríunni *Thermus aquaticus* Y_T-1 og er á slíku formi með sameindarmassann 28 kDa [11]. *Thermus aquaticus* Y_T-1 er gram-neikvæð baktería og

hefur hún tvær frumhimnur, innri og ytri himnu. Þarf því AQUI sem er seytt úr frumunni að fara yfir tvær himnur. Til að komast yfir himnurnar á AQUI sér forvera (e. precursor) og samanstendur hann af fjórum virknisvæðum; merkipeptíði (14 a.s.), NH₂-enda forröð (113 a.s.), fullvirkt aqualysin I (281 a.s.) og C-enda forröð (105 a.s.). Talið er að flutningur aqualysins I út úr frumunni eigi sér stað með eftirfarandi móti: "pre-pro" aqualysin I (51 kDa) er flutt yfir innri himnu með hjálp merkipeptíðs, sem er síðan klofið af. Pro-aqualysin I með NH₂- og C-enda forraðir (48 kDa) er staðsett í millihimnurýminu og festist við ytri himnuna með hjálp C-enda forraðarinnar [12]. N-enda forröðin hjálpar einnig til við rétta svipmótun próteinsins, virkar sem innbyggt chaperone [17]. NH₂- enda forröðin er þá klofin af og próteinið (38 kDa) er þá flutt yfir ytri himnu með hjálp C-enda forraðarinnar. Þegar próteinið er komið yfir ytri himnuna klofnar C-enda forröðin af og það fullvirkt ensím myndast (28 kDa) [12]. Aqualysin I hefur verið tjáð og klónað í *E.coli* og er það framleitt sem stærra prótein sem hefur mólmassann 38 kDa. Við hitameðferð (65 °C) á sér stað sjálfsmelting og við það myndast og er seytt virka 28 kDa form próteinsins [12].

Aqualysin I er mjög hitastöðugt prótein. T_{50%} (hitastigið þar sem ensímið missir helming af virkni sinni á 30 mín) fyrir AQUI er 95 °C og til samanburðar er það 56°C í tilfelli VPR [13]. AQUI er með tvær dísulíðbrýr, Cys67-Cys99 og Cys163- Cys194 [14] (Sjá mynd 5). AQUI hefur tvö Ca²⁺ bindiset, annað sterkara enn hitt. Veikara bindisetið virðist vera mikilvægara fyrir stöðugleika ensímsins heldur en það sterkara [9]. Hámarks ensímvirkni í viðurvist Ca²⁺ er við 80°C en án þess 70°C [11].

1.3 Markmið rannsókna.

Í þessu verkefni var verið að kanna áhrif þrefaldrar stökkbreytingar H119A/R120S/R121G stökkbreytingu á stöðugleika og virkni aqualysins I. Til að meta áhrif stökkbreytingarinnar var stökkbreytta ensímið borið saman við villigerð þess, með mælingum á hraðafraði og stöðugleika próteinsins. Með þessari stökkbreytingu var verið að líkja eftir amínósýruröð á þessu svæði í VPR. Er þetta svæði valið bæði vegna þess að það er mikill munur á amínósýruröð á milli VPR og AQUI og að samkvæmt "normal modes" kraftssviðsútreikningum voru vísbendingar um að þetta svæði væri með hreyfanlegustu svæðum í VPR. Einnig mátti ætla að sveigjanleiki á þessu svæði hefði áhrif á virkni ensímsins þar sem það er nálægt hvarfefnabindisetinu. Hefur gagnkvæm stökkbreyting verið gerð í VPR þ.e. A119H/S120R/G121R og hafði hún marktæk áhrif á stöðuleika próteinsins sem og

hraðfræðilega eiginleika þess [18]. Sjá mynd 6 fyrir staðsetningu stökkbreytingarinnar í aqualysin I. Á mynd 6 sést að lykkjan sem inniheldur stökkbreytinguna liggur úr helix C (númerun á helixum er skilgreind í mynd 3). Er þetta svæði talið tengjast nauðsynlegum hreyfingum í hvarfefnabindisetinu, hjálpar við bindingu myndefnis og losun hvarfefnis. Einnig sést nálægð stökkbreytingarinnar við hvarfsetið.



Mynd 6. Sameindarlíkan af aqualysin I. Mynd A sýnir staðsetningu H119/R120/R121 stökkbreytisetanna, staðsetningu dísfúlfíð brúnna (Cys67-99 og Cys 163-194) og hvötunarþrenndina His70, Ser220 og Asp37. Mynd B er A snúið 180° til að sýna stökkbreytisetin betur.

2. Efni og aðferðir

2.1 Próteinhreinsun

Aqualysin I genið var klónað í pJOE og yfirtjáð í *E.coli* stofni BL2 (C43). Stökkbreytingin var framkvæmd af Jóhönnu Arnórsdóttur. Aðferðin við stökkbreytinguna á AQUI er lýst í leiðbeiningum með Quick change™ Site-Directed Mutagenesis Kit frá Stratagene.

H119A/R120S/R121G stökkbreytingin var gerð í tveim skrefum og eru vísarnir sem notaðir voru sýndir í töflu 1. Stökkbreytivarflausnin og keðjuhvarfið er líst hérna að neðan.

Tafla 1. Stökkbreytingarvísar fyrir AQUI og bræðslustig.

HR119AS	Bs. (°C)
Forward: 5' GTCACGCGGAACGCAAGTAGGCCGGCCGTTGCCAACATG 3' Reverse: 5' CATGTTGGCAACGGCCGGCCTACTTGCGTTCCGCGTGAC 3'	75,4
R121G b	
Forward: 5' GAACGCAAGTGGTCCGGCCGTTGCCAACATG 3' Reverse: 5' CATGTTGGCAACGGCCGGACCACTTGCGTTC 3'	78,7

Stökkbreytivarflausnin var þannig samsett:

1 µl DNA mót (~ 100 ng)

1 µl af fw/rv vísi (10 pmól)

1 µl dNTP (10 mM)

5 µl 10x buffer

1 µl High fidelity DNA polymerasi frá Fermentas (2U)

Fyllt uppí 50 µl með H₂O

Útbúin var hvarflausn fyrir hvorn vísi fyrir sig. Keðjuhvarf var látið ganga í fjóra hringi og síðan voru hvarflausnirnar sameinaðar, 1 µL af polymerasa bætt í og síðan var lausnin sett í 16 hringja keðjuhvarf við eftirfarandi aðstæður:

1. 94°C í 5 mínútur
2. 95°C í 30 sekúndur
3. 60 °C í 40 sekúndur
4. 68 °C í 5 mínútur og 30 sekúndur
Prep 2. 16 sinnum
5. 68 °C í 10 mínútur

Í hvarflausnina var bætt 1 μ l af Dpn1 endónúkleasa og melt við 37 °C yfir nótt. Top 10 frumur voru ummyndaðar með meltu hvarflausninni á LB-amp agar. Kóloníur voru hreinsistrikaðar, plasmíð hreinsuð og AQU1 genið raðgreint til staðfestingar á stökkbreytingu.

Frumurnar, bæði fyrir villigerð og stökkbrigðið, voru ræktaðar yfir nótt í LB (Lysogeny broth) æti sem innihélt 100 μ g/ml ampicillin. Eftir næturræktina var lausnin svo þynnt 40 falt og ræktað við 37°C þangað til OD₆₀₀ náði gildinu 1. Tjáningin var vakin með 0,1% rhamnósa, CaCl₂ var bætt við í upphafi að lokastyrk 10 mM og ræktað í 3 klst við 37°C. Frumurækt var spunnin niður við 4000 xg í 15 mín og frumunum safnað. Frumurnar voru leystar uppí 50 ml af buffer A (tafla 1) sem innihélt 1 mg/ml lýsósím og látið standa við stofuhita í 30 mín. Sýnið var fryst og þiðið þrisvar sinnum til að sprengja frumurnar. Frumuhrat var spunnið í skilvindu með snúningi við 10.000 xg í 15 mín og við 20 °C og botnfallinu safnað. Virkni var mæld í flotinu til að skera úr um að próteinið væri allt í botnfalli. Botnfallið var svo leyst upp í 40 ml buffer A með 150 mM NaCl. Lausnin var hituð við 70°C í 60 mín til að losa próteinið úr frumuhimnunni og til að vera örugglega með 28 kD form aqualysins I. Eftir hitun var lausnin spunnin við 10.000 xg í 15 mín við 20°C og floti safnað. Við flotið var bætt (NH₄)₂SO₄ að 1 M styrk og lausnin svo spunnin við 15.000 xg í 20 mín við 20°C, floti safnað og svo sterílfiltrerað og sett í 50 ml sýnislykkju (superloop). Allar súlukeyrslur voru framkvæmdar á Äkta purifier tæki (Amersham Biosciences).

Sýnið var sett á phenyl-sepharósa súlu (30 ml) sem áður hafði verið jöfnuð með buffer B (tafla 1). Próteinlausnin var sett á súluna og losað af henni með þrepalosun, þ.e. farið var úr 100% buffer B með línulegum stígli niður í 65%, síðan niður í 35% og að síðustu niður í 0% buffer B, eða 100% buffer A. Var virkni mæld í gegnumflæði og söfnuðum skömmtum og virkum toppi safnað. Glös með mestu virknina (yfir 0,8 U/mL) var safnað og prótein saltað út með 90% mettun (NH₄)₂SO₄. Lausnin var látin standa við stofuhita í 45-60 mín. Sýnið var svo spunnið við 15.000 xg í 45 mín við 20°C. Botnfallinu var safnað og leyst upp í 2-3 ml af buffer A með 150 mM NaCl. Sýni var hitað við 65°C í 40 mín. Sýnið var því næst sett á Hitrap afsöltunar súlu (frá Amersham Biosciences) sem hafði verið jöfnuð með buffer C (tafla 1) og keyrt með fyrirfram gefnu forriti fyrir þessa súlu. Skammtar með virkni voru sameinaðir og sýni sett á katjónaskilju SPXL (5ml). Katjónaskiljan hafði áður verið jöfnuð með buffer C og próteinið losað af súlunni með 20 súlurúmmála stighalla að 100% buffer D. Virkum toppi var safnað og sýni geymd við 4°C.

Tafla 2. Bufferar sem notaðir voru í hreinsunarferlinu.

<u>Buffer A</u> 25 mM Tris pH 8 10 mM CaCl ₂	<u>Buffer B</u> 25 mM Tris pH 8 10 mM CaCl ₂ 1 M (NH ₄) ₂ SO ₄
<u>Buffer C</u> 25 mM MES pH 6 10 mM CaCl ₂	<u>Buffer D</u> 25 mM MES pH 6 10 mM CaCl ₂ 500 mM NaCl

2.2 Virknimælingar

Virknin var ákvörðuð með 0,5 mM succinyl-AlaAlaProPhe-p-nitróanilíði (sAAPF-pna) í 100 mM Tris, 10 mM CaCl₂ og pH 8,6 við 40 °C. Gleypnibreytingin var mæld við 410 nm og var notast við eðlisgleypnistuðulinn 8480 M⁻¹cm⁻¹ til að reikna út einingar/ml (U/ml).

2.3 Áhrif hitastigs á stöðuleika

Áður en mælingar hófust þá var sýnið sett á Hitrap afsöltunarsúlu og skipt um buffer á sýninu. Bufferinn sem notaður var í mælingunum var 25 mM Tris, 1 mM CaCl₂, 100 mM NaCl við pH 8,95. Sýnin voru höfð í hitabaði og mæld á hitastigum á bilinu 88-96 °C og virknin mæld með 1.0 mM sAAPF-pna við 40 °C með reglulegu millibili.

Hraðafasti virkniþapsins var ákvarðaður með fyrsta stigs hraðajöfnunni:

$$virkni_{t=0} = virkni_{t=0} \cdot e^{-kt} \quad (\text{jafna 2})$$

Þar sem k er hraðafastinn og t er tíminn í sekúndum. Miðað við hlutfallslega virkni við tíma t þar sem virkni við t=0 er 100%. Var T_{50%} notað til að meta stöðuleika gagnvart hita.

Arrheníusarjafnan lýsir sambandi hraðafasta og hitastigs:

$$k = Ae^{-E_a/RT}$$

$$\ln(k) = \ln(A) - \frac{E_a}{RT} \quad (\text{jafna 3})$$

$T_{50\%}$ er reiknað út frá Arrheníusargrafi þar sem $\ln k$ er fall af $1/T$ út frá jöfnunni hér að ofan og samband hraðafasta og hitastigs (T) samkvæmt Arrheníusargrafi:

$$k(T_{50\%}) = (\ln(100) - \ln(50)) / (30 \text{ mín} \cdot 60 \text{ s mín}^{-1}) \quad (\text{jafna 4})$$

$T_{50\%}$ er ákvarðað úr frá jöfnu bestu línu í grafinu samkvæmt:

$$T_{50\%} = E_a \cdot 1000 / R(\ln A - \ln K) \quad (\text{jafna 5})$$

Þar sem E_a/R er hallatala Arrheníusargrafs og $\ln A$ er skurðpunktur við x-ás.

2.4 Michaelis Menten hraðafraði

Sýni var sett á Hitrap afsöltunar súlu með buffer 100 mM Tris, 10 mM CaCl_2 , við pH 9,02. Mæld var gleypnin á sýninu við 280 nm til að meta próteinstyrkinn. Mælt var við sjö mismunandi styrki af hvarfefninu sAAPF-pna á styrkbilinu 0,0075- 1,0 mM. Mælt var við 410 nm og 40 °C. Mælt var með Helios α ljósmæli frá Thermospectronis. Hitastýring var með Peltier hitunarbúnað (single cell) frá sama fyrirtæki.

2.5 Flúrljómunarbæling með akrýlamíði

Til að kanna hvort það hefðu orðið breytingar á heildarsveigjanleika próteinsins við H119A/R120S/R121Gstökkbreytinguna þá var notast við flúrljómunarbælingu með akrýlamíði og það borið saman við villigerðina.

Notast var við 500 μl af próteinsýni ($A_{280} \approx 0,1$) og það hindrað með 50 μl af 10 mM PMSF. Sýnið var svo sett í dýlýsu yfir nótt til að skipta um buffer. Bufferinn innihélt 50mM Tris, 10 mM CaCl_2 og pH 8,0.

Mælt var í Spex FluorMax flúrljómunarmæli með hitastýribúnaði. Skannað var frá 300-400 nm eftir örvun við 285 nm, notast var við raufarvídd (slit width) 3 nm fyrir örvun og 8 nm fyrir útljómun. Mælingar voru framkvæmdar við 25°C og var hitastigi viðhaldið með gegnumflæðisvatnsbaði. Notast var við 2,5 M akrýlamíð til bælingar. Bætt var 4 μl af akrýlamíði 13 sinnum og mælt við hverja viðbót. Lokastyrkur akrýlamíðs varð 0,25 M.

Því næst voru niðurstöðurnar teiknaðar upp samkvæmt Stern-Volmer jöfnunni (jafna 6):

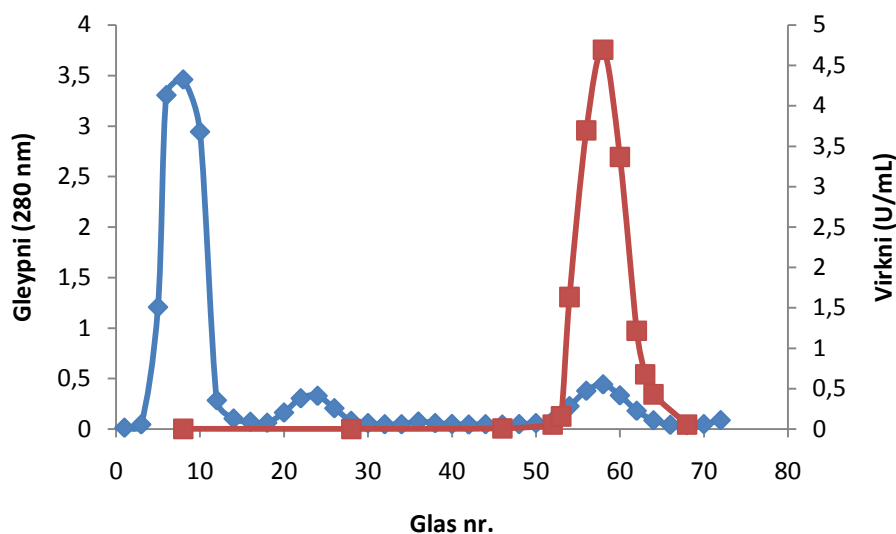
$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q] \quad (\text{jafna 6})$$

Þar sem F_0 og F tákna ljómunarstyrkinn án og með bælinum (Q) og K_{SV} er Stern-Volmer konstantinn.

3. Niðurstöður og umræður

3.1 Hreinsun

Hreinsunarferlið eins og lýst var undir Efni og aðferðir var þróað og miðað við villigerð aqualysins I. Það hefur þó gefið góða raun við hreinsun þeirra stökkbrigða sem framleidd hafa verið af ensíminu. Við hreinsun þrefalda H119A/R120S/R121G stökkbrigðisins eftir sprengingu frumanna og spuna við 10.000 xg í 15 mín við 20 °C, þá mældist töluverð virkni í flotinu eða rúmlega helmingur alls ensíms sem ræktast hafði, hinn hlutinn féll út með botnfallinu. Er þetta töluvert frábrugðið því sem gerðist hjá villigerðinni þar sem engin virkni mældist í flotinu. Er ekki vitað hver ástæðan fyrir þessari breytingu er og hefur þetta ekki gerst hjá öðrum stökkbrigðum rannsóknarhópsins. Þetta þarf að skoða betur síðar.

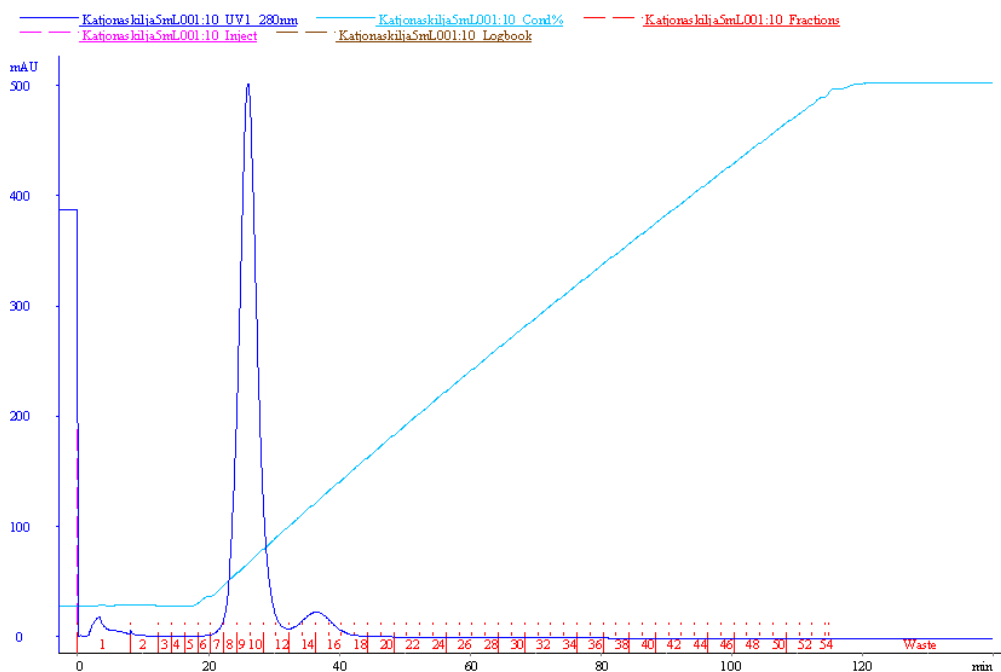


Mynd 7. Keyrsla á phenyl-sepharósa súlu við hreinsun á stökkbrigðinu. Bláa línan sýnir gleypni við 280 nm á glas. Rauða línan sýnir virkni (U/ml) í einstaka glösum. Súlan hafði verið jöfnuð með buffer B (25 mM Tris, 10 mM CaCl₂, 1 M (NH₄)₂SO₄ og pH 8) og próteinið svo losað af með buffer A (25 mM Tris, 10 mM CaCl₂ og pH 8) með þrefalosun. Stigullinn var 100%, 65%, 40% og 0% buffer B. 100% í glasi 1-20, 65% í glasi 40, 40 glasi 60 og 0% eftir glas 70. Virknin var mæld með 0,5 mM sAAPF-pna við 40°C.

Mynd 7 sýnir þrjá gleypnitoppa. Stærsti toppurinn (sem kom fyrst af súlunni) og litli toppurinn næst honum innihalda hin ýmsu prótein frumunnar sem ekki er verið að sækjast eftir og bindast ekki súlunni. Kom stökkbrigðið af súlunni við 40 % buffer B og kemur það

fram á grafinu sem toppurinn sem kom seinast. Sést greinilega út frá virknimælingunum að próteinið er aðeins í seinasta toppinum og hvergi annars staðar.

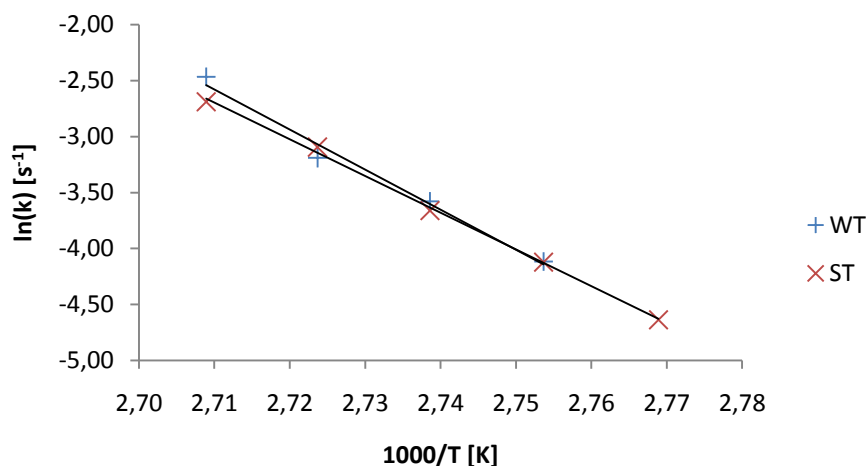
Sýnunum með mestu virknina var safnað saman og sett á katjónaskilju Hitrap SPXL (5 ml). Hjá stökkbrigðinu voru notaðir bufferar C og D með pH 5.6 en ekki pH 6. Var þetta gert til að vega upp á móti hleðslubreytingunni á próteininu við stökkbreytinguna, svo að stökkbrigðið kæmi af katjónasúlunni á svipuðum stað og villigerðin. Vegna bilunar í ljósmæli Ákta Purifier tækinu er ekki til ferill fyrir keyrslu stökkbrigðisins á katjónasúlunni. Á mynd 8 er hægt að sjá samskonar keyrslu á katjónasúlu hjá villigerðinni.



Mynd 8. Keyrsla katjónasúlu. Súlan var fyrst jöfnuð með buffer C (25 mM MES, pH 6, 10 mM CaCl₂) og svo losað af með 20 súlurúmmálum af buffer D (25 mM MES, pH 6, 10 mM CaCl₂, 500 mM NaCl). Dökkbláa línan sýnir losun próteinsins af súlunni og ljóbláa línan sýnir aukningu í saltstyrk.

3.2 Stöðugleikamælingar - Ákvörðun á T_{50%}

Virknitap var mælt við ákveðin hitastig fyrir bæði H119A/R120S/R121Gstökkbrigðið og villigerð ensímsins. Til að reikna T_{50%} voru niðurstöðurnar settar fram í Arrheníusargrafi og notast við jöfnur sem skilgreindar voru í Efni og aðferðir.



Mynd 9. Arrheníusargraf af niðurstöðum mælinga á hraða virkniþaps við mismunandi hitastig. Mælt var í 25 mM Tris, 1 mM CaCl₂, 100 mM NaCl og pH 8,95. Sýni voru sett í vatnsböð á hitastigsbilinu 88-96 °C og virkni mæld með reglulegu millibili með 0,5 mM sAAPF-pna við 40°C.

Mynd 8 sýnir Arrheníusar graf og út frá því sést að það er nánst enginn munur á stöðuleika villigerðar (WT) og stökkbrigðis (ST).

Þá var T_{50%} reiknað útfrá Arrheníusargrafi fyrir villigerðina og stökkbrigðið. Niðurstöðurnar fyrir stökkbrigðið og villigerðina eru sýndar í töflu 2.

Tafla 3. Niðurstöður mælinga á T_{50%} fyrir stökkbrigðið og villigerð.

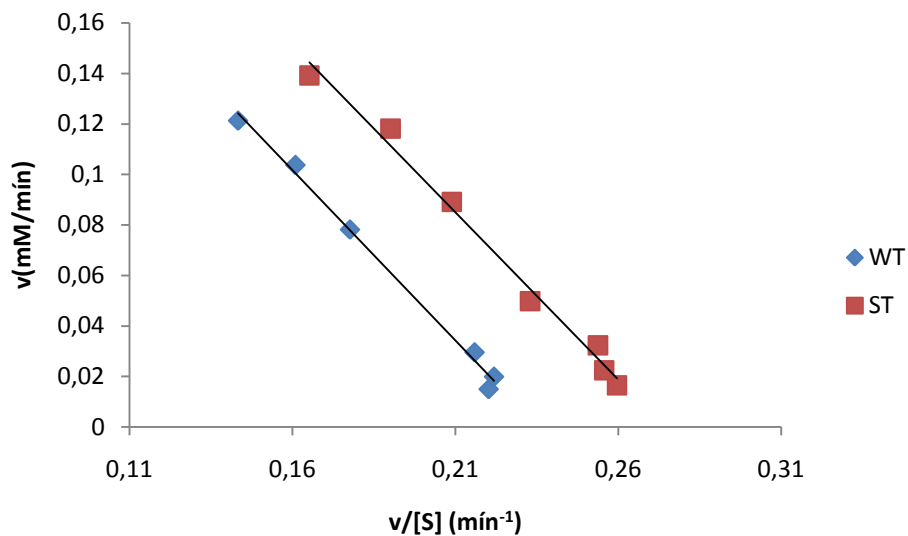
Mæling	T _{50%} (°C)	Ea (kJ/mól)
H119R120R121/ASG	90,7 ± 0,5	259,5 ± 22,8
Villigerð	91,4 ± 0,3	263,6 ± 13,4

Meðaltal fyrir stökkbrigðið er 90,7 ± 0,5 °C en 91,4 ± 0,3 °C (óbirtar niðurstöður) fyrir villigerðina. Er þetta ekki marktækur munur.

3.3 Hraðafraeðilegar mælingar

Til að athuga hvort breyting hefði átt sér stað í K_m, k_{cat} og k_{cat}/K_m var notast vð Michaelis-Menten hraðamælingar. Mæld var virkni á hvarfefnisstyrkbilinu 0,075-1,0 mM við 410 nm og

40°C. Voru niðurstöðurnar settar uppí Eadie-Hofstee graf (sjá mynd 10) og hraðafastarnir reiknaðir (tafla 3).



Mynd 10. Eadie-Hofstee graf af niðurstöðum fyrir villigerð (WT) og stökkbrigði (ST). Mælt var í 100 mM Tris, 10 mM CaCl₂, pH 9,02 við 40°C. Mælt var á styrk bilinu 0,075-1,0 mM fyrir hvarfefnið sAAPF-pna.

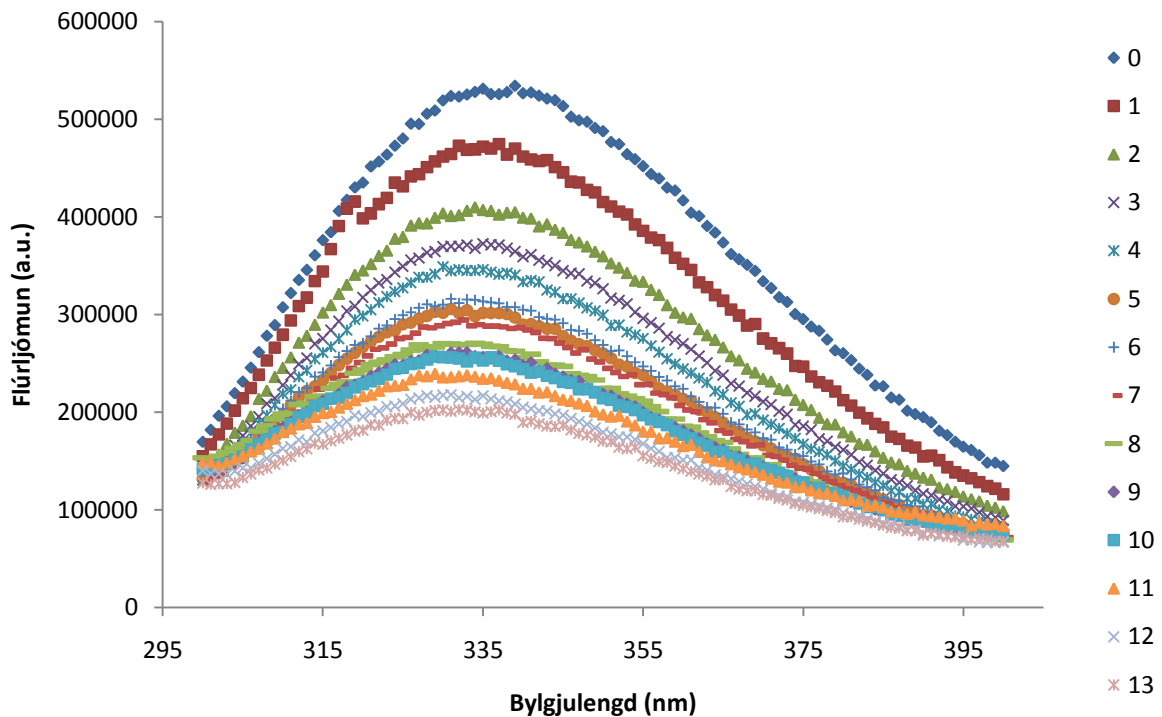
Tafla 4. Niðurstöður mælinga á k_{cat} , K_m og k_{cat}/K_m fyrir stökkbrigðið.

Mæling	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)
H119R120R121/ASG	62,8 ± 2,7	1,22 ± 0,1	51,7 ± 1,3
Villigerð	66,7 ± 9,2	1,33 ± 0,1	51,0 ± 3,9

Eins og tafla 3 sýndir þá er ekki mikill munur á hraðaföstum stökkbrigðis og villigerðar (óbirtar niðurstöður). Er munurinn það lítil að hann telst ekki marktækur.

3.4 Flúrljómunarmælingar

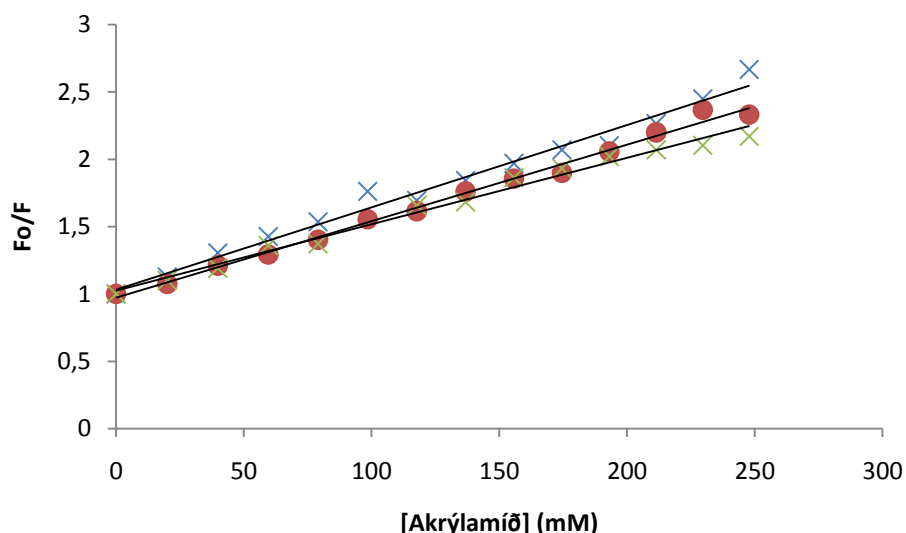
Hægt er að nota flúrljómun til að skoða hreyfanleika eða sveigjanleika próteina. Er þá m.a. notast við hóp smásameinda á borð við akrýlamíð til að bæla flúrljómun tryptófan amínósýrurnar. Við hækkandi styrk bælisins (akrýlamíðs) er hægt að notast við Stern Volmer graf til að meta hreyfanleika sameindarinnar. Vegna þess hve tryptófan er óskautuð amínósýra er hún yfirleitt staðsett inni í kjarna próteina í mjög vatnsfælnu umhverfi. Með því að nota smásameindina akrýlamíð er hægt að mæla hversu auðveldlega hún kemst að amínósýrunni. Aðgengi akrýlamíðs fer eftir sveigjanleika próteinsins, eða því meiri sveigjanleiki því auðveldara á akrýlamíð með að komast að tryptófan í kjarna próteinsins [15,16].



Mynd 11. Flúrljómunarbæling á stökkbrigðinu með akrýlamíði við 25°C. Sýnir 0 ferillinn próteinið án viðbætt akrýlamíðs en hver ferill er síðan eftir viðbót 4 μ l af 2,5 M akrýlamíði út í 500 μ l lausn (1-13). Eftir viðbót 13 var lokastyrkur akrýlamíðs orðinn 0,25 M. Mælt var á bylgjulengdarbilinu 300-400 nm.

Á mynd 11 sést hvernig akrýlamíð bælir flúrljómun stökkbrigðisins við aukinn styrk akrýlamíðs.

Ferlarnir voru síðan notaðir til að setja upp s.k. Stern-Volmer graf sem sést á mynd 12. Var Stern-Volmer grafið sett upp miðað við mælingar við 335 nm. Út frá Stern – Volmer grafi má meta sveigjanleika próteina þar sem gildir að hærri hallatala (K_{sv}) gefur til kynna meiri sveigjanleika.



Mynd 12. Stern Volmer graf af mælingum með akrylamíð bælingu. Mælt var í buffernum 50mM Tris, 10 mM CaCl₂ og pH 8,0 við 25 °C og við 335 nm. Rauði depillinn er villigerðin, blái og græni krossinn eru stökkbrigðið.

Hægt er að sjá útfra mynd 12 að með þessari aðferð greinist ekki munur á sveigjanleika í byggingum villigerðar og H119A/R120S/R121G stökkbrigðis. K_{sv} fyrir villigerðina er 0,0057 M⁻¹ og meðal K_{sv} fyrir stökkbrigðið er 0,0055 M⁻¹.

4. Umræða

Niðurstöður mælinga á hraðaföstum og stöðuleika villigerðar og stökkbrigðisins er sýnt í töflu 4.

Tafla 5. Samanburður á stöðuleika og hraðafraðilegum stærðum fyrir villigerð og stökkbrigði aqualysin I.

Mæling	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)	$T_{50\%}$ (°C)
Villigerð	66,7 ± 9,2	1,33 ± 0,1	51,0 ± 3,9	91,4 ± 0,3
H119R120R121/ASG	62,8 ± 2,7	1,22 ± 0,1	51,7 ± 1,3	90,7 ± 0,5

Eins og sést í töflu 4 þá er ekki mikill munur á niðurstöðum mælinga á villigerðinni og stökkbrigðinu. Styðja niðurstöður úr flúrljómunarmælingum niðurstöðurnar úr hraða- og stöðugleikamælingunum að það er lítill sem enginn munur á H119A/R120S/R121Gog villigerðinni. Eina breytingin sem var sýnileg er hegðun stökkbrigðisins í hreinsunarferlinu. Til að draga ensímið út úr himnunni eftir yfirtjáningu, hefur þurft að virkja villigerð og önnur

stökkbrigði með hitameðferð við >65 °C. Stökkbrigðið H119A/R120S/R121Gvarð hins vegar virkt við stofuhita og losnaði úr frumuhtrati án hitameðhöndlunar að hluta. Ekki hefur fundist skýring á þessu fráviki.

Gerðar hafa verið mælingar á tvöfalda stökkbrigðinu H119A/R120S á aqualysin I (óbirtar niðurstöður). Samkvæmt þeim rannsóknum þá mældist $k_{cat} = 54,3 \pm 6,8 \text{ s}^{-1}$, $K_m = 1,14 \pm 0,1 \text{ mM}$, $k_{cat}/K_m = 47,6 \pm 3,7 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ og $T_{50\%} = 93,4 \pm 1,0$ °C. Ef þessar niðurstöður eru bornar saman við mæld gildi hjá villigerðinni (tafla 4), þá sést að það er marktækur munur á mæligildunum. Þessi munur á tvöfalda stökkbrigðinu H119R120/AS og svo því þrefalda H119A/R120S/R121Ger erfitt að útskýra.

Verður haldið áfram rannsóknum á þessu svæði í aqualysini I þar sem þetta er mjög áhugavert svæði. Til að styðja þessar niðurstöður væri áhugavert að gera hraðafraeðilegar mælingar við lærra hitastig, sérstaklega í ljósi hegðunarinnar í hreinsunarferlinu. Einnig væri fróðlegt að mæla flúrljómunarþælingu við fleiri hitastig.

5. Heimildaskrá

- [1] Jaenicke, R. & Böhm, G. (1998). The stability of proteins in extreme environments. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**:738-748.
- [2] Razvi, A. & Scholtz, J.M. (2006) Lesson in stability from thermophilic proteins. *Protein Sci.* **15**: 1569-1578.
- [3] Kristjánsson, M.M. & Ásgeirsson, B. (2002) Properties of extremophilic enzymes and their importance in food science and technology.: *Handbook of Food Enzymology*. (Whitaker, J.R., Voragen, A.G. & Wong, D.W.S., ritstjórar), bls. 77-100. Marcel Dekker, Inc. New York.
- [4] Kristjánsson, M.M. (2007) Kuldaaðlögun próteina – Nokkrar staðreyndir og vangaveltur. *Raust – Tímarit um raunvísindi og stærðfræði.* **4 (1.hefti)**: 79-88.
- [5] Branden, C. & Tooze, J. (1999) *Introduction to Protein Structure*, 2nd ed, Garland Publishing, NY.
- [6] R.J. Siezen & Leunissen, J. (1997) Subtilases: The superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Sci.* **6**:501-523.
- [7] Larsen, A.N., Moe, E., Helland, R., Gjellesvik, D.R. & Willassen, N.P. (2006). Characterization of recombinantly expressed proteinase K-like enzyme from psychrotrophic *Serratia* sp. *FEBS J.* **273**: 47-60.
- [8] Betzel, C., Gourinath, S., Kumar, P., Perbandt, M., Eschenburg, S., Singh, T.P. (2001) Structure of serine proteinase K from *Tritirachium album* limber at 0.98 Å resolution. *Biochemistry.* **40**: 6706.
- [9] Lin, S.J., Yoshimura, E., Saki, H., Takayoshi, W. & Matsuzawa, H. (1999) Weakly bound calcium ion involved in the thermostability of aqualysin I, a heat-stable subtilisin-type protease of *Thermus aquaticus* YT-1. *Biochim. Biophys. Acta.* **1433**: 132-138.
- [10] Arnórsdóttir, J., Kristjánsson, M.M. & Ficner, R. (2005) Crystal structure of a subtilisin-like serine proteinase from a psychrotrophic *Vibrio* species reveals structural aspects of cold adaption. *FEBS J.* **272**: 832-845.
- [11] Matsuzawa, H., Tokugawa, K., Hamaoki, M., Mizoguchi, M., Taguchi, H., Terada, I., Kwon, S.-T. & Ohta, T. (1988) Purification and characterization of aqualysin I (thermophilic alkaline serine protease) produced *Thermus aquaticus* YT-1. *Eur. J. Biochem.* **171**: 441-447.

- [12] Terada, I., Kwon, S.-T., Miyare, Y., Matuzawa, H., & Ohta, T. (1990) Unique precursor structure of an extracellular protease, aqualysin I, with NH₂- and COOH- terminal prosequences and its processing in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**: 6576-6581. +
- [13] Kristjánsson, M. M., Magnússon, Ó. Th., Gudmundsson, H. M., Alfredsson, G. Á. & Matsuzawa, H. (1999) Properties of a subtilisin-like proteinase from a psychrotrophic *Vibrio* species. Comparisons with proteinase K and aqualysin I. *Eur. J. Biochem.* **260**: 752-726.
- [14] Kwon, S.T., Matsuzawa, H., Ohta T. (1988) Determination of the position of the disulfide bonds in aqualysin I (a thermophilic alkaline serine protease) of *Thermus aquaticus* YT-1. *J. Biochem.* **104**: 557-559.
- [15] Eftink, M.R. & Ghiron, C.A. (1976) Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies. *Biochemistry.* **15**: 672-680.
- [16] Secundo, F., Russo, C., Giordano, A., Carrea, G., Rossi, M. & Raia, C.A. (2005) Temperature-induced conformational change at the catalytic site of *Sulfolobus solfataricus* alcohol dehydrogenase highlighted by Asn249Tyr substitution. A hydrogen/deuterium exchange, kinetic, and fluorescence quenching study. *Biochemistry.* **44**: 11040-11048
- [17] Marie-Claire, C., Yabuta, Y., Suefuji, K., Matsuzawa, H. & Shinde, U. (2001) Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone: The structural and functional characterization of the aqualysin I propeptide. *J. Mol. Biol.* **305**: 151-165.
- [18] Sigurðardóttir, A.G. (2007) Áhrif markvissra stökkbreytinga á hitastigsaðlögun VPR, subtilisin-líks serín próteinasa úr kuldakærri *Vibrio* tegund. Meistararitgerð við Háskóla Íslands.