

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP





## Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap ved Universitetet for Miljø- og Biovitenskap (UMB) i tidsperioden august 2008 til juni 2010.

Først om fremst vil vi takke vår fantastiske internveileder, stipendiat Henrik Zakariassen, som har bidratt enormt til tross for permisjon. Uten din enestående veiledning og støtte hadde vi nok sittet på laben og pipettert enda.

En stor klem til våre utholdende mødre, Bente og Britt Christin, som har hjulpet oss med å holde motivasjonen oppe når ting har gått trått. Tusen takk til oppmuntrende pappa Dag Helge for mange, gode datatips og skanning av utallige bilder. Videre en stor takk til Jacob for at du er den du er.

Takk til Berit B. Aam for all hjelp på laben og til Ellinor B. Heggseth som hjalp oss i Trondheim. Også en takk til Øyvind Busk som har gjort dagene på laben morsommere og alltid har hatt en åpen dør. Kristine B. Eide, Salima Fjeld og Anne Cathrine Bunæs har også vært til stor hjelp og har bidratt til et godt miljø både på og utenfor laben.. Også en takk til intern veileder Anne Line Norberg for hjelp og støtte underveis. En spesiell takk til Gustav Vaaje-Kolstad og Bjørge Westereng for at de tok det med fatning da vi hadde et lite ”uhell” med HPLC- instrumentet og derved tok seg av videre opplæring.

Til slutt vil vi takke vår utrolige veileder Morten Sørli som har gjort dette mulig. Du har bidratt til at dette har blitt to meget lærerike år og har, mer enn en gang, beroliget oss med dine velvalgte ord.

Ås, juni 2010

---

Christine Rønneberg

---

Anna Sønnerland

## Innholdsfortegnelse

<i>Forord</i> .....	<i>1</i>
<i>Sammendrag</i> .....	<i>ix</i>
<i>Abstract</i> .....	<i>xi</i>
<i>Forkortelser</i> .....	<i>xiii</i>
<b>1 Introduksjon</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Karbohydrater</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Kitin</b> .....	<b>2</b>
1.2.1 Struktur og egenskaper .....	2
1.2.2 Anvendelser .....	3
<b>1.3 Kitosan</b> .....	<b>4</b>
1.3.1 Struktur .....	4
1.3.2 Anvendelser .....	5
<b>1.4 Kitooligosakkarider (KOS)</b> .....	<b>6</b>
<b>1.5 Glykosidaser</b> .....	<b>7</b>
1.5.1 Klassifisering .....	7
1.5.2 Struktur .....	8
1.5.3 Mekanisme .....	10
1.5.3.1 Bevarende mekanisme .....	11
1.5.3.2 Inverterende mekanisme .....	11
1.5.4 Prosessivitet .....	13
<b>1.6 Kitinaser</b> .....	<b>14</b>
1.6.1 Klassifisering .....	14
1.6.2 Serratia kitinaser .....	15

---

1.6.2.1 ChiA .....	16
1.6.2.2 ChiC.....	16
1.6.3 ChiB .....	17
1.6.3.1 Det aktive setet .....	18
1.6.3.2 Det kitin bindende domenet, ChBD .....	18
1.6.4 Mekanisme substrat assistert katalyse .....	19
1.6.5 Prosessivitet og kitinaser .....	20
1.6.5.1 Måling av prosessivitet i kitinaser .....	23
<b>1.7 Kitinbindende protein CBP21 .....</b>	<b>24</b>
<b>1.8 Kinetiske og termodynamiske parametere .....</b>	<b>26</b>
1.8.1 $K_{cat}$ .....	26
1.8.2 Dissosiasjonskonstant ( $K_D$ ) og Gibbs frie energi ( $\Delta G$ ).....	27
<b>1.9 Seterrettet mutagenese.....</b>	<b>28</b>
<b>1.10 Kromatografi .....</b>	<b>29</b>
1.10.1 Ionebytterkromatografi.....	30
1.10.2 Hydrofob interaksjonskromatografi (HIC).....	30
1.10.3 Rensing på kitinkolonne.....	31
1.10.4 Størrelseseksklusjonskromatografi (SEC).....	31
1.10.5 High performance liquid chromatography (HPLC) .....	32
<b>1.11 Kjernemagnetisk Resonans (NMR) .....</b>	<b>32</b>
1.11.1 $^1H$ NMR.....	34
<b>1.12 Massespektrometri (MS) .....</b>	<b>36</b>
1.12.1 Matrix-Assisted Desorption Ionisation (MALDI).....	36
1.12.2 MALDI TOF .....	37
<b>1.13 Viskositet .....</b>	<b>38</b>

---

---

1.13.1 Viskositetsmåling og reduserende ende assay .....	38
<b>1.14 Mål med oppgaven .....</b>	<b>39</b>
<b>2 Materialer: .....</b>	<b>40</b>
2.1 Laboratorieutstyr .....	40
2.2 Kjemikalier .....	45
2.3 Proteiner og substrater .....	48
2.5 Bakteriestamme .....	48
2.6 Plasmid .....	49
2.7 Primere .....	49
2.8 Kits.....	50
2.9 Agar og medier .....	50
2.10 Programvare .....	51
<b>3. Metoder .....</b>	<b>52</b>
<b>3.1 Design av ny mutant: .....</b>	<b>52</b>
3.1.1 Oppdyrking av bakteriestamme .....	52
3.1.2 Isolering av plasmid DNA fra E. Coli.....	52
3.1.3 Primer design.....	53
3.1.4 Seterettet mutagenese:.....	54
3.1.5 PCR, polymerase chain reaction .....	55
3.1.6 Transformering av plasmid inn i XL1-Blue superkompetent celler (Stratagene)...	56
3.1.7 Isolering av mutert plasmid fra en koloni .....	57
3.1.8 Sekvensering .....	57
3.1.9 Sekvensering av nytt plasmid.....	59
3.1.10 Transformering over i BL21 Star (DE3), E. Coli celler .....	60
3.1.11 Tillagning av -80 °C frysestock.....	60

---

<b>3.2 Produksjon av ChiB mutanter .....</b>	<b>61</b>
3.2.1 Overekspresjon av ChiB: .....	61
3.2.2 Tillagning av periplasmatisk ekstrakt: .....	62
<b>3.3 Rensing av Chitinase B .....</b>	<b>63</b>
3.3.1 Ionebytterkromatografi.....	63
3.3.2 Sodium Dodecyl Sulfate- Polyakrylamid Gel Elektroforese (SDS- PAGE).....	64
3.3.3 Hydrofob interaksjonskromatografi (HIC).....	66
3.3.4 Rensing av aktive mutanter på kitinkolonne .....	67
3.3.5 Oppkonsentrering av ChiB .....	69
3.3.6 Fluorometrisk bestemmelse av proteinkonsentrasjon .....	69
3.3.7 Aktivitetstest.....	70
<b>3.4 Fremstilling av kitosan.....</b>	<b>72</b>
3.4.1 <sup>1</sup> HNMR- analyse for bestemmelse av acetyleringsgrad av kitosan .....	73
<b>3.5 Nedbrytning av kitosan.....</b>	<b>75</b>
3.5.1 Løsning av kitosan .....	75
3.5.2 Degradering av kitosan.....	75
3.5.3 Prøveopparbeidelse <sup>1</sup> H NMR .....	76
3.5.4 Kjernemagnetisk resonans (NMR).....	77
3.5.5 Tolkning av <sup>1</sup> H NMR-spektra .....	78
3.5.6 Størrelses eksklusjonskromatografi (SEC).....	79
3.5.7 Massespektrometri (MS) .....	80
<b>3.6 Bindingsassay.....</b>	<b>81</b>
3.6.1 Tillagning av standardkurve:.....	81
3.6.2 Bindingsassay:.....	81
<b>3.7 Substrattilgjengelighetsforsøk.....</b>	<b>82</b>

---

3.7.1 Forberedelser til substrattilgjengelighets forsøk .....	83
3.7.2 Tillagning av $\beta$ -kitin-substrat .....	83
3.7.2.1 Ultrasonikering .....	83
3.7.3 Substrat forsøk.....	83
3.7.4 HPLC (High Performance Liquid Chromatography) .....	84
3.7.4.1 Tillagning av standarder .....	85
3.7.4.2 HPLC-analyse .....	86
<b>3.8 Viskositetsmåling.....</b>	<b>87</b>
3.8.1 Viskositetsmåling .....	87
3.8.1.1 Forberedelser .....	87
3.8.1.2 Viskositetsassay: .....	89
3.8.2 3-metyl-2-benzothiazolinone hydrazone assay (MBTH):.....	89
<b>4 Resultater .....</b>	<b>92</b>
<b>4.1 Subsete mutasjoner i ChiB: .....</b>	<b>92</b>
4.1.1 R446: .....	94
4.1.2 F190A:.....	95
4.1.3 F191A:.....	95
4.1.4 D316A:.....	95
4.1.5 W97A: .....	96
4.1.6 W220A: .....	96
4.1.7 W97A/ D316A: .....	96
4.1.8 W97A/ W220A: .....	97
<b>4.2 Rensing av Chitinase B .....</b>	<b>97</b>
4.2.1 Isolering av ChiB-WT .....	98
4.2.2 Isolering av R446 .....	100



---

4.2.3 Fluorometrisk bestemmelse av proteinkonsentrasjon .....	103
4.2.4 Aktivitetskontroll av isolerte enzymer .....	104
<b>4.3 Fremstilling av kitosan.....</b>	<b>106</b>
<b>4.4 Nedbrytning av kitosan <math>F_A = 0,63</math> .....</b>	<b>107</b>
4.4.1 $^1\text{H}$ NMR.....	108
4.4.2 SEC.....	111
4.4.2 Partalls/oddetalls ratio .....	115
<b>4.5 Viskositetsmåling: .....</b>	<b>116</b>
<b>4.6 Nedbrytning av kitin med ulik grad av substrattilgjengelighet .....</b>	<b>120</b>
4.6.1 [A2] mot tid og $k_{\text{cat}}$ .....	121
4.6.2 [A2]/ [A1] ratio .....	127
<b>4.7 Substratbindingsassay mot kitin.....</b>	<b>129</b>
<b>5 Diskusjon.....</b>	<b>133</b>
<b>5.1 Prosessivitets studie av de ulike mutantene .....</b>	<b>133</b>
5.1.1 ChiB-WT .....	133
5.1.1.1 Kitosan.....	133
5.1.1.2 Kitin.....	134
5.1.2 R446 .....	134
5.1.2.1 Kitosan.....	134
5.1.2.2 Kitin.....	135
5.1.3 F190A.....	135
5.1.3.1 Kitosan.....	135
5.1.3.2 Kitin.....	136
5.1.4 F191A.....	136
5.1.4.1 Kitosan.....	136
5.1.4.2 Kitin.....	137

---

5.1.5 D316A .....	137
5.1.5.1 Kitosan.....	137
5.1.5.2 Kitin.....	138
5.1.6 W97A .....	138
5.1.7 W97A/D316A .....	139
5.1.7.1 Kitosan.....	140
5.1.7.2 Kitin.....	140
5.1.8 W220A .....	140
5.1.8.1 Kitosan.....	140
5.1.8.2 Kitin.....	141
5.1.9 W97A/W220A .....	141
5.1.9.1 Kitosan.....	141
5.1.10 Oppsummering: faktorer i enzymet som støtter prosessiv mekanisme.....	142
<b>5.2 Oppsummering: sammenligning av ulike metoder for måling av prosessivitet ...</b>	<b>144</b>
<b>5.3 Nedbrytning av kitin med ulik grad av substrattilgjengelighet .....</b>	<b>146</b>
<b>5.4 Dissosiasjonskonstant (<math>K_D</math>) og Gibbs frie energi (<math>\Delta G</math>).....</b>	<b>147</b>
<b>5.5 Videre studier .....</b>	<b>148</b>
<b>6 Referanser .....</b>	<b>149</b>
<b>7 Appendix .....</b>	<b>157</b>

## Sammendrag

Denne oppgaven er skrevet som en del av større forskningsprosjekt hvor det overordnede målet er å utvikle enzymer som mest mulig effektivt degraderer den uløselige biopolymeren kitin ( $\beta$ -(1, 4)-bundet *N*-acetylglucosamine (GlcNAc)) og dets vannløselige analoge kitosan (delvis deacetyllert kitin) til oligosakkarider av en gitt lengde. Siden kitin er veldig likt cellulose, som benyttes til produksjon av andre generasjons bioetanol, og de enzymatisk katalyserte hydrolyser av disse også er like er degraderingsstudier av kitin svært aktuelt.

Hovedmålet i studiet har vært å finne den best egnede metoden for måling av prosessivitet i familie 18 kitinaser, samt undersøke effekten åtte ulike mutasjoner har på den katalytiske mekanismen til kitinase B (ChiB) fra jordbakterien *Serratia marcescens*. I tillegg har enzymerne blitt testet mot ulike substratvarianter da det er økende interesse for om andre faktorer enn enzymet selv, som for eksempel substrattilgjengelighet, kan påvirke grad av prosessivitet. Det har også blitt utført bindingsassay hvor målet var å undersøke om bindingsstyrken mellom enzym og substrat er proporsjonal forgrad av prosessiv katalyse.

Størrelsesekslusjonskromatografi, estimering av initiell hastighet for substratnedbrytning, apparent  $k_{cat}$ , og viskositetsmålinger ble benyttet for måling av prosessivitet mot det løselige substratet kitosan hos de ulike enzymvariantene. Når substratet var kitin ble prosessivitet målt ved å bestemme konsentrasjon av resulterende dimerer etter hydrolyse delt på det samme for monomerer ( $[(\text{GlcNAc})_2] / [\text{GlcNAc}]$  ratio). Samtlige analyser indikerte at mutantene F190A, W97A, W220A, W97A/ W220A og W97A/ D316A for ChiB har redusert prosessiviteten både mot kitin og kitosan. ChiB viltype, samt mutantene R446 (deletering av det kitinbindende domene til ChiB), F191A og D316A viste prosessive egenskaper mot kitosan i samtlige analyser bortsett fra viskositetsmålinger for mutant D316A som ga avvikende resultater. R446 var prosessiv mot det vannløselige substrate kitosan, men hadde sterkt redusert prosessivitet mot det vannuløselige kitin som antyder at det kitinbindende domenet er viktigere for prosessiv hydrolyse av uløselige substrater. Resultatene viser derfor at kunnskap om degradering av løselig kitosan ikke alltid direkte kan overføres til degradering av krystallinsk kitin. Sammenligning av de ulike fremgangsmåtene for måling av grad av

prosessivitet antydnet at størrelsesekslusjonskromatografi, estimering av apparent  $k_{cat}$  og  $[(GlcNAc)_2]/[GlcNAc]$  ratioen er de best egnede metodene. Apparent  $k_{cat}$ -verdier for de ulike enzymene viste og at ikke-prosessive enzymer var mer effektive mot løselig substrat enn de prosessive, og motsatt for uløselig substrat. Dette sammenfaller med tidligere forslag om at prosessive enzymer er mer effektive mot krystallinske substrater og mindre mot løselige substrater.

Degraderingsforsøk av ulike former for kitin med hensyn på substrattilgjengelighet (sonikert og ikke-sonikert) og med og uten hjelpeprotein (CBP21) ble også utført i nærvær av ChiB-WT og mutant R446 for å bestemme forholdet mellom substrattilgjengelighet og grad av prosessiv hydrolyse. En klar, positiv korrelasjon mellom substrattilgjengelighet og grad av prosessivitet ble observert. I tillegg var det en positiv korrelasjon mellom bestemte  $k_{cat}$ -verdier og substrattilgjengelighet som videre bygger under teorien om at økende grad av prosessivitet fører til økning i aktivitet mot kitin.

Bindingsstyrken mellom enzym og kitin ble beregnet for ChiB-WT, R446, F190A, F191A, D316A, W97A og W97A/ W220A ved å måle dissosiasjonskonstanten,  $K_D$ , og Gibbs frie energi,  $G$ , for samtlige dissosieringsreaksjoner. Alle enzymvariantene viste tilnærmet like verdier, uavhengig om de hydrolyserer kitin prosessivt eller ikke- prosessivt. Dette tyder på at enzymets affinitet for kitin ikke har noen direkte sammenheng med prosessivitet.

## Abstract

This paper is written as part of larger research project with the overall goal of developing enzymes that most efficiently degrades chitin ( $\beta$ -(1, 4)-linked *N*-acetylglucosamine (GlcNAc)) and its water soluble analogue chitosan (partially deacetylated chitin) to oligosaccharides of a given length. Since chitin is very similar to cellulose which is used in production of second generation bioethanol, and the enzymatically catalyzed hydrolysis of these also is very similar, degradation studies of chitin is particularly relevant.

The main objective of the study was to determine the most suitable method for measuring processivity in family 18 chitinases and investigate the effect of eight different mutations on the catalytic mechanism of chitinase B (ChiB) from the soil bacterium *Serratia marcescens*. In addition, enzymes have been tested against various substrates as there is an increasing interest in whether other factors than the enzyme itself, such as substrate accessibility, may affect the degree of processivity. There have also been carried out binding assays where the goal was to investigate if the binding strength between the enzyme and substrate is proportional to the degree of processive catalysis.

Size exclusion chromatography, estimating the initial rate of substrate hydrolysis, apparent  $k_{cat}$ , and viscosity measurements were used for measuring processivity against the soluble substrate chitosan with the different enzyme variants. When the substrate was chitin, processivity was measured by determining the concentration of the resulting dimers after hydrolysis divided by the same for monomers ( $[(GlcNAc)_2] / [GlcNAc]$  ratio). All of the analysis indicated that the mutants F190A, W97A, W220A, W97A / W97A and W220A / D316A for ChiB have reduced their processivity against both chitin and chitosan. ChiB wild type and the mutants R446 (deletion of the chitin binding domain to ChiB), F191A and D316A showed processive properties against chitosan in all analysis except for the viscosity measurements for the D316A mutant that gave abnormal results. R446 had a processive mode of action towards the soluble substrate chitosan, but showed strongly reduced processivity against the insoluble substrate chitin suggesting that the chitin binding domain is more important for processive hydrolysis of insoluble substrates. The results therefor indicate that knowledge of the degradation of soluble chitosan is not always directly transferable to the

degradation of crystalline chitin. Comparison of different methods for measuring processivity suggested that size exclusion chromatography, estimation of apparent  $k_{cat}$  and the  $[(GlcNAc)_2]/[GlcNAc]$  ratio are the best suited methods. Apparent  $k_{cat}$ -values for the different enzymes also showed that the non-processive enzymes were more effective against soluble substrate than processive enzymes, and vice versa for the insoluble substrate. This coincides with earlier suggestions that processive enzymes are more effective against crystalline substrates and less effective towards soluble substrates.

Degradation experiments with different types of chitin with respect for substrate accessibility (both sonicated and non-sonicated) and with and without chitin-binding protein (CBP21) was also performed in the presence of ChiB wild type and mutant R446 to determine the relationship between substrate accessibility and the degree of processivity. A clear, positive correlation between the substrate accessibility and the degree of processivity was observed. In addition there was a positive correlation between specific  $k_{cat}$ -values and substrate accessibility which strengthens the theory that an increase in the degree of processivity will lead to an increase in activity towards chitin.

Binding strength between the enzyme and chitin were calculated for ChiB wild type, R446, F190A, F191A, D316A, W97A and W97A / W220A by measuring the dissociation constant,  $K_D$ , and Gibbs free energy,  $\Delta G$ , for all dissociation reactions. All enzyme variants showed approximately the same values, whether they hydrolyze chitin processive or non-processive way. This suggests that the enzyme's affinity for chitin does not directly relate to processivity.

---

## Forkortelser

4- MU- (GlcNAc) <sub>2</sub>	4-metylumbelliferyl- $\beta$ -D-N,N'-diacetylchitobiose
A <sub>280</sub>	Absorpsjon ved 280 nm
Ala	Alanine
Asp (D)	Asparaginsyre
ChiA	Kitinase A
ChiB	Kitinase B
ChiC	Kitinase C
$\Delta G$	Endring i Gibbs frie energi
dH <sub>2</sub> O	Sterilt vann (Milli Q)
DP	Polymeriseringsgrad
F <sub>A</sub>	Acetyleringsgrad
GlcN	D-glukosamin
(GlcNAc) <sub>1-6</sub>	(N-acetylglukosamin) <sub>1-6</sub>
HCHT	Human chitotriosidase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
<i>I</i>	Kjernespinn
K <sub>cat</sub>	Turnover number
KOS	Kitooligosakkarider
K <sub>D</sub>	Dissosiasjonskonstanten

---

MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MS	Massespektrometri
Mw	Molekylvekt
NMR	Kjernemagnetisk resonans
Phe (F)	Fenylalanine
pI	Isoelektrisk punkt
PMSF	Phenylmetylsulfonyl fluorid
Rpm	Rotasjon per minutt
SEC	Størrelses eksklusjonskromatografi
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfat Polyakrylamid Gel Elektroforese
TMS	Tetrametylsilane
TOF	Time of flight
Trp (W)	Tryptofan
WT	Villtype
Å	Ångstrøm (0,1 nm)



# 1 Introduksjon

## 1.1 Karbohydrater

Karbohydrater er en samlebetegnelse for en stor gruppe biologiske molekyler som spiller en rekke ulike roller i naturen [1]. Sakkaridene klassifiseres i grupper ut fra molekylens oppbygning. Monosakkarider er den minste, enkleste formen for et karbohydrat og er byggesteinen i de større molekylene, oligosakkarider og polysakkarider. Monosakkaridene bindes sammen til større molekyler via glykosidbindinger som er av de mest stabile bindingene funnet i naturen[2]. Antallet mulige kombinasjoner sakkarider byr på en enorm variasjon og diversitet. Alle levende organismer utnytter denne diversiteten ved å benytte sukkerkjeder av ulike lengder til flere ulike biologiske funksjoner og prosesser [3].

Forbindelsene finnes hovedsaklig i planter som omdanner karbondioksid til karbohydrater gjennom fotosyntese og lagres stort sett som cellulose, stivelse og sukker. Forbrenning av karbohydrater er også den viktigste energikilden i celler uten fotosyntese [2, 4].

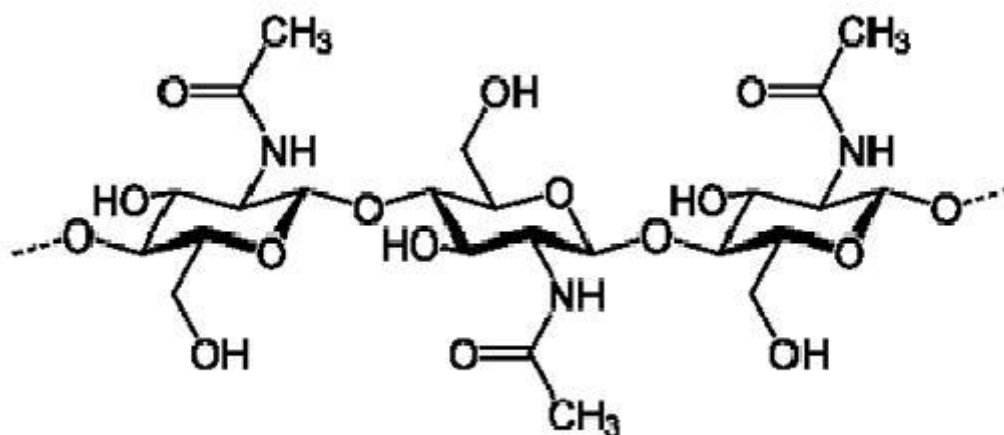
Karbohydrater inngår også som strukturelementer i celleveggen til bakterier og planter og i eksoskjelettet hos skalldyr. Selektiv hydrolyse av disse glykosidbindingene er avgjørende for ekspansjon og degradering. I tillegg er karbohydrater involvert i signalgivningsveier som gjenkjennelsesmolekyler på celleoverflater for andre celler og molekyler. De er i denne sammenhengen ofte bundet til proteiner og lipider, og fremstår da som henholdsvis glykoproteiner og glykolipider [1].

Konsekvensen av den store diversiteten til polysakkarider er at man også ser en stor variasjon blant enzymene som foretar hydrolyse av glykosidbindinger [2].

## 1.2 Kitin

### 1.2.1 Struktur og egenskaper

Kitin, foruten om cellulose, er den biopolymeren det finnes mest av i naturen. Den skilles hovedsakelig ut som støttevev i insekter, sopp, skalldyr, og andre marine organismer. Polysakkaridet er en uløselig, lineær homopolymer av  $\beta$ -1,4 linket *N*-acetylglukosamin (GlcNAc). I kitin er sukkerenhetene rotert  $180^\circ$  i relativt til deres nabo- residuer [5] og den funksjonelle og strukturelle komponenten i kitin er derfor et disakkarid [6]. Strukturen til kitin er vist i figur 1.1.



**Figur 1.1:** Den kjemiske strukturen til kitin[7]. Sukkeret består av  $\beta$ -1,4 linket *N*-acetylglukosamin (GlcNAc). Sukkerenhetene rotert  $180^\circ$  i relativt til deres nabo- residuer og den strukturelle enheten i kitin er derfor et disakkarid [5].

Det finnes tre typer krystallinske former kitin med tanke på arrangementen av kitin- kjedene:  $\alpha$ - kitin hvor kjedene er anti- parallelle,  $\beta$ - kitin hvor kjedene er parallelle og  $\gamma$ - kitin som består av en miks av anti- parallell og parallel arrangement av kitin- kjedene [6]. Den parallelle organiseringen av polymerkjedene i  $\beta$ - kitin har svakere intermolekylære krefter enn i  $\alpha$ - kitin, som følgelig gjør det mer tilgjengelig for depolymerisering.

Som flere andre sakkarider, kan GlcNAc- enheten forligge på to anomere former. Ved ringdannelsen av et sukker dannes det et stereogent senter ved det anomere karbonet (C1) som kan ha to konfigurasjoner,  $\alpha$  eller  $\beta$ . Når hydroksylgruppen på C1 sitter i aksial posisjon får man  $\alpha$ - epimeren, mens ekvatorial posisjon gir  $\beta$ - epimeren. Selv om de sykliske formene vanligvis er favorisert, vil sakkarider i løsning alltid være i likevekt med den åpne kjede formen og dermed også mellom  $\alpha$ - og  $\beta$ - konfigurasjon. Likevektsløsningen av de to epimerene resulterer i endring av optisk aktivitet. Dette kalles mutarotasjon [4].

### ***1.2.2 Anvendelser***

Kitin har anvendelsesområder spesielt innen landbruk og bioteknologi. I landbruk bidrar kitin for eksempel til retensjon av næringsstoffer i jorda. Kitin har også blitt brukt i dyrefor for dets vekstfremmende effekt hos kylling. Innen bioteknologi har kitin vist seg og være nyttig som matriks for immobilisering av ulike enzym [8].

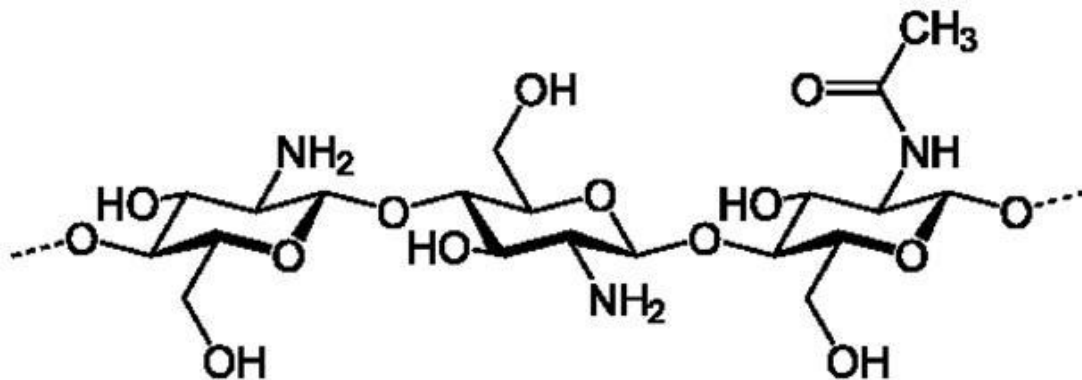
Kitin er som sagt en av hovedbestanddelene i celleveggen til sopp og eksoskjelettet til mange invertebrater. Kitindegradering er derfor en viktig forsvarmekanisme mot patogener for planter og dyr [9]. Kitinomsetning har vist seg å spille en rolle i astmatiske inflammasjoner og immunresponser. Fordi kitin heller ikke finnes i mennesker er kitinmetabolisme også viktig for utvikling av medisiner og pesticider [10].

Kitin har vist seg å spille en rolle i biologiske prosesser som overføring av malaria[11] og inaktivering av insektvirus [12]. I tillegg har karbohydratets sterke og fleksible egenskaper vist seg å være gunstig innen medisin, blant annet som tråd i kirurgisk sammenheng [13]. En av de viktigste anvendelsene til kitin er likevel fremstilling av kitosan (seksjon 1.3), og kitooligosakkarider (seksjon 1.4) som har mange og viktige anvendelsesområder [14].

## 1.3 Kitosan

### 1.3.1 Struktur

Kitosan er et lineært polysakkarid som kommersielt produseres ved deacetylering av kitin. Sukkeret er en heteropolymer og består av  $\beta$ - 1,4 linket *N*- acetylglukosamin (GlcNAc (A)) og glukosamin (GlcN (D)). Den detaljerte kjemiske sammensetningen til kitosan varierer og er avhengig av fraksjonen av acetylerede enheter ( $F_A$ ), samt sekvensen av disse. Tidligere studier har vist at homogen deacetylering av kitin gir en tilfeldig distribuering av *N*-acetyl enheter [14]. Figur 1.2 viser strukturen til kitosan.



**Figur 1.2:** Den kjemiske strukturen til kitosan[7]. Sukkeret består av  $\beta$ - 1,4 linket *N*-acetylglukosamin (GlcNAc (A)) og glukosamin (GlcN (D)) [14].

I motsetning til kitin, som er løselig i kun et lite antall løsemidler, er kitosan løselig i vandige syrer. Dette på grunn av de mange aminogruppene polymeren besitter. I sure og nøytrale løsninger vil aminogruppene protoneres og derved øke polariteten, samt grad av elektrostatiske repulsjon [15]. Dette vil følgelig forbedre løseligheten til sukkeret.

### ***1.3.2 Anvendelser***

Nyttiggjørelse av kitosan er avhengig av flere parametre: molekylstørrelse, grad av deacetylering, sekvens og løselighet. Kontrollering av disse faktorene muliggjør produksjon av et vidt spekter av kitosan som kan benyttes til ulike formål [16].

Kitosan benyttes for eksempel til rensing av vann og andre drikkevarer. Sukkeret opptre da som en flokkulerende agent ved at de positivt ladde aminogrupper binder opp organiske kontamineringer med motsatt ladning [17]. Kitosan er i tillegg markedsført som slanke- og kolesterolsenkende middel hvor polymeren da vil binde opp fett- og kolesterolmolekyler [18, 19].

Kitosan benyttes også i kosmetisk sammenheng. I hudpleieprodukter vil sukkeret binde vann og hindre dehydrering av huden. Kitosan bidrar til allergivennlig kosmetikk da polymeren binder opp allergifremkallende tung- metaller [17].

Studier har vist at kitosan har hemostatiske og antimikrobielle egenskaper og benyttes derfor ved sårheling [20]. Sukkeret anvendes i tillegg på flere områder innen medisin, som for eksempel kreftbekjempelse og medisinlevering [21].

## 1.4 Kitooligosakkarider (KOS)

Kitin og kitosan kan degraderes til kortere fragmenter kalt kitooligosakkarider (KOS) som består av et antall N- acetylglukosamin eller glukosamin residuer [22]. KOS er av spesiell interesse da de har et spekter av biologiske og fysiologiske aktiviteter [23], og som hos kitosan er aktiviteten relatert til acetyleringsgrad, polymeriseringsgrad og fordelingen av GlcNAc/ GlcN.

KOS har høyere vannløselighet enn kitin og kitosan og er lett degraderbare i naturen. De transporteres og absorberes lett i kroppen hvilket er viktig i medisinske sammenhenger [24].

KOS har blant annet vist seg å virke bakterie- og sopphekkende, i tillegg til å ha stort potensial som enzyminhibitorer. Som kitosan, har også KOS antitumor- og immunofremmende effekter [25, 26] og benyttes også i matindustrien på grunn av sin kolesterol-senkende og vann- retarderende virkning [26].

På grunn av KOS' mange bruksområder innen både biomedisin og matproduksjon er det økende interesse for utvikling av tilfredsstillende prosesser for hydrolysing av kitin og kitosan. KOS har til nå blitt fremstilt ved sonikering, hydrodynamisk kutting, kjemisk hydrolyse og enzymatisk hydrolyse, hvorav sistnevnte har vist seg å være den best egnede og mest miljøvennlige metoden [23]. Det er derfor viktig med studier av enzymer som bryter ned kitin og kitosan for og kunne nyttiggjøre seg disse i fremstilling av KOS.

## 1.5 Glykosidaser

Som tidligere nevnt resulterer det enorme antallet mulige kombinasjoner og størrelser sakkarider i en strukturell og funksjonell diversitet, mye større enn det som er mulig for peptider eller nukleinsyrer av samme størrelse. Levende organismer utnytter denne variasjonen ved å ta i bruk oligo- og polysakkarider i et vidt spekter av biologiske funksjoner. Selektiv hydrolyse av glykosid bindinger er derfor viktig for energi opptak, cellevegg ekspansjon og degradering, og ”turnover” tid for signal- molekyler. Som en konsekvens av diversiteten i karbohydrater, er det også stor variasjon i enzymene som degraderer dem. Disse enzymene hydrolyserer glykosidbindingen mellom sukkerenhetene og kalles glykosyl hydrolaser (oftest forkortet til glykosidaser). Defekter i gener som koder for glykosidaser fører til genetisk arvelige sykdommer [3].

Glykosidaser har et bredt spekter av anvendelsesområder, inkludert degradering av plantematerialer i mat- og papirindustrien. I organisk kjemi kan glykosidaser benyttes som syntetiske katalysatorer for dannelsen av glykosidbindinger ved enten revers hydrolyse eller transglykolysering [27].

Glykosidaser benyttes også i matindustrien, for eksempel ved redusering av viskositet i enkelte matvarer [28]. En annen type glykosidaser tilsettes vaskemidler for å bevare fargene på klærne ved at enzymene fjerner mikrofiber som har oppstått på overflaten av stoffet [29].

### *1.5.1 Klassifisering*

Det finnes flere systemer for klassifisering av glykosidaser. Dette omfatter blant annet de som er basert på substrat- eller produktspesifisitet, måten de angriper substratet på og stereokjemisk mekanisme [30]. Sekvensbasert klassifisering er likevel den mest benyttede klassifiseringsmetoden og har ledet til definering av mer enn 100 ulike familier [31]. Det underliggende prinsippet for denne inndelingen er at siden sekvens og struktur er relatert, kan strukturell informasjon hentes på bakgrunn av sekvens. Ettersom strukturen bestemmer katalytisk mekanisme, gjenspeiler denne klassifiseringen direkte den molekylære mekanismen

til hver familie. I tillegg vil medlemmer i en sekvens- relatert familie ha lignende folding noe som tillater homologi modellering [30].

### ***1.5.2 Struktur***

De fleste glykosidasene har en struktur som består av et eller flere ikke- katalytiske domener i tillegg til det katalytiske domenet. Noen av de ikke- katalytiske domenene har vist seg å være involvert i substratbinding, men de fleste har ukjent funksjon. Den katalytiske delen til disse proteinene består blant annet av et aktivt sete hvor selve katalysen skjer. Det er her identifisert flere folder som er karakteristisk for hver av de ulike glykosyl hydrolase familiene [3].

Topologien til det aktive setet er ofte relatert til enzymets ekso- eller endoaktivitet [30].

Glykosidaser med eksoaktivitet er kjede- ende spesifikke. Disse vil degradere sukkerpolymerer fra den reduserende eller den ikke- reduserende enden og produsere di- eller trisakkarider. Endoaktive glykosidaser vil derimot kunne katalysere hydrolysere tilfeldig langs polymerkjeden og produsere multimere sukkerenheter [30, 32, 33].

Strukturen til det aktive setet hvor selve hydrolysen skjer, kan for glykosidaser deles inn i tre kategorier: lomme/ krater, kløft/ grop og tunnel (figur 1.5). Disse topologiene kan i prinsippet bygges på samme fold, med de samme katalytiske residuene [3]. Subsetene i det aktive setet nummereres fra  $-n$  (ikke- reduserende ende) til  $+n$  (reduserende ende). Hos glykosidaser kuttes glykosidbindingen alltid mellom  $-1$  og  $+1$  [34]. De andre subsetene bidrar til binding og stabilisering av enzym- substrat kompleks [34].

#### ***Lomme/ krater***

Lomme/krater (figur 1.3 A) topoligen er optimal for substrater med mange tilgjengelige ender på overflaten og er tilskrevet enzymer med eksoaktivitet. Siden katalyse krever at polysakkarid- kjeden tres gjennom lommen er enzymer med denne type aktivt sete lite



effektive på substrater med få, frie kjede-ender [3]. Dybden og formen av lommen reflekterer antall sub seter som bidrar til binding [30].

### ***Kløft/ grop***

Enzymer med kløft/grop topologi (figur 1.3 B) tillater tilfeldig binding av mange ulike sukker på grunn av den åpne strukturen. Denne topologien er derfor ofte funnet hos enzymer med endoaktivitet [3].

### ***Tunnel***

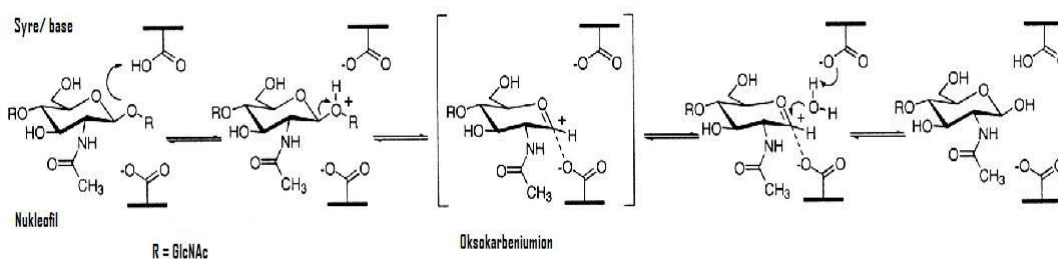
Tunnelstrukturen (figur 1.3 C) har evolvert fra kløft/ grop- strukturen og har utviklet lange looper som dekker deler av kløften og danner på denne måten en tunnel. Studier har vist at denne topologien tillater disse enzymene å frigjøre produktet mens de fremdeles er bundet til substratet. Det er ennå uklart om sukkerkjeden initielt entrer det aktive setet på ekso- måte ved å bli tredd gjennom tunnelen, eller om det entrer på endo- måte ved at loopene periodevis kan åpnes [3].



### 1.5.3.1 Bevarende mekanisme

Ved bevaring av konfigurasjonen til det anomere karbonet (C1) følger glykosidasene en totrinns dobbel forskyvnings mekanisme som involverer to aktiv sete residuer hvor den ene fungerer som syre/base og den andre som en nukleofil [37] (figur 1.4). Bevarende glykosidaser har den katalytiske basen proksimalt til det anomere karbonet og den gjennomsnittlige avstanden mellom de to katalytiske residuene er  $\sim 5.5 \text{ \AA}$  [3].

I det første steget fungerer det ene av de to karboksylsyresiduenes som syrekatalysator og protonerer glykosid oksygenet. Det andre karboksylsyresiduet fungerer som nukleofil og angriper det anomerske senteret og danner et glykosyl-enzym kompleks via et oksokarbeniumion. Hydrolysen gjennomføres ved at et vannmolekyl protonerer det residuet som tidligere fungerte som syrekatalysator. Dette residuet fungerer da som base. Det deprotonerte vannmolekylet agerer som nukleofil mot oksokarbeniumionet, og den katalytiske basen blir den utgående gruppen [38]. Siden vannmolekylet angriper karbonet fra samme side som den utgående gruppen var bundet, opprettholdes den stereokjemiske konfigurasjonen. Figur 1.4 viser de to stegene i katalysen.



**Figur 1.4:** Viser retaining mekanisme i glykosidaser. Reaksjonen skjer i to steg ved at det og resulterer i opprettholdelse av den anomerske konfigurasjonen til substratet [39].

### 1.5.3.2 Inverterende mekanisme

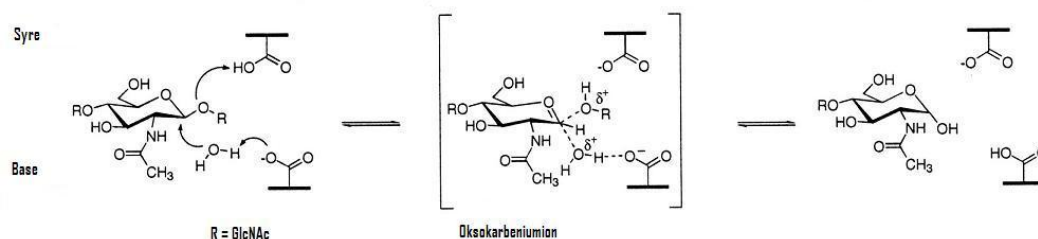
Inverterende glykosidaser benytter en enkel forskyvnings mekanisme med hjelp fra en generell syre og en generell base [37]. I motsetning til hos bevarende proteiner skjer denne reaksjonen i ett steg ved at den utgående gruppen sparkes ut samtidig som vannmolekylet angriper det anomere karbonet. I enzymer som anvender denne mekanismen er avstanden

mellom de to katalytiske residuene  $\sim 10$  Å, som følgelig gir plass til vannmolekylet mellom basen og sukkeret [3].

Hos inverterende glykosidaser fungerer det ene karboksylsyre-residuet som en generell syre, mens det andre fungerer som en generell base som aktiverer vann ved deprotonering for nukleofilt angrep på C1. I likhet med dobbel forskyvningsmekanismen, involverer også denne reaksjonen et oksokarbeniumion intermediet.

Siden vannmolekylet her angriper det anomere karbonet fra motsatt side som den utgående gruppen er bundet, resulterer denne mekanismen med inversjon av den opprinnelige stereokjemiske konfigurasjonen [40]. Det vil si at hydrolyse av  $\alpha$ -glykosidbinding vil danne produkt med  $\beta$ -konfigurasjon, og vice versa.

Figur 1.5 viser mekanismen for inverterende glykosidaser.



**Figur 1.5:** Viser invertierende mekanisme i glykosidaser. Reaksjonen skjer i ett enkelt trinn ved nukleofilt angrep på C1 av et aktivert vannmolekyl samtidig som den utgående gruppen avsettes. Produktet av katalysen vil ha motsatt konfigurasjon enn substratet i utgangspunktet hadde [39].

#### ***1.5.4 Prosessivitet***

Polymerer, og nedbrytningsprodukter av disse, er essensielle for alle levende organismer. Naturen har derfor utviklet effektive mekanismer for degradering av disse molekylene. Enzymer som degraderer polymerer gjør dette ofte på en prosessiv, eller ”multiple attack”, måte. Det betyr at enzymene utfører flere hydrolytiske kutt uten substratdissosiering [41]. Prosessiv degradering tenkes å forbedre den katalytiske effektiviteten til det aktuelle enzymet da det reduserer antall ganger proteinet må utføre den energetisk ugunstige prosessen med å tilgjengeliggjøre og binde en enkelt polymerkjede [5]. Studier av prosessivitet i ulike enzymer er derfor viktig. Et aktuelt eksempel på dette er nedbrytning av cellulose (svært likt kitin) i treverk til glukose ved hjelp av glykosidaser. Glukose kan benyttes til etanolproduksjon som videre kan benyttes som transportdrivstoff. Da hovedsaklig som biodrivstoff i tillegg til bensin. Det jobbes derfor med å finne et protein som gjør at utvinning av bioetanol fra tømmer går raskere [27].

Basert på grad av lukking rundt substratet kan prosessive enzymer deles inn i to hovedkategorier. I den ene gruppen lukker enzymet seg kun delvis rundt substratet, mens i den andre gruppen er lukking rundt substrat fullstendig. I den sistnevnte kategorien oppnås lukking enten ved at enzymet besitter en asymmetrisk struktur eller en symmetrisk toroide. I begge tilfellene er enzymet og substratet topologisk bundet sammen, noe som forklarer hvorfor ikke enzymet dissosierer. Den strukturelle basisen for enzymer som kun delvis lukkes rundt substratet ved katalyse er derimot ikke opplagt. Generelt vil disse proteinene binde substratet og oppnå prosessivitet ved hjelp av en stor interaksjonsoverflate. Dette gjør at enzymet kan binde substratet med moderat affinitet på flere seter, fremfor å binde sterkt til få seter. Dette tillater ”glidning” av substratet gjennom det aktive setet [41].

Studier har vist at delvis eller fullstendig lukking av enzym rundt substrat ser ut til å være avgjørende, men at struktur alene ikke er tilstrekkelig, for prosessivitet [41].

## 1.6 Kitinaser

Kitinaser er en gruppe enzymer som hydrolyserer glykosidbindinger i det lineære polysakkaridet kitin [42]. Kitinasene finnes i stor variasjon i organismer fra prokaryoter til menneske.

I organismer som inneholder kitin spiller kitinasene en viktig rolle for opprettholdelse av normal livssyklus, i form av celledeling og tidlig utvikling [43]. Planter som produserer kitinaser bruker disse som forsvar mot patogene mikroorganismer, mens flere bakterier og fungi benytter de kitinolytiske enzymene til å produsere mindre fragmenter av kitin som igjen benyttes som energikilde.

Det humane genomet koder for åtte familie 18 kitinaser (seksjon 1.6.1)[44]. Dette til tross for at pattedyr ikke er kjent for verken å syntetisere kitin eller nyttiggjøre den som næring. To av de humane kitinasene har vist enzymatisk aktivitet, human-chitotriosidase (HCHT) og *Acidic Mammalian Chitinase* (AMCase). De resterende mangler den katalytiske glutamat-residuen som fungerer som protondonor i hydrolysen og er derfor trolig lektiner (sukkerbindende proteiner).

### 1.6.1 Klassifisering

Som tidligere nevnt klassifiseres glykosyl hydrolasene etter aminosyresekvenslikhet, og har til nå blitt delt inn i mer enn 100 ulike familier [45]. Dette oppdateres kontinuerlig. På basis av deres mekanisme og sekvenshomologi faller kitinasene inn under glykosyl hydrolase familiene 18 og 19. Medlemmer av familie 18 kitinaser viser en substratassistert reaksjonsmekanisme, mens de i familie 19 viser en ”fold-og-reaksjons” mekanisme [46].

Familie 18 inneholder kitinaser fra bakterier, virus, fungi, og dyr, samt klasse III og V fra planter [44, 47]. Klasse I, II og IV, i motsetning til de to foregående kitinase klassene tilhører familie 19. Denne familien inneholder hovedsakelig kitinaser fra planter. De to kitinase familiene viser ingen sekvens- eller tredimensjonal struktur likhet [47].

Det katalytiske domenet, eller  $(\alpha/\beta)_8$ -barrel (TIM-barrel), i familie 18 kitinaser er et konserverte signatur motiv, DXXDXDXE . Dette domenet befinner seg på den fjerde  $\beta$ -strand i det aktive setet [48, 49]. Glutamat residu (E) i dette sekvensmotivet er den katalytiske syre/basen i glykosylhydrolysen [50].

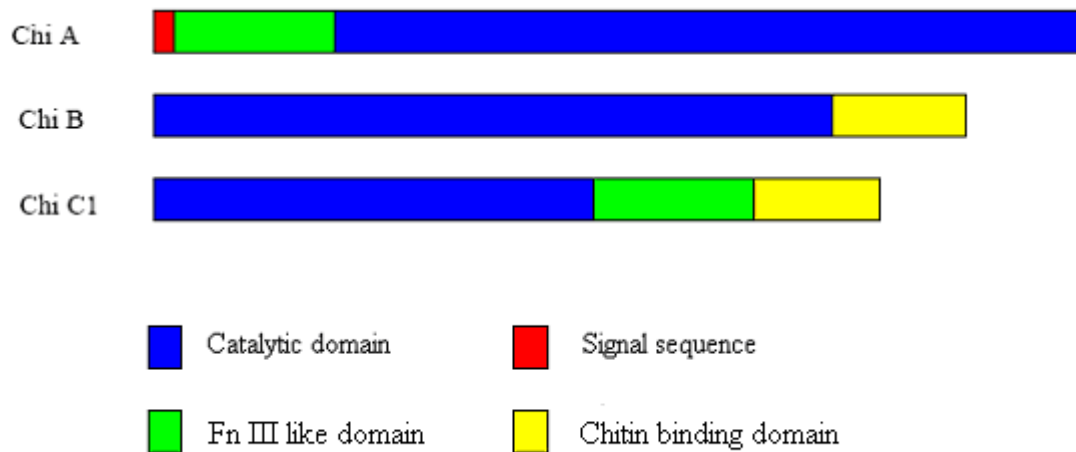
Familie 19 kitinasene har et stort innhold av sekundærstrukturen  $\alpha$ -heliks [49]. De to familiene inneholder både ekso- og endokitinaser [43].

### ***1.6.2 Serratia kitinaser***

Den Gram-negative kitinolytiske jord bakterien, *Serratia marcescens*, produserer flere ekstracellulære enzymer, der i blant kitinaser. *S. marcescens* er en av de mest effektive bakteriene for degradering av kitin vi kjenner til. Den sekreterer tre ulike kitinaser; kitinase A (ChiA), kitinase B (ChiB) og kitinase C (ChiC1), og et hydrolytisk produkt av denne, (ChiC2), en kitobiase (en glykosylhydrolase som hydrolyserer kitobiose), og det kitin bindende proteinet CBP21 [43].

ChiA, ChiB og ChiC fra *S. marcescens*, på bakgrunn av deres sekvenslikhet, tilhører alle tre familie 18 kitinasene. Alle inneholder det karakteristiske DXXDXDXE sekvens motivet i det aktive setet som er spesielt for familie 18 kitinasene. I tillegg til det katalytiske domenet inneholder enzymene ett eller flere domener som tenkes å være involvert i binding av det uløselige polymeriske substratet [51]. I dette studiet har det kun blitt jobbet med familie 18 kitinasen, ChiB.

Figur 1.6 viser en sammenligning av sekvensen til de tre familie 18 kitinasene fra *S. marcescens*.



**Figur 1.6:** Sammenligning av sekvensene til ChiA, ChiB og ChiC 1 fra *Serratia marcescens*. Av figuren kommer det frem at ChiA har et FnIII liknende domene i stedet for det kitin bindende domene til ChiB. ChiC 1 inneholder begge domene [51].

### 1.6.2.1 ChiA

ChiA består av i alt 540 residuer. Den er lokalisert ekstracellulært og har et aktivt sete som kan binde opp til seks GlcNAc enheter. ChiA inneholder TIM-barrel og en dyp substratbindende kløft. Denne kløften har ikke noe "tak" og er i tillegg åpen i begge ender. Dette resulterer i at substratet kan komme inn fra begge sider, noe som støtter opp om teorien om at ChiA er et ekso enzym [51]. Studier av K.M. Vårum et. al. 2006 foreslår imidlertid at både ChiA og ChiB er prosessive endoenzymer når substratet er løselig i form av kitosan [52]. Hele strukturen til ChiA har blitt bestemt og har vist et 114 residu langt domene med en fold som ligner fibronectin III som bidrar til substratbinding [51, 52].

### 1.6.2.2 ChiC

ChiC (ChiC 1) består av et katalytisk domene og to kitinbindende domener som er lokalisert C-terminalt i sekvensen. ChiC har en mer åpen substrat-bindende kløft sammenlignet med ChiA og ChiB (beskrevet nedenfor). ChiC forekommer også i en form hvor de to kitinbindende



domenene er hydrolysert av og refereres til som ChiC2. Dette fragmentet består kun av det katalytiske domenet og er 479 residuer langt. ChiC har vist seg å være et ikke-prosjesivt endoenzym [51, 52].

### **1.6.3 ChiB**

Strukturen til ChiB fra *S. marcescens* at enzymet i hovedsak består av et katalytisk domene, residuene 1-425, hvor den karakteristiske TIM- barrel inngår (residuene 295-373). Det inneholder i tillegg et konservert glutamat residu, Glu144, som fungerer som en syre under katalysen. Den katalytiske Glu144 er lokalisert i enden av  $\beta$ - strand 4 i TIM-barrel. Bak denne, på vei vekk fra det aktive setet og ned mot TIM-barrel kjernen ligger en rad av aspartat residuer (Asp142, Asp140 og Asp137). Disse utgjør sekvens motivet DXXDXDXE som er karakteristisk for alle familie 18 kitinaser [53].

Videre inneholder enzymet en linker, residuene 426- 450, og et kitin bindende domene, som refereres til som ChBD, residuene 451-499. I tillegg har ChiB en "support" loop og en fleksibel loop som utgjør "taket" over det aktive setet. Dette "taket" gjør at den substrat-bindende kløften har en relativt lukket struktur, og får et "tunnellignende" utseende. Dette i motsetning til ChiA og ChiC som har en mer åpen struktur. Strukturen til ChiB viser at den har en avlang form, og er på det lengste 81 Å langt. Det aktive setet utgjør en avlang kløft gjennom enzymet som er ~ 40 Å lang, 20 Å dyp og 15 Å bred[53].

Krystallstrukturen til ChiB antyder at denne er en eksokitinase som degraderer kitinkjeder ved å kutte av dimerer og trimerer ( $\text{NAG}_2$ ,  $\text{NAG}_3$ ) fra den ikke- reduserende enden.

Som tidligere nevnt inneholder ChiB i tillegg til det katalytiske domenet med TIM-barrel fold, et kitin bindende domene (ChBD) som kan interagere med den reduserende enden på substratet [54]. Fordi ChBD forlenger den substrat-bindende kløften på den siden hvor den reduserende enden til substratet binder, antas det at enzymet degraderer kitinkjeden fra den ikke-reduserende enden, som et eksoenzym[51]. Studier utført av P. Sikorski et. al. 2006 viser til at denne teorien kun er gjeldende for degradering av kitin og ikke kitosan hvor den i tillegg fungerer som et endoenzym [52].

### **1.6.3.1 Det aktive setet**

Det aktive setet i ChiB består av seks subseter, -3 til +3 [14, 55, 56].

Sukkeret i -3 subsetet danner fem interaksjoner med enzymet, fire hydrogenbindinger og en apolar kontakt [53]. I -2 subsetet er det lite interaksjoner mellom sidekjeder og substrat, med unntak av noen få apolare residuer som interagerer med -1 subsetet. -1 har, sammenlignet med de andre subsetene mest protein kontakt. Totalt dannes 10 sidekjeder interaksjoner med sukkeret i denne posisjonen. De fleste av interaksjonene er apolare. I dette subsetet forekommer konformasjonsendringen av -1 sukkerenheten som er viktig for hydrolyse av kitin. +1 subsetet er karakteristisk på grunn av oksygenatomet fra den katalytiske Glu144, i tillegg til fem andre residuer, som bidrar til dannelse av i alt fem hydrogenbindinger [53].

ChiB har en 55 Å lang lineær sti med aromatiske aminosyrer på overflaten som strekker seg inn i det katalytiske setet [53]. Disse aromatiske residuene består i hovedsak av tryptofan og tyrosin. Aminosyrene danner hydrofobe interaksjoner med sukker polymeren. Mengden interaksjoner mellom den aromatiske aminosyren og sukkerpolymeren er avhengig av om aminosyren er posisjonert parallelt med substratet, eller vinkelrett på.

En parallell posisjonering vil føre til en større kontaktflate og derfor flere interaksjoner enn en vinkelrett posisjonering. På motsatt side av de aromatiske residuene befinner det seg noen få polare residuer, disse danner spesifikke hydrogenbindinger med *N*- acetyl gruppene på kitin polymeren, og bidrar derved til stabilisering.

### **1.6.3.2 Det kitin bindende domenet, ChBD**

Hele ChBD er 49 residuer langt og er et C- terminalt domene. Tre antiparallele  $\beta$ -strands utgjør det kitin bindende domene, disse henger sammen ved hjelp av lange loops. Domenet har to aromatiske residuer eksponert på overflaten, Trp479 og Tyr481. Disse er de første i rekken aromatiske residuer som danner stien som går inn i det aktive setet, beskrevet ovenfor. De eksponerte residuene befinner seg alle med lik avstand til hverandre,  $\approx 11$  Å [53]. Dette tilsvarer lengden mellom ekvivalente atomer i den første og tredje *N*- acetylglukosamin (GlcNAc) og i en trimer, (GlcNAc)<sub>3</sub>.

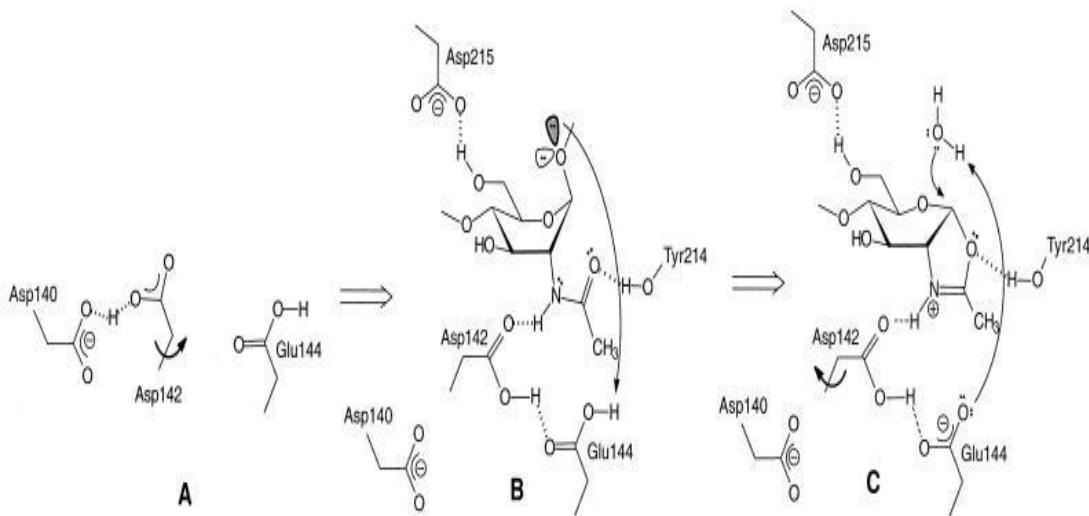
I rekken av aromatiske residuer befinner det seg noen få polare. Det antas at disse finnes der for å danne spesifikke hydrogenbindinger med *N*-acetyl gruppen, noe som er viktig for binding av substrat.

ChBD er festet til det katalytiske setet ved hjelp av en linker. Denne starter på residu 424, samme posisjon som den siste  $\alpha$ -heliksen som utgjør TIM barrel kjernen, og avsluttes ved den første residuen i ChBD, residu 451 [53].

#### ***1.6.4 Mekanisme substrat assistert katalyse***

Ulike studier av familie 18 kitinaser har vist at mekanismen som benyttes for degradering av kitin er substrat assistert katalyse. Katalysen forekommer ved retensjon av den anomere konfigurasjonen hvor karbonyl-oksygenet på *N*-acetylgruppen i sukkerenheten, fremfor et syre-residu, opptrer som en nukleofil[54, 57-59]. Hydrolysen har en absolutt preferanse for en acetylt sukkerenhet i -1 subsetet og binding av en deacetylt enhet vil være non- produktiv [14]. Figur 1.7 viser foreslått mekanisme og Asp140, Asp142 og Glu144, konserverte i familie 18 kitinaser, vises under flere trinn av katalysen [47].

Reaksjonen initieres av en konformasjonsendring av -1 sukkerringen til båtformasjon når substratet binder enzymet [52, 54, 60]. Substratbinding forårsaker i tillegg rotasjon av Asp-142 mot Glu-144. Dette resulterer i tap av hydrogenbinding mellom Asp-140 og Asp-142 og muliggjør samtidig hydrogenbinding mellom hydrogenatomet på Asp-142 og Glu-144. Videre protonerer Glu-144 det anomere oksygenatomet som binder GlcNac- residuene -1 og +1 sammen. Karbonylgruppen på *N*-acetyl gruppen utfører et nukleofilt angrep på det anomere karbonet og et positivt ladet oksasoliniumion intermediat dannes [54, 60]. Dette forklarer hvorfor mekanismen er kritisk avhengig av en *N*-acetyl glukosamin enhet posisjonert i -1 subsetet [43, 54, 60]. Den positive ladningen stabiliseres gjennom interaksjoner med et konserverte Asp- residu i nærheten av Glu- residuet [61-63]. Hydrolyse av oksasoliniumionet av et innkommende vannmolekyl fører til protonering av Glu-144 og fullfører reaksjonen. Asp-142 roterer tilbake til utgangsposisjon hvor den deler proton med Asp-140 [54, 60].

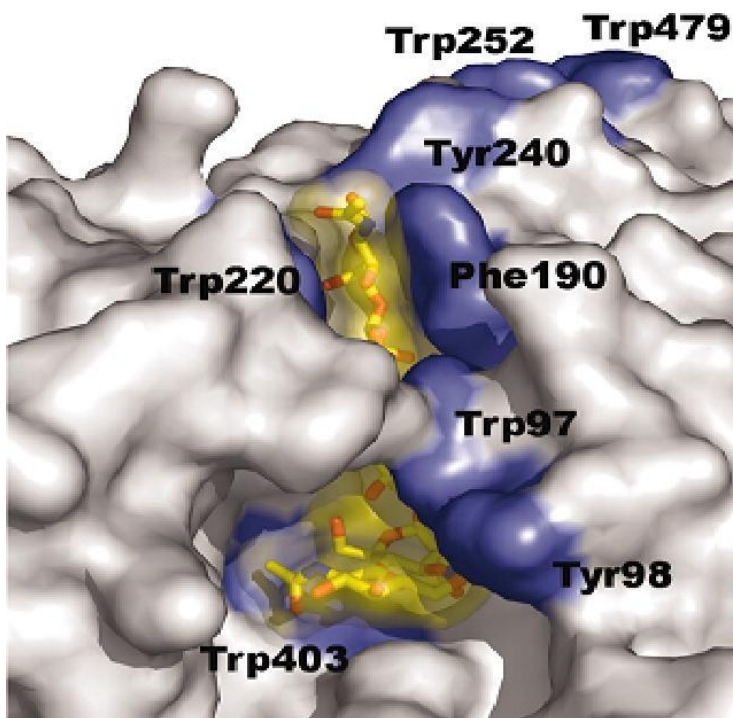


**Figur 1.7:** Viser en foreslått katalytisk mekanisme. Asp140, Asp142 og Glu144, konserverv i familie 18 kitinaser, vises under flere trinn av katalysen. (A) Asp142 har for stor avstand til å interagere med Glu144. (B) Binding av substrat, kun i -1 subsetet til enzymet, gjør at man får en konformasjonsendring i pyranoseringen til båtformasjon i tillegg til rotasjon av Asp142 nærmere Glu144. Forskyvningen av Asp142 muliggjør hydrogenbinding mellom Asp142 og Glu144. (C) Hydrolyse av oksazoliumion intermedietet fører til protonering av Glu144 og rotasjon av Asp142 tilbake til sin initielle posisjon hvor det deler proton med Asp140 [60].

### 1.6.5 Prosessivitet og kitinaser

Degraderingsstudier av kitin og kitosan med kitinaser fra *S.marcescens* støtter opp under en prosessiv mekanisme for ChiA og ChiB og en ikke- prosessiv mekanisme for ChiC [55]. Substratbindingskløften i ChiB har aromatiske residuer, spesielt tryptofan residuer, og disse tenkes å være viktig for prosessiviteten til enzymet [64, 65]. De hydrofobe interaksjonene er nonspesifikke og bidrar til en stor interaksjonsoverflate, som sikrer en sterk, men ”flytende” binding [4]. Samtidig hindres sterke bindinger på spesifikke seter som kan hemme glidebevegelsen av substratet. Det finnes eksempler som viser at mutasjon av slike aminosyrer reduserer prosessiviteten, men øker aktiviteten til proteinet [5, 64]. Endring av residuene

Trp97, Phe190, Phe191, Trp220, Tyr240 og Trp403 har alle vist seg å ha negativ effekt på prosessiviteten til ChiB [64]. For ChiB er det også antatt at det lukkede "taket" bidrar til redusert diffusjon av substratkjeden og dermed økt prosessiv hydrolyse. Tidligere studier utført av S. J. Horn et. al. 2006 av Asp316 residuet lokalisert i "taket", har i midlertidig vist at dette ikke er dominerende faktor for prosessivitet i ChiB [64]. Figur 1.8 viser det lukkede "taket" i ChiB når sukkerkjeden er bundet, samt de aromatiske residuene som befinner seg i enzymets substratbindingskløft.



**Figur 1.8:** Illustrerer det lukkede "taket" i ChiB når substratet er bundet og bidrar til tett enzym- substrat kontakt ved katalyse [64].

Studier utført av blant annet M. Baretto et. al. 2001 belyser også andre faktorer enn enzymmutasjoner som er avgjørende for prosessivitet [66]. Et eksempel på dette er tilgjengelighet av substrat hvor ultra-sonikering av kitin har vist seg å endre substratets morfologi og dermed gjøre det mer tilgjengelig for hydrolyse [66].

Et annet muligens medvirkende forhold kan være tilstedeværelsen av det kitin-bindende proteinet, CBP21, som også har vist seg å bidra til økt substrattilgjengelighet (seksjon 1.6) [67].

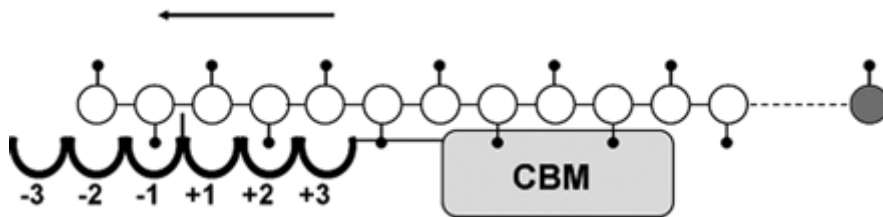
Som beskrevet i seksjon 1.2 er de strukturelle og funksjonelle komponentene i kitin, disakkarider som er rotert 180° i forhold til hverandre (avsnitt 1.2.1) [6]. Noen av subsetene i det aktive setet til ChiB er spesifikke for retningen av *N*-acetyl gruppene i substratet. Spesielt subsete -1 har en absolutt preferanse for korrekt binding av en *N*-acetyl gruppe. Følgelig må, dersom katalysen er prosessiv, kitin- kjeden forflytte seg to enheter før neste hydrolytiske kutt kan skje[14]. Dette forklarer hvorfor produktene i kitinhydrolyse hovedsakelig er dimerer (GlcNAc)<sub>2</sub>.

Den initielle bindingen av ChiB til kitinkjeden involvere binding fra -3 subsetet eller -2 subsetet. Katalyse- produktet fra det første steget kan derfor være en dimer eller en trimer, hvor trimeren vil hydrolyseres videre til en monomer og en dimer. Dette resulterer i at fullstendig hydrolyse av kitin nesten utelukkende vil gi monomerer og dimerer.

I tilfeller hvor kitosan er substratet, kan enzym- substrat komplekser som dannes ved prosessiv degradering være non- produktiv da sukkeret bundet i -1 subsetet kanskje mangler *N*-acetyl gruppen som kreves for hydrolyse. Kitosan- kjeden vil da forflytte seg videre to enheter til den støter på en acetyl- gruppe. Dette vil føre til dannelse av lengre, partall antall oligomerer som er typisk for prosessiv degradering [64]. Resultatet viser at non- produktiv bindinger ikke nødvendigvis følges av frigjøring av substrat, men heller konstitutiv relokalisering av sukker- kjeden [14].

Figur viser skjematisk enzym- substrat kompleks av ChiB og en kitinkjede. Enzymet har seks subsester nummerert fra -3 til +3. En korrekt posisjonert *N*-acetyl gruppe (vist som ”ball and stick”) i -1 setet er nødvendig for katalyse [64].

I dette studiet har prosessivitetsanalyser blitt utført på det vannløselige substratet kitosan og kitin. Kitinasers naturlige substrat er kitin, og prosessivitet ansees til å bidra til øke effektiv degradering. Ved å studere prosessivitet mot begge substratvarianter kan man få innblikk i om enzymene oppfører seg likt mot begge varianter og om det er mulig å ”overføre” resultatene oppnådd for kitin til resultatene oppnådd for kitosan.



**Figur 1.8:** Illustrer skjematisk degradering av kitin med ChiB. For at katalyse skal skje må det være en N- acetyl gruppe i -1 posisjon i enzymets aktive sete. Etter det initielle kuttet vil kitinkjeden forflytte to enheter slik at neste N- acetyl gruppe kommer i -1 subsetet [55].

#### 1.6.5.1 Måling av prosessivitet i kitinaser

Måling av prosessivitet hos kitinaser kan utføres ved hjelp av ulike metoder. Blant disse finner man størrelseseksklusjonskromatografi hvor produktene fra degradering av kitosan separeres med henhold på størrelse (seksjon 1.8.4). Et prosessivt enzym vil gi kromatogram med topper hovedsaklig bestående av partall oligomerer, mens et ikke- prosessivt enzym vil gi en tilfeldig fordeling av partall og oddetalls kjedelengder.

Den kinetiske parameteren  $k_{cat}$  (turnover number) vil også kunne relateres direkte til prosessivitet. Dette gjelder midlertidig kun når substratet er løselig kitosan (seksjon). Hvor høy grad av prosessivitet tenderer til å gi lavere  $k_{cat}$ . Dette fordi det hastighetsbestemmende trinnet er dannelsen av produkt og frigjørelse av dette. Når substratet er kitin er hastighetsbestemmende trinnet binding til substrat og kinetikken til prosessiviteten kan ikke observeres da denne kommer etter det hastighetsbestemmende steget.

Bestemmelse av forholdet mellom konsentrasjon av dimer og konsentrasjon av monomer ( $[A_2]/[A_1]$  ratio) ved hjelp av "high performance liquid chromatography" (HPLC) vil og kunne gi et mål på prosessivitet hos kitinaser. Oligomerer av ulik størrelse vil retarderes i ulik grad og vises som ulike topper i kromatogrammet, hvor konsentrasjonen av kitooligosakkaridene kan bestemmes ved og sammenligne med kjente standardprøver (seksjon 1.8.5). Høyere ratio vil indikere høyere grad av prosessivitet siden  $[A_1]$  indikerer initiell binding.

En annen benyttet metode for beregning av prosessivitet er måling av viskositet og estimering av antall kutt per binding, *Ncuts* (seksjon 1.11).

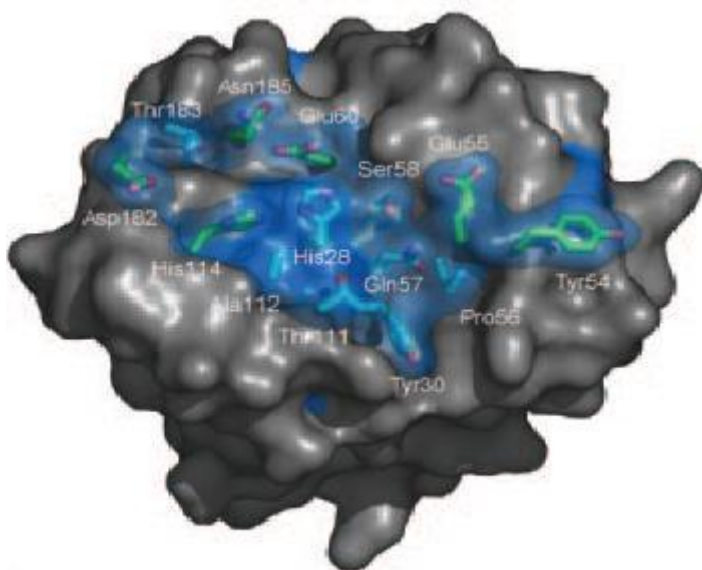
## 1.7 Kitinbindende protein CBP21

Jordbakterieren *S.marcescens* produserer, som tidligere nevnt, tre typer kitinaser ChiA, ChiB og ChiC. Når bakterien dyrkes med kun kitin som karbonkilde, produserer den i tillegg et ikke- katalytisk kitinbindende protein som refereres til som CBP21. Proteinet tilhører CBP familie 33 og har en spesifikk preferanse for binding til  $\beta$ - kitin. Binding av CBP21 til det uløselige substratet fører til strukturendringer i kitin og oppløsning av individuelle polymerer, som følgelig gjør substratet mer tilgjengelig for degradering av kitinaser [67, 68].

I motsetning til majoriteten av CBP- proteinene som benytter eksponerte aromatiske aminosyrer for interaksjon med substratet, mangler CBP21 aromatiske overflate- residuer. Mekanismen til CBP21 er ikke kjent, men det er vist at proteinet utøver sin effekt gjennom konserverte, hydrofile sidekjerder. Interaksjoner mellom disse spesifikke aminosyrene og kitin er viktig for endring av substrat- strukturen, samt bindingen av CBP21 til kitin [67].

Figur 1.9 illustrerer overflaten til proteinet, hvor de interagerende residuene er farget blå.





**Figur 1.9:** Bildet viser overflatestrukturen til CBP21- proteinet. Residuer som er mer enn 90 % konservert er farget blått og det er i hovedsak disse som deltar i tilgjengeliggjøring av, og binding til kitin [67].

Studier utført av G. Vaaje- Kolstad et. al. 2005 har vist at binding av CBP21 til krystallinsk  $\beta$ -kitin, øker hydrolysehastigheten når substratet degraderes av ChiA, ChiB eller ChiC [67].

## 1.8 Kinetiske og termodynamiske parametere

### 1.8.1 $k_{cat}$

$k_{cat}$ , *turnover number*, er definert som maks antall substratmolekyler et enzym kan omdanne til produkt per katalytiske sete per tidsenhet. I dette tilfellet antall glykosidbindingsbrudd per minutt[69]. Parameteren gir et direkte mål på den katalytiske produksjonen av produkt under optimale forhold, det vil si ved substratmetning, og kan kalkuleres ved hjelp av likningen:

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]}$$

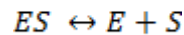
(likning 1.1)

$k_{cat}$  er følgelig et mål på katalytisk aktivitet og representerer kinetisk effektivitet til et enzym [69].

Som tidligere nevnt har mange kitinaser (og cellulaser) vist en prosessiv mekanisme ved degradering av substrat. Dette tenkes å være gunstig da prosessivitet øker substrattilgjengelighet. Studier av H. Zakariassen et. al. 2010 viser derimot at dette kun gjelder for uløselige substrater [70]. Mot mer løselige og tilgjengelige substrat kan prosessivitet faktisk redusere katalytisk effektivitet ( $k_{cat}$ ). Grunnen til dette er at hastighetsbestemmende trinnet for degradering av uløselig krystallinsk  $\beta$ - kitin er dannelse av enzym- substrat kompleks, altså binding av enzym til substrat. Følgelig vil det være mer katalytisk effektiv å utføre flere hydrolytiske kutt når kitinase først har utført den energetisk ugunstige prosessen med å binde substrat. Når substratet er løselig kitosan er derimot det hastighetsbestemmende trinnet dannelse av produkt og frigjørelse av dette. Følgelig er grad av prosessivitet reflektert i den kinetiske parameteren  $k_{cat}$  for kitosanhydrolyse [70].

### 1.8.2 Dissosiasjonskonstant ( $K_D$ ) og Gibbs frie energi ( $\Delta G$ )

I biokjemi er dissosiasjonskonstanten ( $K_D$ ) en termodynamisk likevektskonstant som beskriver tendensen et makromolekyl har til å dissosiere fra en ligand.  $K_D$  kan og benyttes for å beskrive den reversible assosiasjonen mellom et protein (P) og dets substrat (S) etter følgende likevektslikning:



(likning 1.2)

Hvor  $k_a$  og  $k_d$  er hastighetskonstantene for assosiasjon og dissosiasjon av protein-substratkomplekset, respektivt.

$K_D$  er spesifikk for en type protein- substrat interaksjon og lavere  $K_D$  indikerer sterkere binding [71].

I en bindingsreaksjon mellom et enzym og et substrat vil konsentrasjon av fritt enzym kunne observeres som absorbansforandring i et UV- spektra. Videre kan konsentrasjon av enzym bundet til substrat estimeres og et ikke- lineært plott av [enzym fritt] mot [enzym bundet] vil gi  $K_D$  for bindingsreaksjonen:

$$[\text{Enzym bundet}] = B_{\max} \times \left( \frac{[\text{Enzym fritt}]}{K_D + [\text{Enzym fritt}]} \right)$$

(likning 1.3)

$B_{\max}$  er maksimal binding.  $K_D$  er lik enzymkonsentrasjonen ved halv  $B_{\max}$ .

Binding av ChiB til sukkerkjeden er essensielt for at enzymet skal kunne utføre sin katalytiske funksjon. Hvor sterk protein- substrat interaksjonen er vil også være avgjørende for enzymets aktivitet. Mutasjoner av residuer involvert i substratbinding kan føre til endring i affinitet for det aktuelle substratet, og dermed også endring i dissosiasjonskonstanten,  $K_D$ . Måling av  $K_D$  på ulike ChiB mutanter vil følgelig kunne gi informasjon om hvilke aminosyre- residuer som er avgjørende for binding av kitin til ChiB.

Gibbs frie energi beskriver stabiliteten til et biologisk kompleks, og er den viktigste termodynamiske beskrivelsen for en bindingsreaksjon.

Gibbs frie energi ( $\Delta G$ ) kan relateres til dissosiasjonskonstanten  $K_D$  gjennom ligningen:

$$\Delta G = RT \ln K_D \quad (\text{likning 1.4})$$

Der R er den generelle gasskonstanten (1,987 cal/ K·mol) og T er temperaturen i grader Kelvin. Bindingsreaksjonen vil være spontant dersom  $\Delta G$  er negativ, det vil si dersom  $K_D > 1$  [72].

## 1.9 Seterettet mutagenese

Bruksområdene for de fleste ulike enzymer har vært preget av enzymenes ekstremt gode tilpasning til naturlige biologiske prosesser, men ikke like gode tilpassning til den industrielle teknologien [73, 74]. Ved å benytte metoder som enzym engineering i laboratorium har man kunnet foreta ønskede endringer av enzymer for bedre tilpassning til industrien. Endringer av enzymeres egenskaper har ført til ny kunnskap om hvordan enzymene fungerer [73, 75]. Seterettet mutagenese er en viktig metode for å studere proteiners egenskaper og virkemåter. Slike studier kan gi økt kunnskap som gjør at man lettere kan designe mutanter med ønskede egenskaper.

*In vitro* seterettet mutagenese er en teknikk for å studere DNA modifisering i molekyllær biologiske studier samt forholdet mellom struktur og funksjon i proteinet ved hjelp av å mutere en enkel residu. Det er også et verktøy for å se på genuttrykk og vektor modifikasjoner [76, 77]. I dag er den enkleste og mest brukte metoden den kommersielle QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis System (QCM) utviklet av Stratagene (La Jolla, CA) [77]. Ved å kombinere seterettet mutagenese med *polymerase chain reaction* (PCR) kan man benytte metoden på dobbeltrådet DNA (dsDNA). Dette har tidligere ikke har vært mulig. Ved å benytte PCR oppnår man separering av de to komplementære DNA trådene ved et temperaturavhengig denaturerende trinn, i tillegg til polymerisering av PCR primere som inneholder den aktuelle mutasjonen [76].

Ved å benytte denne metoden blir det dannet et nytt gen for enzymet som inneholder den ønskede endringen, slik er det mulig å endre det aktive setet i kitinaser. Subsetene endres, slik at substrat og produkt spesifisiteten til enzymet endres, og man kan lage enzym varianter til å effektivt degradere kitin og kitosan.

## 1.10 Kromatografi

Kromatografi er et samlebegrep for teknikker som benyttes for å separere ulike kjemiske komponenter i blanding. Hovedprinsippet for denne analysemetoden er at forbindelser med forskjellige fysiske og kjemiske egenskaper distribueres ulikt mellom to faser.

Et kromatografisk system består av en bevegelig mobilfase og en immobil, ikke- blandbar stasjonærfase som vanligvis er pakket i en kolonne med en gitt størrelse. Mobil- og stasjonærfasen velges slik at komponentene som skal separeres har ulik løselighet i hver av fasene. Mobilfasen og den aktuelle prøveløsningen tvinges gjennom kolonnen hvor de ulike forbindelsene vekselvirker med den stasjonære fasen med ulik grad. Dette fører til at noen komponenter retarderes mer enn andre og man vil få en separasjon av de ulike stoffene. Stoffene detekteres så av en passende detektor. Signalet fra detektoren sendes vanligvis til en datamaskin som presenterer de digitale dataene grafisk i form av et kromatogram [78].

I ionebytterkromatografi, hydrofob interaksjonskromatografi, separasjon på kitin kolonne og high performance liquid chromatograp (seksjon 1.10.1-1.10.3 og 1.10.5) benyttes det ofte UV- detektorer basert på måling av UV- absorpsjon. Det er da en forutsetning at molekylerne som skal separeres inneholder en eller flere kromoforer som absorberer den elektromagnetiske strålingen. UV detektoren vil selektivt detektere ionene av interesse mens andre komponenter i prøven vil gi lite eller ikke noe signal.

I størrelseseksklusjonskromatografi (seksjon 1.10.4) benyttes derimot en refraktiv indeks detektor (RI). Kitoooligosakkaridene som elueres ut detekteres ofte ved hjelp av en RI detektor, da dette er en god metode for deteksjon av sukkerpolymerer. En RI måling går ut på å måle brytningsindeksen til den aktuelle prøven [79].

### ***1.10.1 Ionebytterkromatografi***

Ionebytterkromatografi er en type kromatografi som baserer seg på elektrostatiske interaksjoner mellom et ladet molekyl og en motsatt ladet stasjonærfase. Kolonnematerialet består av en uløselig, ladet matriks som har bundet til seg et utskiftbart motion. Disse motionene vil kunne byttes ut med likt ladede ioner fra mobilfasen eller prøveløsningen. Separasjon forekommer på grunn av komponentenes ulike affinitet til den ladede stasjonærfasen [80].

Det skilles mellom to typer ionebytter: anionbytter og kationbytter. På anionbyttere er det et anion som er motionet, mens på kationbyttere er et kation motionet. Retensjon av molekylene er avhengig av pH og komponentenes isoelektriske punkt (pI). Når bufferens (mobilfasen) pH er over proteinets pI bør derfor en anionbytter benyttes. På samme måte bør en kationbytter benyttes dersom pH er under pI for molekylet man ønsker og rense. Applisering av prøve skjer under betingelser som gir sterk binding av analytt til kolonnematerialet. Eluering av analytt oppnås ved å endre betingelsene slik at prøvemolekylets ladning endres og derved slipper stasjonærfasen [7]. Eluering kan også oppnås ved å øke bufferens saltkonsentrasjon, slik at ionene i bufferen vil få større affinitet til stasjonærfasen og fortrenger analytt slik at proteinene elueres [80].

### ***1.10.2 Hydrofob interaksjonskromatografi (HIC)***

I hydrofob interaksjonskromatografi (HIC) skilles proteinene etter relativ hydrofobisitet. Det benyttes da en stasjonærfase med moderat hydrofobisitet som vil danne interaksjoner med hydrofobe deler av prøvemolekylenes overflate. Når prøveløsning pumpes gjennom kolonnen vil de mest hydrofobe komponentene retarderes i større grad enn de mindre hydrofobe [80].

For å øke affinitet mellom analytt og stasjonærfase tilsettes ofte salt til prøveløsningen. Saltet binder opp vannmolekyler slik at hydratisering avtar og prøvemolekylenes hydrofobe egenskaper øker. Eluering av analytt oppnås ved og bytte til en mobilfase med lavere ionestyrke slik at løselighet til analytt i mobilfasen øker. Dersom interaksjonene mellom molekylene og kolonnematerialet er for sterk, må elueringsbufferen i tillegg inneholde et

organisk løsemiddel med høyere affinitet for stasjonærfasen enn analytt. Den organiske forbindelsen vil da «fortrenge» analytt slik at den elueres ut [80].

### ***1.10.3 Rensing på kitinkolonne***

Det er mulig og rens aktive enzymer på kolonner hvor stasjonærfasen består av det aktuelle enzymets substrat[81]. Man appliserer da prøven på kolonnen under betingelser som fører til dannelse av enzym- substrat kompleks. Kun proteiner som er spesifikt for kitinet i kolonnematerialet vil dermed retarderes. Proteinene elueres ved å endre betingelsene for binding av enzym til substrat, ofte ved tilsetning av syre eller base til mobilfasen. Det er en forutsetning at enzymet er aktivt, da inaktive enzymer tenderer til å binde irreversibelt og kun kan elueres som denaturerte proteiner [81].

### ***1.10.4 Størrelseseksklusjonskromatografi (SEC)***

Størrelseseksklusjonskromatografi (SEC) er en analysemetode innen kromatografi som separerer komponenter etter størrelse, eller deres hydrodynamiske volum [78]. I SEC består den stasjonære fasen av et porøst pakkemateriale med en gitt porestørrelse. Molekyler som er for store til og trenge inn i pakkematerialet vil elueres ut i den i den første toppen sammen med voidvolumet,  $V_0$ . Dette kalles total eksklusjon. Molekyler som er mindre enn porestørrelsen vil i ulik grad entre stasjonærfasen og dermed få en gjennomsnittlig residenstid i kolonnen som utelukkende er avhengig av størrelse. De minste komponentene som uten restriksjoner kan trenge inni stasjonærfasens totale væskevolum vil elueres ut med det maksimale elueringsvolum,  $V_0 + V_i$  [80]. Ulike forbindelser vil da få ulike transittider og elueres ut på ulike tidspunkt. Mindre hydrodynamisk volum gir økt retensjon.

### 1.10.5 High performance liquid chromatography (HPLC)

High performance liquid chromatography (HPLC) er en instrumentell analyseteknikk som separerer ulike stoffer i en væske. Metoden har et bredt anvendelsesområde og benyttes for kvantitativ og kvalitativ analyse innen biokjemi og analytisk kjemi. Fordelen med HPLC er at det er mulig å separere forbindelser med høyt kokepunkt og høy molekylvekt [82].

I HPLC er kolonnen pakket med svært små partikler, som forbedrer metodens separasjonsegenskaper [83]. En høytrykkspumpe fører mobilfasen og prøveløsningen gjennom kolonnen og en analytts transittid bestemmes av fysiske og kjemiske interaksjoner med stasjonærfasen. Ulike stoffer vil retarderes i ulik grad og vil dermed separeres.

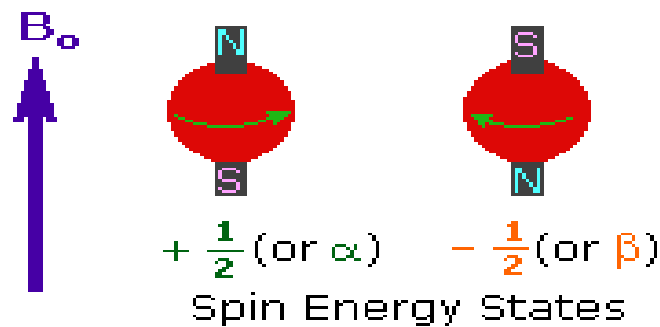
## 1.11 Kjernemagnetisk Resonans (NMR)

Kjernemagnetisk resonans eller Nuclear Magnetic Resonans (NMR) er et eksempel på absorpsjonsspektroskopi [84]. NMR er en viktig metode for strukturbestemmelse av organiske forbindelser løst i et løsningsmiddel. Metoden blir benyttet mye innenfor feltene biokjemi, organisk kjemi og medisin. Ved å benytte NMR går man helt ned på atom nivå, og kan på denne måten observere hver eneste kjerne i proteinet [71].

Alle atomkjerner har en positiv ladning. Noen av kjernene spinner rundt sin egen akse og danner på denne måten en magnetisk dipol, de oppfører seg som magneter [84]. Det hele kan beskrives av kjernens *spinnkvantetall*,  $I$ , som er kjernens tillatte spinn. Det er kun kjerner med spinn,  $I \neq 0$ , som er NMR-aktive, og kan observeres ved NMR.

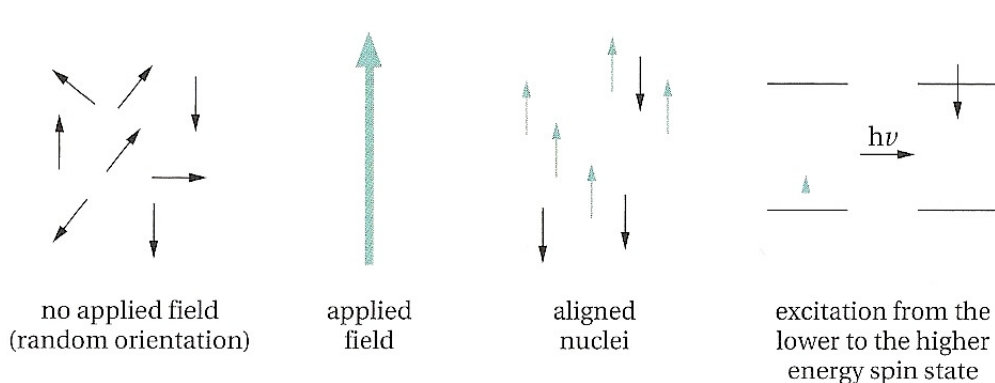
Ved et påført ytre magnetfelt vil magnetkjernene orientere seg i  $2I + 1$  måter. De kjernene med ulikt antall protoner og nøytroner i kjernen vil ha kjernespinns på  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{2}{3}$ ,  $\frac{5}{2}$  og så videre [84]. For hydrogen ( $I=1/2$ ) er det to mulige spinn ( $2(1/2) + 1 = 2$ ) for kjernen, med klokken ( $+1/2$ ), og mot klokken ( $-1/2$ ). Fenomenet illustreres i figuren under.





**Figur 1.10:** Illustrerer hvordan magnetkjernene ved et påført ytre magnetfelt vil ha en spinn og orientere seg i forhold til dette. I dette tilfellet for hydrogen som vil kunne orientere seg i to mulige spinn[7].

Ved å plassere atomkjernene med spinn i påvirkning av et ytre statisk magnetfelt vil de orientere seg med eller mot dette. Figur 1.10 viser atomkjerner som orienterer seg i forhold til et ytre magnetfelt. De atomkjernene som orienterer seg med det ytre magnetfeltet har lavere energi enn de som orienterer seg mot [4].



**Figur 1.11:** NMR-aktive atomkjerner tilfeldig orientert da det ikke er påført et ytre magnetfelt. Viser videre at ved et påført ytre magnetfelt vil atomkjernene orientere seg mot og med magnetfeltet. Helt til høyre på figuren vises eksitering av en kjerne fra lavt til høyere energispinn [4].

Når atomkjernene plasseres i et magnetfelt og bestråles med elektromagnetiskstråling i et radiofrekvensområde medfører dette at kjernen eksiteres fra det laveste til det høyeste spinnnivå. Når den tilførte energien er nøyaktig den samme som den forskjellen mellom de to

energinivåene vil den absorberes av kjernen [4]. Den spesifikke frekvensen som skal til for at dette fenomenet forekommer kalles Larmor frekvens [84]. Et plot som viser mengde energi absorbert av prøven mot påført radiofrekvens gir et NMR-spekter [4].

Moderne NMR- instrumenter benytter en metode hvor magnetfeltet holdes konstant, mens man tilfører en kort puls av energi. Energipulsen gjør at alle kjernene kommer i resonans. Signalene sorteres ved hjelp av matematisk analyse ved metoden Fourier transformering [4].

### 1.11.1 $^1\text{H}$ NMR

$^1\text{H}$  NMR eller proton NMR sammen med  $^{13}\text{C}$  NMR er de viktigste NMR spektroskopimetodene. Begge har spinn nivå på  $\frac{1}{2}$  og er dermed NMR- aktive [84]. Ved  $^1\text{H}$  NMR benyttes hydrogenkjernene i en prøve til strukturbestemmelse.

Kjemisk skift ( $\delta$ ) beskriver hvor i spekteret signalet fra en bestemt atomkjerne kommer, og måles i en skala hvor man ser på  $\delta$ - enheter fra signalet til en referanseforbindelse. Referanseforbindelsen som er vanligst å benytte er tetrametylsilan (TMS). På grunn av sine 12 ekvivalente hydrogenatomer vises TMS i spekteret som en singlet, som gjør at det er en god referanse. I tillegg er TMS inert og flyktig [4]. De fleste organiske forbindelser gir signaler ved lavere felt enn TMS og har derfor positiv kjemisk skift ( $\delta$ ) noe som gjør TMS lett å identifisere i spekteret.

Ved  $^1\text{H}$  NMR benyttes et spekter fra +12 til -4 ppm til å studere de fleste organiske forbindelser. Spesifikke kjemiske grupper har ulike karakteristiske kjemiske skift.

$$\text{Kjemisk skift} = \delta = \frac{\text{Observert avstand fra TMS målt i Hz}}{\text{Spektrometerfrekvens målt i MHz}} \text{ ppm}$$

(likning 1.5)

Arealet under signaltoppene i et  $^1\text{H}$  NMR spektrum er direkte proporsjonale med antall  $^1\text{H}$ -kjerner som gir opphav til toppen [4].

”Spin-spin splitting” bidrar til verdifull informasjon om antall nabo atomer, og med det molekylets struktur. NMR signalet fra et proton blir ofte splittet opp i flere linjer i spekteret, dette på grunn av interaksjoner med protoner som sitter på karbon atomene i nærheten. Signalet til et spesifikt proton vil splittes av protoner på ”nabo” karbonet inn i  $n+1$  topper (hvor  $n$  er antall tilstøtende proton).

NMR kan benyttes til å se på nedbrytningsgrad,  $\alpha$ , av ulike sukkerpolymerer blant annet kitosan.  $\alpha$  er definert som antall hydrolyserte glykosidbindinger dividert på det totale antall glykosidbindinger i en sukkerpolymer [14, 52].

Progresjonen i degradering av sukkerpolymeren kan bestemmes som gjennomsnittlig fraksjon av glykosidbindinger i kitosanen kuttet av enzymet [14]. Ved å måle økning i resonans av reduserende ender relativ til resonansen fra interne anomere protoner kan polymeriseringsgraden,  $DP_n$ , estimeres.  $\alpha$  ble videre funnet ved å dividere  $DP_n$  på 1.

Analysen brukes til bestemmelse av nedbrytningsgrad,  $\alpha$ , som plottes mot tid. Videre kan  $k_{cat}$  (seksjon 1.8.1) estimeres ved hjelp av følgende likning (jamfør likning 1.1):

$$k_{cat} = \frac{S}{0,5} \times \frac{[A2]}{[Enzym]}$$

(likning 1.6)

$S$  er stigningstallet i grafen nedbrytningsgrad ( $\alpha$ ) mot tid. Tallet 0,5 indikerer maks  $\alpha$ , det vil si at kitinasen kan i teorien bryte ned til  $\alpha = 0,5$ . Det vil da være kun dimerer igjen.  $[A2]$  tilsvarer teoretisk maks antall dimerer i løsningen.

## 1.12 Massespektrometri (MS)

MS er en teknikk som opererer i høyvakuum og kan benyttes for analyse av flere ulike forbindelser. Metoden benyttes i dag til sekvensering av proteiner og peptider, identifisering av oligonukleotider og analyser av komplekse glykokonjugater i tillegg til klassisk analyse av organiske forbindelser [85, 86].

I hovedsak består et MS instrument av en ionekilde, en analysator og en detektor. Ionekilden har som oppgave å introdusere molekylene til instrumentet og omdanne dem til ioniserte former. Når ionene har forlatt ionekilden akselererer de inn i masseanalysatoren hvor ionene separeres i forhold til masse over ladning ( $m/z$  ratio). Dette blir gjort ved hjelp av et elektrisk eller magnetisk felt. Avslutningsvis sendes ionene inn til detektoren ved å produsere en elektrisk strøm som forsterkes og detekteres. Det hele vises i et massespektrum [86]. Hvis tilstrekkelig mengde energi tilføres molekylet under ioniseringsprosessen kan molekylær ionene dissosiere ytterligere til mindre fragmenter, som muligens selv er ioner.

For at ionene skal tiltrekkes detektoren må spenningen påført detektoren være motsatt av den ionene har. I et massespektrum vil vise relativ masse forekomst av ioner med ulike  $m/z$  ratio, hvor  $m$  er massen og  $z$  er ladningen [86].

### *1.12.1 Matrix-Assisted Desorption Ionisation (MALDI)*

MALDI er en ioniserings metode som benyttes for å ionisere forbindelser med høy molekylærvækt som proteiner, sukkerforbindelser og nukleinsyrer [86]. MALDI benytter en pulserende UV laserstråle med en gitt bølgelengde til å ionisere prøvemolekylene. Analytten blandes med en matriks som er tilpasset til laserens bølgelengde slik at dennes energi absorberes. Matriksen absorberer laserenergien og bidrar til ionisering av prøve molekylene via elektron overføring og kjemiske prosesser. Absorberingen av energien gjør at molekylene eksiteres over i gassfase hvor de ioniseres.

### ***1.12.2 MALDI TOF***

Time of Flight (TOF) analysatoren separerer ioner og måler  $m/z$  verdien basert på tiden det tar å ”fly” fra ionekilden til detektoren. Ionene som dannes i kilden påføres et høyt akselerasjonspotensial før det pulseres gjennom et feltfritt rør. Deretter bestemmes massen på bakgrunn av tiden analytten har fra akselerasjonen til detektoren [86].

MALDI benyttes som oftest i kombinasjon med en TOF masseanalysator [85]. Dette fordi time-of flight analyser passer godt til den pulserende strålingen i MALDI. I tillegg har TOF-analysatoren ingen øvre massegrense noe som er gunstig fordi MALDI produserer ioner med veldig høy  $m/z$  verdi [85].

MALDI-MS er en rask enkel og nøyaktig metode for å oppnå informasjon om molekylær vekten til forbindelser på en vid skala.

I denne oppgaven har MALDI-TOF blitt benyttet til analyse av sukkerkjedene kuttet av de ulike mutantene av ChiB. Analysen startet med en hydrolysering av sukkerkjeden ved hjelp av de ulike mutantene av ChiB inn i ulike lengder oligosakkarider. Disse ble analysert på MALDI-TOF ved å sammenligne retensjonstid og fragmenteringsmønster med kjente standarder.

## 1.13 Viskositet

Viskositet er definert som en indre friksjon i væsker og gasser når flere lag av stoffet glir mot hverandre med forskjellig hastighet [87].

En av de mest presise måle metodene i polymerstudier er viskositetsmålinger av egenviskositet,  $[\eta]$ . Egenviskositet måles ved å beregne gjennomstrømstiden til en løsning gjennom en glasskappillær. Det mest benyttede viskosimeteret for bestemmelse av egenviskositet er Ubbelohde viskosimeteret.

### 1.13.1 Viskositetsmåling og reduserende ende assay

Viskositetsmålinger benyttes til å studere nedgang i egenviskositet til en løsning for å se på enzymets grad av prosessivitet til familie 18 kitinaser. Dette blir gjort ved å se på degradering av den vannløselige polymeren kitosan.

For å finne gjennomsnittlig kjedelengde i polymer fraksjonen,  $\alpha_{pol}$ , går man ut fra at relativ viskositet er lik egenviskositet. Ved å måle den relative viskositeten med regelmessige intervaller, og se på reduksjon i relativ viskositet for så å plote denne mot tid, kan man finne gjennomsnittlig molekylærvækt og gjennomsnittlig kjedelengde ( $DP_n$ ). I tillegg gjøres uttak fra løsningen som benyttes til å finne konsentrasjon av reduserende ender ( $\alpha_{tot}$ ) ved gitte tidspunkt. For dette benyttes reduserende ende assay (MBTH) [52].

Ved å bruke data fra viskositetsmålingene er det mulig å beregne gjennomsnittlig antall kutt enzymet gjør for hver assosiasjon med substratet,  $N_{cuts}$ .  $N_{cuts}$  representerer grad av prosessivitet og bestemmes ved først å plote  $\alpha_{pol}$  mot  $\alpha_{tot}$ , for deretter å dividere 1 på stigningstallet vist i likning 1.6 under. Et høyt stigningstall indikerer at enzymet har lite prosessiv aktivitet, mens et lavt stigningstall indikerer det motsatte.

$$N_{cuts} = \frac{1}{\text{Stigningstallet}}$$

(linkning 1.6)

## 1.14 Mål med oppgaven

Hovedmålet med oppgaven har vært å finne den beste metoden for bestemmelse av prosessiv aktivitet for mutanter av ChiB fra *Serratia marcescens*. Dette er viktig fordi prosessiv degradering er tenkt å forbedre den katalytiske effektiviteten ved at antallet ganger enzymet må gjennomføre den energetisk ugunstige prosessen å få tilgang til en enkel polymerkjede reduseres.

Grad av prosessivitet ble bestemt for ChiB mutantene R446, D316A, F190A, F191A, W97A, W220A, W97A/W220A og W97A/WD316A. Dette for å belyse hvilke residuer som er avgjørende for prosessivitet og aktivitet. De ulike variablene ble estimert ved hjelp av ulike analysemetoder og resultatene ble videre sammenlignet opp mot hverandre, og med studier utført tidligere, for å kunne si noe om hvilken metode som egnet seg best for måling av den aktuelle parameteren. ChiB-WT har blitt tatt med i studiet for sammenligning. Prosessiviteten til de ulike mutantene ble sett på i sammenheng med aktiviteten for hydrolyse av det løselige substratet kitosan.

For å se på i hvilken grad resultatene for prosessivitet og aktivitet av kitosan kunne direkte overføres til nedbrytning av det uløselige men naturlige substratet kitin, ble det gjennomført substratforsøk med mål av katalytisk effekt.

$K_D$  ble i tillegg bestemt for å se om dissosiasjonsenergien har en sammenheng med prosessiviteten til enzymet. Man kunne få en indikasjon av dette ved å se på sammenhengen mellom hvor sterkt enzymet binder substratet og de prosessive egenskapene til enzymet.

## 2 Materialer:

Utstyr, kjemikalier og andre materialer som har blitt brukt i dette studiet er nevnt i denne seksjonen.

### 2.1 Laboratorieutstyr

<u>Laboratorieutstyr:</u>	<u>Spesifikasjon:</u>	<u>Leverandør:</u>
Amiconrør	Ultra-15, 10 kDa	Sigma-Aldrich
Autoklavtape	13 mm	VWR
Automatpipetter	Finnpipetter	ThermoLabsystems
Avtrekkskap	AV-100	Telstar
Blåboks	AVS 310	Schott Gerate
C-18 kolonne	Sep-pak C <sub>18</sub>	Waters
Centriconrør	Centricon-Plus 18	Millipore
Cryorør	2 mL	Starsted
Blåkorkflasker	2000 mL	Boro
	1000 mL	
	500 mL	
	250 mL	
Dialysemembraner	Vol/lengde: 2,0 ml/cm	Spectrum Lab, Inc.
Eksikator		Glaswerk Westheim



---

Elektroforeseutstyr	Gelkjøringskammer	VWR
	Gelspenningskile	
	Gelkniv	
Eppendorfrør	1, 5 mL	Axygen
Filter	0, 22 µm	Millipore
	1,2 mm	Whatmanfilter
Filtersil	75 µM	
Fluorometer	DyNA Quant 200	Hoefer
Fotoutstyr (gel)	Gelfotosystem GSF 1000	Techtum Lab ab
	Lyskilde	Kilab AS
	UV transuliminator	UVP, inc
Frysetørker	Maxi Dry, SPD111V	Savant Speed Vac
FPLC-system	GradiFrac	Pharmacia Biotech
	Rec 102	
	Pumpe P-50	
	Valve PSV-50	
	Uvicors SII	
Glassutstyr		Schott-Duran
HPLC	Ultimate 3000 system	Dionex
	Autoinjektor	

---

---

	Pumpe	
	UV/VIS detektor	
	Rør og caps	
HPLC-forkolonne	TSK-Amide 80	Tosho
	4,6 mm x 1 cm	
HPLC-kolonne	TSK-Amide 80	Tosho
	4,6 mm x 24cm	
Inkubator	Multricon standard	Infors
	Multricon Eco	Infors
Ionebytterkolonne	Q Serharose® Fast Flow	Sigma-Aldrich
Kanyler	0,8 x 40 mm	BD Microlance
Konduktivitetmåler	TetraCon 4-Electorde	WRW
Magnetrorer	Bruckmanning 28	Labortechnik AG
Merketape	13 mm	VWR
MS	Ultra Flex TOF/TOF	Bruker
NMR	Oxford NMR 300	Varian
NMR-rør	5 mm vegger, 7" lengde	Sigma-Aldrich
Nuncrør	50 mL	OneMed
	15 mL	OneMed
Oppkonsentrator	Amicon 8400	Millipore

---

---

Oppkonsentratorfilter	10000 MWCO	Sigma-Aldrich
PCR	Master cycler gradient	Eppendorf
	MJ Resrch PTC-100	GMI Inc.
PCR-rør		
Pasteurpipetter	Glass, 130 mm	VWR
	Glass, 230 mm	VWR
Petriskåler		Heger
pH-meter	MP 220	Mettler-Toledo
Risteinkubator	Multitron Standard	Infors
	Multitron Eco	Infors
Ristestativ	Ika-Vibrax-VKR Tup UX8	Janke & Kunkel
SEC	HiLoad pumpe P-50	GE healthcare
	133 Refractive Index Detector	Gilson
	Superfrac	Pharmacia
SEC-kolonner	HiLoad 26/60Superdex, Prepgrade	GE healthcare
Sentrifuge eppendorf	Avanti J-25	Beckman
	CS-6R Centrifuge	Beckman
Sentrifuge multi	Multifuge 3 S-R	Heraeus
Sentrifugerotor	JA-14	Beckman
	JA-10	Beckman

---

---

Sentrifugerør	500 mL	Nalgene
Software viskmåling	ViscControl	
	ViscRun	
Sonikator	Vibracell	Sonics
Sonikatorbad	5510	Branson
Spektrofotometer	Libra S32 PC	Biochrom
	U-1100	Hitachi
Sprøyter	1 mL	BD Plastipak
	5 mL	
	50 mL	
Sprøytefilter	0,45 µm	Sarstedt
Sterilbenk	AV-100	Telestar
Ubbelohde	53101/0a	Schott
Vannbad	Eco Temp TW12	Julabo
	31A	Julabo
Vekt	LC621P	Sartorius
Vekt, fin	1692 MPS	Sartorius
Vekt, mikro	CP2 P	Sartorius
Whirlmixer	Yellowline TTS 2	IKA-Works
Qubit™ assayrør		Invitrogen

---

## 2.2 Kjemikalier

Alt vann som ble brukt i forsøkene var av Milli-Q kvalitet og er beregnet som destillert vann, dH<sub>2</sub>O.

<u>Kjemikalium</u>	<u>Leverandør</u>
2, 5- Dihydroxybenzoic acid	Bruker Daltonics
4-methylumbelliferyl-_-D-N,N'-diacetylchitobiose	Sigma-Aldrich
4-methylumbelliferone	Sigma-Aldrich
β-kitin, 80 mesh	Sigma-Aldrich
Acetone, CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich
Acetonitril, CH <sub>3</sub> CN	Sigma-Aldrich
Agar, Bacto-agar	Difco
Ammoniumacetat, NH <sub>4</sub> Ac	Merck
Ammoniumsulfat, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
Ampicillin, natriumsalt, C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	Sigma
Bacto™ Tryptone	Difco
Bacto™ Yeast extract	Difco
Bovint serum albumin (BSA)	
Coomassie® Brilliant Blue R-250	Bio-Rad
Deconex	
Destillert vann, dH <sub>2</sub> O	

---

Deuteriumklorid, DCl	Aldrich
Deuteriumoksid, D <sub>2</sub> O	CDN isotopes
Di-kaliumhydrogenfosfat, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	AppliChem
Di-natriumhydrogen	Merck
Dimetylsulfoksid	Riedel-de Haën
Eddiksyre, CH <sub>3</sub> COOH	Prolabo
Etanol, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Arcus
Etanolamin, C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO	Sigma- Aldrich
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma- Aldrich
Glyserol, C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	Merck
Helium, 6.0 Ultraplus	Yara Industrial AS
Hydrogenklorid, HCl	Sigma- Aldrich
Isopropanol	Merk
Kaliumdihydrogenfosfat, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	AppliChem
Kaliumhydroksid, KOH	Merck
Karbondioksid, CO <sub>2</sub>	Yara Industrial AS
Kitinkuler, NEB	
Magnesiumklorid, MgCl <sub>2</sub>	Sigma- Aldrich
Metanol, CH <sub>3</sub> OH (high quality)	Sigma- Aldrich
MOPS SDS Runningbuffer	Merck

---

---

Natriumcyanoboranhidrid, 95 %	Aldrich
Natriumdeuteriumoksid, NaOD	Aldrich
Natriumhydrogenoksid, NaOH	Merck
Natriumdihydrogenfosfat, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Natriumklorid, NaCl	VWR
Natriumacetat, CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> Na	Sigma- Aldrich
Nitrogen, N <sub>2</sub>	AGA
NucleoSpin <sup>®</sup> Plasmid Kit	Machery- Nagel
NuPAGE <sup>®</sup> 10 % Bis-Tris Gel 1, 0 mm x 10 well	Invitrogen
NuPAGE <sup>®</sup> Samplebuffer (4x)	Invitrogen
NuPAGE <sup>®</sup> Sample reducing agent (10x)	Invitrogen
Phenylmetylsulfonyl fluorid (PMSF)	Sigma
Quant-IT <sup>™</sup> Protein Assay Kit 0, 25-5 µg	Invitrogen
Quant-IT <sup>™</sup> protein buffer	
Quant-IT <sup>™</sup> protein reagent	
Quant-IT <sup>™</sup> proteinstandarder 0-400 ng/µl	
QuickChange <sup>®</sup> Site- Direct Mutagenesis Kit	Stratagene
Sitronsyre	Prolabo
Sulfaminsyre (H <sub>3</sub> NSO <sub>3</sub> )	
Trietylamin	VWR

---

---

Trizma base, C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich
Yeast Nitrogen Base med ammoniumsulfat, uten aminosyrer (YNB)	Sigma-Aldrich

### 2.3 Proteiner og substrater

Benchmark Ladder	Invitrogen
Biovine Serum Albumin (BSA) purified 100x, 10 mg/mL	New England BioLabs. Inc
Kitinase;	
<i>Chitinase B</i>	
Substrat;	
<i>N</i> -acetyl-D-Glucosamine	Sigma-Aldrich
<i>N-N</i> -acetylchito-diose	Sigma-Aldrich
Tri- <i>N</i> -acetylchito-triose	Sigma-Aldrich
Kitosan, Fa= 0, 62 Fa= 0, 63	
Kitin, β-kitin, 80 mesh	Sigma-Aldrich

### 2.5 Bakteriestamme

<u>Stamme</u>	<u>Leverandør</u>
<i>E. Coli</i> One Shot <sup>®</sup> BL21Star (DE3)	Invitrogen



## 2.6 Plasmid

*E. Coli* pMay-20

Bruberg M.B. (UMB)

## 2.7 Primere

*Tabell 2.1: Viser de 11 primerne som ble benyttet ved andre PCR kjøring for å amplifisere hele plasmidet.*

<b>Nr. Primer</b>
1 T7_f
2 T7_r
3 PETM11 FI
4 PETM11 RI
5 SPb_r
6 800F
7 ES_f
8 SH_r
9 500_r
10 ES_r
11 SH_f

---

---

## 2.8 Kits

<u>Kit</u>	<u>Leverandør</u>
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAprep Spin kolonner og oppsamlingsrør	
Buffer P1	
Buffer P2	
Buffer N3	
Buffer PB	
Buffer PE	
Buffer EB	
seeDNA Kit	GE healthcare life science RPN 5200
QuickChange® Site-Direct Mutagenesis Kit	Stratagene
10x reaksjonsbuffer	
<i>DpnI</i> restriksjons enzym	
dNTP miks	
<i>PfuTurbo</i> DNA polymerase	
<i>E.coli</i> XL1-Blue superkomponente celler	

## 2.9 Agar og medier

<u>Medium</u>	<u>Leverandør</u>
SOC-medium (ferdiglaget)	Novagen

LB-medium (1L), pH 7:

Tryptone	10 g
Gjærekstrakt	5 g
NaCl	10g
Ampicillin	50 µg/mL

Løsningen løses i 1L dH<sub>2</sub>O og autoklaveres før ampicillin tilsettes.

## 2.10 Programvare

HPLC-programvare	Chromeleon
MS-programvare	Flex Analysis
	Flex Control
NMR-programvare	VJMR
SEC-programvare	Advantec Adam View
Viskositet-programvare	Visc Run
	Visc Conto

## 3. Metoder

### 3.1 Design av ny mutant:

På bakgrunn av de mutantene som i tidligere forskning av designet (seksjon 4.1) var det interessant å lage en dobbelt mutant med mutasjon i D316A og W97A. Disse to aminosyrene inngår i den sterke hydrogenbindingen som danner "taket" over det aktive setet. Mutasjon ble foretatt for å studere om en slik dobbelmutasjon vil ha innvirkning på binding av substrat i det aktive setet. De aktuelle aminosyrene ble mutert til alanin.

#### *3.1.1 Oppdyrking av bakteriestamme*

Det ble benyttet et plasmid med allerede mutert D316A aminosyre som templat for ytterligere mutering til W97A.

#### Materialer

- LB-medium
- Ampicillin (50 mg/ ml)

#### Metode

5 ml LB-medium med en ampicillin konsentrasjon på 0,05mg/ml ble inokulert med en bl21 star (DE3) *E. Coli* stamme fra – 80 °C frysestock. Dyrking av kulturen ble gjort i avtrekksskap med sterilt utstyr for å hindre kontaminering. Bakteriekulturen ble dyrket opp i risteinkubator ved 37 °C og 255 rpm over natt (~16 timer).

#### *3.1.2 Isolering av plasmid DNA fra E. Coli*

Plasmidet med eventuell mutasjon ble isolert fra bakteriekulturen ved hjelp av et NucleoSpin® Plasmid Kit. Dette er et system som baserer seg på alkalisk lysing av de

høstede bakteriecellene. Prosessen ble utført i tre hovedtrinn; preparering av lyserte bakterieceller, tilsetning av salt bufferløsning for nøytralisering, og binding av de lyserte cellene til membran. Kolonnen ble avslutningsvis vasket og eluert ved bruk av etanolholdige bufferløsninger. Resultatet etter endt prosedyre var et miniprep\_plasmid, som ble benyttet videre for å lage PCR-miks.

En mer detaljert beskrivelse finnes i Plasmid DNA Purification User Manual NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid.

### ***3.1.3 Primer design***

Det ble benyttet et QuickChange<sup>®</sup> Site-Direct Mutagenesis Kit. Fordi oligonukleotid primerne induserer den ønskede mutasjonen i DNA, er det kritisk at primerne som benyttes i Kit-metoden blir designet individuelt avhengig av den bestemte mutasjon.

Følgende punkter må tas til etterretning ved design av en primer.

- Begge primerne som skal benyttes må inneholde den ønskede mutasjonen da disse er komplementære, og skal fusjonere til samme sekvens i motsatt DNA tråd.
- Primerne burde ha en lengde på mellom 25 og 45 baser, og et smeltepunkt ( $T_m$ ) på 10 °C høyere enn fusjonstemperaturen i PCR. Det vil i dette tilfellet si 78 °C eller høyere.

Følgende formel er gitt for estimering av  $T_m$ :

$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \% \text{ mismatch}$  (Stratagene, QuickChange<sup>®</sup> Site-Direct Mutagenesis Kit, Catalog #200518)

- Mutasjonen bør være lokalisert i midten av primeren med 10-15 basepar på hver side.
- Primerne burde ha et minimum GC innhold på 40 % for optimal funksjon.

Primerne som ble benyttet var laget av B. Synstad:

- W97A\_f
- W97A\_r

Primerne er navngitt etter original aminosyre (W97Af), residunummer (W97Af), den innsatte aminosyren (W97Af) og primerens retning (W97Af).

### **3.1.4 Seterettet mutagenese:**

Innsetting av plasmid med ønsket mutasjon ble utført ved hjelp av seterettet mutagenese. Prosedyren som ble fulgt var QuickChange® Site-Direct Mutagenesis Kit, Stratagene (seksjon 1.9).

#### Materialer

- 10 x reaksjonsbuffer
- dsDNA templat (pMay-20, *E. Coli*)
- Primere (W97A\_f, W97A\_r)
- dNTP miks
- dH<sub>2</sub>O
- *PfuTurbo* DNA polymerase

Følgende PCR miks ble laget, de ulike løsningene ble tilsatt i gitt rekkefølge:

- 5 µL reaksjonsbuffer
- 5 µL templat
- 1,4 µL primer 1
- 1,4 µL primer 2
- 1 µL dNTP miks
- MilliQ H<sub>2</sub>O til et totalt volum på 50 µL

Avslutningsvis:

- 1 µL *PfuTurbo* DNA polymerase

### 3.1.5 PCR, polymerase chain reaction

PCR- metoden for oppamplifisering av spesifikke sekvenser DNA innebærer å benytte temperatur sykluser. Ved høy temperatur, 95 °C, vil det dobbeltrådede target DNAet denaturere, slik at man får dannet enkeltrådet DNA. Deretter senkes temperaturen til 55 °C slik at primerne kan basepare med deres komplementære sekvenser. Temperaturen økes så til 68 °C slik at DNA polymerasen kan feste seg til primerne og elongere DNA tråden i begge retninger (dsDNA).

#### Materialer

- Dpn I (restriksjonsenzym)
- seeDNA
- 3M natrium acetat, pH 5,2
- 70 % etanol

#### Metode

To ulike PCR-sykluser ble brukt i denne prosedyren. Tabell 3.1. viser den første av de to reaksjonssyklusene.

**Tabell 3.1:** Reaksjonssyklusen for første PCR kjøring.

Sykluser:	Temperatur:	Tid:
1	95 °C	30 sekunder
18	95 °C	30 sekunder
	55 °C	1 minutt
	68 °C	1minutt

Det ble foretatt 18 sekvenssykluser.

Ved endt PCR ble prøvene satt på is i 2 min for avkjøling til 37 °C. Videre ble det tilsatt 1 µL Dpn I restriksjons enzym for selektering av det nysyntetiserte muterte DNA. Dpn I vil kutte det ikke-muterte parentale DNA- templatet.

Det ble videre foretatt utfelling og oppkonsentrering av plasmid ved hjelp av seeDNA-kit før transformering over i XL1-Blue superkompetent celler.

seeDNA- prosedyren gjør at man får dannet et rosa bunnfall som gjør det letter å lokalisere pelleten Bunnfallet bidrar også til en maksimal gjenoppretting av nukleinsyrene. For en mer detaljert beskrivelse se seeDNA protokoll (GE Healthcare life science RPN 5200).

### ***3.1.6 Transformering av plasmid inn i XL1-Blue superkompetent celler (Stratagene)***

XL1-Blue superkompetente celler egner seg godt til oppbevaring av DNA i tillegg til at de gir mange kolonier ved oppdyrking. Plasmidet ble derfor transformert over i denne typen celler for at man skulle få en oppamplifisering av det ønskede plasmidet.

#### Materialer

- XL1-Blue superkompetent celler
- PCR miks
- SOC-medium
- LB medium
- Agar Bacto (Agar skåler)

#### Metode

XL1-Blue superkompetente celler oppbevares i – 80 °C fryseren og tines opp på is før bruk. 50 µL av de superkompetente cellene ble overført i eppendorfrør og tilsatt 5 µL av



PCR-miksen. Reagentene ble blandet forsiktig, deretter inkubert på is i 30 min. Videre ble cellene utsatt for et varmesjokk ved å settes i vannbad på 42 °C i 30 sekunder, deretter tilbake på is. Etter varmesjokket ble det tilsatt 250 µL SOC-medium som var varmet opp til 42 °C på forhånd. Transformasjonsreaksjonen ble satt i risteinkubator ved 225 rpm og 37 °C i 1 time.

Det ble støpt agarskåler for oppdyrking av bakteriekolonier med tilsatt ampicillin slik at kun bakterier som var ampicillin-resistente ville overleve. Det ble overført et lite volum fra transformasjonsreaksjonen som ble platet ut på agarskåler og inkubert i varmeskap ved 37 °C over natt (~16 timer).

Etter endt tid ble det plukket en koloni som ble satt til dyrking i risteinkubator ved 37 °C og 225 rpm over natt (~16 timer). Dette ble gjort i avtrekksskap med sterilt utstyr for å unngå kontaminering.

### ***3.1.7 Isolering av mutert plasmid fra en koloni***

For isolering av det muterte plasmidet ble det benyttet NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid Kit på samme måte som i seksjon 3.1.2. Etter endt prosedyre sitter man igjen med miniprep\_plasmid. Dette ble benyttet videre til PCR-miks.

### ***3.1.8 Sekvensering***

Før sekvensering ble det laget en PCR-miks.

#### Materialer

- Miniprep\_plasmid
- 5x sekvenseringsbuffer
- Primere
- RR-mix
- dH<sub>2</sub>O

---

Hvert PCR-rør ble tilsatt:

- 2  $\mu$ L miniprep\_plasmid
- 2  $\mu$ L 5x seq
- 4  $\mu$ L RR-miks
- 7,7  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O
- Primere

### Metode

Denne gangen ble det benyttet 11 primere for sekvensering av hele plasmidet. Det ble tillaget 11 ulike PCR-rør som innehold reagensene beskrevet over og deretter tilsatt hver sin primer. Dette fordi man nå skulle sjekke at den seterrettede mutagenesen hadde vært vellykket og at man hadde klart å lage plasmid med de to ønskede mutasjonene i W97A og D316A. Det ble benyttet flere både revers og forward primere for sekvensering av hele plasmidet. Disse er vist i tabell 2.1.

Det ble deretter foretatt en PCR-syklus for oppamplifisering av det ønskede plasmidet. Tabell 3.2 viser sekvenseringssyklusen som ble benyttet.

*Tabell 3.2: Viser reaksjonssyklusen for andre PCR kjøring.*

---

<b>Temperatur</b>	<b>Tid</b>
<b>96 °C</b>	10-30 sekunder
<b>50 °C</b>	5-15 sekunder
<b>60 °C</b>	4 minutt

Det ble foretatt 40 slike sekvenssykluser.

Ved endt PCR ble det foretatt oppkonsentrering og utfelling av sekvenseringsproduktet ved hjelp av EtOH/EDTA- utfelling.

### Materialer

- 125 mM EDTA
- 96 % EtOH
- 70 % EtOH

### Metode

PCR- produktet ble først tilsatt 2  $\mu$ L 125 mM EDTA, deretter 62,5  $\mu$ L 96 % etanol, og blandet. Miksen ble så inkubert ved romtemperatur i 15 min. Ved endt inkubasjonstid ble løsningen sentrifugert ved 4 °C, maks hastighet i 30 min. Umiddelbart etter sentrifugering ble supernatanten sugd av. Det ble videre foretatt et vasketrinn ved å tilsette 60  $\mu$ L 70 % etanol, for så å sentrifugere ved maks hastighet i 10 min. Supernatanten ble igjen sug av, og løsningen ble inkubert for tørkning ved 37 °C i 10 min.

#### ***3.1.9 Sekvensering av nytt plasmid***

Etter tørking ble PCR-prøvene sendt til sekvenseringslaboratoriet for å kontrollere at man hadde riktig mutasjon.

DNA sekvensering er en metode hvor man ser på den presise sekvensen av nukleotidene i DNAet. Dette gjøres ved å sammenligne det nylagede plasmidet med WT. Sekvensen skal være lik i hele plasmidet bortsett fra der basene skal være endret, mutasjonen. Det er også en metode for å finne ut om det har blitt introdusert noen uønskede mutasjoner. Sekvensen ble gjennomlest ved hjelp av data programmet, Bio Edit, samt manuelt.

### ***3.1.10 Transformering over i BL21 Star (DE3), E. Coli celler***

Etter å ha sammenlignet nukleotid sekvensen fra det nysyntetisert DNAet med WT, og på denne måten fastslått at den ønskede mutasjonen fantes i plasmidet ble det transformert inn i BL21 Star (DE3), *E. Coli* celler.

#### Materialer:

- Cellekultur
- BL21 Star (DE3), *E. Coli* celler
- SOC-medium

#### Metode

Til 5 µL av cellekulturen ble det tilsatt 10 ng DNA som ble blandet meget forsiktig. Deretter ble cellene inkubert på is i 30 min. På samme måte som i seksjon 3.1.6. ble det foretatt et varmesjokk før miksen ble inkubert i 42 °C i 30 sekunder, og deretter direkte overført på is. Det ble videre tilsatt 250 µL SOC-medium før cellene ble plassert i en risteinkubator ved 37 °C og 225 rpm i 1 time.

Etter endt inkubasjonstid ble 200 µL cellekultur strøket ut på agarskåler med ampicillin og inkubert ved 37 °C over natt (~16 timer).

### ***3.1.11 Tillagning av -80 °C frysestock***

Fra skålene med transformanter ble det valgt ut kolonier som ble overført i 5 ml LB-medium med 5 µL ampicillin for oppdyrking. Bakteriekulturen stod over natt.

#### Materialer

- Cellekultur
- 87 % glyserol

## Metode

1050  $\mu$ L cellekultur ble overført til et eppendorfrør og tilsatt 450  $\mu$ L 87 % glyserol, blandingen ble satt i  $-80$  °C fryseren for langtidsoppbevaring.

## **3.2 Produksjon av ChiB mutanter**

De ulike mutantene av ChiB ble uttrykket i *E. Coli*, BL21 Star (DE3). Bakteriekulturene ble tilsatt glyserol for langtidsoppbevaring i  $-80$  °C fryser.

De ulike mutantene R446, D316 A, F190A, F191A, W97A, W220A, W97A/W220A, W97A/WD316A, ChiB-WT og CBP21 hjelpeprotein har alle blitt dyrket opp og rensset i denne oppgaven.

### ***3.2.1 Overekspresjon av ChiB:***

Overekspresjon av ChiB ble gjort ved å benytte bakterier fra frysestock til å lage en forkultur. Denne ble overført til storkultur som sto over natt. Deretter ble det laget et periplasmatisk ekstrakt av cellene som videre ble rensset og benyttet til de ulike forsøkene i oppgaven.

## Materialer

- BL21 Star (DE3), *E. Coli* celler
  
- LB- medium (1 liter forkultur og 3 liter storkultur)
  - 10 g Trypton
  - 5 g Gjær ekstrakt
  - 10 g Natriumklorid
  
- Ampicillin
  - Ampicillin konsentrasjon 50 mg/mL

## Metode

Dyrking av de ulike aktuelle bakteriekulturene ble gjort i avtrekksskap (LAF-benk) med sterilt utstyr for å forhindre kontaminering. Det ble laget LB- medium til forkultur og storkultur som begge ble autoklavert.

Forkulturen ble fordelt på 3 rør som alle inneholdt, 2,5 ml LB- medium med tilsatt 2,5 µl ampicillin, sistnevnte for å hindre vekst av andre, uønskede bakterier. Til hvert av de 3 rørene ble det videre tilsatt den aktuelle BL21 Star (DE3), *E. Coli* cellekultur inneholdende plasmid for ChiB-WT eller med ønsket mutasjon av ChiB. Rørene ble inkubert i risteinkubator ved 37 °C og 225 rpm i 6 timer.

3 liter storkultur ble fordelt på 6 kolber, tilsatt ampicillin og forkultur, deretter inkubert i risteinkubator ved 37 °C og 225 rpm. over natt (~ 16 timer).

### ***3.2.2 Tillagning av periplasmatisk ekstrakt:***

BL21 Star (DE3), *E. Coli* celler er Gram negative og ChiB-WT og mutanter blir etter dannelse eksportert til periplasmaen. Første trinn i renseprosedyren er å isolere det periplasmatiske ekstrakt som inneholder de ønskede proteiner. Lysing av cellene (ytterste cellemembran) ble gjort ved å benytte spheroplastbuffer og sterilt kaldt vann.

## Materialer

- Sentrifuge
  - Ja- 14, 500 ml sentrifugerør
- Spheroplastbuffer
  - 200 µl 0,5 M (EDTA)
  - 20 ml 1 M Tris/HCl, pH 8
- 10 ml 20 mM MgCl<sub>2</sub>
- 300 µl PMSF
- Sterilt H<sub>2</sub>O

## Metode

Den aktuelle bakteriekulturen ble fordelt i 500 ml sentrifugerør og spunnet ned ved 8000 rpm i en Ja-14 rotor i 10 min ved 4 °C. Supernatanten ble fjernet og pelleten ble resuspendert i kald spheroplastbuffer. Dette ble gjort for at sukkerkonsentrasjonen skulle være høyere inne i cellene enn utenfor, slik at når man i neste omgang tilsetter kaldt vann vil cellene få et osmotisk sjokk.

Rørene ble videre sentrifugert på samme måte som beskrevet over. Supernatanten ble igjen fjernet og pelleten varmet opp til romtemperatur. Det ble tilsatt kaldt dH<sub>2</sub>O for lysning av cellene ved osmotisk sjokk. Deretter ble løsningen resuspendert. Det ble videre tilsatt MgCl<sub>2</sub> for å stabilisere proteinene, deretter spunnet ned igjen. Supernatanten ble steriltfiltrert i et 0,22 µm filter ved hjelp av vakuumsug. Det ble avslutningsvis tilsatt PMSF, en proteasehemmer som forhindrer spalting proteinene. Det periplasmatiske ekstraktet ble oppbevart ved 4 °C.

## **3.3 Rensing av Chitinase B**

### ***3.3.1 Ionebytterkromatografi***

Det periplasmatiske ekstraktet ble innledningsvis rensert på en anionbytter (seksjon 1.10.1). ChiB har en pI på 8. Det vil si at ved pH > 8 vil proteinet, på grunn av deprotonering, ha en netto negativ ladning, og vil kunne renses på en anionbytter. Som stasjonærfase kan anionbytt materialet Q Sepharose benyttes. Mobilfasen, samt det periplasmatiske ekstraktet, ble justert til en pH på 9,4. Negativt ladede ChiB molekyler vil da retarderes av den positivt ladde stasjonærfasen, mens andre proteiner vil elueres i voidtoppen, V<sub>0</sub>. Eluering av ChiB skjer ved gradvis økning av bufferens saltkonsentrasjon, også kalt gradienteluering. ChiB vil da synes som den siste toppen i kromatogrammet.

## Materialer

- Periplasmatisk ekstrakt
- Buffer A (mobilfase):

- 40 mM Etanolamin (EA), pH 9,4

- Buffer B (elueringsbuffer):

- 40 mM EA/ 1 M NaCl, pH 9, 4

- 20 % etanol
- Q Sepharose- kolonne
- FPLC- system

### Metode

Ionebytterkolonnen ble først vasket med 4 x kolonnevolum buffer A for innstilling av baselinje. Det periplasmatiske ekstraktet ble så applisert på kolonnen med en gjennomstrømning på 4,0 ml/ min. Ekstraktet hadde på forhånd blitt pH- justert med EA til en pH på 9,4. Dette for å sikre deprotonering og binding av proteinet til kolonnematerialet. Kolonnen ble videre vasket med buffer A til baselinje igjen var oppnådd. Gradienteluering ble startet hvor target- konsentrasjon av buffer B ble satt til 100 % etter 120 min. Proteinene ble detektert ved hjelp av UV detektor og ChiB ble manuelt samlet opp i reagensrør og oppbevart ved 4 °C. Etter fraksjonssamling ble kolonnen vasket (4 x kolonnevolum) og lagret i 20 % etanol.

### **3.3.2 Sodium Dodecyl Sulfate- Polyakrylamid Gel Elektroforese (SDS- PAGE)**

SDS- PAGE er en teknikk som kan benyttes for separasjon av proteiner i henhold til deres elektroforetiske mobilitet i en polyakrylamid gel.

Metoden går ut på at proteinløsningen som skal fraksjoneres blir tilsatt sodium dodecyl sulfat (SDS). Binding av de negativt ladede SDS- molekylene fører til at proteinene denaturerer og får en netto negativ ladning. Løsningen med de ufoldede, ladede proteinene blir så applisert på en polyakrylamid gel og plassert i et elektrisk felt. Proteinenes negative ladning vil føre til at de vil vandre mot den positive elektroden. Gelen består av et netteværk av kopolymerer, og



molekylenes vandringshastighet vil dermed være avhengig av størrelse. De største molekylene vil retarderes i størst grad [78].

Ved bruk av en proteinstandard med kjente molekylvekter, kan man fastsette molekylvekten til eluerte proteiner.

SDS- PAGE ble benyttet til å bestemme hvilke fraksjoner fra ionebytter- prosedyren som inneholdt ChiB og som skulle renses videre på HIC.

### Materialer

- Proteinfraksjoner fra ionebytter
- Proteinstandard: Bench Mark Ladder
- NuPAGE® 10 % Bis- Tris Gel 1,0 mm x 10 well (ferdigstøpt)
- NuPAGE® Samplebuffer (4x)
- NuPAGE® Sample reducing agent (10x)
- MOPS SDS Running Buffer
- SDS- fargeløsning:
  - 0,1 % Coomassie Brilliant Blue
  - 10 % metanol
  - 10 % eddiksyre
- SDS- avfargingsløsning:
  - 10 % metanol
  - 10 % eddiksyre

### Metode

5 µL NuPAGE® Samplebuffer (4x), 2 µL NuPAGE® Sample reducing agent (10x) og 10 µL av proteinprøven ble blandet i et eppendorfrør. Prøvene ble varmet opp ved 70 °C i

---

10 minutter for å sikre denaturering.

Den ferdigstøpte gelen ble montert i elektroforesekaret, og MOPS SDS Running Buffer ble benyttet til eluering av proteiner. 5 µL protein- ladder og 17 µL av prøvene ble applisert i brønnen. En spenning på 250 V ble satt på i 50 min.

Etter elektroforeseprosedyren ble gelen satt til farging med SDS- fargeløsning på risteinkubator i ca. 30 min. Deretter ble gelen tilsatt avfargingsløsning og inkubert på risteinkubator over natten.

Etter endt avfarging ble det tatt bilde av gelen ved hjelp av Gelfotosystem GSF 1000, program Epi White.

De fraksjonene hvor ChiB ble observert ble rensert videre på HIC.

### ***3.3.3 Hydrofob interaksjonskromatografi (HIC)***

Fraksjonene som viste ChiB- bånd fra ionebytterkromatografi- prosedyre ble rensert videre ved hjelp av hydrofob interaksjonskromatografi (HIC) (seksjon 1.10.2).

Denne kromatografiske metoden benyttes ofte for rensing av proteiner. Fordi ChiB inneholder eksponerte, hydrofobe residuer, er HIC en velegnet prosedyre for rensing av dette enzymet [88]. Det benyttes da en kolonne med Phenyl Superose som stasjonærfase. Phenyl Superose er et derivat av den agarose- baserte Superose 12 som inneholder kovalent- bunnede hydrofobe fenyl- grupper. De hydrofobe gruppene vil vekselvirke med de hydrofobe residuene på ChiB. Følgelig vil de molekylene som er mest hydrofobe retarderes i størst grad og komme ut til sist. Eluering oppnås ved senking av ionestyrke og tilsetning av organisk forbindelse, ofte isopropanol da denne alkoholen er mer hydrofob en ChiB.

#### Materialer

- Fraksjoner fra ionerbytte- prosedyre
- Buffer A (mobilfase):
  - 20 mM Tris/ HCl, pH 8,0

- Buffer B (elueringsbuffer):
  - 20 mM Tris/ 4 % isopropanol, pH 8,0
- 20 % etanol
- Phenyl Superose kolonne
- FPLC- system

### Metode

4 x kolonnevolum buffer A, flow 4,0 ml/ min, ble applisert på kolonnen for innstilling av baselinje.

Fraksjonene fra ionbytter- prosedyren ble pH- justert med Tris/ HCl til pH 8,0 som har vist seg å være gunstig for lagring av ChiB (upubliserte resultater). Fraksjonene ble så applisert på kolonnen med en flow på

1,5 ml/min. Før elueringsprogrammet, ble kolonnen vasket med buffer A til baselinjen igjen var innstilt. Det ble startet en gradienteluering med flow på 3,0 ml/ min hvor buffer B- konsentrasjonen ble satt til 100 % etter 75 min. ChiB ble detektert ved hjelp av UV- detektor og fraksjoner ble samlet manuelt og oppbevart ved 4 °C. Kolonnen ble avslutningsvis regenerert med 4 x kolonnevolum buffer A, og deretter lagret i, 20 % etanol.

Fraksjonene fra HIC ble analysert på SDS- PAGE på samme måte som ionebytter- fraksjonene (seksjon 3.4.2). De som viste ChiB- bånd ble oppbevart for videre forsøk.

#### ***3.3.4 Rensing av aktive mutanter på kitinkolonne***

Enzymene ChiB-WT, W97A, W220A, W97A/ W220A og W97A/ D316A ble rensert i ett trinn på kitinkolonne, som er et raskere alternativ til ionebytterkromatografi og HIC (seksjon 1.10.1 og 1.10.2). ChiB binder til kitin og kan følgelig renses på en kolonne bestående av kitin- kuler. Prøveløsningen appliseres ved pH 6,3 som fasiliterer binding av ChiB til

kolonnematerialet. Eluering av enzymet oppnås ved å gjøre mobilfaseløsningen surere som vil medføre at enzymet frigjøres fra kitin- kulene og elueres ut.

### Materialer

- Periplasmatisk ekstrakt
- NEB kitinkuler
- 20 % etanol
- Buffer A:
  - 100 mM natriumfosfatbuffer, pH 6,3
- Buffer B:
  - 20 mM eddiksyre
- Regenereringsbuffer:
  - 0,3 M NaOH

### Metode

10 mL kolonnemateriale, NEB kitinkuler, ble pakket med 3 x kolonnevolum 20 % etanol, deretter 3 x kolonnevolum buffer A.

Buffer A ble tilsatt med en flow på 2,5 mL/ min til baselinjen var stabil før det periplasmatiske ekstraktet ble applisert på kolonnen. Dersom mengde ekstrakt overskrider 150 mL må prøven renses i to omganger for å forhindre overbelastning av kolonnematerialet.

Buffer A ble applisert til baselinjen igjen var stabil. Deretter ble foretatt isokratisk eluering med buffer B. ChiB vil da vises som den siste, store toppen i kromatogrammet. Kolonnen ble regenerert med 0,3 M natriumhydroksid.

### **3.3.5 Oppkonsentrering av ChiB**

Oppkonsentrering av proteinløsninger ble utført ved hjelp av sentrifugefilter som separerer proteinene av interesse fra andre proteiner og løsemiddel. I dette tilfellet ble det benyttet Amicon Ultra- 15 sentrifugefilter som slipper igjennom komponenter som er mindre enn 10 000 Da. Molekyler, som ChiB, med MW > 10 000 Da vil ikke kunne passere og vil bli igjen i filteret. Komponenter med MW < 10 000 Da derimot, vil ved sentrifugering spinnes gjennom filteret. ChiB vil bli værende igjen i filteret, mens løsemiddel, samt andre proteiner, ekskluderes.

#### Materialer

- Fraksjoner fra HIC- prosedyre
- Amicon sentrifugerør

#### Metode

Fraksjonene renses prosedyren viste ChiB- bånd på SDS- PAGE- analyse, ble samlet og overført til Amicon sentrifugerør. Disse ble sentrifugert ved 4000 rpm, ved 4 °C i til proteinløsningen var oppkonsentrert til mellom 1 og 1,5 mL. Den oppkonsentrerte løsningen i filteret ble så overført til cryorør og oppbevart kjølig (4 °C).

### **3.3.6 Fluorimetrisk bestemmelse av proteinkonsentrasjon**

Quant- iT<sup>TM</sup> protein assay er en rask og nøyaktig metode som benyttes for konsentrasjonsbestemmelse av proteiner. Metoden basert på fluorometriske målinger og er høyt selektivt for proteiner. Quant- iT<sup>TM</sup> protein reagent tilsettes den aktuelle protein- prøven. Reagenten binder proteinene i prøven og danner et fluorescerende kompleks som vil eksiteres ved ~ 470 nm og emittere lys ved ~ 570 nm. Dette lyset detekteres av et Qubit<sup>TM</sup>- fluorometer innen et konsentrasjonsområde på 0,25- 5 µg.

### Materialer

- Oppkonsentrert protein
- Quant- iT<sup>TM</sup> Protein Assay Kit 0,25- 0,5 µg
- Quant- iT<sup>TM</sup> protein buffer
- Quant- iT<sup>TM</sup> protein reagent
- Quant- iT<sup>TM</sup> proteinstandarder (0, 200 og 400 ng/µL)

### Metode

Quant- iT<sup>TM</sup> løsningene ble romtemperert før en arbeidsløsning bestående av Quant- iT<sup>TM</sup> protein reagent og Quant- iT<sup>TM</sup> protein buffer ble laget i forholdet 1:200. De tre proteinstandardene (0, 200 og 400 ng/µL) ble så fortynnet med arbeidsløsningen i forholdet 1:20. Prøvene ble så inkubert ved romtemperatur i 15 minutter før de ble brukt til kalibrering av fluorometeret.

For at proteinkonsentrasjonen ikke skulle havne utenfor standardkurvens sertifiserte område, ble proteinprøven fortynnet ti ganger. Tre paralleller av prøven ble deretter fortynnet med arbeidsløsningen i forholdet 1:100. Etter inkubasjon i 15 minutter ved romtemperatur ble proteinkonsentrasjonen målt direkte med Qubit<sup>TM</sup>- fluorometeret.

#### **3.3.7 Aktivitetstest**

Aktiviteten til ulike ChiB- mutanter kan bestemmes ved hjelp av enzymassay hvor 4-methylumbelliferyl-β-D-N, N'- diacetylchitobiose (4-MU-(GlcNAc)<sub>2</sub>) er substrat [63]. Ved hydrolyse spaltes denne til N, N'- diacetylchitobiose og 4- methylumbelliferyl (4-MU) som er fluorescerende og kan konsentrasjonsbestemmes i et fluorimeter.

---

## Materialer

- ChiB- varianter
- 1700  $\mu\text{M}$  4-MU-(GlcNAc)<sub>2</sub>
- 100  $\mu\text{M}$  4- methylumbelliferone
- Citrat- phosphate buffer, pH 5,2
  - 17,9 mL 0,1 M sitronsyre (19,21 g sitronsyre løst i 1000 mL dH<sub>2</sub>O)
  - 32,1 mL 0,2 M dibasic sodium phosphate (53,65 g NaHPO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O løst i 1000 mL dH<sub>2</sub>O)
  - 50 mL dH<sub>2</sub>O
- 0,2 M natriumkarbonat
  - 2,12 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> løst i 100 mL dH<sub>2</sub>O
- Bovint serum albumin (BSA)
- Fluorimeter

## Metode

En arbeidsløsning bestående av citrat- phosphate buffer og BSA, som hindrer at proteinene aggregerer, ble blandet i forholdet 1:990. Enzymprøvene ble fortynnet ti ganger med citrat- phosphate buffer for å forhindre at verdiene kommer utenfor standardkurvens område. Glassrør til tre blindprøver og tre paralleller for hver en enzymprøve ble merket. Hvert av rørene ble tilsatt 91  $\mu\text{L}$  arbeidsløsning og 4  $\mu\text{L}$  4-MU-(GlcNAc)<sub>2</sub>. Rørene ble satt i 37 °C vannbad og enzymet som skulle testes ble tilsatt i rørene til et totalvolum på 100  $\mu\text{L}$ . I de blanke prøvene ble det tilsatt citrat- phosphate buffer istedenfor enzym. Etter nøyaktig 10 minutter ble reaksjonen stoppet ved å tilsette 1,9 mL natriumkarbonat. Før avlesning av prøvene på fluorimeter ble instrumentet nullstilt og kalibrert med 1,9 mL natriumkarbonat og 1,9 mL natriumkarbonat + 3  $\mu\text{L}$  4- methylumbelliferone, respektivt.

---

Aktiviteten ble regnet ut ved hjelp av likning 3.1 vist under.

$$\left( \text{vol (l)} \times \frac{\text{gjennomsnittlig abs.}}{10} \right) / \text{Tid (min)} / \text{enzym volum} \times \text{mg/ml}$$

(likning 3.1)

### 3.4 Fremstilling av kitosan

Kitosan ble fremstilt ved homogen N- deacetylering av kitin (seksjon 1.3).

#### Materialer

- Kitin
- 40 % w/w NaOH
  - 80 g NaOH pellets
  - 120 g dH<sub>2</sub>O
- Konsentrert HCl
- 1 M HCl
- pH- papir
- Nitrogengass (N<sub>2</sub>)
- Dialysemembraner
- Whatman filter (1,2 µm)
- Millipore filter (08 µm)

#### Metode

4,0 g kitin ble veid ut og tilsatt 100 g kald 40 % w/w NaOH for desterifisering av N- acetyl bindingene. For at deacetylering ikke skulle starte før man ønsket, ble løsningen oppbevart kjølig (4 °C).

Løsningen ble tilsatt 300 g is under kraftig røring med glasstav, deretter satt på magnetrøring



til all isen var oppløst, og blandingen homogen. Løsningen ble så sentrifugert i 15 minutter ved 10 000 rpm., ved 4 °C. Supernatanten ble videre overført til en blåkorkflaske og behandlet med nitrogengass i ca. 10 minutter for inertisering. Løsningen ble avslutningsvis satt i vannbad (25 °C) i 48 timer (gir  $F_A = 0,65$  ved høyacetylerert kitin).

Deacetyleringsprosessen ble stoppet ved å tilsette 280 g is under omrøring. Kaldt, konsentrert HCl ble videre tilsatt til  $\text{pH} \approx 7$ . pH- papir ble benyttet for avlesning av pH. Prøven ble hele tiden oppbevart på is. pH ble videre justert til 4,5 med 1 M HCl.

Dialyse membraner ble rensert og undersøkt for eventuelle hull i MQ- H<sub>2</sub>O. Prøveløsningen ble så overført til membranene (fylt opp til ca 2/3). Videre ble det foretatt dialyse i MQ- H<sub>2</sub>O. Vann ble byttet hvert døgn og det ble da samtidig målt konduktivitet. Dialyse av løsningen ble endt når ledningsevnen var ca. 3  $\mu\text{S}$ .

Kitosanløsningen ble overført fra dialyse membranene til et begerglass og pH- justert til 4,5 med 1 M HCl (viktig at kitosanet er på kloridform for økt løselighet). Løsningen ble til slutt vakuumfiltrert gjennom Whatman filter (1,2  $\mu\text{m}$ ) og Membranfilter (0,8  $\mu\text{m}$ ), før den ble frysetørket.

### ***3.4.1 <sup>1</sup>HNMR- analyse for bestemmelse av acetyleringsgrad av kitosan***

Ved endt tillagning av kitosan fra kitin ble acetyleringsgraden ( $F_A$ ) av kitosanløsningen bestemt.  $F_A$  er konkretisert som den molare konsentrasjonen acetylerede enheter (A) dividert på den totale konsentrasjonen monomerer (A + D). Dette for å kontrollere om kitosanen kunne benyttes som substrat i de videre forsøkene i oppgaven. Kitosanløsningen må ha en acetyleringsgrad på  $\approx 0,65$ .

#### Materialer

- D<sub>2</sub>O
- NaNO<sub>2</sub> (10mg/mL)
- DCI 1M
- NaOD

---

## Metode

20 mg kitosan løses i 2 mL D<sub>2</sub>O. Løsningen ble satt i risting i inkubatorskap ved 37 °C. Ved endt tid ble det tilsatt 30 µL NaNO<sub>2</sub> og 150 µL 1 M DCl. Løsningen ble tildekket med aluminiumsfolie og satt til risting ved 37 °C i 2 timer. Videre ble pD justert til pD 4,5 ved NaOD og overført i NMR- rør. Acetyleringsgraden (F<sub>A</sub>) ble bestemt ved <sup>1</sup>HNMR- analyse (seksjon 3.5.4), og ved videre å benytte likning 3.2.

$$F_A = (A + A\alpha + A\beta) / (A + A\alpha + A\beta + D + D\alpha)$$

(likning 3.2)

A er definert som acetylerede enheter inni sukkerkjeden eller på ikke- reduserende ende, Aα er acetylerede α- anomerer på reduserende ende og Aβ er acetylerede β- anomerer på reduserende ende. D er deacetylerede enheter inni sukkerkjeden eller på ikke- reduserende ende og Dα er deacetylerede α- anomerer på reduserende ende.

Acetylerede α-anomerer og acetylerede β-anomerer på reduserende ende ble lagt sammen med acetyleret enhet, inni eller på ikke-reduserende ende, dette ble deretter dividert på det totale antallet reduserende og ikke-reduserende ender.

### 3.5 Nedbrytning av kitosan

Kitosan med acyleringsgrad  $F_A = 0,68$  ble degradert til kitooligosakkarider av ulike lengde ved hjelp av ulike ChiB mutanter. Degraderingsproduktene ble eksaminert ved hjelp av  $^1\text{HNMR}$ , SEC og MS.

#### 3.5.1 Løsning av kitosan

##### Materialer

- Kitosan ( $F_A = 0,68$ )
- $\text{dH}_2\text{O}$

##### Metode

Kitosan ble veid ut og tilsatt  $\text{dH}_2\text{O}$  til en konsentrasjon på 20 mg/mL. Løsningen ble inkubert i risteinkubator, 37 °C og 225 rpm, til alt sukkeret var løst.

#### 3.5.2 Degradering av kitosan

##### Materialer

- Nedbrytningsbuffer, pH 5,5
  - 0,8 M NaAcetat
  - 0,2 M NaCl
- Mutanter av ChiB
  - 12 M HCl
  - 1 M NaOH

### Metode

Den oppløste kitosanen ble tilsatt likt volum nedbrytningsbuffer som tidligere tilsatt dH<sub>2</sub>O.

Den aktuelle ChiB- mutanten ble tilsatt løsningen til en enzymkonsentrasjon på 50 µg/ 10 mg kitosan. Reaksjonsløsningen ble satt til risting (225 ppm) ved 37 °C. Uttak på 1,5 mL ble gjort på ulike tidspunkt, mellom 2,5 minutter og 1 uke.

Reaksjonen ble stoppet med 1 M HCl til en pH på 2,5. Prøven ble videre kokt i 4 minutter før innfrysing.

Løsningen ble så filtrert ved hjelp av sprøytefiltre med porestørrelse på 0,22 µm og deretter fordelt i tre eppendorfrør: 800 µL til SEC, 500 µL til NMR og 200 µL til MS.

SEC- og NMR- prøvene ble frysetørket ved hjelp av en SpeedVac over natten. Prøvene ble oppbevart i fryser (-20 °C) før videre analyse.

### **3.5.3 Prøveopparbeidelse <sup>1</sup>H NMR**

For å oppnå best mulig signal ved NMR-analyse ble prøvene løst i D<sub>2</sub>O. Dette for å forhindre at H<sub>2</sub>O-løsemiddelsingalet skulle bli for dominerende. Deuterium er en stabil isotop av hydrogen som består av et proton og et nøytron. Deutererte løsemidler er ofte benyttet i <sup>1</sup>H NMR for at signalene til protoner i løsemiddelet ikke skal overskygge signalet til protoner i analytten. I dette tilfellet ble D<sub>2</sub>O brukt for at H<sub>2</sub>O, i løsemiddelet, og – OH, i sukkeret, signalene skulle overlape hverandre.

### Materialer

- NaOD
- DCl
- Ph-meter
- D<sub>2</sub>O
- Frysetørker

### Metode

---

Prøvene (500 $\mu$ L) ble frysetørket og deretter løst i D<sub>2</sub>O. Videre ble prøvene pD-justert til pD 4,2 ved å benytte fortynninger av DCl og NaOD, deretter frysetørket igjen. Prosedyren ble gjentatt to ganger, dette for å fjerne all H<sub>2</sub>O fra prøvene. Prøvene ble avslutningsvis løst i 700  $\mu$ L D<sub>2</sub>O og oppbevart i eppendorfrør i fryser (-20 °C).

### **3.5.4 Kjernemagnetisk resonans (NMR)**

<sup>1</sup>H NMR- analysen ble benyttet til å bestemme degradering av kitosanpolymerene ved hjelp av de ulike mutantene ved ulike tidsintervaller. Med dette menes fraksjon av glykosidbindinger i kitosanen kuttet av enzymet. Ved å måle økning i resonans av reduserende ender relativ til resonansen fra interne anomere protoner kan degraderingen bestemmes. Analysen brukes til bestemmelse av nedbrytningsgrad som plottes mot tid for bestemmelse av apparent  $k_{cat}$  (seksjon 1.8.1).

#### Materialer

- Oxford NMR 300
- NMR-rør
- Aceton

#### Metode

Prøvene som allerede var pD justert og løst i D<sub>2</sub>O ble overført til 5 mm NMR-rør for NMR-analyse.

Prøvene ble analysert ved 85 °C og 300 MHz. Spektralvidden ble satt til 3595,8, pulsvinkelen til 10,50, antall scans til 256 og blokkstørrelsen til 8. Relakseringstiden ble satt til 4,563 sekunder. Spektrene ble korrigert ved å benytte en gaussfunksjon i et VJMR-program. NMR-rørene ble vasket med aceton mellom hver analyse.

### 3.5.5 Tolkning av $^1\text{H}$ NMR-spektra

Ved å benytte VJMR- programvare kunne integralene og derved arealet under de ulike toppene bestemmes. Med integralene som utgangspunkt kunne videre grad av polymerisering (antall sukkerenheter i en polymer) (DP) bestemmes, og da også nedbrytningsgrad ( $\alpha$ ). Gjennomsnittlig grad av polymerisering, DP<sub>n</sub>, av den enzym-degraderte kitosanen ble bestemt fra grad av anomer (H-1) resonans ved hjelp av likning 3.3 [14]:

$$\text{DP}_n = \frac{[\text{område med all H} - 1 \text{ resonans (interne og reduserende ender)}]}{(\text{område med reduserende ende resonans})}$$

(likning 3.3)

Utrekningen kan noe enklere beskrives ved ligningen 3.4.

$$\text{DP}_n = \frac{(A\alpha + A\beta + A + D)}{(A\alpha + A\beta)}$$

(likning 3.4)

$\alpha$  ble funnet ved å benytte ligning 3.5 vist under. DP<sub>n</sub> er definert som gjennomsnittlig grad av polymerisering,

$$\alpha = \frac{1}{\text{DP}_n}$$

(likning 3.5)

### 3.5.6 Størrelses eksklusjonskromatografi (SEC)

SEC brukes ofte for separasjon basert på størrelse av store makromolekylære komplekser som proteiner og syntetiske polymerer [7]. Metoden er derfor godt egnet for fraksjonering av kitoooligosakkarider av ulik størrelse. Det benyttes flere kolonner koplet i serie for å oppnå høyere oppløsning. Kolonnene som benyttes er ofte Superdex<sup>TM</sup> 30, hvor stasjonærfasen består av dekstran og krysskoplet agarose. Porene i kolonnematerialet vil retardere sakkaridene i henhold til størrelse. Kitosanprøvene som i ulik grad var brutt ned av ChiB-WT og mutanter, ble analysert ved hjelp av størrelses eksklusjonskromatografi (seksjon 1.10.4).

#### Materialer

- Degradert kitosan
- 0,15 M NH<sub>4</sub>Ac, pH 4,6
- Superdex<sup>TM</sup> 30 x 3

#### Metode

Kitoooligosakkaridene fra degradering av kitosan ved hjelp av ulike ChiB mutanter ble separert på et størrelses eksklusjonssystem som bestod av tre seriekoblede Superdex<sup>TM</sup> 30 kolonner. Mobilfasen, 0,15 M NH<sub>4</sub>Ac (pH 4,6), hadde en flow på 0,8 mL/ min. Den frysetørkede prøven (≈ 10 mg) ble løst i 1 mL mobilfase og injisert i systemet.

Oligomerene ble detektert av en RI- detektor som videre var koblet til en datamaskin som presenterte resultatene i form av et kromatogram. Fraksjoner på 4 mL ble samlet og analysert ved hjelp av MS.

#### Bearbeiding av data:

Kromatogrammene ble baselinje korrigert ved hjelp av programmet RData 2.8.0 og funksjonen baselineGUI som gjør det mulig å korrigere baselinjen i ulike kromatogram.

### 3.5.7 Massespektrometri (MS)

For identifikasjon av sukkerpolymerene i et utdrag av toppene fra SEC- analyse ble gjennomført ved å benytte MALDI-TOF-MS. Dette ble gjort for å vise at hydrolyse av sukkerene hadde forekommet, og hvilke produkter som fantes i løsningen.

Matriks som ble benyttet var 2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB). DHB absorberer UV-lys ved 337 nm. DHB inneholder fenolgrupper som overfører protoner fra matriks til prøvemolekyler som er viktig for å oppnå full ionisering [86].

#### Materialer

- DHB 2,5-Dihydroxybenzoic acid
- EtOH
- H<sub>2</sub>O
- MeOH

#### Metode

Tillagning av matrix ble gjort ved å tilsette 15mg DHB i 1000 µL 30 % EtOH og 70 % H<sub>2</sub>O. Prøvene ble fortynnet 1:2 ved å tilsette 1µL prøve i 1 µL 50 % MeOH. Prøve og matrix ble deretter blandet 1:1 ved å tilsette 1 µL prøve på parafilm, deretter 1 µL matrix. 1 µL av blandingen ble videre påført MALDI-platen. Platen ble satt inn i instrumentet.

Dataprogrammet som ble benyttet for identifisering av sukkeroligomerer var FlexControl 2.4, data ble analysert på FlexAnalysis 2.4. Toppene i SEC- kromatogrammet ble annotert ved å sammenligne masselister fra MS- spekter og masselister for uderivatiserte oligosakkarider. På denne måten var det mulig å si hvilke hydrolyseprodukter prøven inneholdt.



### 3.6 Bindingsassay

For å beregne  $K_D$  (seksjon 1.6.6) for bindingsreaksjonen mellom de ulike mutantene samt WT med kitin, ble det foretatt bindingsassay for å bestemme effekten den enkelte mutasjon har på bindingsinteraksjonen.

#### 3.6.1 Tillagning av standardkurve:

##### Materialer

- natriumacetat 20 mM, pH 6.1
- dH<sub>2</sub>O
- enzym

##### Metode

Det ble laget en individuell standardkurve for hver mutant ved å måle absorbans ved  $A_{280}$  av løsninger med kjent enzymkonsentrasjoner på henholdsvis 0  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 4  $\mu$ M, 6  $\mu$ M, 8  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 12  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 18  $\mu$ M, 25  $\mu$ M og 35  $\mu$ M.

Det ble laget en reaksjonsmikse med et totalvolum på 0,475 mL, som besto av NaAc 20 mM, pH 6,1 og enzym. Det ble laget 3 paralleller av hver konsentrasjon.

#### 3.6.2 Bindingsassay:

Etter måling av  $A_{280}$  ble løsningene satt ved 4 °C. Viktig at forsøket foregikk ved 4 °C for å redusere den hydrolytiske aktiviteten til enzymene.

##### Materialer

- $\beta$ -kitin, 80 mesh

### Metode

Det tilsatt  $\beta$ -kitin fra en 20 mg/mL løsning til hver av reaksjonsmiksene som allerede inneholdt buffer og enzym til en  $\beta$ -kitin- konsentrasjon på 1 mg/mL og et sluttvolum på 0,5 mL. Tilsetningen av  $\beta$ -kitin foregikk ved 4 °C.

Total tid for forsøket var 3 timer. Etter ½, 1 og 2 timer ble et utdrag av parallellene tatt ut spunnet ned i en mikrosentrifuge ved 4 °C og 13000 rpm i 5 min, og  $A_{280}$  ble målt. Målingene ble foretatt for å se at verdiene holdt seg stabile.

Etter måling ble miksene satt tilbake, og det ble pipetert slik pelleten skulle være løst i miksen.

Etter endte 3 timer ble alle prøvene spunnet ned ved 4 °C og 13000 rpm i 5 min.

Supernatanten ble tatt av og absorbansen ved  $A_{280}$  målt.

Likning fra standardkurven ble brukt til å finne konsentrasjonen av enzym. Det var da mulig å plote konsentrasjon bundet enzym mot konsentrasjon fritt enzym for så å estimere  $K_d$ .

## **3.7 Substrattilgjengelighetsforsøk**

De fleste biopolymerene i naturen fungerer som fysisk støttevev i levende organismer. Disse danner strukturer som øker i størrelse, fra enkle molekyler og fibriller på nanonivå, til krystaller på mikrometer nivå. Eksempler på slike biopolymerer er cellulose og kitin.

Strukturene som utgjør kitin består av krystallerte mikrofibriller.

Ultrasonikering er en prosess som bryter opp kitinkrystaller til nanofibre som vil være 3-4 nm i vidden og minst et par mikrometer i lengden[89]. Med dette økes gjennomsnitts overflaten til kitinsubstratet og med det tilgjengeligheten for enzymer.

### **3.7.1 Forberedelser til substrattilgjengelighets forsøk**

Før forsøket ble det laget to ulike substrater, henholdsvis  $\beta$ -kitin og sonikert- $\beta$ -kitin. Ved å benytte ultralyd til å sonikere kitin dannes et substrat som ikke er like tettpakket, og derfor lettere tilgjengelig for enzymet.

### **3.7.2 Tillagning av $\beta$ -kitin-substrat**

#### Materialer

- $\beta$ -kitin 80 mesh
- Natriumacetat 50 mM, pH 6,1
- Eddiksyre 10 %

#### Metode

80 mesh  $\beta$ -kitin ble silt i en 75  $\mu$ M filtersil. Det silte  $\beta$ -kitinet ble veid ut og løst sammen med NaAc til en konsentrasjon på 5 mg/mL. Det ble laget to batcher, en sonikert og en ikke-sonikert. Den løsningen som skulle sonikeres ble pH justert til pH 3,7 ved å benytte eddiksyre.

#### **3.7.2.1 Ultrasonikering**

Ultrasonikeringen ble påført løsningen i 2 min ved å benytte en ultrasonic homogeniserer ved 30 ampl (i artikkel 19,5 kHz og 300 W). Løsningen ble oppbevart på is.

### **3.7.3 Substrat forsøk**

Forsøket ble gjort på WT og mutanten R446 mot fire ulike substrater.  $\beta$ -kitin med og uten CBP21, samt sonikert- $\beta$ -kitin med og uten CBP21.

I tillegg ble forsøket utført på de resterende syv mutantene, men da kun mot ikke-sonikert  $\beta$ -kitin uten tilstedeværelse av CBP21.

### Materialer

- Acetonitril 100 %
- BSA (0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
- CBP21 (5  $\mu\text{M}$ )
- Enzym (0,2  $\mu\text{M}$ )
  - WT
  - R446
- Substrat (0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
  - $\beta$ -kitin
  - $\beta$ -kitin med CBP21
  - Sonikert  $\beta$ -kitin
  - Sonikert  $\beta$ -kitin med CBP21

### Metode

Det ble laget reaksjonsmikser som inneholdt enzym, substrat, BSA, og eventuelt CBP21. Det ble laget 3 paralleller av hver prøve. Reaksjonen gikk ved 37 °C og ble startet ved å tilsette enzymet, deretter gikk reaksjonen fra 1 time til 3 uker (endpoint). Reaksjonen ble stoppet ved å ta ut ønsket mengde fra reaksjonsmiksen, tilsette likt volum 100 % acetonitril, deretter spinne ned ved bruk av eppendorfsentrifuge ved maks rpm i 2 min. Supernatanten ble overført til HPLC-rør, og oppbevart i – 80 °C fryseren.

#### **3.7.4 HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)**

HPLC er et verktøy som er mye brukt for separasjon av kitoooligosakkarider av ulik størrelse, samt anomere former av sukkerene [88]. Oligomerene separeres da som regel på en Amid- 80, grafittkarbon kolonne ved hjelp av normal fase kromatografi [90].

Kolonnematerialet består da av polare, ikke- ioniske amino- grupper kjemisk bundet til silica-

---

partikler. Mobilfasen, 70 % acetonitril, er mindre polar enn stasjonærfasen. Hydrogen- atomer i stasjonærfasen vil danne hydrogenbindinger med oksygenatomene i hydroksyl og/ eller karbonylgruppen i sukkerene, og på denne måten retardere molekylene i ulik grad [7].

Sakkaridene av størst kjedelengde vil inneholde flere seter for dannelse av hydrogenbinding og dermed retarderes i større grad enn de av mindre størrelse. Kvantifisering av de ulike sakkaridene ble oppnådd ved å måle arealet under hver topp. Topparealet ble så sammenlignet med toppareal fra standardprøver med kjent konsentrasjon for bestemmelse av  $[A_1]$ ,  $[A_2]$  og  $[A_3]$ . Ved hjelp av disse parametrene var det mulig å estimere  $k_{cat}$  for hydrolyse samt grad av prosessivitet ( $[A_2] / [A_1]$ ) ratio) i ChiB mutantene.

### ***3.7.4.1 Tillagning av standarder***

#### Materialer

- Monomer ( $A_1$ ), 221 g/mol
- Dimer ( $A_2$ ), 424 g/mol
- Trimer ( $A_3$ ), 627 g/mol
- Natriumacetat 50 mM, pH 6,1
- Acetonitril 100 %

#### Metode

Det ble laget til standardprøver av  $A_1$ ,  $A_2$  og  $A_3$  ved å veie ut den aktuelle og løse det i  $dH_2O$  til en konsentrasjon på 100  $\mu M$ . Disse ble deretter blandet til en standardmiks som inneholdt alle de tre standardene ( $A_1 + A_2 + A_3$ ) og NaAc til et totalvolum på 500  $\mu L$ . 40  $\mu L$  av standardmiksen ble deretter blandet med 40  $\mu L$  acetonitril, overført til HPLC-rør og oppbevart i fryser.

### 3.7.4.2 HPLC-analyse

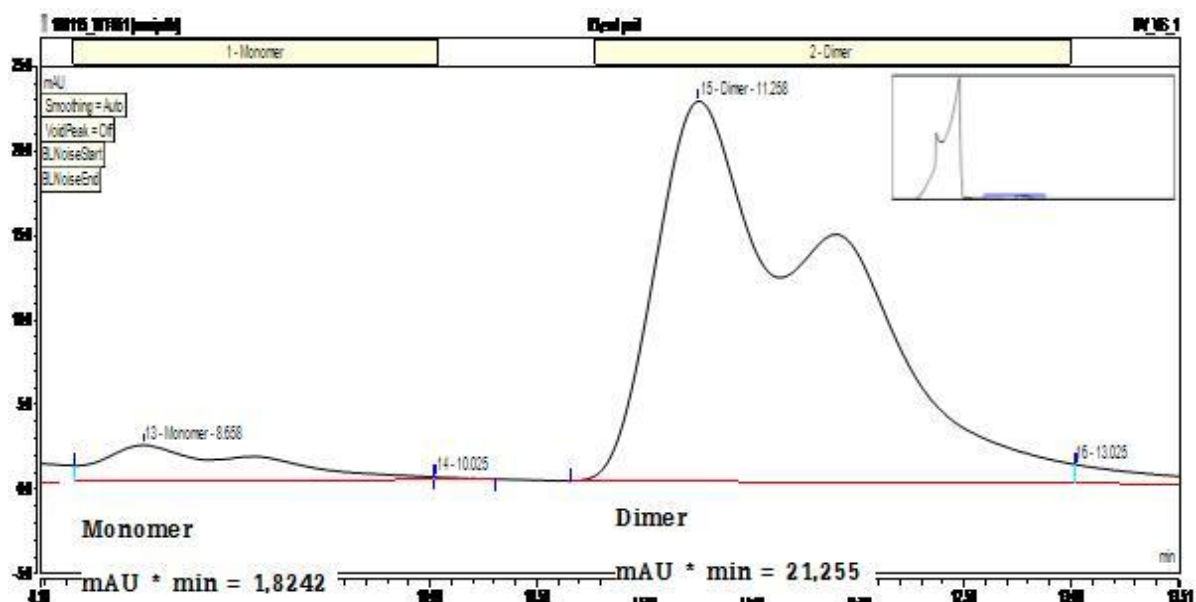
De ulike prøvene ble videre analysert ved HPLC ved å benytte en Amid 80 kolonne.

#### Materialer

- Amid 80 kolonne (4,6 mm x 24 cm)
- 70 % acetonitril

#### Metode

Prøvene ble injisert på kolonnen med en flow på 70  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Mobilfasen som ble brukt var romtemperert 70 % acetonitril. Oligosakkaridene ble registrert ved å måle absorbans ved 210 nm, og kvantifiseringen ble gjort ved å måle topparealet ( $\text{mAU} \cdot \text{min}$ ) som ble sammenlignet med standardprøver. Alle forsøk ble utført i tre paralleller og en snittverdi av de estimerte verdiene ble benyttet for å regne ut de aktuelle parametrene. Figur 4.23 viser kromatogram for ChiB WT etter 168 timer (end point) testet mot kitin. Toppen til venstre betegner mengde monomer, mens toppen til høyre betegner mengde dimer.



**Figur 3.1:** Kromatogrammet for hydrolyse av kitin ved hjelp av ChiB WT etter 168 timer. Toppen til venstre indikerer monomer, mens toppen til høyre indikerer dimer. Ved hjelp av

---

topparealet for de respektive toppene kunne de sammenlignes mot kjente standarder og  $[A_1]$  og  $[A_2]$  kunne estimeres.

### Bearbeiding av data

For hvert enkelt forsøk kunne man lage et plot,  $[A_2]$  mot tid for estimering av  $k_{\text{cat}}$ , samt estimere forholdet  $[A_2]/[A_1]$  for bestemmelse av prosessivitet.

Ved å beregne stigningstallet i den initielle, lineære fasen i  $[A_2]$  mot tid plottet får man hastigheten ( $\mu\text{M}/\text{tid}$ ) for hydrolysereaksjonen. Dersom substratet er i stort overskudd, hvilket det er under de gitte betingelser [5], vil hydrolysereaksjonshastigheten være  $\approx V_{\text{maks}}$ . En apparent  $k_{\text{cat}}$  kan dermed estimeres ( $k_{\text{cat}} = V_{\text{maks}} [\text{enzym}]$ ).

Estimering av  $[A_2]/[A_1]$  ved endepunkt uttaket kan man få et mål på hvor prosessivt enzymet er. Høyere verdi indikerer høyere grad av prosessivitet da  $[A_1]$  indikerer initiell binding.

## **3.8 Viskositetsmåling**

Det ble foretatt viskositetsmåling på ChiB mutantene D316A, W97A/D316A og W97A/W220A fra *S. marcescens*. I dette forsøket ble det sett på degradering av polymerkjedene. Ved hjelp av analysen kan man si noe om enzymet kutter ekso- eller endo, i tillegg grad av prosessivitet ved estimering av  $N_{\text{cuts}}$ .

### **3.8.1 Viskositetsmåling**

#### **3.8.1.1 Forberedelser**

Det ble på forhånd beregnet hvilken konsentrasjon enzym som skulle tilsettes. Dette ble gjort ved å se på verdier fra SEC,  $^1\text{H}$  NMR analyser og konsentrasjon fra tidligere viskositetsstudier av ChiB-WT.

Programmene ViscControl og ViscRun ble benyttet for å måle viskositeten til løsningen. ViscControl ble benyttet til å generere en kontrollfil, denne inneholdt data om ubbelohden, løsemiddel, temperatur, ulike konsentrasjoner samt ulike parametere for hvordan forsøket utføres, til hver analyse. ViscRun satte i gang de ulike målingene og lagret data.

### Materialer

- Ubbelohde, Schott 53101/0a (speisal designet glasskolbe for måling av viskositet)
- Kitosan (F<sub>A</sub> 0,63)
- Buffer 0,08 M NaAc, pH 5,5 (solvent)
- 5 µL filter
- 5 % deconex
- Aceton
- BSA 0,1 mg/mL

### Metode

Det ble veid ut 26 mg kitosan som ble satt i eksikator i 4 timer. Dette ble gjort for å fjerne overflødig H<sub>2</sub>O.

Kitosanen ble deretter løst i MilliQ til en konsentrasjon på 2 mg/mL, og satt til risting.

Buffer 0,08 M NaAc, pH 5,5, ble laget og blandet i ett 1:1 forhold med MilliQ. Blandingen ble videre overført til en ubbelohde og satt i stativ i 37 °C vannbad.

Det ble foretatt 5 målinger av solvent flowthrough time. Etter målingene ble Ubbelohden vasket med Deconex, skylt med MilliQ x 5, og tørket med aceton.

Videre ble den løste kitosanen tilsatt buffer til et totalvolum på 22 mL og en konsentrasjon på 1 mg/mL i et 1:1 forhold.

Løsningen ble filtrert og tilsatt BSA. På samme måte som tidligere ble løsningen tilsatt ubbelohden og gjennomstrømstiden målt.

Den ble videre satt til røring ved hjelp av en magnetrører for homogenisering av løsningen og satt i 37 °C vannbad. Det ble gjort 5 målinger, og gjennomsnittsverdi regnet ut.



### **3.8.1.2 Viskositetsassay:**

#### Materialer

- AVS-310 (Schott-Gerate)
- Enzym, ChiB mutanter

#### Metode

Forsøket ble startet med å tilsette enzym til løsningen som befant seg i ubelohden beskrevet i seksjon 3.8.1. Tilsetting av enzym ble gjort ved å benytte en lang pasteurpipette, skylt i MilliQ på forhånd. En magnetrører sørget hele tiden for at løsningen var homogen.

Det ble foretatt 15 viskositetsmålinger, med 7 uttak av  $\approx 1$  mL, hvor tid fra første måling, samt viskositetsmålingsnummer ble registrert. Den relative viskositeten ble målt ved å benytte en AVS-310 (Schott-Gerate) kontrollenhet med jevne intervaller.

Uttak på  $\approx 1$  mL ble 200  $\mu$ L ble overført til reagensrør som allerede inneholdt 5 M NaOH for å stoppe reaksjonen. Det ble utført tre paralleller og for punkter hvor relativ viskositet ble beregnet ble det tatt ut prøver for å bestemme konsentrasjon av reduserende ender (vha MBTH assay, beskrevet nedenfor) som igjen ble benyttet til å regne ut grad av hydrolyse,  $\alpha$ .

### **3.8.2 3-metyl-2-benzothiazolinone hydrazone assay (MBTH):**

Det ble foretatt et MBTH-assay for kvantifisering av reduserende ender,  $\alpha_{\text{tot}}$ .

Ved å plote  $\alpha_{\text{pol}}$  mot  $\alpha_{\text{tot}}$  for så å benytte stigningstallet var det mulig å estimere  $N_{\text{cuts}}$  (seksjon 1.13.1).  $N_{\text{cuts}}$  beskriver antall kutt enzymet gjør for hver gang det er assosiert med substratet, og er dermed et mål på prosessivitet.

#### Materialer

- 5 M NaOH
- 0,5 %  $(\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- 0,5 % Sulfaminsyre ( $\text{H}_3\text{NSO}_3$ )
- 0,25 M HCl

Metode

Uttak fra løsningen Ubbelohden (seksjon 2.8.1) på 200  $\mu\text{L}$  ble overført til reagensrør som inneholdt 200  $\mu\text{L}$  NaOH dette ble gjort for å stoppe reaksjonen. Prøvene ble oppbevart på is. Like volum av 3 mg/mL MBTH og 1 mg/mL DTT ble blandet og 200  $\mu\text{L}$  av denne nylagede miksturen ble tilsatt hvert reagensrør. Deretter ble prøvene overført i varmebad ved 80  $^{\circ}\text{C}$  i 15 minutter. Direkte etter fjerning fra varmebadet ble prøvene tilsatt 400  $\mu\text{L}$  av en blanding bestående av 0,5 %  $(\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$ , sulfaminsyre og HCl. Løsningene ble satt til avkjøling på is før det ble laget en A1 standardkurve (0-100  $\mu\text{M}$ ), absorbansen ble målt ved 620 nm.

Bearbeiding av data:

For å beregne stigningstallet til standardkurven, ble absorbans av reduserende ender plottet mot konsentrasjon reduserende ender (tillagede standarder). Videre ble gjennomsnittlig absorbans dividert på stigningstallet fra standardkurven, dette for å finne konsentrasjon av reduserende ender i uttakene. Konsentrasjon reduserende ender fra uttakene ble så plottet mot tid. For beregning av  $\alpha_{\text{tot}}$  var det nødvendig først å estimere gjennomsnittlig kjedelengde ( $\text{DP}_n$ ) [91]. Det ble gjort ved hjelp av likning 3.6.

$$DP_n = \frac{\left( \frac{\text{Konsentrasjon polymer } \left( \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)}{\sim 200 (Mw, \text{monomer})} \right)}{\text{Kons. reduserende ender (M)}}$$

(likning 3.6)

Videre ble likning 3.7 benyttet til å beregne  $\alpha_{\text{tot}}$ .

$$\alpha = \frac{1}{DP_n}$$

(likning 3.7)

Gjennomsnittlig kjedelengde i polymerfraksjonen ( $\alpha_{pol}$ ) ble bestemt ved å måle den relative viskositeten med jevne intervaller. Ved å anta at relativ viskositet er lik egenviskositet kan man få et estimat på gjennomsnittlig molekylærvekt for hele polymeren. Denne ble funnet ved å plote reduseringen i relativ viskositet mot tid. Ved å dividere gjennomsnittlig molekylærvekt for hele polymeren på molekylærvekt for monomeren kunne gjennomsnittlig kjedelengde estimeres ( $DP_n$ ). Likning 3.6 ble så benyttet for bestemmelse av  $\alpha_{pol}$ . Ved å plote  $\alpha_{pol}$  mot  $\alpha_{tot}$ , og benytte stigningstallet til kurven kunne  $N_{cuts}$  beregnes.  $N_{cuts}$  sier hvor mange kutt enzymet gjennomsnittlig foretar for hver gang det er assosiert med substratet.

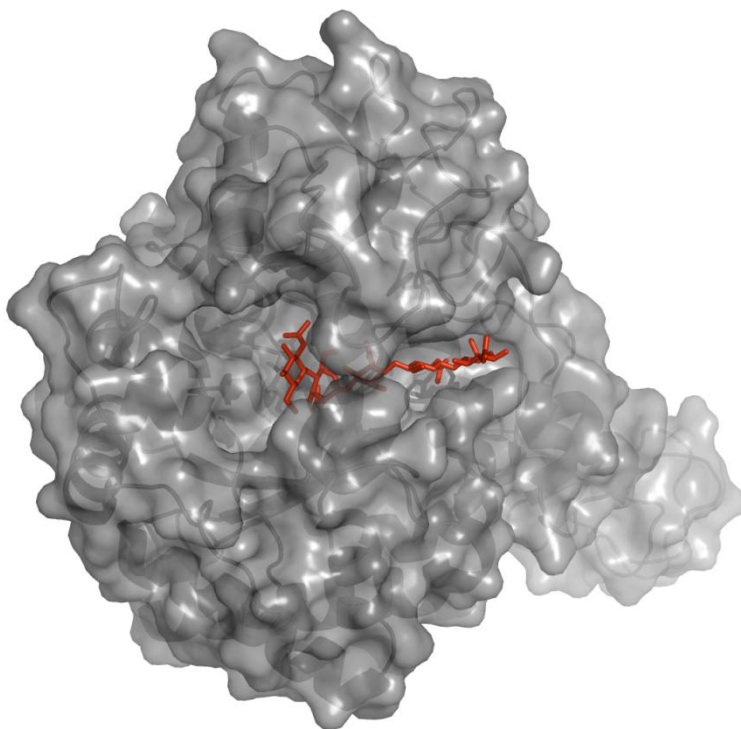
Ved å se hvor store fall som ble registrert i egenviskositet kan man se hvor i polymeren enzymet hydrolyserer. Hvis hydrolysen skjer vilkårlig i polymerkjeden sier man at enzymet har endo- aktivitet, en slik degradering vil føre til et større fall i egenviskositeten enn ved degradering fra en av endene, ekso- aktivitet.

## 4 Resultater

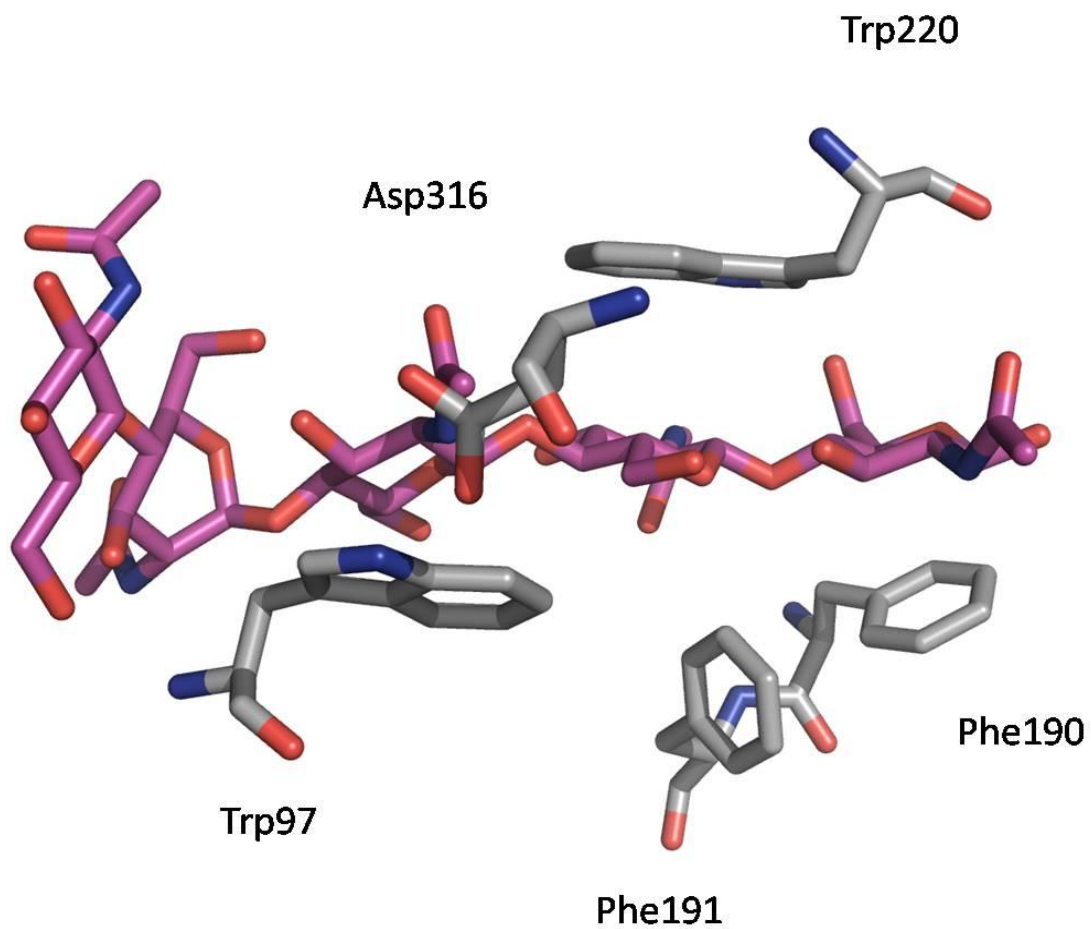
### 4.1 Subsete mutasjoner i ChiB:

I den substratbindende kløften hos prosessive kitinaser befinner det seg flere aromatiske residuer som utgjør en lineær sti fra det kitinbindende domenet inn mot det katalytiske setet[53]. Disse bidrar til substratbinding ved å danne interaksjoner med substratet. I tillegg bidrar de med å skyve polymeren gjennom den aktive kløften, denne skyvemekanismen utgjør enzymets prosessive egenskaper. Ved å mutere ulike residuer i den substratbindende kløften som antas å være med i den prosessive mekanismen for ChiB til alanin, er det mulig å studere deres effekt på prosessiviteten. Videre er det også interessant å studere rollen til det kitinbindende domenet i en prosessiv mekanisme siden denne antas å gjøre det uløselige substratet lettere tilgjengelig for hydrolyse.

I tillegg til de åtte mutantene beskrevet i seksjon 4.1.1-4.1.8 har også ChiB-WT blitt analysert i denne oppgaven. Figur 4.1 viser ChiB i kompleks med substrat, figur 4.2 presenterer residuene aktuelle for oppgaven slik de befinner seg i det katalytiske setet.



**Figur 4.1:** Surface fremstilling av ChiB i kompleks med sukker pentamer (farget rød). Viser den substratbindende kløften med lukket "tak" når substratet er bundet. De to residuene Asp316 og Trp97 bidrar til lukking (seksjon 4.1.4). Til høyre i bildet vises det kitin bindende domenet.



**Figur 4.2:** Presentasjon av en oligomer som interagerer med enzymet i det katalytiske setet. Oligopentameren er farget i rosa, mens aminosyrene Trp97, Phe190, Phe191 og Asp316 er farget i grått.

Nedenfor er det en beskrivelse av ulike mutantene som ble benyttet i dette studiet.

#### 4.1.1 R446:

Mutasjonen innebærer deleksjon av de 55 siste aminosyrene i aminosyresekvensen etter residu 446, arginin. Denne delen inneholder et lite C-teminal domene som refereres til som det kitin bindende domene (ChBD). ChBD har vist seg å ha en innvirkning i forhold til binding av substrat. Det er tidligere ikke undersøkt om det kitin bindende domene er involvert i enzymets prosessivitet.

**4.1.2 F190A:**

Residu 190 i aminosyresekvensen er den aromatiske aminosyren fenylalanin, Phe190. Den befinner seg i subsete +3, og danner apolare interaksjoner med sukkerkjeden. Fordi Phe190 ligger parallelt med substratet vil de inngå en rekke interaksjoner og er derfor viktig for stabilisering.

**4.1.3 F191A:**

I den primære aminosyresekvensen posisjon 191 finnes fenylalanin. Denne aromatiske aminosyren ligger i den aktive kløften mellom subsetene +1 og +2. Den er viktig fordi den danner hydrofobe interaksjoner med substratet ved hydrolyse, i tillegg til at den er den med på å stabilisere proteinet via interaksjoner med residuene Tyr145, Arg194 og Trp97.

F191 befinner seg i et område med flere hydrofobe residuer, disse ligger annenhver parallelt med, og står vinkelrett på, sukkerpolymeren. F191 står vinkeltett på sukkerpolymeren og kan derfor ikke danne interaksjoner med sukkerkjeden på samme måte som de residuene som ligger parallelt med den.

**4.1.4 D316A:**

Lokalisert i residu nummer 316 i primærsekvensen til ChiB befinner asparaginsyre seg, Asp316. Som tidligere nevnt har Asp316 en sidekjede som danner sterke hydrogenbindinger med Trp97 ved substratbinding som gir en delvis lukking av "taket" over den aktive kløften. Ved å mutere denne aminosyren til Ala er det ønskelig å finne ut om lukkingen av "taket" over substrat påvirker prosessiviteten og hastigheten til nedbrytning av kitin og kitosan.

**4.1.5 W97A:**

I posisjon 97 i primærsekvensen til ChiB finnes den aromatiske aminosyren tryptofan (Trp97). Denne ligger i +1 subsete, det vil si meget nær det katalytiske senteret.

W97 ligger parallelt med sukkerkjeden og har derfor mange hydrofobe interaksjoner med sukkeret som binder i dette subsete. I tillegg danner W97 en hydrogenbinding med Asp316 som bidrar til ”lukking” av taket over aktivsete kløften og substratet under substratbinding. En mutasjon av Trp til Ala fjerner de hydrofobiske interaksjonene i +1 subsete og bryter hydrogenbindingen med Asp316.

Studier utført av Horn et. al. 2006 har vist tap av prosessivitet for W97A, og en 29 ganger økning i degraderingsraten av vannløselig kitosan ved sammenligning med WT.

**4.1.6 W220A:**

I subsete +2 er det aromatiske residuet tryptofan 220 (W220) lokalisert. W220 ligner W97 i at denne også ligger nær det katalytiske senteret. På samme måte som W97 ligger også W220 parallelt med sukkerkjeden, den danner en stor kontaktflate, og kan derfor inngå flere hydrofobe interaksjoner med sukkeret.

W220A er mindre prosessiv en ChiB-WT og har også økt aktivitet mot kitosan (fire ganger mer aktiv).

**4.1.7 W97A/ D316A:**

Ved å lage en slik dobbelmutasjon var det ønskelig å studere hvilken effekt det har å fjerne begge residuene som inngår den sterke hydrogenbindingen som danner taket over det aktive setet. Det var ønskelig å se om mutasjonen hadde noen innvirkning på binding av substrat, aktivitet og prosessivitet.



#### **4.1.8 W97A/ W220A:**

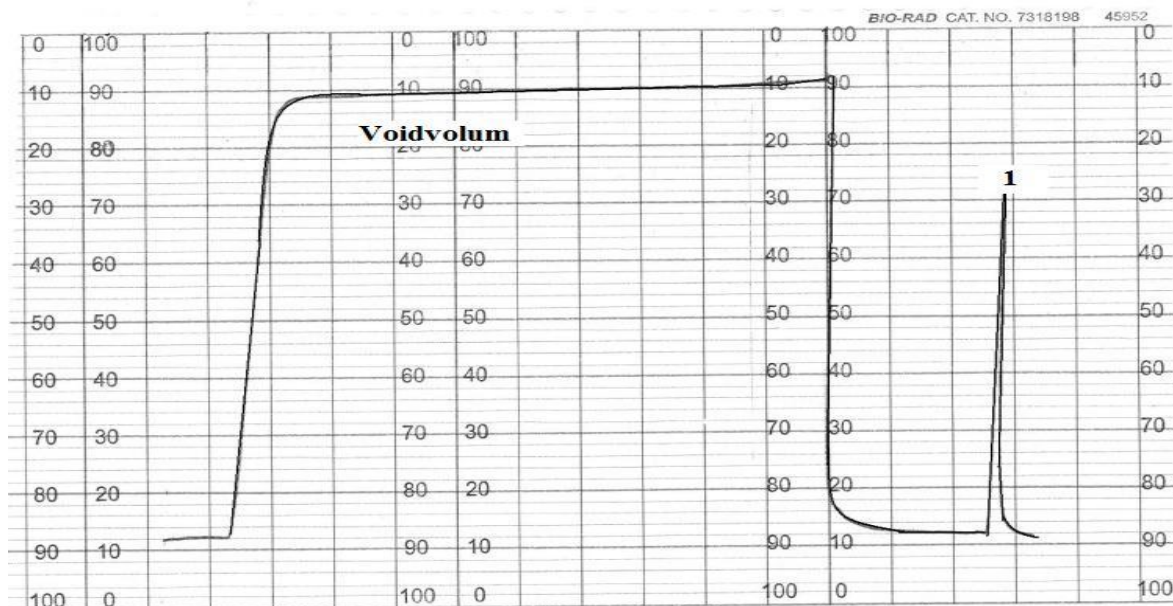
Det er spesielt interessant å se om dobbeltmutanten er mindre prosessiv enn enkelt mutantene. I tillegg er det relevant å se dobbeltmutanten er enda raskere i nedbrytningen av kitosan slik det er observert for en liknende mutant av ChiA.

## **4.2 Rensing av Chitinase B**

Det periplasmatiske ekstraktet som inneholdt det aktuelle proteinet ble renset enten på kitinkolonne eller ved hjelp av ionebytter- og hydrofob interaksjonskromatografi (HIC) (seksjon 1.10). De mest aktive mutantene ble renset på førstnevnte, mens de proteinene som ville binde kitinkulene i kolonnematerialene for sterkt, ble renset ved å benytte først ionebytterkromatografi og deretter HIC.

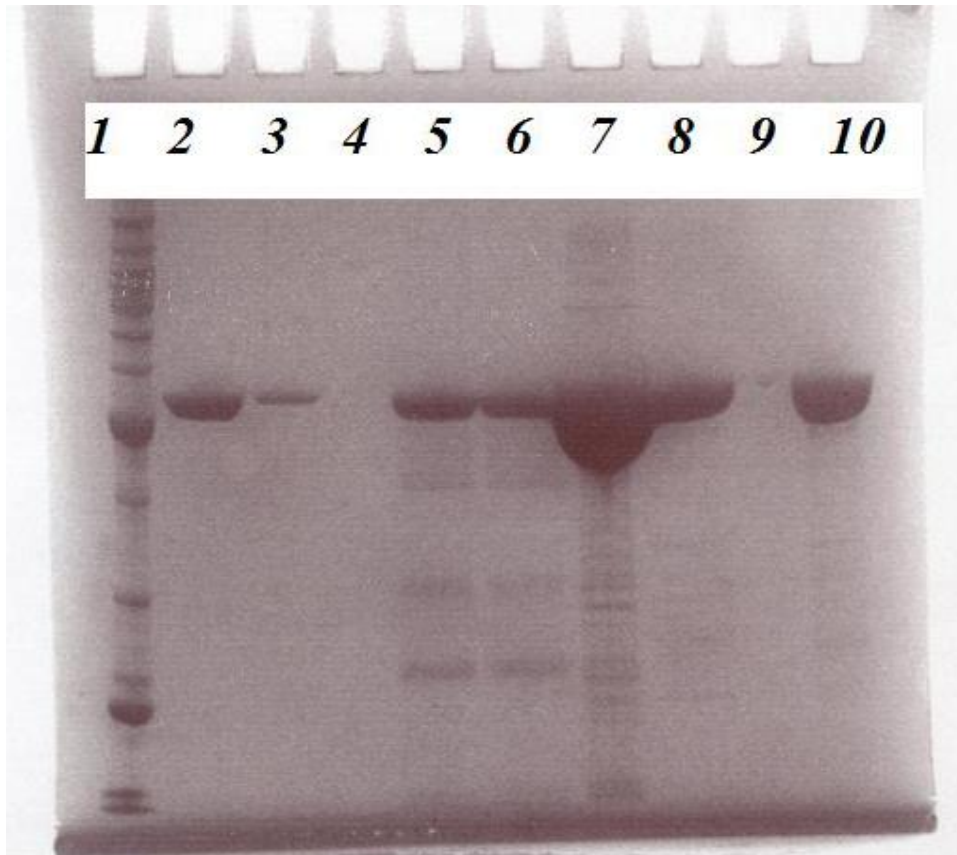
I figurer vises resulterende kromatogram for rensing av ChiB på kitinkolonne (figur 4.3) og R446 på hhv. ionebytter- (figur 4.5) og HIC-kolonne (figur 4.6). I tillegg er gelene fra SDS PAGE analysene for disse to proteiner vist i henholdsvis figur 4.4 og 4.7. ChiB har en molekylærvækt på 58,5 kDa og R446 på 46,0 kDa. Ved bruk av SDS PAGE, kan størrelsen på proteinene og renheten i prøven identifiseres. Resultatene for mutantene F190A, F191A, D316A, D316A/ W97A, W97A, W220A og W97A/ W220A finnes i appendix (avsnitt 7.1).

#### 4.2.1 Isolering av ChiB-WT



**Figur 4.3:** Kromatogrammet for rengjøring av ChiB WT på kitin kolonne. ChiB ble eluert i den siste toppen merket 1, mens de andre proteinene ble eluert med voidvolumet i den første, største toppen.

Diagrammet viser to tydelige toppe. Den første, store toppen er voidvolumet,  $V_0$ , og angir total eksklusjon. Proteinene av interesse ble eluert ut i den siste, minste toppen og fraksjonen(e) ble samlet opp for kvalitativ analyse på SDS- PAGE gel. Resultatet for SDS fargegel for ChiB-WT vises i figur 4.4 i brønn 10.

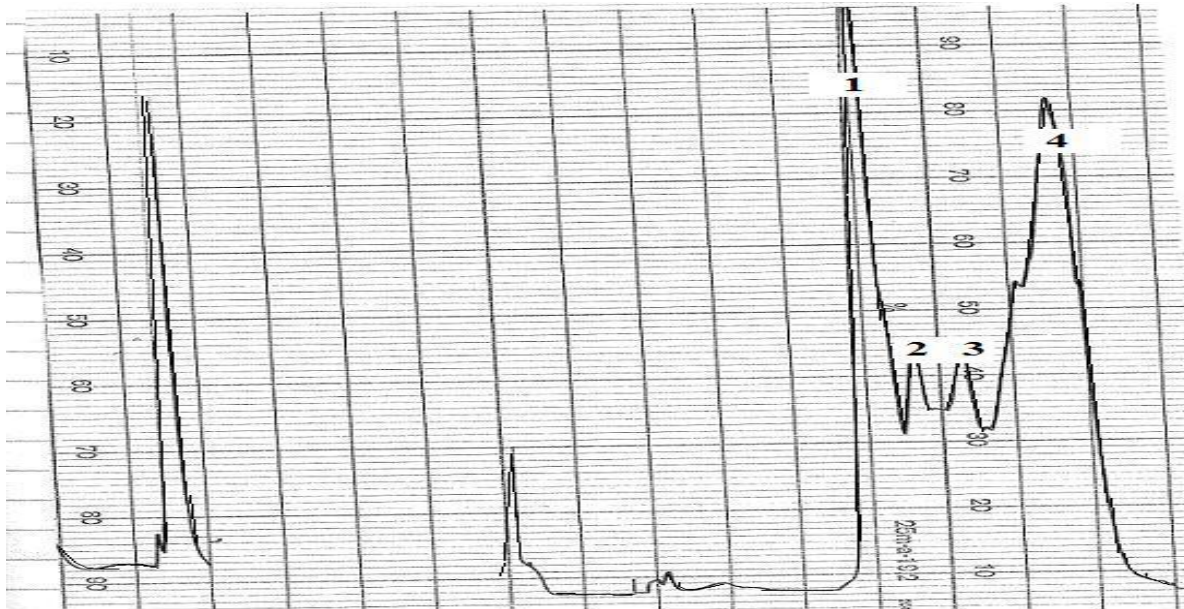


**Figur 4.4:** SDS- PAGE gel for den relevante fraksjonen samlet i renseprosedyren for ChiB-WT vises i brønn 10.

Gelbildet viser tydelig ChiB bånd i brønn nr. 10. Prøven i denne brønningen foreviser heller ingen andre bånd som tyder på andre interfererende proteiner. Følgelig ble denne fraksjonen tatt vare på for videre analyse.

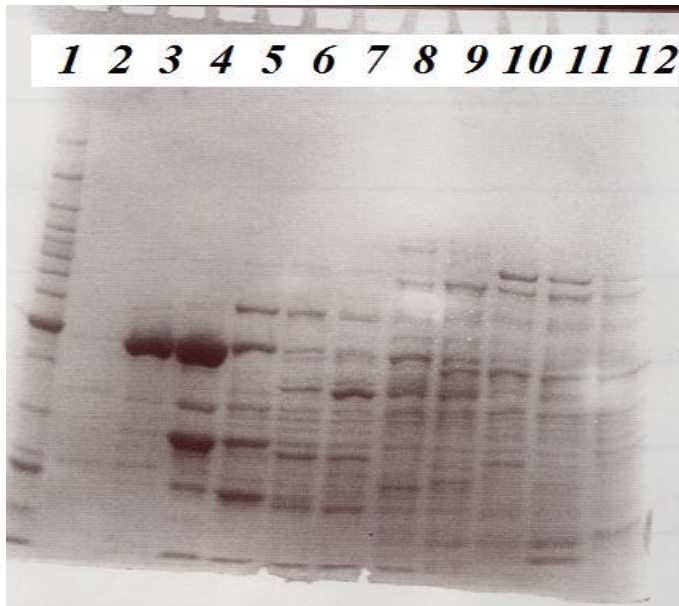
### 4.2.2 Isolering av R446

Mutant R446 ble rensset på ionbytter- og HIC- kolonne, respektivt, da dette gir høyere utbytte enn metoden benyttet for ChiB-WT. Diagrammet for det første kromatografiske rensetrinnet er vist i figur 4.5.



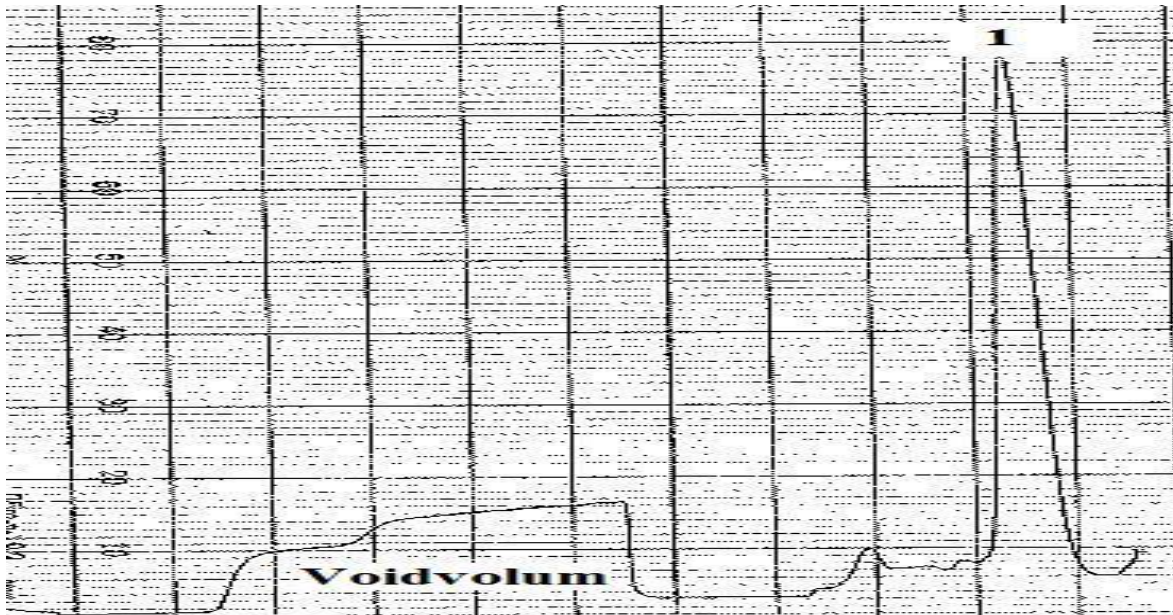
**Figur 4.5:** Kromatogrammet for rensing av mutant R446 ved hjelp av ionebytterkromatografi. Fraksjoner ble samlet fra og med den første toppen etter eluering startet.

Figuren viser fire, sammenhengende topper i slutten av diagrammet, hvor det ble samlet fraksjoner fra samtlige. De oppsamlede fraksjonene fra ionebyttersteget ble videre analysert ved hjelp av SDS- PAGE fargegel (figur 4.6), prøvene som viste R446- bånd ble rensset videre på HIC- kolonne.



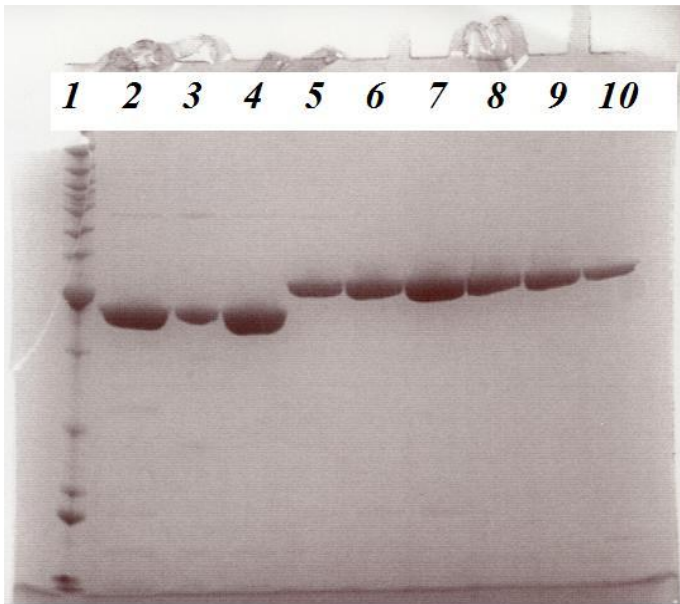
**Figur 4.6:** SDS- PAGE fargegel for de oppsamlede fraksjonene fra ionebytter- steget. Brønn 3, 4 og 5 viser sterke ChiB bånd, mens brønnene 6- 10 viser svake bånd. Samtlige fraksjoner ble rensset videre på HIC- kolonne.

Av figur 4.6 kan man se at brønnene 3-10 viser R446 bånd, hvorav brønn 3,4 og 5 viser de sterkeste. Samtlige brønner viser også andre proteinbånd som ikke er R446. For å optimalisere isoleringen av det ønskelige proteinet, ble derfor fraksjonene rensset videre på HIC- kolonne. Kromatogrammet for denne rensprosessen er vist i figur 4.7.



**Figur 4.7:** Kromatogrammet for rensing av mutant R446 på HIC- kolonne. Proteinene ble eluert i den siste, store toppen, mens de andre proteinene ble eluert med voidvolumet i den første, brede toppen merket 1.

Kromatogrammet fra HIC- rensingen (figur 4.7) viser en klar topp i slutten av diagrammet. Fraksjoner samlet fra denne toppen ble kvalitativt analysert videre ved hjelp av SDS- PAGE, vist i figur 4.8.



**Figur 4.8:** Resultatet for SDS- PAGE gel for de oppsamlede fraksjonene fra HIC-rensedyren av mutant R446, brønn 5- 10.

Av figur 4.8 ser vi at samtlige gelbrønner hvor proteinet ble applisert, brønn 5- 10, viser sterke, tydelige R446 bånd. Disse brønnene viser ikke tegn til andre, uønskede proteiner og tyder følgelig på vellykket rensing av mutant R446.

#### **4.2.3 Fluorimetrisk bestemmelse av proteinkonsentrasjon**

De relevante fraksjonene fra den kromatografiske rensingen av det periplasmatiske ekstraktet ble oppkonsentrert ved hjelp av spesielle separasjonsfilter (seksjon 3.3.6). Ved hjelp av Quant- iT<sup>TM</sup> protein assay ble proteinkonsentrasjonen for de ulike mutantene bestemt. Utbyttet, milligram protein isolert per liter dyrkingsmedium, for de ulike rensingene er fremstilt i tabell 4.1. For hver rensing ble det brukt 3 liter LB- medium.

**Tabell 4.1:** Utbyttet av proteinrensingen i milligram enzym per liter cellekulturmedium. Verdiene er beregnet ut fra antall liter dyrkningsmedium (3liter).

Enzym	Utbytte (mg/L)
WT	4,3
R446	7,4
F190A	7,2
F191A	6,3
D316A	5,7
W97A	1,7
W220A	3
W97A/ D316A	1
W97A/ W220A	2,6

Av tabellen ser man at rensingene for mutantene R446, F190A, F191A og D316A er de isoleringene som har gitt mest utbytte. Alle disse ble rensset i to trinn ved hjelp av ionebytter- og hydrofob interaksjonskromatografi. De resterende enzymvariantene ble rensset i ett trinn på kitinkolonne. Resultatene antyder dermed at rensing i to trinn gir bedre separasjon.

#### 4.2.4 Aktivitetskontroll av isolerte enzymer

De rensede proteinene ble testet mot 4-MU-(GlcNAc)<sub>2</sub>, for kontroll av aktivitet. Substratet har en fluoriserende gruppe (4-MU) bundet til seg som vil gi fluorescens når det frigjøres fra (GlcNAc)<sub>2</sub>. 4-MU-(GlcNAc)<sub>2</sub> ble inkubert med det aktuelle enzymet i nøyaktig 10 minutter før reaksjonen ble stoppet. Prøvene ble målt spektroskopisk ved hjelp av et fluorometer, ut fra avlest fluorescens ble aktivitet regnet ut ved hjelp av ligning 3.1. Forsøket ble utført i tre paralleller og en snittverdi ble benyttet for estimering av aktiviteten. Aktivitetesverdiene for aktiviteten til de respektive enzymene er vist i tabell 4.2.



---

**Tabell 4.2:** Beregnet aktivitet for de ulike enzymvariantene når de ble testet mot 4-MU-(GlcNAc)<sub>2</sub>. Forsøket ble utført i tre paralleller og en gjennomsnittsverdi ble brukt til estimering av aktivitet ved hjelp av likning 3.1.

<b>Enzym</b>	<b>Aktivitet (nM/ min/ mg)</b>
WT	257 200
R446	150 394
F190A	139 826
F191A	16 693
D316A	225 246
W97A	49 739
W220A	63 681
W97A/ D316A	6 750
W97A/ W220A	17 380

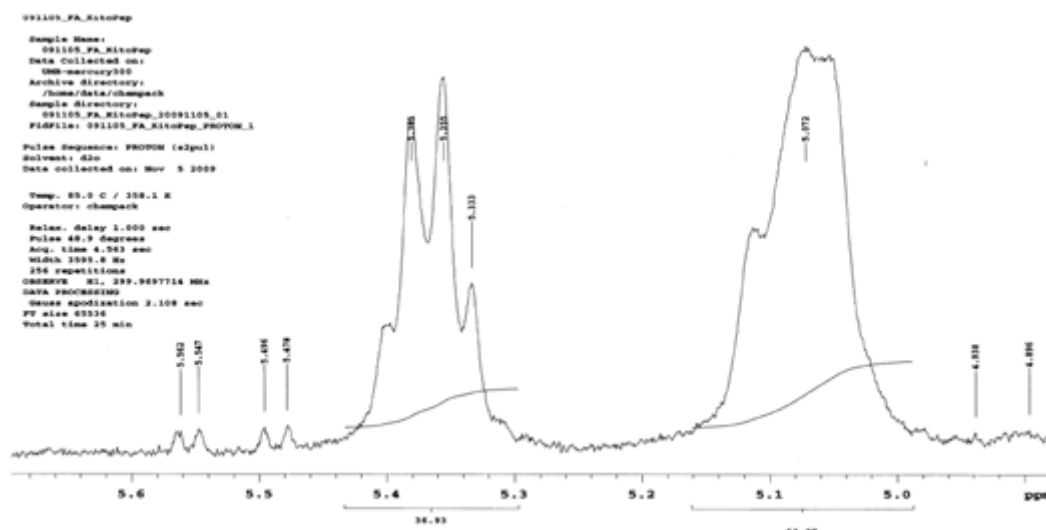
WT og mutantene R446, F190A og D316A skilte seg klart ut på aktivitetmålingene da de viste en mye høyere verdi enn de resterende. Substratet som er benyttet vil ikke nødvendigvis reflektere hvor aktivt det aktuelle enzymet er mot kitin eller kitosan.

### 4.3 Fremstilling av kitosan

Fremstilling av heteropolymeren kitosan fra kitin ble gjort ved homogen deacetylering av kitin beskrevet i seksjon 3.4. Homogen deacetylering av kitin gir en tilfeldig distribuering av N-acetyl enheter. Fra utveide 4 g kitin besto produktet av mellom 1-2 g kitosan. Utbyttet, i gram, for de ulike deacetyleringene (2 paralleller per forsøk) er fremstilt i tabell 4.3.

Acetyleringsgraden ( $F_A$ ) ble bestemt ved å foreta  $^1\text{H}$  NMR- analyse (seksjon 3.5.4).

Figur 4.9 viser  $^1\text{H}$  NMR- spekteret for kitosan med  $F_A=0,63$  (seksjon 3.4.3). Resterende spektre for fremstilling av kitosan finnes i appendix (seksjon 7.2).



**Figur 4.9:**  $^1\text{H}$ NMR- spekter for kitosan, med estimert  $F_A=0,63$ .  $F_A$ - verdi ble beregnet ved likning 3.2.

For estimering av acetyleringsgrad ble acetylererte  $\alpha$ -anomerer og acetylererte  $\beta$ -anomerer på reduserende ble lagt sammen med acetylerert enhet, inni eller på ikke-reduserende ende. Dette ble deretter dividert på det totale antallet reduserende og ikke-reduserende ender, som ga estimert  $F_A$ -verdi lik 0,63 (likning 3.2).

**Tabell 4.3:** Antall batcher kitosan fremstilt, mengde kitosan i gram ut fra 4.0 gram kitin som startmaterial, samt estimert  $F_A$ -verdi beregnet ved hjelp av likning 3.2.

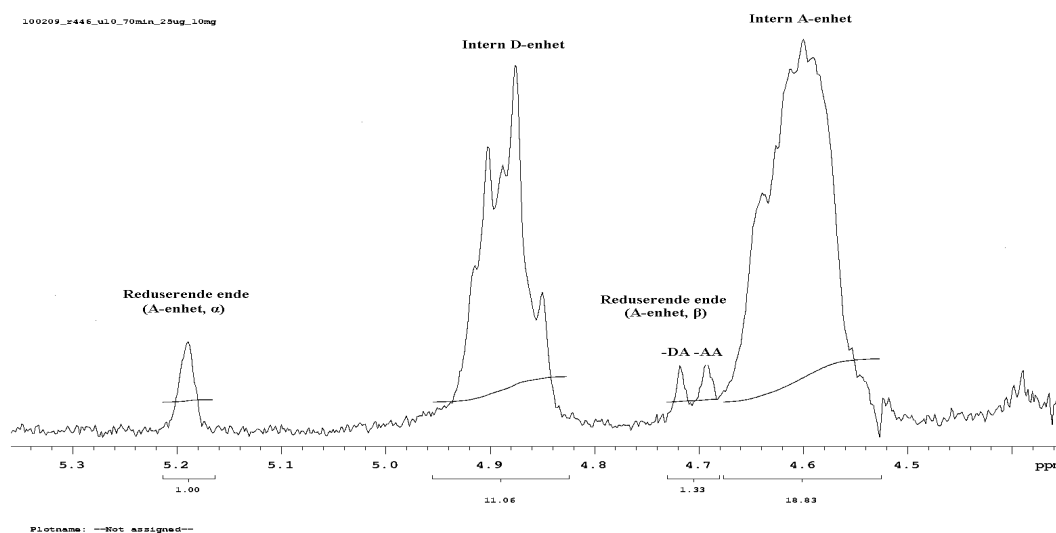
Prøvenr.	Mengde kitosan (g)	$F_A$ - Verdi
1.1	1,76	0,63
1.2	1,73	0,63
2.1	1,69	0,62
2.2	1,89	0,62
3.1	2,06	0,49
3.2	1,93	0,49
4.1	2,10	0,54
4.2	1,73	0,54

#### 4.4 Nedbrytning av kitosan $F_A = 0,63$

Det ble foretatt hydrolyse av kitosan ved de åtte mutantene beskrevet i seksjon 4.1., samt WT. Analyse av uttakene ble gjort ved bruk av  $^1\text{H}$  NMR hvor,  $\alpha$ , nedbrytningsgrad ble estimert. Ved bruk av størrelses eksklusjons kromatografi ble de ulike oligosakkaridene separert med henhold på størrelse og oddetalls/partalls ratio bestemt. MS ble brukt for å vise at hydrolyse hadde forekommet, og hvilke produkter som var dannet.

#### 4.4.1 $^1\text{H}$ NMR

Fra uttakene gjort for nedbrytning av kitosan ble det laget prøver til  $^1\text{H}$  NMR- analyse hvor nedbrytningsgraden ( $\alpha$ ) ble estimert ved å bestemme reduserende ender i forhold til interne enheter (forklart under). Uttakene estimert til  $\alpha \approx 0,05$  ble videre analysert på SEC.

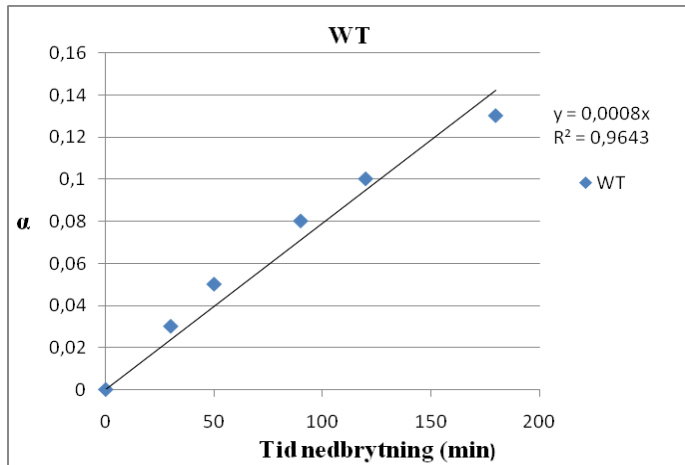


**Figur 4.10:** Spekteret viser nedbrytning av kitosan ( $F_A = 0,63$ ) ved mutant R446 i 70 min ved konsentrasjon  $25\mu\text{g}/10\text{mg}$  ( $\alpha = 0,05$ ).

Den reduserende enden til  $\alpha$ -anomeren av en acetyllert enhet gir resonans ved 5,19 p.p.m., mens  $\beta$ -anomeren fra samme enhet gir resonans ved 4,7-4,8 p.p.m. D- og A- enheter inne i, og ved ikke-reduserende ender gir resonans ved henholdsvis 4,9 og 4,6 p.p.m [14].

Som tidligere nevnt (seksjon 1.11.1) representerer  $k_{\text{cat}}$ , *turnover number*, antall substratmolekyler hvert enzym konverterer til produkt per tidsenhet, antall hydrolyser av glykosidbindinger per minutt. Fordi det hastighetsbestemmende trinnet vil være forskyvning og frigjøring av produkt når substratet er kitosan, kan  $k_{\text{cat}}$  direkte relateres til prosessivitet [5]. For bestemmelse av  $k_{\text{cat}}$  for de ulike mutantene ble  $\alpha$ - verdiene, bestemt ved  $^1\text{H}$  NMR-

analyse, plottet mot tid som vist i figur 4.11. Stigningstallet i den lineære, initielle fasen ble bestemt og ved hjelp av ligning 1.6 kunne den aktuelle parameteren estimeres.



**Figur 4.11:**  $\alpha$  som funksjon av tid (min) for ChiB WT. Plottet ble benyttet til beregning av *apparent*  $k_{cat}$ .

$\alpha$  som funksjon av tid gjennomført for de ulike mutantene viste alle estimert  $R^2$ -verdi  $\approx 0,95$ , som tilsvarer en god tilpasning av datasettet.

**Tabell 4.4:** Estimert  $k_{cat}$  for de ulike mutantene, hvor kitosan har blitt benyttet som substrat.  $\alpha$  plottet mot tid og stigningstallet i den initielle fasen ble videre satt inn i likning 1.6 for estimering av parameteren. Forsøket ble utført i kun en parallell.

Enzym	Apparent $k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )
WT	$19 \pm 1,7$
R446	$21 \pm 1,1$
F190A	$15 \pm 1$
F191A	$25 \pm 1,5$
D316A	$19 \pm 5,1$
W97A	$401 \pm 2,9$
W220A	$422 \pm 2$
W97A/ D316A	$570 \pm 0,8$
W97A/ W220A	$1230 \pm 1,4$

Tabell 4.4 viser at dobbeltmutantene har høyere apparent  $k_{cat}$  – verdi sammenlignet med de andre enzymene. Det er foreslått en ikke- prosessiv mekanisme for begge disse mutantene. W97A/W220A viser høyeste verdi,  $1230 s^{-1}$ , det vil si en gjennomsnittlig omdannelse av 1230 substratmolekyler til produkt per sekund. Den andre dobbeltmutanten, W97A/D316A, viser og en av de høyeste  $k_{cat}$ - verdiene, men har halvparten så lav verdi som W97A/ W220A. I tillegg viser de antatt ikke- prosessive enzymene W97A og W220A høye  $k_{cat}$ - verdier på henholdsvis 401 og  $422 s^{-1}$ . De antatt prosessive enzymene ChiB-WT, R446, F191A og D316A har  $k_{cat}$ - verdier flere ganger lavere. Dette gjelder også mutant F190A som har vist ikke- prosessive tendenser.

#### 4.4.2 SEC

ChiB har en absolutt preferanse for acetyllert enhet i -1 subsetet ved hydrolyse av kitin eller kitosan. Fordi enhetene i substratet er vridd  $180^\circ$  i forhold til hverandre (seksjon 1.6.6) vil kun annenhver sukkerenhet kunne binde produktivt til enzymet. Dette vil derfor hovedsakelig gi partalls- oligomerer ved prosessiv katalyse fordi ved en ikke produktiv binding vil polymeren alltid flyttes med to sukkerenheter før neste forsøk på produktiv binding. En ikke-prosessiv katalyse vil gi en tilfeldig distribuering av partalls- og oddetalls- oligomerer. Ved å se på partalls/oddetalls ratio mellom toppene er det derfor mulig å si noe om enzymets prosessive egenskaper i forbindelse med degradering av substrat.

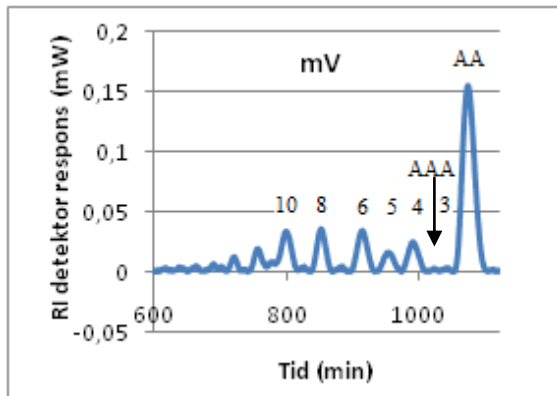
Størrelseseksklusionskromatografi retarderer og separerer kitoooligosakkarider i henhold til størrelse (seksjon 1.10.4). Figurene 4.12- 4.20 viser fordeling av degraderingsproduktene fra hydrolyse av kitosan ( $F_A = 0,63$ ), uttak ble gjort med ulike tidsintervaller.

Voidtoppen, også kalt polymertoppen, ble fjernet fra prøven før analyse. Dette ble gjort for en enklere identifisering av toppene i kromatogrammene. Voidtoppen vil inneholde polymerer med DP større enn 40.

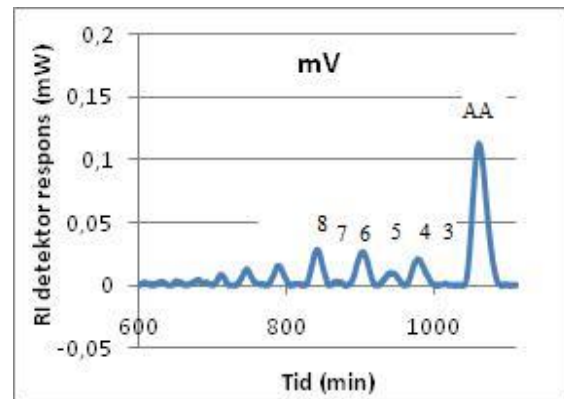
Toppene i kromatogrammet er merket enten med nummerering som indikerer lengden på polymerkjeden (DP), eller med sekvensen til oligomeren hvis toppen kun inneholder en dimer. Annoteringen til toppene baserer seg på bruk av standard prøver samt  $^1\text{H}$  NMR-analyse (A. Sørbotten et. al. 2004). I tillegg er det her også brukt MS. Et eksempel er vist for R446 i figur 4.20. Dimerfraksjonene vil eluere ut i to topper identifisert som AA-, to acetyllerte enheter, og DA-, en deacetyllert og en acetyllert enhet. På samme måte vil også trimer og tetramer fraksjonene eluere ut i to topper [14].

Prøvene som etter  $^1\text{H}$  NMR- analyse viste en  $\alpha$ - verdi  $\approx 0,05$  ble analysert på SEC.

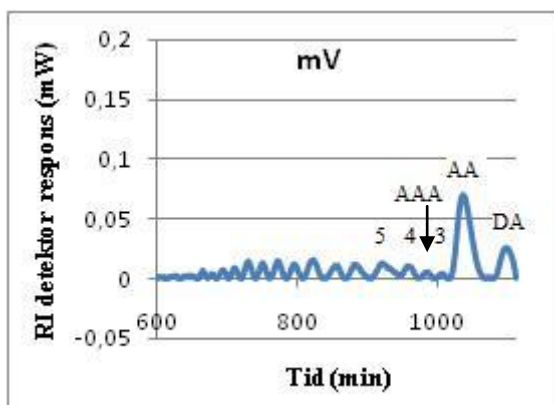
Resultatene for partalls/oddetalls ratio for toppene i kromatogrammene for de ulike mutantene er fremstilt i tabell 4.5. Høy partall/oddetall ratio indikerer større grad av prosessivitet for hver aktuelle mutant.



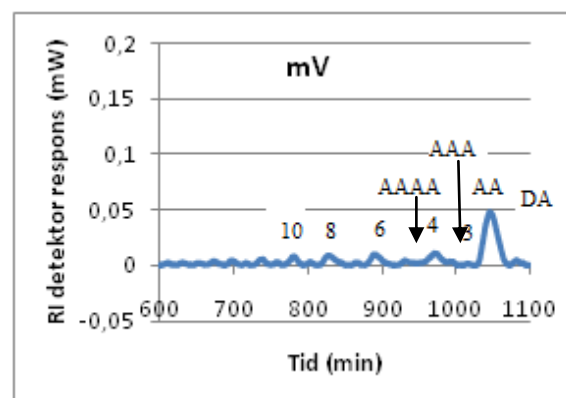
**Figur 4.12:** SEC- kromatogrammet viser distribusjon av oligomer fraksjonene for kitosan hydrolysert av ChiB WT i 50 min min,  $\alpha \approx 0,05$ .



**Figur 4.13:** SEC- kromatogrammet viser distribusjon av oligomer fraksjonene kitosan hydrolysert av mutant R446 i 70 min,  $\alpha \approx 0,05$ .

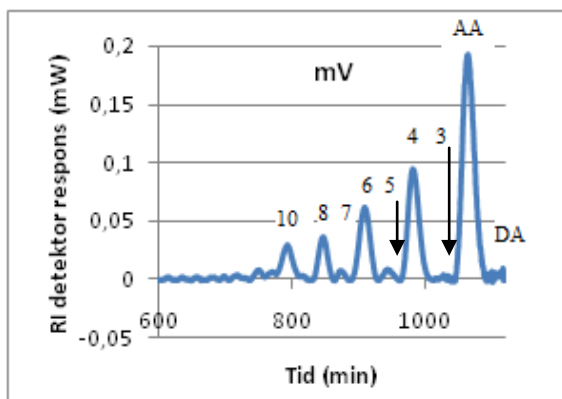


**Figur 4.14:** SEC- kromatogrammet viser distribusjon av oligomer fraksjonene for kitosan hydrolysert av mutant F190A i 90 min,  $\alpha \approx 0,05$ .

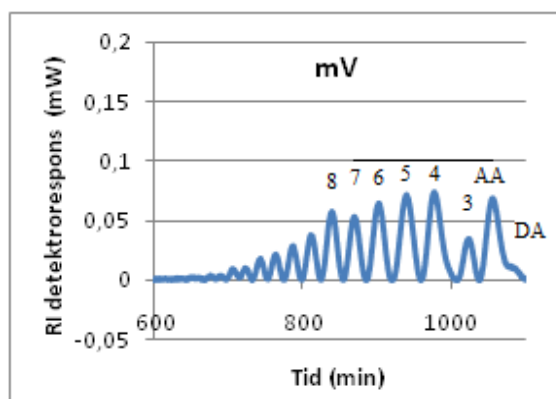


**Figur 4.15:** SEC- kromatogrammet viser distribusjon av oligomer fraksjonene for kitosan hydrolysert av mutant F191A i 90 min,  $\alpha \approx 0,05$ .

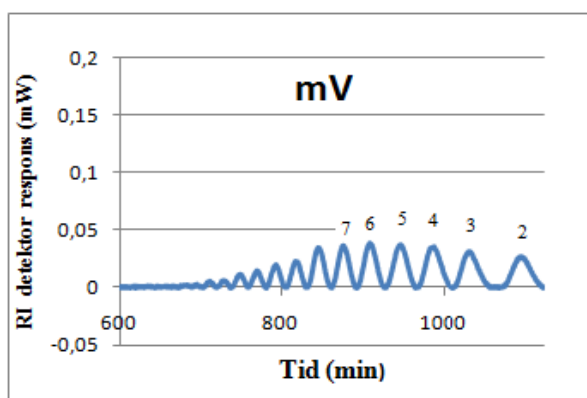




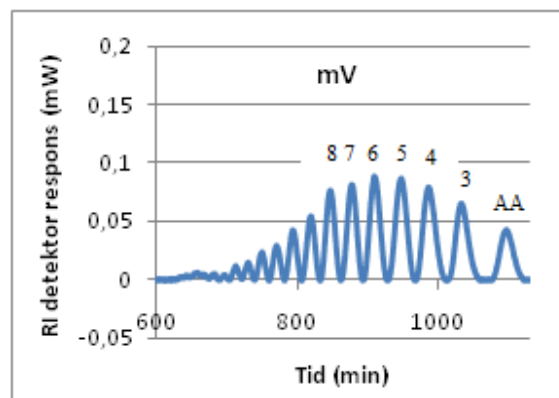
**Figur 4.16:** SEC- kromatogrammet viser distribusjon av oligomer fraksjonene for kitosan hydrolysert av mutant D316A i 37 min  $\alpha \approx 0,05$ .



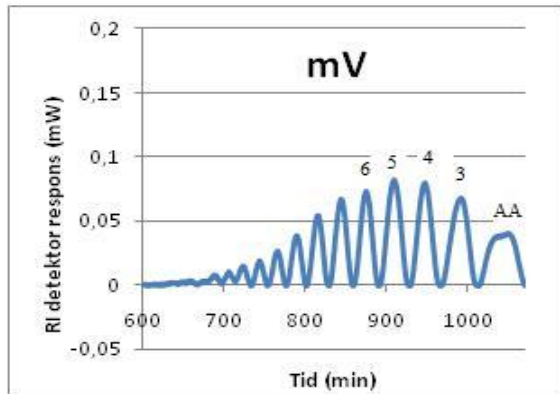
**Figur 4.17:** SEC- kromatogrammet viser distribusjon av oligomer fraksjonene for kitosan hydrolysert av mutant W97A i 5 min  $\alpha \approx 0,07$ .



**Figur 4.18:** SEC- kromatogrammet viser distribusjon av oligomer fraksjonene for kitosan hydrolysert av mutant W220A i 90min,  $\alpha \approx 0,1$ .



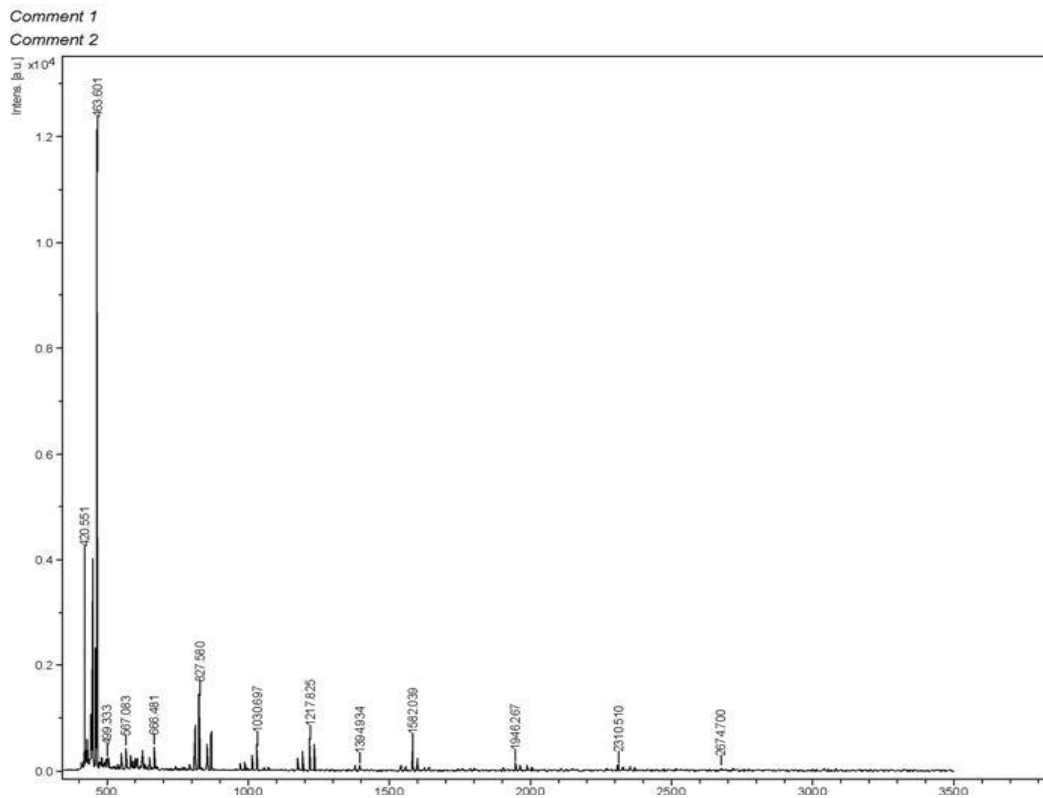
**Figur 4.19:** SEC- kromatogrammet viser distribusjon av oligomer fraksjonene for kitosan hydrolysert av mutant W97A/W220A i 15 min,  $\alpha \approx 0,03$ .



**Figur 4.20:** SEC- kromatogrammet viser distribusjon av oligomer fraksjonene for kitosan hydrolysert av mutant W97A/D316A i min  $\alpha \approx 0,1$ .

Figurene 4.12, 4.13, 4.15 og 4.16 viser kromatogram for henholdsvis WT, R446, F191A og D316A som i stor grad består av korte partallsoligomerer (DP 2-12), og tyder derfor på en prosessiv degraderingsmekanisme. Initielt vil enzymet binde enten fra subseite -3 eller -2, det vil si at det første hydrolytiske kuttet vil gi enten en trimer eller en dimer. Dersom katalysen er prosessiv vil enzymet forbli bundet til substratet og videre gi dimerer (og partallsoligomerer dersom substratet er kitosan). Kromatogrammene viser partallstopper med større areal enn oddetallstopperne, som tyder på en slik prosessiv hydrolyse.

I kromatogrammene vist i figurene 4.14, 4.17, 4.19 og 4.20, henholdsvis for F190A, W97A og W97A/W220A og W97A/D316A, viser alle toppene relativt lik arealstørrelse, som tyder på lik dannelse av partalls og oddetalls oligomerer i prøven. Dette antyder en ikke-prosessiv katalyse.



**Figur 4.21:** MS-spekteret for mutant R446. Ved å sammenligne toppene i spekteret med en masseliste for uderivatiserte oligomerer var det mulig å identifisere de ulike toppene i spekteret.

#### 4.4.2 Partalls/oddetalls ratio

Partalls/oddetalls ratio i sec- kromatogrammene indikerer grad av prosessivitet hos de ulike enzym variantene.

Tabell 4.5 viser at WT har estimert dimer/trimer ratio lik 76, som kan tyde på høy grad av prosessivitet. I motsetning til WT viser dobbelmutantene W97A/W220A og W97A/D316A en dimer/trimer ratio lik 0,6, noe som indikerer en lav grad av prosessivitet. Videre viser begge dobbelmutantene tetramer/pentamer samt heksamer/ heptamer ratio tilnærmet lik 1, det vil si at toppene er like store noe man også kan se av kromatogrammene (fig 4.11- 4.19). En slik lav ratio forsterker antydningene om at disse mutantene har en ikke- prosessiv hydrolyse av substratet kitosan.

**Tabell 4.5:** Beregnet ratio mellom henholdsvis dimer/ trimertoppene, tetramer /pentamertoppene og hexamer/ heptamertoppene for SEC- kromatogrammene hvor estimert  $\alpha \approx 0,05$ . Høyere forhold indikerer høyere grad av prosessivitet.

Enzym	Dimer/ trimer	Tetramer/ pentamer	Heksamer/ heptamer
WT	76	1,5	10,7
R446	55,7	2,1	10,7
F190A	22,5	0,5	1
F191A	79,6	2,5	3,7
D316A	63,9	11,3	8,5
W97A	1,9	1	1,3
W220A	1	1	1
W97A/ D316A	0,6	1	1
W97A/ W220A	0,6	0,9	1

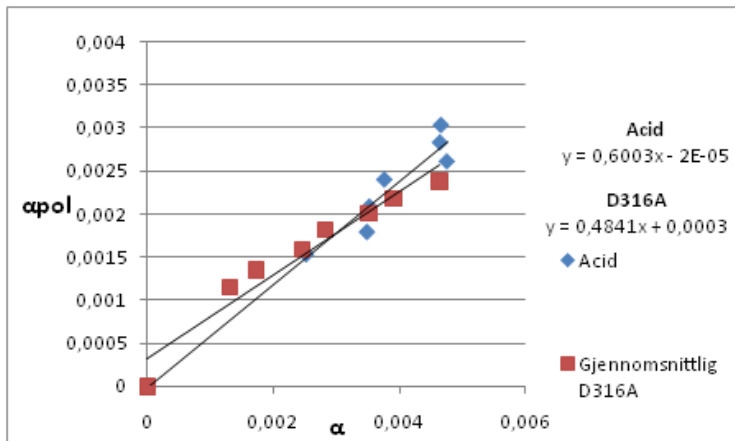
#### 4.5 Viskositetsmåling:

Viskositetsmålinger benyttes til å studere to parametere; grad av prosessivitet og enzymets endo- og eller ekso- aktivitet.

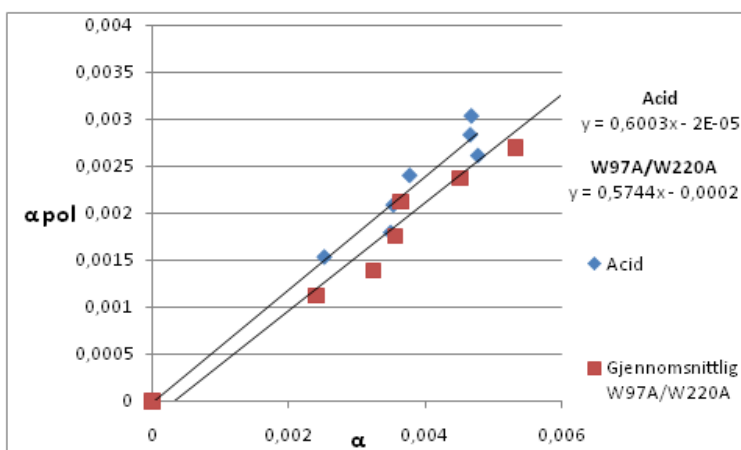
Ved å bruke data fra viskositetsmålingene i kombinasjon med reduserende ende assay foretatt for hver av ChiB mutantene var det mulig å beregne gjennomsnittlig antall kutt enzymet utfører for hver assosiasjon med substratet ( $N_{\text{cuts}}$ ).

Det ble i denne oppgaven foretatt viskositetsmålinger for nedbryting av kitosan ved hjelp av mutantene; D316A, W97A/W220A og W97A/D316A (to paralleller for D316A og W97A/W220A, og en for W97A/D316A grunnet lite tilgang enzym for denne mutanten). I forsøkene hvor det ble foretatt to paralleller ble et gjennomsnitt av målingene brukt for fremstilling av grafen. Figur 4.22 til 4.24 viser grafene for viskositetsmåling av ChiB

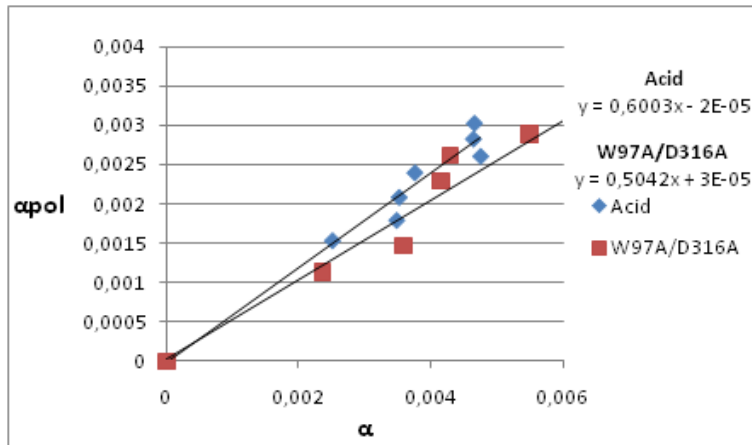
mutantene plottet sammen med viskositetsmålinger for syrenedbrytning av kitosan til sammenligning. Man antar at syre foretar en hydrolyse per assosiasjon med substrat.



**Figur 4.22:**  $\alpha_{pol}$  som funksjon av  $\alpha_{tot}$  for ChiB mutant D316A sammenlignet med viskositetsmålingen for syre.  $\alpha_{pol}$  representerer gjennomsnittlig kjedelengde i polymerfraksjonen, og  $\alpha_{tot}$  konsentrasjon av reduserende ender. Det ble gjennomført to paralleller av forsøket og en gjennomsnittsverdi av  $\alpha_{pol}$  og  $\alpha_{tot}$  ble benyttet for lineær regresjon av datasettet. Stigningstallet ble benyttet for estimering av  $N_{cuts}$ .



**Figur 4.23:**  $\alpha_{pol}$  som funksjon av  $\alpha_{tot}$  for ChiB mutant W97A/ W220A sammenlignet med viskositetsmålingen for syre.



**Figur 4.24:**  $\alpha_{pol}$  som funksjon av  $\alpha_{tot}$  for ChiB mutant W97A/D316A sammenlignet med viskositetsmålingen for syre.

Tidligere, i sammenheng med dette prosjektet, er  $N_{cuts}$  for ChiB-WT og R446 (Ellinor B. Heggset, NTNU og Anne Line Norberg, UMB) og for F190A, F191A og W220A (Heggset). Disse tallene er samlet i tabell 4.6 sammen med de tallene som er bestemt i denne oppgaven. Verdiene blir tatt med i oppgaven for å få en mer helhetlig fremstilling av resultatene.

**Tabell 4.6:** Stigningstallet fra viskositetsplottet for  $\alpha_{pol}$  plottet mot  $\alpha_{tot}$  for ChiB WT, samt mutantene. I tillegg estimert gjennomsnittlig  $N_{cuts}$ -verdi for mutantene etter kjøring av to paralleller for hver mutant, bortsett fra W97A/ D316A.

Enzym	Stigningstall	$N_{cuts}$
Syre	0,6	1
WT	0,2	3,6
R446	0,2	3
F190A	0,5	1,7
F191A	0,3	2,7
D316A	0,5	2
W97A	-	-
W220A	0,4	1,5
W97A/ D316A	0,6	1,7
W97A/ W220A	0,5	1,1

Av tabell 4.6 ser man at mutanten D316A viser gjennomsnittlig 2 kutt per assosiasjon med substratet ( $\alpha_{pol}$  som funksjon av  $\alpha_{tot}$ ). Sammenlignet med syre, W97A/W220A og W97A/D316A som vil foreta henholdsvis 1, 1,1 og 1,7 kutt, indikerer dette større grad av prosessivitet for enkelt mutanten enn for de to dobbelt mutantene. For alle mutantene ligger estimert  $R^2$ -verdi rundt 0,9 noe som tilsier en relativt god tilpasning av verdiene. Mutant W97A/W220A viser at den gjennomsnittlig vil foreta noe gjennomsnittlig litt over ett kutt per assosiasjon med substrat som ikke tilsier store prosessive egenskaper. Estimert  $N_{cuts}$ -verdi for mutant W97A/D316A er 1,7 kutt per assosiasjon med substrat ved sammenligning med syre og W97A/W220A viser dette at dobbeltmutanten er noe mer prosessiv enn de to, men ved sammenligning med ChiB-WT har denne mutanten lav prosessiv aktivitet.

ChiB-WT gir laveste stigningstall og estimert  $N_{cuts}$ -verdi lik 3,6 (tabell 4.11). Dette indikerer større grad av prosessivitet for dette enzymet enn for de andre mutantene som alle har høyere stigningstall, og derved lavere  $N_{cuts}$ -verdi.

Alle  $N_{cuts}$ -verdier er justert i forhold til syre hydrolyse med antagelse om at syre kun foretar et kutt for hver substratassosiasjon.

## 4.6 Nedbrytning av kitin med ulik grad av substrattilgjengelighet

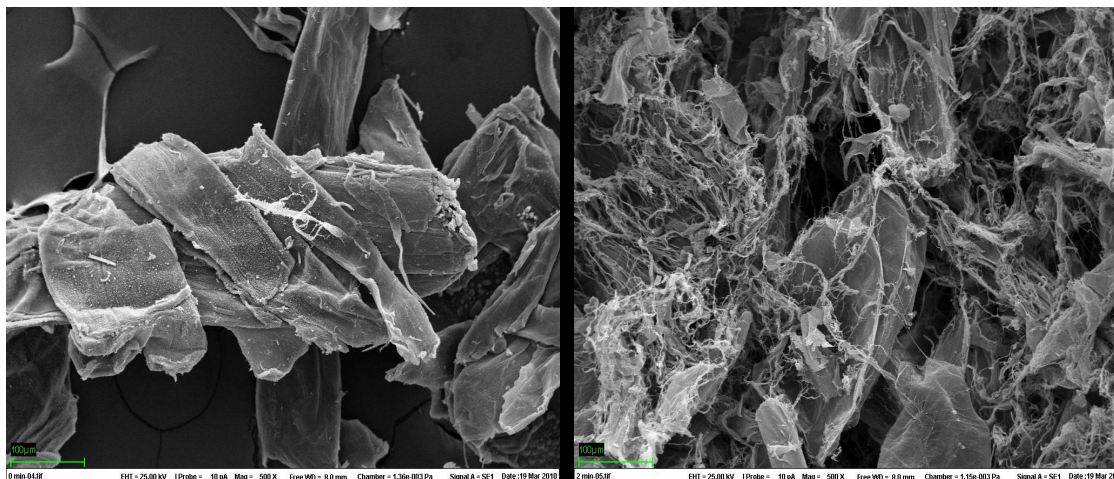
Ved å inkubere enzym med substrat over en viss periode med regelmessige uttak var det mulig å få et estimat på  $k_{cat}$  og prosessivitet.

ChiB-WT og mutant R446 ble testet mot fire ulike substratvarianter: kitin, sonikert kitin, kitin med CBP21, og sonikert kitin med CBP21. Både sonikering av kitin og tilstedeværelse av hjelpeproteinet CBP21 vil bidra til økt tilgjengelighet av substrat og forsøket vil følgelig belyse hvilken effekt dette vil ha på enzym- effektivitet og prosessivitet.

I tillegg ble de resterende mutantene, F190A, F191A, D316A, W97A, W220A, D316A/ W97A, W97A/W220A, testet mot ikke-sonikert kitin for å bestemme effekten mutasjonene har på apparent  $k_{cat}$  i forhold til WT. Dette ble gjort for å kunne sammenligne de aktuelle resultatene, turnover per tid og prosessivitet, mot resultatene oppnådd for nedbrytning når substratet var kitosan.

Figur 4.23 viser kitin før og etter sonikering hvor man tydelig kan se at sonikeringen har hatt effekt på substratet ved å gjøre kitinkjedene mer tilgjengelige.





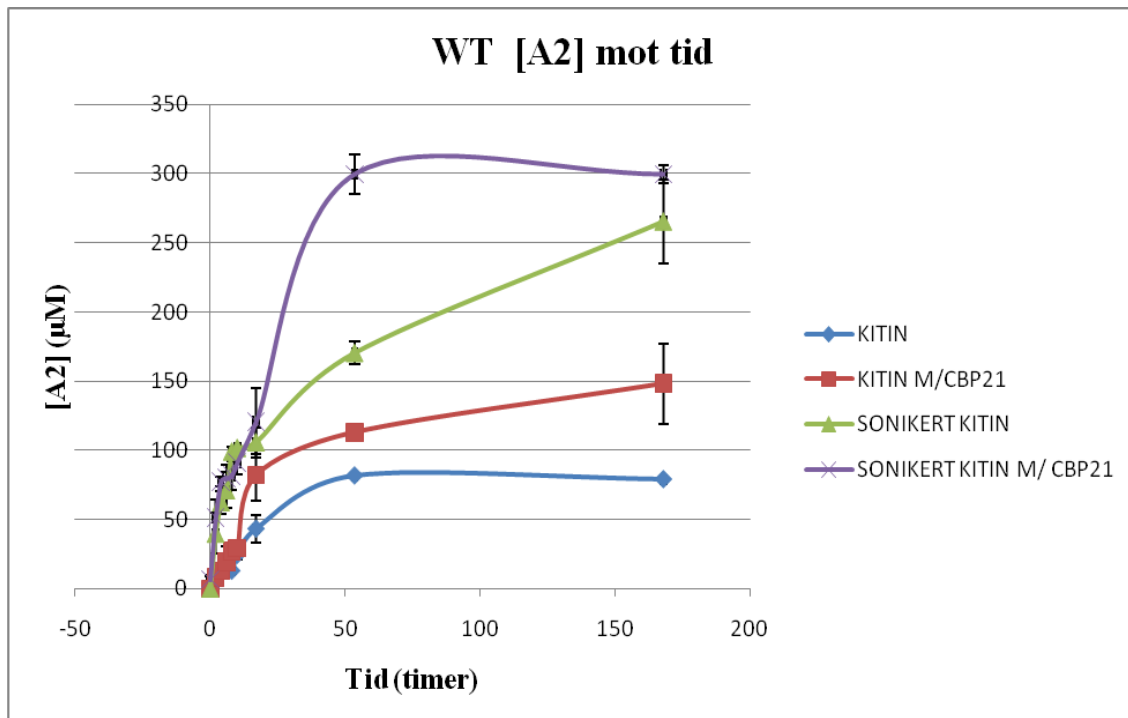
**Figur 4.23:** Kitin før og etter sonikering (Kristine B. Eide). Ultralyd-sonikering ble foretatt i 2 minutter som medfører brudd i interaksjoner mellom sukkerkjedene og gjør kitinet mer tilgjengelig for enzymer.

Uttaksprøvene ble analysert på HPLC med hensyn til å bestemme konsentrasjonen til produsert [A2] og [A1] både mot tid for å estimere en apparent  $k_{cat}$  og som en konsentrasjonsratio for å måle grad av prosessivitet. Alle forsøk ble utført i tre paralleller og en snittverdi av de estimerte verdiene ble benyttet for å regne ut parametrene.

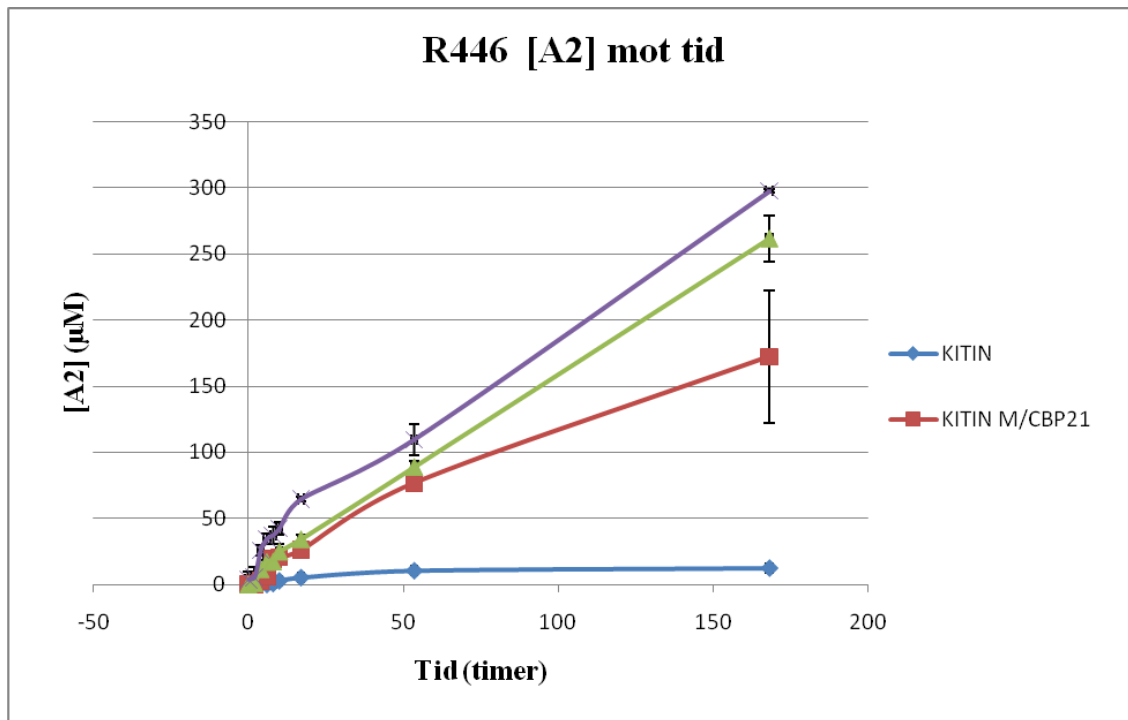
#### 4.6.1 [A2] mot tid og $k_{cat}$

[A2] ble plottet mot tid for å observere nedbrytning over tid. Figur 4.24 og 4.25 viser konsentrasjon av A2 plottet mot tid for ChiB WT og R446, respektivt. Begge proteinene ble testet mot samtlige substratvarianter. ”Error bars” for hvert datapunkt representerer standardavviket mellom de tre målingene utført for hvert punkt. Et gjennomsnitt av verdiene er benyttet i plottet.

[A2] mot tid for de andre mutantene, som kun ble testet mot kitin, finnes i appendix (seksjon 7.7). Tabell 4.7 viser en oversikt over sluttkonsentrasjon av dimer (A2) for samtlige ChiB kitinasene.



**Figur 4.24:** Gjennomsnittlig [A2] fra tre parallellforsøk plottet mot tid for ChiB WT når det ble testet mot kitin, kitin med CBP21, sonikert kitin og sonikert kitin med CBP21. "Error bars" i hvert datapunkt viser hvor mye parallellene i forsøket varierte.



**Figur 4.25:** Gjennomsnittlig [A2] fra tre parallellforsøk plottet mot tid for R446 når det ble testet mot kitin, kitin med CBP21, sonikert kitin og sonikert kitin med CBP21. "Error bars" i hvert datapunkt viser hvor mye parallellene i forsøket varierte.

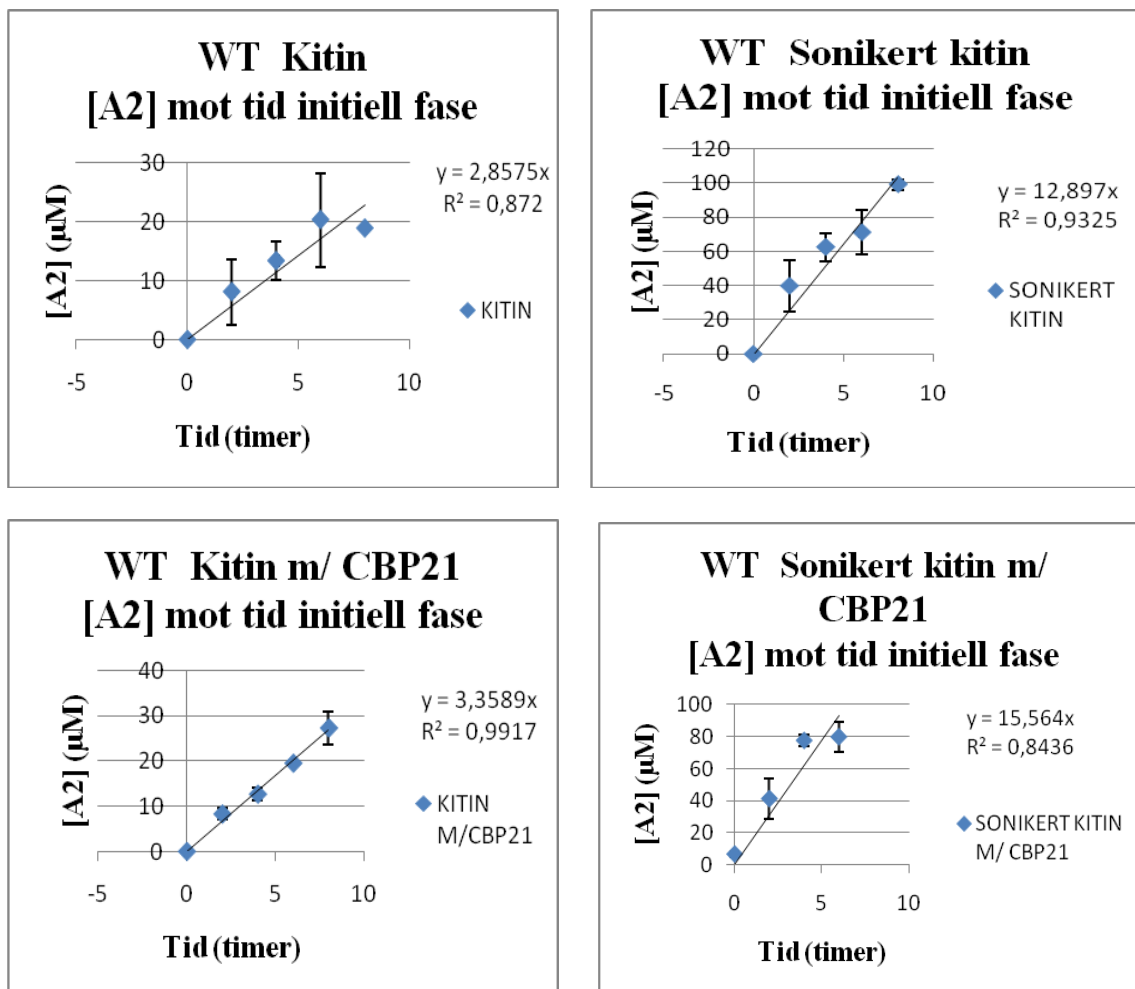
**Tabell 4.7:** Sluttkonsentrasjon av dimer [A2] ( $\mu\text{M}$ ) for samtlige mutanter etter inkubasjon med den aktuelle substratvarianten i 168 timer. Estimater er en gjennomsnittsverdi av de tre parallell- målingene, samt standardavvik av disse. WT og R446 ble testet mot samtlige substrater, mens de resterende mutantene kun ble testet mot kitin.

<b>[A2] (<math>\mu\text{M}</math>) etter 168 timer</b>				
<b>Enzym</b>	<b>Kitin</b>	<b>Sonikert kitin</b>	<b>Kitin m/ CBP21</b>	<b>Sonikert kitin m/ CBP21</b>
WT	$79 \pm 2$	$148 \pm 2$	$265 \pm 29$	$299 \pm 6$
R446	$12 \pm 1$	$172 \pm 18$	$262 \pm 50$	$298 \pm 1$
F190A	$9 \pm 0$	-	-	-
F191A	$27 \pm 1$	-	-	-
D316A	$26 \pm 2$	-	-	-
W97A	$16 \pm 1$	-	-	-
W220A	$19 \pm 1$	-	-	-
W97A/ D316A	$5 \pm 2$	-	-	-
W97A/ W220A	$7 \pm 1$	-	-	-

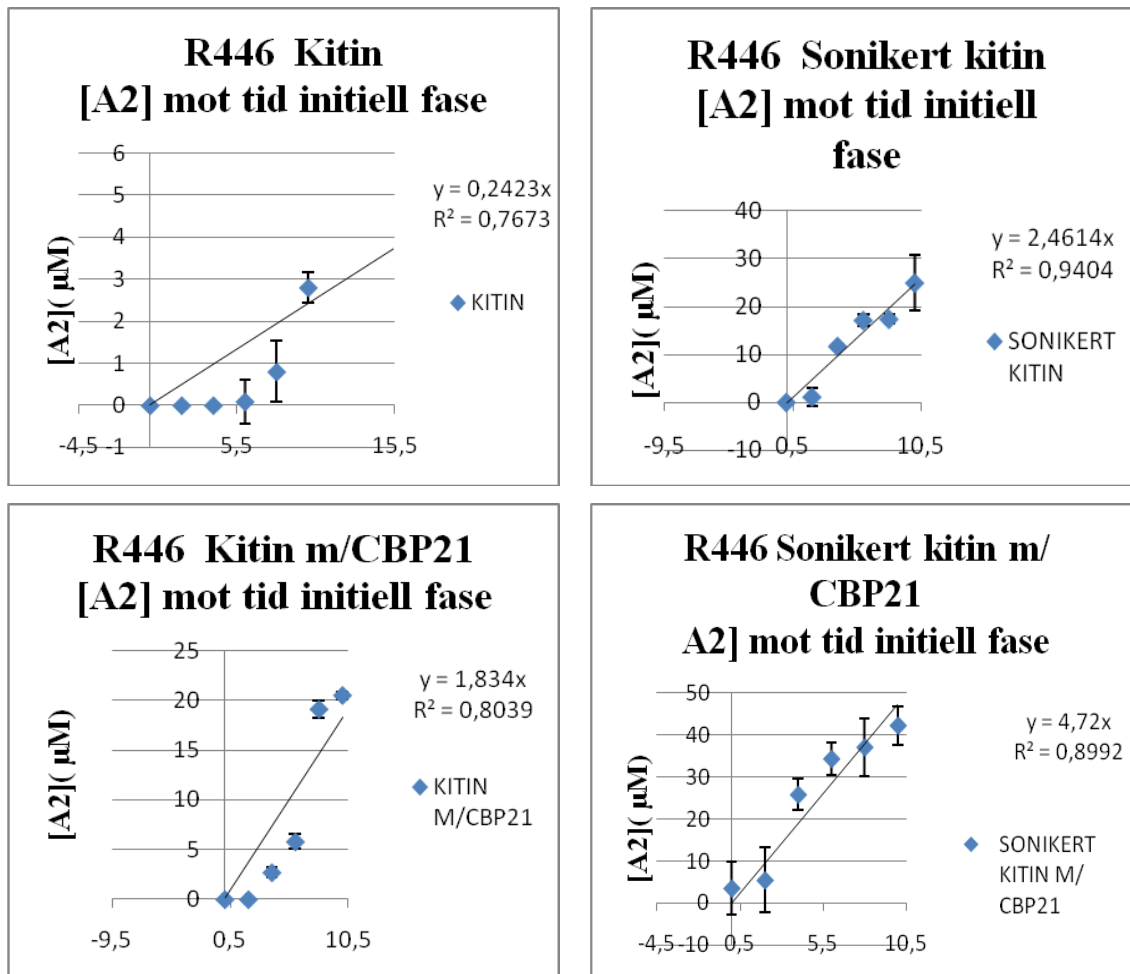
Av figurene for både ChiB WT og mutant R446 ser man at sluttkonsentrasjon for dimer (A2) er klart høyest når substratet er sonikert kitin med CBP21 og lavest når substratet er kitin uten CBP21. "Error bars" for punktene fremstiller variasjon i datasettet, hvorav noen målinger er mer avvikende enn andre. Helhetlig ser man uansett at distinksjonen mellom parallellene er liten med forholdsvis lave standardavvik.

Ved å beregne stigningstallet i den lineære initielle fasen av gjennomsnittlig [A2] mot tid plottet er det mulig å få et estimat for apparent  $k_{\text{cat}}$  siden substratet er i stort overskudd i forhold til enzymkonsentrasjon under de gitte betingelsene [5]. Stigningstallet i dette tidsrommet vil være lik den maksimale hastigheten,  $V_{\text{max}}$  ( $\mu\text{M}/\text{t}$ ). Ved å dividere på enzymkonsentrasjonen som ble benyttet i forsøket,  $0,2 \mu\text{M}$ , og deretter dele på 60 minutt/time, vil man få et estimat på  $k_{\text{cat}}$  (ligning 1.6). Benevnning vil da være  $\text{min}^{-1}$  og være et anslag på hvor mange katalytiske brudd enzymet utfører per minutt. Figurene 4.26 og 4.27

viser lineær regresjon av datapunktene i den initielle fasen av degraderingen av kitin for henholdsvis WT og mutant R446 med stigningstall,  $R^2$ - verdi og ”error bars”.



**Figur 4.26 :** Gjennomsnittlig [A2] plottet mot tid i den initielle nedbrytningsfasen for WT testet mot de ulike substratene. Stigningstallet i denne fasen ble benyttet til å estimere  $k_{cat}$ . ”Error bars” viser variasjon i dataene.



**Figur 4.27:** Gjennomsnittlig [A2] plottet mot tid i den initielle nedbrytningsfasen for R446 testet mot de ulike substratene. Stigningstallet i denne fasen ble benyttet til å estimere  $k_{cat}$ . "Error bars" viser variasjon i dataene.

Figurene for beregning av stigningstall i initiell fase viser en noe lav  $R^2$ - verdi noe som antyder dårlig korrelasjon mellom datasett og graf. Grad av variasjon mellom parallellene ("error bars") er varierende, hvorav noen datapunkter viser svært avvikende målinger og andre ikke. Tabell 4.8 viser beregnet  $k_{cat}$  for samtlige mutanter mot det aktuelle substratet. Usikkerheten i  $k_{cat}$  ligger i tilpasning av dataene til grafen i den initielle fasen, samt avvik mellom de tre parallellene. De fleste relative standardavvikene var  $< 25\%$ , noe som tyder på forholdsvis god nøyaktighet og presisjon i forsøkene.

**Tabell 4.8:** Estimert  $k_{cat}$  for de ulike mutantene. WT og R446 ble testet mot alle substratvarianter, mens de gjenstående mutantene kun ble testet mot kitin. Parameteren er estimert ved å plote gjennomsnittlig  $[A2]$  for de tre parallellforsøkene mot tid i den initielle fasen. Det ble videre utført lineær regresjon for estimering av stigningstall som videre ble benyttet til å beregne  $k_{cat}$  ved hjelp av ligning 1.1.

Enzym	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )			
	Kitin	Sonikert kitin	Kitin m/ CBP21	Sonikert kitin m/ CBP21
WT	$0,2 \pm 0,84$	$1,08 \pm 9,1$	$0,3 \pm 1,1$	$1,3 \pm 16$
R446	$0,02 \pm 2,4$	$0,23 \pm 2,6$	$0,15 \pm 1,9$	$0,43 \pm 5,3$
F190A	$0,01 \pm 0,2$	-	-	-
F191A	$0,03 \pm 0,5$	-	-	-
D316A	$0,03 \pm 0,2$	-	-	-
W97A	$0,02 \pm 1$	-	-	-
W220A	$0,01 \pm 0,2$	-	-	-
W97A/ D316A	$0,01 \pm 0,2$	-	-	-
W97A/ W220A	$0,02 \pm 0,6$	-	-	-

#### 4.6.2 $[A2]/ [A1]$ ratio

$[A2]/ [A1]$  ratio vil være et mål på grad av prosessivitet da  $[A1]$  indikerer initiell binding av proteinet til substratet. Tabell 4.9 viser  $[A2]/ [A1]$  ratio etter 168 timer for alle enzymvariantene hvor WT og mutant R446 ble testet mot samtlige substratvarianter, mens de resterende mutantene kun ble testet mot kitin. Målingene ble utført i tre paralleller og verdiene er beregnet ved å dele gjennomsnittlig dimerkonsentrasjon på gjennomsnittlig monomerkonsentrasjon. Både ChiB WT og R446 viste signifikant høyere ratio når substratet var sonikert kitin og når reaksjonsmiksen var tilsatt hjelpeproteinet CBP21.

Sammenligning av  $[A2]/ [A1]$  ratio for alle de ulike enzymvariantene når substratet var kitin, viser at enzymer som WT, F191A og D316A, har høyest ratio (2,9 til 4,1) mens F190A,

W97A, W97A/ W220A og D316A/ W97A, fremviser en mye lavere ratio (1- 1,6). Dette gjelder også for mutant R446 hvor hele det kitinbindende domenet er kuttet bort.

**Tabell 4.9:** Beregnet  $[A2]/ [A1]$  ratio for WT og mutanter av ChiB etter inkubasjon med substrat i 168 timer. Forsøket ble utført i tre paralleller og en gjennomsnittverdi av disse ble brukt for estimering av parameteren.

<b>[A2]/ [A1] ratio etter 168 timer</b>				
<b>Enzym</b>	<b>Kitin</b>	<b>Sonikert kitin</b>	<b>Kitin m/ CBP21</b>	<b>Sonikert kitin m/ CBP21</b>
WT	4,1	10	6,3	10,4
R446	1	1,5	2,2	2,4
F190A	1,1	-	-	-
F191A	2,9	-	-	-
D316A	3	-	-	-
W97A	1	-	-	-
W220A	1,6	-	-	-
W97A/ D316A	1	-	-	-
W97A/ W220A	1	-	-	-

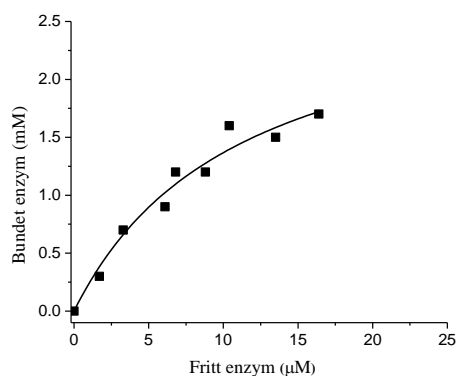
Dataene fra tabell 4.9 viser at  $[A2]/ [A1]$  ratio øker med økende grad av substrattilgjengelighet, det vil si når substratet er sonikert eller inkubasjonsmiksen er tilsatt hjelpeprotein CBP21. Dette tyder på at enzymets grad av prosessivitet, i tillegg til å være avhengig av proteinet selv, også er avhengig av substratets morfologi.



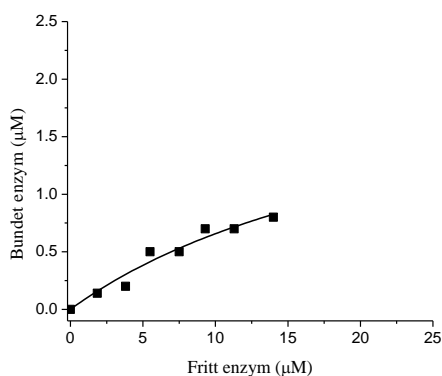
## 4.7 Substratbindingsassay mot kitin

$K_D$  og  $\Delta G$  for ChiB-WT og de ulike mutantene ble bestemt ved å inkubere enzym og kitin konstant trykk og temperatur i 3 timer (seksjon 3.7).

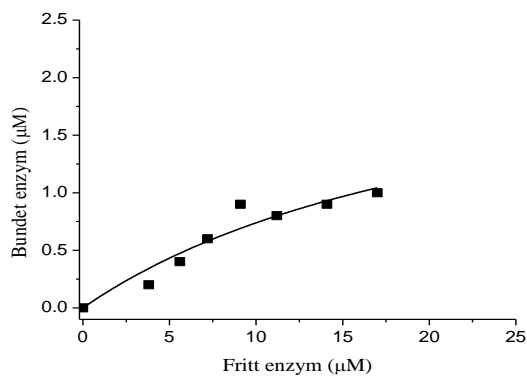
UV- absorbans ved 280 nm ble så avlest, og ved hjelp av en tidligere utarbeidet standardkurve, individuell for hver enzymvariant, ble [enzym fritt] og [enzym bundet] beregnet og plottet mot hverandre. Plottene vises i figurene 4.28 – 4.34. Ved hjelp av en 1:1 hyperbolsk bindingsmodell (likning 1.3) ble dataene fra bindingsforsøket tilpasset for å gi  $K_D$ . Videre ble  $\Delta G$  beregnet ved hjelp av likning 1.4. Tabell 4.6 viser de estimerte verdiene for de respektive bindingsreaksjonene.



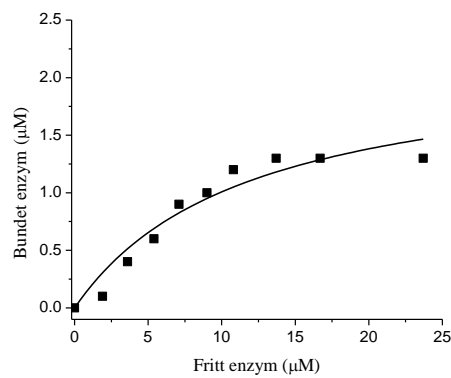
**Figur 4.28:** [enzym fritt] plottet mot [enzym bundet] for mutant WT. Punktene er eksperimentelle data fra tre parallellforsøk og en 1:1 hyperbolsk bindingsmodell er brukt for å tilpasse dataene.



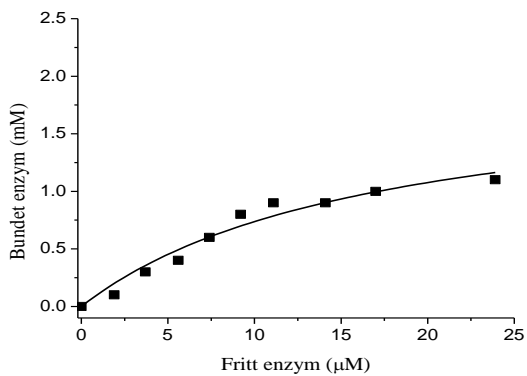
**Figur 4.29:** [enzym fritt] plottet mot [enzym bundet] for mutant R446. Punktene er eksperimentelle data fra tre parallellforsøk og en 1:1 hyperbolsk bindingsmodell er brukt for å tilpasse dataene.



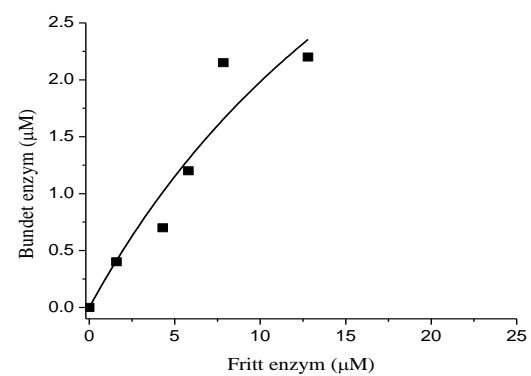
**Figur 4.30:** *[enzym fritt] plottet mot [enzym bundet] for mutant F190A. Punktene er eksperimentelle data fra tre parallellforsøk og en 1:1 hyperbolsk bindingsmodell er brukt for å tilpasse dataene.*



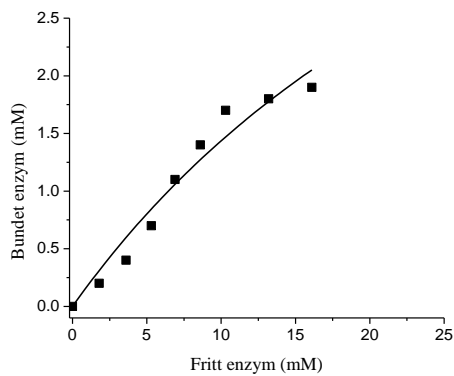
**Figur 4.31:** *[enzym fritt] plottet mot [enzym bundet] for mutant F191A. Punktene er eksperimentelle data fra tre parallellforsøk og en 1:1 hyperbolsk bindingsmodell er brukt for å tilpasse dataene.*



**Figur 4.32:** *[enzym fritt] plottet mot [enzym bundet] for mutant D316A. Punktene er eksperimentelle data fra tre parallellforsøk og en 1:1 hyperbolsk bindingsmodell er brukt for å tilpasse dataene.*



**Figur 4.33:** *[enzym fritt] plottet mot [enzym bundet] for mutant W97A. Punktene er eksperimentelle data fra tre parallellforsøk og en 1:1 hyperbolsk bindingsmodell er brukt for å tilpasse dataene.*



**Figur 4.34:** [enzym fritt] plottet mot [enzymbundet] for mutant W97A/ W220A. Punktene er eksperimentelle data fra tre parallellforsøk og en 1:1 hyperbolsk bindingsmodell er brukt for å tilpasse dataene.

**Tabell 4.10:** Beregnet  $K_D$  og  $\Delta G$  for ChiB WT, samt de ulike mutantene.  $K_D$  ble beregnet ved hjelp av likning 1.3.

Enzym	$K_D^a$	$\Delta G^b$
WT	$11 \pm 4$	-6.3
R446	$25 \pm 18$	-5.8
F190A	$25 \pm 20$	-5.8
F191A	$12 \pm 5$	-6.2
D316A	$17 \pm 6$	-6.0
W97A	$27 \pm 12$	-5.8
W220A	-	-
W97A/ D316A	-	-
W97A/ W220A	$26 \pm 36$	-5.8

<sup>a</sup> benevning i  $\mu\text{M}$ ; <sup>b</sup> benevning i kcal/mol. Verdien til  $\Delta G$  er for binding av enzym til kitin.

Tabellen viser at dissosiasjonskonstanten for ChiB-WT er 11  $\mu\text{M}$ . Videre viser dataene at mutanter som mangler en eller flere aromat-sukker stackinginteraksjoner har høyere  $K_D$  verdier (omtrent dobbel så høy) enn for WT.

Samtlige reaksjoner var eksoterme ( $\Delta G < 1$ ), det vil si at binding av enzym til substrat er en spontan prosess. Det var relativt godt korrelasjon mellom de tilpassede grafene og dataene ( $R^2 > 0,9$ ).

Det ble ikke utført målinger for W220A og W97A/D316A grunnet mangel på enzym (frysestockprøvene for disse forsvant i forbindelse med at en  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gikk i stykker og det var ikke tid nok til å utføre en kloning på nytt).

## 5 Diskusjon

Prosessivitet har vist seg å være en utfordrende egenskap å måle, det prøves derfor kontinuerlig å utarbeide effektive metoder [92]. Å kunne måle prosessivitet er en viktig faktor for å kunne forstå effektiv degradering av det uløselige krystallinske substratet kitin, som er viktig på veien til å finne en prosedyre for effektiv nedbrytning av biomasse.

I denne oppgaven ble ni kitinaser fra *S. marcescens*, en villtype og åtte mutanter, med hensyn på hvilke aminosyrer i enzymet er viktig for prosessiv hydrolyse ved bruk av flere metoder som kan benyttes til å kvantifisere prosessivitet. I tillegg er grad av prosessiv mekanisme blitt studert med hensyn på substrattilgjengelighet.

### 5.1 Prosessivitets studie av de ulike mutantene

#### 5.1.1 *ChiB-WT*

ChiB-WT er tidligere blitt studert med hensyn på prosessivitet og har i våre forsøk blitt benyttet som en kontroll. På samme måte som i tidligere forsøk (S. J. Horn et. al. 2006, og A. Sorbotten et. al. 2004), er det vist prosessiv aktivitet ved hydrolyse av kitin og kitosan.

##### 5.1.1.1 *Kitosan*

$k_{cat}$ - verdien for ChiB-WT ble estimert til  $19 \text{ s}^{-1}$ , det vil si at enzymet bryter 19 glykosidbindinger per sekund. Dette var et av de laveste estimatene sammenlignet med de andre mutantene. Lav  $k_{cat}$ - verdi antyder høy prosessiv aktivitet da det er vist sammenheng mellom de to parametrene [70]. Analyse av nedbrytningsproduktene av kitosan ved hjelp av SEC viste prosessiv degradering av kitosan med en dimer/trimer ratio på 76 og heksamer/ heptamer ratio på 10,7 (figur 4.11 og tabell 4.5). Viskositetsmålinger viser at det i snitt foretas 3,6 bindingsbrudd per substratassosiasjon i forhold det som forekommer i sterk syre (gjennomført av A. L. Norberg og E. B. Heggseth).

### **5.1.1.2 Kitin**

ChiB-WT viste prosessiv hydrolyse også når kitin var substratet med en [A2]/ [A1] forhold på 4,1. Det vil si at konsentrasjon av dimer er 4,1 ganger så stor som konsentrasjon av monomer.

Dette var den høyeste verdien som ble observert av alle enzymer som ble undersøkt.

Vedrørende kitin nedbrytninger er både hastigheten (~10 ganger) og effektiviteten (~3 ganger i forhold til de nest beste) høyere for ChiB-WT enn mutantene. Dette viser at når substratet er uløselig så er prosessivitet gunstig fordi flere hydrolyser foretas på substratet etter hver assosiasjon som er det mest energikrevende trinnet i katalysen, mens når det er motsatt når substratet er løselig.

### **5.1.2 R446**

Det er antatt at det kitinbindende domenet er viktig for nedbrytning av kitin gjennom å gjøre substratet mer tilgjengelig for hydrolyse. Som tidligere nevnt er aromatiske residuer nær det aktive setet viktig for prosessivitet [64]. På det kitinbindende domenet er det to aromater (Tyr-481 og Trp-497). Ved tilgang til R446, hvor det kitinbindende domenet er kuttet bort, er det mulig å studere bidraget aromater relativt langt borte fra det aktive setet samt hva substrattilgjengelighet har å si for prosessiv hydrolyse.

#### **5.1.2.1 Kitosan**

SEC- kromatogrammet av mutanten domineres av partallsfraksjoner med dimer/trimer og heksamer/hepamer forhold relativt likt som for ChiB-WT.

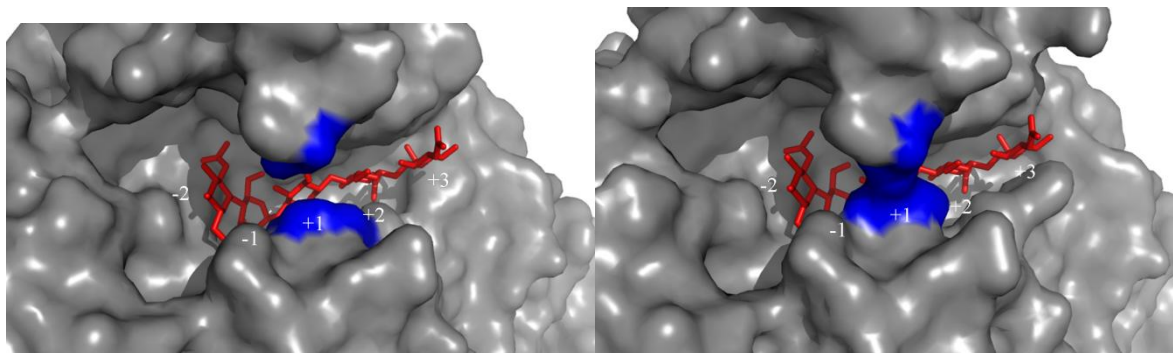
Videre har R446 en tilsvarende  $k_{cat}$ -verdi som for WT. Resultatene fra viskositetsmålingene for R446 (gjennomført av A. L. Norberg og E. B. Heggseth) viser at enzymet kutter gjennomsnittlig 3 ganger per assosiasjon mot 3,6 for ChiB-WT. Resultatene nevnt over indikerer at enzymet har prosessiv katalyse i tilnærmet samme grad som ChiB-WT, og med det at aromater relativt langt unna det aktive setet ikke er viktig i en prosessiv mekanisme mot et løselig substrat.

### 5.1.2.2 Kitin

Det er spesielt interessant å se at R446 ikke lenger er prosessiv mot uløselig kitin ( $[A2]/[A1] = 1$ ). Mutanten viser videre en 10 ganger lavere  $k_{cat}$ -verdi, samt en mye lavere sluttkonsentrasjon av dimer, enn WT. Selv om ikke aktivitetsparameteren direkte reflekterer prosessivitet, er det tidligere vist at prosessive enzymer er mer effektive mot uløselig kitin enn ikke-prosessive. Dette indikerer sterkt at substrattilgjengeligheten er viktig for prosessiv hydrolyse.

### 5.1.3 F190A

Mutasjon av Phe-190 som befinner seg i subsete +3 er spesielt interessant å studere. Denne er nær det aktive setet og en aromat samtidig som at den er mindre enn Trp (som er +1 og +2) og at den har en stor bevegelse ved substrat binding når denne stacker med en sukkergruppe (figur 5.1). Dette studiet viser tvetydige resultater.



**Figur 5.1:** Krystallstruktur for ChiB (venstre) før substratbinding med et  $(GlcNAc)_5$  molekyl modellert inn i det aktive sete og etter substratbinding (høyre) av  $(GlcNAc)_5$ . Det ses tydelig at Phe-190 (markert med et +3) beveger seg og stacker med sukkerenheten ved binding.

### 5.1.3.1 Kitosan

Kromatogrammet fra SEC-analysen (seksjon 4.4) for mutanten viste at toppene i kromatogrammet er like store noe som tyder på en ikke-prosessiv aktivitet med unntak av en markant dimertopp.

Viskositetsanalysen foretatt på F190A ga en estimert gjennomsnittlig  $N_{\text{cuts}}$ -verdi lik 1,7. Denne verdien ligger lavere enn både ChiB-WT og R446, som tilvarer en mindre prosessiv aktivitet enn for de to, og er høyere enn for mutanter hvor Trp er fjernet i +1 og +2 subsetet. Estimert  $k_{\text{cat}}$ -verdi for mutanten var den laveste av verdiene ved sammenligning med de andre mutantene og er av omtrent samme verdi som for ChiB-WT (også observert av Katuna et. al.) [65]. Dette antyder prosessive egenskaper. Det kan også være at bevegelsen til Phe-190 og stackingen til sukkerenheten er viktig for stabiliteten til enzym-substrat komplekset slik at man har to motstridende faktorer som påvirker  $k_{\text{cat}}$ , økt hastighet som resultat av redusert prosessivitet og redusert hastighet som resultat av lavere enzym-substrat kompleksstabilitet.

### **5.1.3.2 Kitin**

Mot uløselig kitin viste F190A et 1:1 forhold mellom dimer og monomer som tyder på en ikke-prosessiv mekanisme. Mutanten viste dessuten 20 ganger lavere  $k_{\text{cat}}$ , samt lavere sluttkonsentrasjon av dimer, sammenlignet med prosessive ChiB-WT. Dette sammenfaller med idéen om at reduksjon i prosessivitet også fører til reduksjon i degraderingshastighet og effektivitet mot uløselig substrat.

### **5.1.4 F191A**

Phe-191 befinner seg i den aktive kløften mellom subsete +2 og +3. Phe-191 danner en hydrogenbinding med substratet (protein backbone til karbonylgruppen til sukkeret i +2) og ikke en aromat-sukker stacking interaksjon som Phe-190 gjør [60].

#### **5.1.4.1 Kitosan**

SEC-analysen (seksjon 4.4) viser en prosessiv degraderingsmekanisme ved at dimertoppen samt de andre partallstoppene var dominerende (tabell 4.5).

Videre ble  $k_{\text{cat}}$  estimert til  $25 \text{ s}^{-1}$ , en verdi som oversteg ChiB-WT, D316A og R446.

Resultatene fra målingene antyder derfor at mutanten har prosessive egenskaper, men i noe mindre grad enn de tre.

Dette støttes også av den estimerte  $N_{\text{cuts}}$ -verdien (2,7) som er lavere enn for ChiB-WT og R446, men som igjen er høyere enn verdien for mutant D316A.



#### **5.1.4.2 Kitin**

F191A var den enzymvarianten som ga høyest [A2]/ [A1] ratio etter ChiB-WT og mutasjonen har, som vist mot kitosan, redusert den prosessive katalysen i kun liten grad. Sammenlignet med WT viste mutanten en 7 ganger lavere  $k_{cat}$  og har dermed tapt mye av effektiviteten. I forhold til de andre mutantene viste mutanten derimot en av de høyeste aktivitetverdiene, samt sluttkonsentrasjon av dimer. Dette antyder at enzymet degraderer kitin relativt effektivt, som er forventet for prosessive enzymer. Siden både  $k_{cat}$  og dimerkonsentrasjon var forholdsvis høye tyder det på at mutanten degraderer kitin effektiv i både den innledende og avsluttende nedbrytningsfasen.

Resultatene for en F191A antyder at en slik mutasjon ikke vil ha noen stor innvirkning på enzymets prosessive egenskaper mot verken kitosan eller kitin. Dette viser at det er stacking mellom sukker og et aromatisk residu, og i mindre grad dipol-dipol interaksjoner, som er viktig for en prosessiv mekanisme.

#### **5.1.5 D316A**

Aminosyren Asp-316 bidrar sammen med Trp-97 til lukking av "taket" over det aktive setet. Mutasjon D316A har i tidligere studier gjennomført av S. J. Horn et. al. 2006 ikke vist noen økt aktivitet, og dermed ikke tap av prosessivitet ved hydrolyse av kitosan.

##### **5.1.5.1 Kitosan**

Resultatene i dette studiet har vist prosessiv aktivitet med odde/partallsratio karakteristisk for prosessiv nedbrytning selv om det er litt lavere både dimer/trimer og heksamere/hetpamer forhold enn for ChiB-WT (tabell 4.5).

Estimert  $k_{cat}$ - verdi for nedbrytning av kitosan tilsvarte verdien estimert for WT og følger samme trend som F191A. Disse resultatene er sammenfallende med resultater fått i tilsvarende studier [64].

Viskositetsmålingene for D316A viste lavere gjennomsnittlig verdi for antall kutt foretatt for

hver assosiasjon med substrat ( $N_{\text{cuts}}$ ) enn både ChiB-WT, R446 og F191A (3,6, 3,0 og 2,7 mot 2,0).

### **5.1.5.2 Kitin**

Mot kitin viste D316A og prosessive egenskaper med en  $[A2]/[A1]$ - ratio på 3 hvor den samme verdien var 4,1 for WT.  $k_{\text{cat}}$  var, som hos F191A, 7 ganger lavere enn for WT og tap av prosessivitet kan være en av flere grunner til den reduserte verdien. Årsaken til at D316A har mistet prosessivitet mot kitin, men ikke kitosan, kan muligens tilskrives substratets utilgjengelige struktur. Studier av H. Zakariassen et. al. 2009 har vist at dannelse av enzym-substrat kompleks når substratet er kitin er mer kritisk enn når substratet er kitosan. Lukkemekanismen rundt substratet, som D316 bidrar til, er derfor antakeligvis viktigere ved hydrolyse av krystallinsk, uløselig kitin enn for kitosan.

Resultatene, samlet for både kitosan og kitin, indikerer at Asp-316 i liten grad påvirker den prosessive mekanismen.

### **5.1.6 W97A**

Trp-97 har mange interaksjoner med det bundne substratet da det ligger parallelt med sukkerkjeden i +1 bindingssetet, og danner følgelig en stor kontaktflate. Residuet befinner seg mellom subsete -1 og +1, men har størst interaksjon med +1 sukkeret. Det spiller derfor en sentral rolle til at sukkeret kan "gli" gjennom den substratbindende kløften ved en prosessiv degraderingsmekanisme. Den aromatiske aminosyren bidrar dessuten også til fleksibilitet langs den substratbindende kløften, som er antatt å være viktig for prosessivitet. Mutasjon W97A senker proteinets evne til å binde substratet og fjerner stabiliserende bindinger mellom sukker og protein [93].

#### **5.1.6.1 Kitosan**

Enzymet viste 21 ganger økning i  $k_{\text{cat}}$  og like mye dannet oddetal som partall kitoooligosakkarider (figur 4.17) ved nedbryting av kitosan som også tidligere observert [64].

Viskositetsmålingene for W97A ble ikke gjennomført i dette studiet da dette var gjort tidligere av Sikorski et. al. 2006. Estimert  $N_{\text{cuts}}$ -verdi for mutanten har vist seg umulig å få tak i Sikorski et. al. 2006 viser imidlertid at W97A har et høyere stigningstall enn ChiB-WT, men et lavere enn syre og det ikke-prosessive enzymet ChiC. Dette indikerer at mutanten har noe gjenværende prosessivitet, men at den er sterkt redusert [64].

#### **5.1.6.2 Kitin**

W97A viste også ikke-prosessiv hydrolyse av substratet kitin med en  $[A2]/[A1]$  lik 1. Dette er karakteristisk for ikke-prosessive enzymer som gir en tilfeldig distribuering av partalls- og oddetalls- oligomerer. Det ble også observert en lavere  $k_{\text{cat}}$ - verdi for kitinhydrolyse ( $0,02 \text{ min}^{-1}$ ) i forhold til WT ( $0,2 \text{ min}^{-1}$ ) og en markert lavere effektivitet.

Samtlige resultater indikerer at W97 er et viktig residu for degradering av kitin og kitosan da enzymet har mistet alle sine prosessive egenskaper mot begge substratene. Dette studiet, samt tidligere studier, bekrefter at forstyrrelser i forskyvningsmekanismen vil være avgjørende for måten enzymet hydrolyserer substratet på. Dette fordi den medvirker til binding og stabilisering av substrat, som er viktig for et prosessivt reaksjonsmønster. Ved bruk av isotermisk titreringskalorimetri er det funnet at en sukker – tryptofan interaksjon har en entalpiendring på  $\sim -4 \text{ kcal/mol}$  [94]. I tillegg hydrogenbinder Trp-97 med både sukkeret i  $-1$  og  $-2$ . Et slikt bindingsenergitap vil sterkt redusere affiniteten for substratet og med evnen enzymet har til å forbli bundet til substratet etter en endt hydrolyse. Interaksjon i subsete  $+1$  er spesielt viktig siden enzymet har mange bindinger mot sukkerene i  $-2$ ,  $-1$  og  $+1$  for å kompensere for energetisk ugunstige konformasjonsendringen ( $\Delta G \sim 8 \text{ kcal/mol}$ , [95]) sukkeret i  $-1$  gjennomgår under hydrolyse.

#### **5.1.7 W97A/D316A**

På bakgrunn av de to enkelt mutasjonene Asp-316 og Trp-97 ble det designet en dobbeltmutant, W97A/D316A. Dette for å studere effekten av å fjerne begge residuene som utgjør "taket" over det aktive setet, for å se om en dobbeltmutasjon hadde noen innvirkning på binding av substrat, effektivitet og prosessivitet.

### **5.1.7.1 Kitosan**

SEC-analysen for dobbeltmutanten mot kitosan viser en 1:1 ratio mellom partall og oddetallstoppene mens viskositetsmålingene viste at dobbeltmutanten fortsatt er litt prosessiv med en  $N_{\text{cuts}}$  på 1.7. Videre viste beregnet en  $k_{\text{cat}}$ -verdi for dobbeltmutanten som tilsvarte en 30 ganger økning i aktivitet ved sammenligning med WT og henholdsvis 1,4 og 30 ganger i forhold til enkelt mutantene (W97A og (tabell 4.4)). Som tidligere nevnt er produkt frigjøring hastighetsbestemmende trinn for hydrolyse av kitosan [70]. I tillegg til å hydrogenbinde med Trp-97 har Asp-316 en gunstig hydrofob interaksjon med metylgruppen på N-acetylgruppen på sukkeret i +1. Det er sannsynlig at fjerning av denne gunstige interaksjonen gjør at produktet frigjøres raskere enn for W97A som fortsatt kan ha denne interaksjonen. I så henseende er det interessant å observere at D316A har samme  $k_{\text{cat}}$  som WT. Det kan være at det samme observeres for D316A som for F190A ved at det er to motstridende faktorer som påvirker  $k_{\text{cat}}$ , en andel redusert prosessivitet (økt hastighet) og redusert enzym-substrat kompleks ( redusert hastighet).

### **5.1.7.2 Kitin**

W97A/ D316A var også ikke-prosessiv mot kitin med en  $[A2]/ [A1]$  ratio lik 1. I tillegg var  $k_{\text{cat}}$ - estimatet blant de laveste verdiene sammenlignet med de andre enzymvarianter. Sluttkonsentrasjon av dimer var dessuten kun på 5  $\mu\text{M}$ , og var den desidert laveste blant enzymene. Dette forsterker ideen om at mutanten er lite effektiv mot krystallinsk kitin i både initiell og avsluttende fase.

### **5.1.8 W220A**

Trp-220 befinner seg i subsete +2 og stacker med substratet fra motsatt side som Trp-97 og har i tillegg en hydrogenbinding med sukkeret i +3. Tidligere studier (SEC analyse) har vist W220A er ikke-prosessiv hydrolyse og bryter ned kitosan 4 ganger sammenlignet med ChiB-WT [64].

### **5.1.8.1 Kitosan**

Resultatene i dette studiet viser en 22 ganger økning i  $k_{\text{cat}}$  sammenlignet med ChiB-WT. Dette

indikerer økning i aktivitet mot kitosan. SEC- analysen foretatt for W220A viste til et ikke-prosessivt degraderingsmønster hvor toppene i kromatogrammet hadde et 1:1 forhold.

Viskositetsmålingene foretatt på W220A ga en av de laveste  $N_{\text{cuts}}$  verdiene på 1,5. Dette indikerer en ikke-prosessiv degradering av kitosan. Verdien ligger noe over syrehydrolyse som har  $N_{\text{cuts}}$  lik 1 som tilvarer ett kutt per assosiasjon med substratet før dissosiasjon [52]. Dette støtter opp under at aromatiske residuer nær det aktive setet er viktig for prosessivitet. Det er uvisst hvorfor vi finner en høyere  $k_{\text{cat}}$  for kitosanhydrolyse sammenliknet med hva som ble observert av Horn et. al. 2006.

### **5.1.8.2 Kitin**

W220A viste, som forventet, lav aktivitet medium relativ effektivitet mot kitin. Blant de enzymene som viste en ikke-prosessiv mekanisme mot kitosan, var det W220A som ga det høyeste  $[A2]/[A1]$  forholdet på 1,6. Selv om denne verdien er noe høyere enn det som er funnet for de andre mutantene, kan man konkludere med at W220A har lave prosessive egenskaper mot krystallinsk kitin. Det er iøynefallende at W220A er mer prosessiv og effektiv mot kitin enn F190A.

### **5.1.9 W97A/W220A**

Det er interessant å studere effekten av en dobbel Trp-mutasjon for å se hva slags effekt dette har på substratnedbrytning.

#### **5.1.9.1 Kitosan**

Dobbelmutanten viste en 60 ganger økning i aktiviteten sammenlignet med WT ved estimering av parameteren  $k_{\text{cat}}$ . Dette tilsvarer den høyeste verdien og vil med dette være den raskeste av de aktuelle mutantene for hydrolyse av kitosan. En liknende trend ble også observert for en dobbel Trp-mutant i ChiA. Igjen er dette i overensstemmelse produkt frigjøring øker med færre Trp residuer i det aktive setet.

Selv om SEC analysen viste samme partall/oddetall ratio for W97A/W220A som for W97A alene, viste viskositetsmålingene en lavere  $N_{\text{cuts}}$  -verdi med 1,3 kutt per assosiasjon (den

laveste blant alle enzymene) og antyder en klar ikke-prosessiv mekanisme.

### 5.1.9.2 Kitin

Mot kitin viste mutanten en  $[A2]/[A1]$  ratio lik 1, en 10 ganger lavere  $k_{cat}$  enn WT, og en effektivitet som er ~6 % av WT. De to siste egenskapene er i øyenfallende fordi selv om disse tallene er lave er dobbelmutanten fortsatt aktiv mot kitin. For dobbel Trp-mutasjonen i ChiA ble kitin aktiviteten utradert fullstendig. Dette blir enda mer spesielt fordi ChiA-WT klarer å degradere kitin fullstendig på egenhånd hvilket ChiB-WT ikke klarer.

### 5.1.10 Oppsummering: faktorer i enzymet som støtter prosessiv mekanisme

Tabell 5.1 viser de aktuelle mutantene samt WT fremstilt i minkende grad av prosessivitet på bakgrunn av resultatene utarbeidet i denne oppgaven.

**Tabell 5.1:** Mutantene fremstilt i minkende grad av prosessivitet ved hydrolyse av kitosan og kitosan.

Minkende grad av prosessivitet mot kitosan	Minkende grad av prosessivitet mot kitin
1 WT	1 WT
2 R446	2 D316A
3 D316A	3 F191A
4 F191A	4 W220A
5 F190A	5 F190A
6 W220A	6 R446
7 W97A	6 W97A
8 W97A/ D316A	6 W97A/ D316A
9 W97A/ W220A	6 W97A/ W220A

Minkende grad av prosessivitet for mutantene mot kitosan ble utarbeidet ved å benytte resultatene fra SEC,  $k_{cat}$  og viskositetsmålinger foretatt i dette, og tilsvarende studier. Minkende grad av prosessivitet mot kitin ble beregnet ved å benytte resultatene fra  $k_{cat}$  og  $[A2]/[A1]$ -ratio.

Resultatene i dette studiet i likhet med flere tidligere studier [5, 64] viser en sammenheng mellom aktivitet og prosessiv mekanisme for de ulike mutantene mot det løselige substratet kitosan. Helhetlig ser man en trend hvor de ikke- prosessive enzymvariantene har høyere  $k_{cat}$  enn de prosessive når substratet er løselig kitosan. Her er det hastighetsbestemmende trinnet frigjøring av produkter. Enzymet vil derfor ikke tape effektivitet ved å måtte rebinde og binde substratet for hvert hydrolytiske kutt. Dette i motsetning til hva som er funnet for kitin, hvor de prosessive mutantene er mest virkingsfulle. Siden det hastighetsbestemmende trinnet for degradering av krystallinsk kitin er dannelse av enzym- substrat kompleks, er det mest katalytisk effektivt å utføre flere kutt når enzymet først har bundet. Resultatene indikerer at bruk av prosessive enzymer ikke alltid vil være mest effektivt for nedbrytning av biomasse for industrielle formål. Ikke-prosessive enzymer vil også være nyttige i forbindelse med å lage oligomerer av en gitt lengde. En annen mulighet er økt tilgjengelighet av substrat for så å bryte ned med ikke-prosessive enzymer, disse vil ha en langt høyere  $k_{cat}$  og vil derved foreta en meget effektiv hydrolyse.

Enzymvariantene som har vist seg å være prosessive mot kitosan, har også vist de samme egenskapene når substratet er kitin. Dette gjelder midlertidig ikke mutant R446 som i dette studiet ser ut til å ha mistet sine prosessive egenskaper når man går fra løselig til uløselig substrat. Dette antyder at substrattilgjengelighet også er viktig for prosessiv hydrolyse og virket som en spire til å studere dette nærmere.

Som en oppsummering viser resultatene klart at aromatiske residuer, helst tryptofan, nær det aktive sete som stacker med sukkeret er hovedbidragsyttere til prosessiv hydrolyse mens hydrogenbindinger og mindre hydrofobe kontakter bidrar relativt lite.

## 5.2 Oppsummering: sammenligning av ulike metoder for måling av prosessivitet

Tabell 5.2 viser en oppsummering av verdiene for apparent  $k_{cat}$ , heksamer/ heptamer ratio, dimer/trimer ratio og  $N_{cuts}$  alle forsøkene gjennomført mot kitosan. Videre  $[A2]/ [A1]$  ratio,  $[A2]$  slutt, samt apparent  $k_{cat}$  mot kitin.

**Tabell 5.2:** Oppsummering av verdiene beregnet for apparent  $k_{cat}$ , heksamer/ heptamer ratio, dimer/trimer ratio og  $N_{cuts}$  alle forsøkene gjennomført mot kitosan, samt  $[A2]/[A1]$  ratio,  $[A2]$  slutt og apparent  $k_{cat}$  mot kitin.

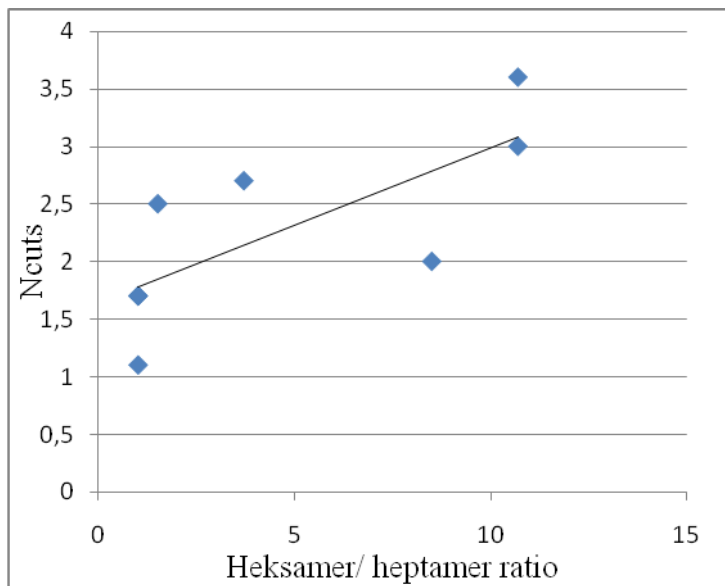
Protein	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ ) kitosan	Heksa/ hepta	Di/ tri	$N_{cuts}$	$[A2]/ [A1]$	$[A2]$ slutt	$k_{cat}$ ( $min^{-1}$ ) kitin
ChiB-WT	19	10,7	76	3,6	4,1	79	0,2
R446	21	10,7	55,7	3	1	12	0,02
F190A	15	1	22,5	1,7	1,1	9	0,01
F191A	25	3,7	79,6	2,7	2,9	27	0,03
D316A	19	8,5	63,9	2	3	26	0,03
W97A	401	1,3	1,9		1	16	0,02
W220A	422			1,5	1,6	19	0,01
W97A/ D316A	570	1	0,6	1,7	1	5	0,01
W97A/W220A	1203	1	0,6	1,1	1	7	0,02
HCHT	86	1,5	5	2,5			
ChiA-WT	12	12	29	9,1			

Estimat for prosessivitet og aktivitet for de ulike enzymene beregnet ved hjelp av ulike metoder. Verdiene for HCHT og ChiA-WT er utarbeidet i tidligere studier [5, 96].

Resultatene, fremstilt i tabell 5.2, gir en relativt god indikasjon på grad av prosessivitet i ChiB. Ved å bruke en kombinasjon av metodene benyttet i denne oppgaven kan man få verdifull informasjon om hvilke måter som egner seg best for måling av prosessivitet.



Figur 5.2 viser sammenheng mellom heksamer/ heptamer ratio og  $N_{cuts}$  for samtlige enzymvarianter. Av dataene kan man se at det er en viss korrelasjon mellom de to metodene. Dette antyder at de ulike metodene, for måling av prosessivitet, gir samme indikasjoner for et gitt enzym.



**Figur 5.2:**  $N_{cuts}$  som funksjon av heksamer/ heptamer ratio for å vise korrelasjon mellom de to parametrene.

---

### 5.3 Nedbrytning av kitin med ulik grad av substrattilgjengelighet

Studier, utført av blant annet M. Baretto et. al. 2001, har belyst andre områder enn enzymmutasjoner som kan bidra til prosessivitet og aktivitet i familie 18 kitinaser [66]. Et eksempel på dette er tilgjengelighet av substrat.

ChiB-WT og mutant R446 ble derfor testet mot fire ulike substratvarianter: kitin, sonikert kitin, kitin med CBP21 og sonikert kitin med CBP21. Sonikering av kitin vil bryte de intermolekulære interaksjonene og følgelig gjøre substratet mer tilgjengelig for hydrolyse [66]. Videre har studier av G. Vaaje-Kolstad et. al. 2005 vist at hjelpeprotein CBP21 vil ha en effekt på morfologien til kitin ved å separere de individuelle polymerene [66]. CBP21 vil derfor også bidra til økt tilgjengelighet av kitin.

ChiB-WT viste en  $[A2]/[A1]$  ratio på 4,1 når substratet var uløselig, krystallinsk kitin mens R446 viste en ratio på 1.

Begge enzymene viste økende grad av prosessivitet når substratet var sonikert og ved tilsetning av hjelpeprotein CBP21. For WT økte  $[A2]/[A1]$  ratioen med 144 % ved sonikering av kitin, 54 % ved tilsetning av CBP21 og 154 % ved endring av begge faktorene.

Mutant R446 viste samme trend som WT. Ved sonikering av kitin og tilsetning av CBP21 økte  $[A2]/[A1]$  forholdet med henholdsvis 50 % og 120 %. Når både CBP21 var tilstede, og substratet var sonikert økte forholdet med 140%. Resultatene viser klart at det er en sammenheng mellom substrattilgjengelighet og prosessivitet.

For begge enzymene forekom høyest grad av prosessivitet ved tilstedeværelse av CBP21 og når substratet var sonikert kitin. Dette antyder at sonikering og CBP21 har additiv effekt.

Videre er det klart både hastigheten og effektiviteten for kitinnedbrytning for begge enzymene tiltar ved økt substrattilgjengelighet, det vil si når substratet er sonikert og ved tilstedeværelse av CBP21. For WT økte  $k_{cat}$  med hele 440 % ved sonikering, 50 % ved tilsetning av CBP21 og 550 % ved endring av begge faktorene. Resultatene tyder her på at sonikering av kitin har større innvirkning på aktivitet enn CBP21 for WT enzymet. Dette ble også funnet for grad av prosessivitet. Mutant R446 følger samme trend som WT, men det ser

ut til at de to forholdene har større additiv effekt. Fra kun sonikering av kitin til endring av begge betingelsene økte  $k_{cat}$  med det dobbelte. Dette i motsetning til WT som kun viste en økning på 20 %.

Videre er det interessant at selv om sonikering og tilstedeværelse av CBP21 ikke gjør R446 like rask som ChiB-WT så gjør disse faktorene R446 like effektiv mot kitin som ChiB-WT. Det vil være naturlig og spennende i neste omgang å se om en ikke- prosessiv mutant som er raskere mot kitosan enn ChiB-WT (for eksempel W97A) også vil være like effektiv som villtypen og kanskje også raskere enn denne når kitinet er sonikert og hydrolysen er i nærvær av CBP21.

## 5.4 Dissosiasjonskonstant ( $K_D$ ) og Gibbs frie energi ( $\Delta G$ )

Dissosiasjonskonstanten ( $K_D$ ) og Gibbs frie energi ( $\Delta G$ ) ble bestemt for de ulike enzymvariantene ved hjelp av bindingsassay hvor binding ble fulgt spektrofotometrisk (seksjon 3.6). Parametrene vil gi en indikasjon på hvor stabilt enzym- substrat komplekset er og vil følgelig belyse hvilken effekt de ulike mutasjonene har på bindingsstyrken. Bindingsmodellen som ble brukt for å estimere  $K_D$  er vist i likning 1.3. Estimering av  $\Delta G$  ble gjort ved hjelp av likning 1.3.

Spesielt interessant var det å få sammenlignet  $K_D$  og  $\Delta G$  for mutant R446 med villtype ChiB. Siden R446 har fått fjernet hele det kitinbindende domenet skulle man tro at dette ville påvirke binding av enzym til substrat. Dette var ikke tilfellet. Både  $K_D$  og  $\Delta G$  for de ulike reaksjonene varierte lite, også for mutant R446. Siden de prosessive og de ikke- prosessive enzymvariantene viste liten variasjon i de termodynamiske parametrene tyder dette på at prosessivitet ikke direkte kan relateres til bindingsenergi.

## 5.5 Videre studier

Fremtidige prosessivitetsstudier av familie 18 kitinaser burde muligens utføres mot kitin, da det er dette som er det naturlige substratet.

Videre kunne det vært interessant å undersøke om en ikke- prosessiv mutant vil være mer effektiv enn WT mot kitin når substratet er gjort mer tilgjengelig, enten ved sonikering eller ved nærvær av CBP21.

---

## 6 Referanser

- [1] Mathews, V. H., Ahern, 2000, Biochemistry.
- [2] Wolfenden, R., Ridgway, C., and Young, G., 1998, "Spontaneous Hydrolysis of Ionized Phosphate Monoesters and Diesters and the Proficiencies of Phosphatases and Phosphodiesterases as Catalysts," *Journal of the American Chemical Society*, 120(4), pp. 833-834.
- [3] Gideon Davies, B. H., 1995, "Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases."
- [4] Hart Harold, C. L. E., Hart David J., Hadad Christopher M., 2007, *Organic Chemistry, A Short Course*, Houghton Mifflin.
- [5] Zakariassen, H., Aam, B. B., Horn, S. J., Varum, K. M., Sorlie, M., and Eijsink, V. G., 2009, "Aromatic residues in the catalytic center of chitinase A from *Serratia marcescens* affect processivity, enzyme activity, and biomass converting efficiency," *J Biol Chem*, 284(16), pp. 10610-10617.
- [6] Aronson, N. N., Jr., Halloran, B. A., Alexyev, M. F., Amable, L., Madura, J. D., Pasupulati, L., Worth, C., and Van Roey, P., 2003, "Family 18 chitinase-oligosaccharide substrate interaction: subsite preference and anomer selectivity of *Serratia marcescens* chitinase A," *Biochem J*, 376(Pt 1), pp. 87-95.
- [7] <http://www.chemistry.adelaide.edu.au/external/soc-rel/content/size-exc.htm>
- [8] Venugopal, V., 2009, *Marine Products for Healthcare: Functional and Bioactive Nutraceutical from the Ocean*.
- [9] Spindler, K. D., Spindler-Barth, M., and Londershausen, M., 1990, "Chitin metabolism: a target for drugs against parasites," *Parasitol Res*, 76(4), pp. 283-288.
- [10] E., C., 1993, "Chitin synthesis and degradation as targets for pesticide action.."
- [11] Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., and Staskawicz, B. J., 2006, "Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response," *Cell*, 124(4), pp. 803-814.
- [12] Hawtin, R. E., Zarkowska, T., Arnold, K., Thomas, C. J., Gooday, G. W., King, L. A., Kuzio, J. A., and Possee, R. D., 1997, "Liquefaction of *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus-Infected Insects Is Dependent on the Integrity of Virus-Encoded Chitinase and Cathepsin Genes," *Virology*, 238(2), pp. 243-253.

- 
- [13] Gupta, B., Arora, A., Saxena, S., and Alam, M. S., 2009, "Preparation of chitosan-polyethylene glycol coated cotton membranes for wound dressings: preparation and characterization," *Polymers for Advanced Technologies*, 20(1), pp. 58-65.
- [14] Sorbotten, A., Horn, S. J., Eijsink, V. G., and Varum, K. M., 2005, "Degradation of chitosans with chitinase B from *Serratia marcescens*. Production of chito-oligosaccharides and insight into enzyme processivity," *FEBS J*, 272(2), pp. 538-549.
- [15] Tharanathan, R. N., and Kittur, F. S., 2003, "Chitin--the undisputed biomolecule of great potential," *Crit Rev Food Sci Nutr*, 43(1), pp. 61-87.
- [16] R.F. Weskaa, J. M. M., L.M. Batistaa, J. Rizzia and L.A.A. Pinto, 2006, "Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response surface methodology," *Journal of Food Engineering*, 80(3), pp. 749-753.
- [17] Bhatnagar, A., and Sillanpaa, M., 2009, "Applications of chitin- and chitosan-derivatives for the detoxification of water and wastewater - A short review," *Adv Colloid Interface Sci*.
- [18] Wydro, P., Krajewska, B., and Hac-Wydro, K., 2007, "Chitosan as a lipid binder: a langmuir monolayer study of chitosan-lipid interactions," *Biomacromolecules*, 8(8), pp. 2611-2617.
- [19] Ylitalo, R., Lehtinen, S., Wuolijoki, E., Ylitalo, P., and Lehtimäki, T., 2002, "Cholesterol-lowering properties and safety of chitosan," *Arzneimittelforschung*, 52(1), pp. 1-7.
- [20] P., B., 2009, "The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient ".
- [21] Ta, H. T., Dass, C. R., Larson, I., Choong, P. F., and Dunstan, D. E., 2009, "A chitosan hydrogel delivery system for osteosarcoma gene therapy with pigment epithelium-derived factor combined with chemotherapy," *Biomaterials*, 30(27), pp. 4815-4823.
- [22] CHIBA YU, K. A., MATSUBUCHI SHIHO, TAYA KAHORU, SAITO TAKAHIRO, IGARASHI HARUYOSHI, 2004, "Facilitative Effects of Chitooligosaccharides on Wound Healing," *Ohu University Dental Journal*.
- [23] Xie, Y., Hu, J., Wei, Y., and Hong, X., 2009, "Preparation of chitooligosaccharides by the enzymatic hydrolysis of chitosan," *Polymer Degradation and Stability*, 94(10), pp. 1895-1899.
- [24] Fernandes, J. C., Eaton, P., Nascimento, H., Belo, L., Rocha, S., Vitorino, R., Amado, F., Gomes, J., Santos-Silva, A., Pintado, M. E., and Malcata, F. X., 2008, "Effects of chitooligosaccharides on human red blood cell morphology and membrane protein structure," *Biomacromolecules*, 9(12), pp. 3346-3352.
-

- 
- [25] Wang, Y., Zhou, P., Yu, J., Pan, X., Wang, P., Lan, W., and Tao, S., 2007, "Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by chitosanase from *Pseudomonas* CUY8," *Asia Pac J Clin Nutr*, 16 Suppl 1, pp. 174-177.
- [26] B. J. Chae, K. N. H., S. C. Choi, W. T. Kim, T. W. Han and I. K. Kwon, "Effects of feeding chitooligosaccharide on growth performance, immunity and microbial changes in growing pigs."
- [27] Kevin A Gray, L. Z. a. M. E., 2006, "Bioethanol" ScienceDirect®.
- [28] Valérie Ducros, S. J. C., Urszula Derewenda, Zygmunt S. Derewenda , Zbigniew Dauter , Claude Dupont, François Shareck, Rolf Morosoli , Dieter Kluepfel and Gideon J. Davies, 2000, "Substrate Specificity in Glycoside Hydrolase Family 10. Structural and kinetic analysis of the streptomyces lividans xylanase 10A," *The Journal of Biological Chemistry*.
- [29] al., N. S. B. e., 1992, "Degradation resistant detergent compositions based on cellulase enzymes."
- [30] Davies, B. H. a. G., 1997, "Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases."
- [31] Bairoch, A., 1999, ""Classification of glycosyl hydrolase families and index of glycosyl hydrolase entries in SWISS-PROT"."
- [32] Mark R. Proctor, E. J. T., Didier Nurizzo, Johan P. Turkenburg , Ruth M. Lloyd , Maria Vardakou , Gideon J. Davies , and Harry J. Gilbert 2005, "Tailored catalysts for plant cell-wall degradation: Redesigning the exo/endo preference of *Cellvibrio japonicus* arabinanase 43A," *PNAS*.
- [33] Chet, R. C.-K. a. I., 1998, "The molecular biology of chitin digestion ".
- [34] Davies, G. J., Wilson, K.S., and Henrissat, B. , 1997, "Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases," *Biochemical Journal*.
- [35] Burmeister, W. P., Henrissat, B., Bosso, C., Cusack, S., and Ruigrok, R. W. H., 1993, "Influenza B virus neuraminidase can synthesize its own inhibitor," *Structure*, 1(1), pp. 19-26.
- [36] Crennell, S. J., Garman, E. F., Laver, W. G., Vimr, E. R., and Taylor, G. L., 1993, "Crystal structure of a bacterial sialidase (from *Salmonella typhimurium* LT2) shows the same fold as an influenza virus neuraminidase," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(21), pp. 9852-9856.
- [37] Bravman T, M. A., Shulami S , Belakhov V, Baasov T , Shoham G, Shoham Y 2001, "Glutamic acid 160 is the acid-base catalyst of beta-xylosidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6: a family 39 glycoside hydrolase," *FEBS*.
-

- 
- [38] Lawrence P. McIntosh, G. H., Philip E. Johnson, Manish D. Joshi, Michael Körner, Leigh A. Plesniak, Lothar Ziser, Warren W. Wakarchuk, and Stephen G. Wither, 1996, "The  $pK_a$  of the General Acid/Base Carboxyl Group of a Glycosidase Cycles during Catalysis: A  $^{13}\text{C}$ -NMR Study of *Bacillus circulans* Xylanase," *Biochemistry*.
- [39] McCarter, J. D., and Stephen Withers, G., 1994, "Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis," *Current Opinion in Structural Biology*, 4(6), pp. 885-892.
- [40] Goddard, K. A. B. a. W. A., 1998, "The role of enzyme distortion in the single displacement mechanism of family 19 chitinases," *PNAS*.
- [41] Matthews, W. A. B. a. B. W., 2001, "A structural basis for processivity," *Protein Sci*.
- [42] Jollès P, M. R., 1999, "*Chitin and Chitinases*," Basel: Birkhäuser.
- [43] Brurberg, M. B., B. Synstad, S.S. Klemsdal, D.M. Van Aalten, L. Sundheim, and, and Eijsink, V. G. H., 2000, "*Chitinases from Serratia marcescens*," *Recent Research Development in Microbiology*.
- [44] He, B., Wang, L., Wang, J., Li, G., and Zhang, S., 2009, "Positive selection of three chitinase genes of the family 18 of glycoside hydrolases in mammals," *Biologia*, 64(4), pp. 819-825.
- [45] Henrissat, B., and Davies, G., 1997, "Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases," *Curr Opin Struct Biol*, 7(5), pp. 637-644.
- [46] Bussink, A. P., Speijer, D., Aerts, J. M., and Boot, R. G., 2007, "Evolution of mammalian chitinase(-like) members of family 18 glycosyl hydrolases," *Genetics*, 177(2), pp. 959-970.
- [47] Ohno, T., S. Armand, T. Hata, N. Nikaidou, B. Henrissat, M. Mitsutomi, and T., and Watanabe, T., 1996, "*A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism Streptomyces griseus HUT 6037*," *Journal of Bacteriology*.
- [48] Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N., Nonaka, T., Sugiyama, J., and Watanabe, T., 2001, "Roles of the exposed aromatic residues in crystalline chitin hydrolysis by chitinase A from *Serratia marcescens* 2170," *J Biol Chem*, 276(44), pp. 41343-41349.
- [49] Robertus JD, M. A., 1999, "*The structure and action of chitinases*," Department of Chemistry and Biochemistry.
- [50] Aronson, N. N., Jr., B.A. Halloran, M.F. Alexeyev, X.E. Zhou, Y. Wang, E.J. Meehan, and Chen, a. L., 2006, "*Mutation of a conserved tryptophan in the chitin-binding cleft of Serratiamarcescens chitinase A enhances transglycosylation*,". *Biosci Biotechnol Biochem*.
-



- 
- [51] S.J. Horn, M. S., G. Vaaje-Kolstad, A. L. Norberg, B. Synstad, K. M. Vårum, & V. G. H. Eijsink, 2006, "Comparative studies of chitinases A, B and C from *Serratia marcescens*," *Biocatalysis and Biotransformation*.
- [52] Sikorski, P., Sorbotten, A., Horn, S. J., Eijsink, V. G., and Varum, K. M., 2006, "Serratia marcescens chitinases with tunnel-shaped substrate-binding grooves show endo activity and different degrees of processivity during enzymatic hydrolysis of chitosan," *Biochemistry*, 45(31), pp. 9566-9574.
- [53] van Aalten, D. M., Synstad, B., Brurberg, M. B., Hough, E., Riise, B. W., Eijsink, V. G., and Wierenga, R. K., 2000, "Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1.9-Å resolution," *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(11), pp. 5842-5847.
- [54] Brameld, K. A. a. W. A. G., 1998, "*Substrate distortion to a boat conformation at subsite-1 is critical in the mechanism of family 18 chitinases*," *Journal of the American Chemical Society*.
- [55] Svein Jarle Horn<sup>1</sup>, A. S., Bjørnar Synstad<sup>1</sup>, Pawel Sikorski<sup>2,3</sup>, Morten Sørli<sup>1</sup>, Kjell M. Vårum<sup>2</sup> and Vincent G. H. Eijsink, 2005, "Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*," *FEBS Journal*.
- [56] Brurberg, M. B., Nes, I. F., and Eijsink, V. G. H., 1996, "Comparative studies of chitinases A and B from *Serratia marcescens*," *Microbiology*, 142(7), pp. 1581-1589.
- [57] Tews, I., Terwisscha van Scheltinga, A. C., Perrakis, A., Wilson, K. S., and Dijkstra, B. W., 1997, "Substrate-Assisted Catalysis Unifies Two Families of Chitinolytic Enzymes," *Journal of the American Chemical Society*, 119(34), pp. 7954-7959.
- [58] Terwisscha van Scheltinga, A. C., Kalk, K. H., Beintema, J. J., and Dijkstra, B. W., 1994, "Crystal structures of hevamine, a plant defence protein with chitinase and lysozyme activity, and its complex with an inhibitor," 2(12), pp. 1181-1189.
- [59] Brameld, K. A., Shrader, W. D., Imperiali, B., and Goddard Iii, W. A., 1998, "Substrate assistance in the mechanism of family 18 chitinases: theoretical studies of potential intermediates and inhibitors," *Journal of Molecular Biology*, 280(5), pp. 913-923.
- [60] van Aalten, D. M., Komander, D., Synstad, B., Gaseidnes, S., Peter, M. G., and Eijsink, V. G., 2001, "Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase," *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(16), pp. 8979-8984.
- [61] Prag, G., Papanikolaou, Y., Tavlas, G., Vorgias, C. E., Petratos, K., and Oppenheim, A. B., 2000, "Structures of chitobiase mutants complexed with the substrate di-N-acetyl--glucosamine: the catalytic role of the conserved acidic pair, aspartate 539 and glutamate 540," *Journal of Molecular Biology*, 300(3), pp. 611-617.
- [62] Bortone, K., Monzingo, A. F., Ernst, S., and Robertus, J. D., 2002, "The Structure of an Allosamidin Complex with the *Coccidioides immitis* Chitinase Defines a Role for a
-

---

Second Acid Residue in Substrate-assisted Mechanism," *Journal of Molecular Biology*, 320(2), pp. 293-302.

[63] Synstad, B., Gåseidnes, S., Aalten, D. M. F. v., Vriend, G., Nielsen, J. E., and Eijsink, V. G. H., 2004, "Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase," *European Journal of Biochemistry*, 271(2), pp. 253-262.

[64] Svein J. Horn, P. S., Jannicke B. Cederkvist, Gustav Vaaje-Kolstad, Morten Sørli, Bjørnar Synstad, Gert Vriend, Kjell M. Vårum, og Vincent G. H. Eijsink 2006, "Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides," *PNAS*.

[65] Katouno, F., Taguchi, M., Sakurai, K., Uchiyama, T., Nikaidou, N., Nonaka, T., Sugiyama, J., and Watanabe, T., 2004, "Importance of Exposed Aromatic Residues in Chitinase B from *Serratia marcescens* 2170 for Crystalline Chitin Hydrolysis," *J Biochem*, 136(2), pp. 163-168.

[66] Paulo, B. C. M. S. R. C.-F. S., 2001, "On the sonication of chitin : effects on its structure and morphology and influence on its deacetylation," *Polymer bulletin*

[67] Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., van Aalten, D. M., Synstad, B., and Eijsink, V. G., 2005, "The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation," *J Biol Chem*, 280(31), pp. 28492-28497.

[68] Vaaje-Kolstad, G., Houston, D. R., Riemen, A. H., Eijsink, V. G., and van Aalten, D. M., 2005, "Crystal structure and binding properties of the *Serratia marcescens* chitin-binding protein CBP21," *J Biol Chem*, 280(12), pp. 11313-11319.

[69] Reginald H. Garrett, C. M. G., 2010, *Biochemistry*.

[70] Zakariassen, H., Eijsink, V. G. H., and Sørli, M., 2010, "Signatures of activation parameters reveal substrate-dependent rate determining steps in polysaccharide turnover by a family 18 chitinase," *Carbohydrate Polymers*, In Press, Corrected Proof.

[71] Lesk, A. M., 2006, *Introduction To Protein Science Architecture, Function, and Genomics*, Oxford.

[72] Zakariassen, H., Cederkvist, F. H., Harbitz, E., Shimizu, T., Lange, R., Mayer, B., Gorren, A. C. F., Andersson, K. K., and Sørli, M., 2008, "Thermodynamic analysis of l-arginine and N[omega]-hydroxy-l-arginine binding to nitric oxide synthase," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1784(5), pp. 806-810.

[73] Arnold, F. H., 2001, "Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design," *Nature*, 409(6817), pp. 253-257.

[74] Olga Kuchner, F. H. A., 1997, "Directed evolution of enzyme catalysts.," *Elsevier Trends Journal*, Vol 15, pp. 523-530.

- 
- [75] Spiller, B., Gershenson, A., Arnold, F. H., and Stevens, R. C., 1999, "A structural view of evolutionary divergence," *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(22), pp. 12305-12310.
- [76] Michael P. Weiner, T. G., Gina L. Costa, John C. Bauer, and Keith A. Kretz, 1995, "Site-directed Mutagenesis using PCR."
- [77] Zheng, L., Baumann, U., and Reymond, J. L., 2004, "An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol," *Nucleic Acids Res*, 32(14), p. e115.
- [78] Ahuja, S., 2003, *Chromatography and separation science*.
- [79] Wu, C.-s., 2004, *Handbook of size exclusion chromatography and related techniques*, Marcel Dekker, Inc.
- [80] Trygve Greibrokk, E. L., Kunt E. Rasmussen 1994, *Kromatografi*, Universitetsforlaget.
- [81] Synstad, B., Vaaje-Kolstad, G., Cederkvist, F. H., Saua, S. F., Horn, S. J., Eijsink, V. G., and Sorlie, M., 2008, "Expression and characterization of endochitinase C from *Serratia marcescens* BJL200 and its purification by a one-step general chitinase purification method," *Biosci Biotechnol Biochem*, 72(3), pp. 715-723.
- [82] Wibetoe, G., "Kromatografi."
- [83] Novotny, M. V., and Mechref, Y., 2005, "New hyphenated methodologies in high-sensitivity glycoprotein analysis," *J Sep Sci*, 28(15), pp. 1956-1968.
- [84] Dudley Williams, I. F., 2008, *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, Mc Graw Hill.
- [85] Siuzdak, G., 1994, "The emergence of mass spectrometry in biochemical research," *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(24), pp. 11290-11297.
- [86] K., D., 2004, *Mass Spectrometry; A Foundation Course*, RSC Publishing.
- [87] "Caplex," <<http://www.caplex.no/Web/ArticleView.aspx?id=9340342>>.
- [88] Queiroz, J. A., Tomaz, C. T., and Cabral, J. M., 2001, "Hydrophobic interaction chromatography of proteins," *J Biotechnol*, 87(2), pp. 143-159.
- [89] Fan, Y., Saito, T., and Isogai, A., 2008, "Preparation of Chitin Nanofibers from Squid Pen  $\hat{P}^2$ -Chitin by Simple Mechanical Treatment under Acid Conditions," *Biomacromolecules*, 9(7), pp. 1919-1923.
- [90] Noboru Tomiya, S. N., Jung Park, Badarulhisam Abdul-Rahman, One Choi, Sundeep Singh, Jun Hiratake, Kanzo Sakata , Michael J. Betenbaugh , Karen B. Palter and Yuan C. Lee, 2006, "Purification, Characterization, and Cloning of a *Spodoptera frugiperda* Sf9  $\beta$ -N-
-

---

Acetylhexosaminidase That Hydrolyzes Terminal *N*-Acetylglucosamine on the *N*-Glycan Core\*," *The Journal of Biological Chemistry*.

[91] Jarle Horn, S., and Eijsink, V. G. H., 2004, "A reliable reducing end assay for chito-oligosaccharides," *Carbohydrate Polymers*, 56(1), pp. 35-39.

[92] Eijsink, V. G. H., Vaaje-Kolstad, G., Vårum, K. M., and Horn, S. J., 2008, "Towards new enzymes for biofuels: lessons from chitinase research," 26(5), pp. 228-235.

[93] Norberg, A. L., 2004, "Karakterisering av substrat og produkt spesifisitet hos naturlige og mutante kitinaser fra *Serratia marcescens*."

[94] Baban, J., Fjeld, S., Sakuda, S., Eijsink, V. G. H., and Sjørlie, M., "The Roles of Three *Serratia marcescens* Chitinases in Chitin Conversion Are Reflected in Different Thermodynamic Signatures of Allosamidin Binding," *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(18), pp. 6144-6149.

[95] Biarnés, X., Ardèvol, A., Planas, A., Rovira, C., Laio, A., and Parrinello, M., 2007, "The Conformational Free Energy Landscape of  $\beta$ -D-Glucopyranose. Implications for Substrate Preactivation in  $\beta$ -Glucoside Hydrolases," *Journal of the American Chemical Society*, 129(35), pp. 10686-10693.

[96] Kristine B. Eide, A. R. L., 2009, "Biochemical Characterization of the Human Chitotriosidase."

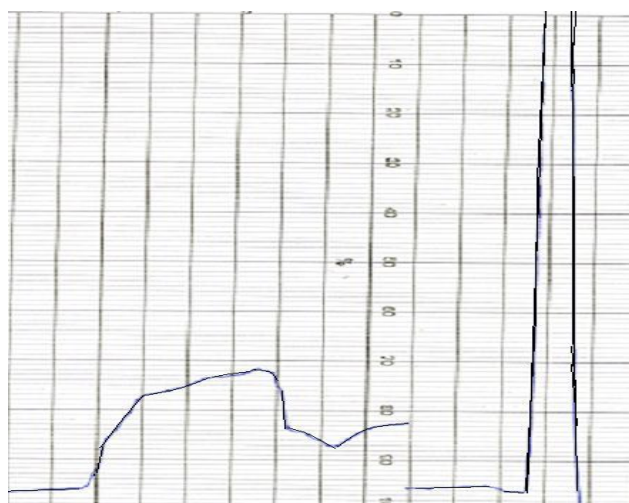
## 7 Appendix

### 7.1 Isolering av proteiner

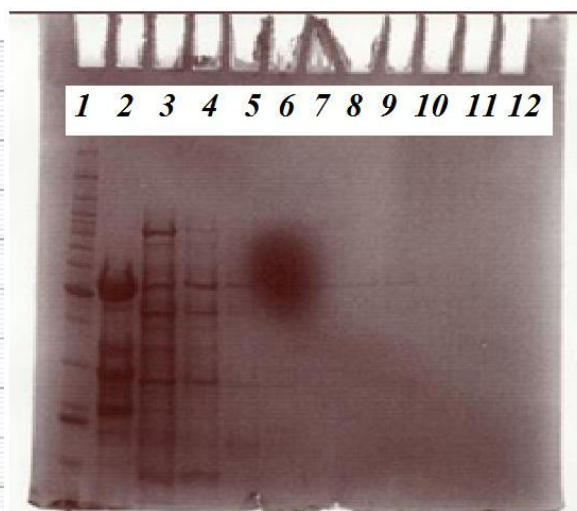
Det periplasmatiske ekstraktet som inneholdt det aktuelle proteinet ble rensset enten på kitinkolonne (seksjon 3.3.4) eller ved hjelp av ionebytter- og hydrofob interaksjonskromatografi (HIC) (seksjon 3.3.1 og 3.3.3). Avsnitt 7.1.1 til avsnitt 7.1.8 viser resultatet av isoleringen av de resterende mutantene, F190A, F191A, D316A, W97A/ D316A, W97A, W220A og W97A/ W220A, samt hjelpeprotein CBP21.

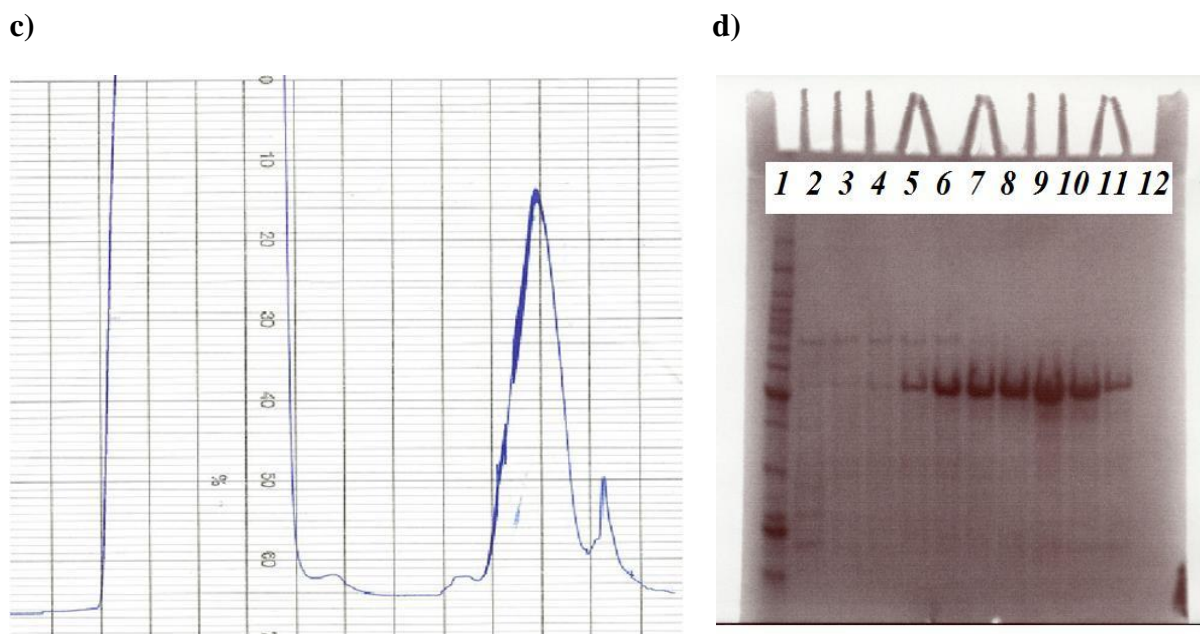
#### 7.1.1 Isolering av *ChiB-F190A*

a)



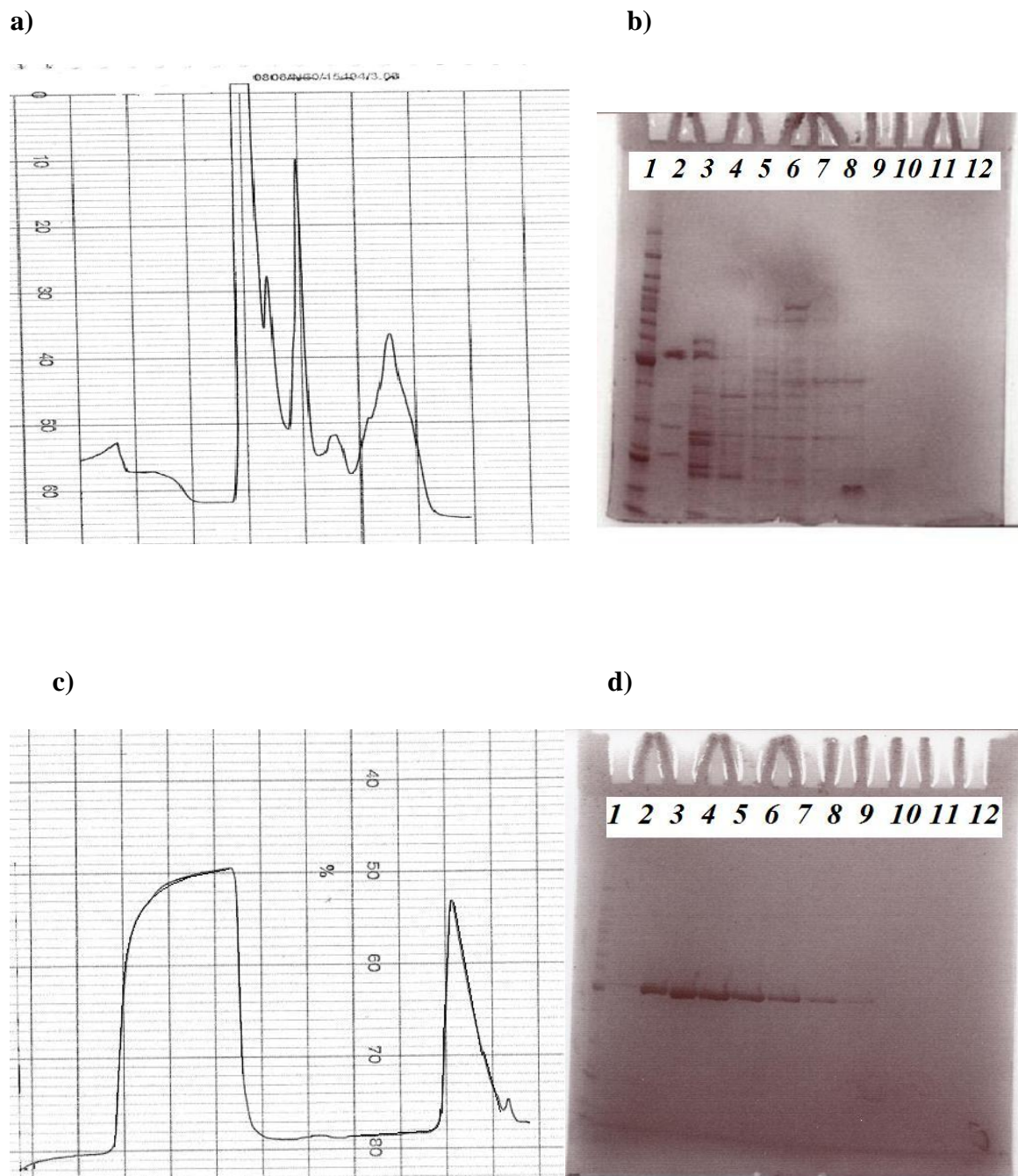
b)





**Figur 7.1:** **a)** Kromatogram for rensing av ChiB-F190A ved hjelp av ionebytterkromatografi. Proteinet ble eluert ut i den siste toppen. **b)** Viser gel- bildet av fraksjonene som ble samlet fra ionebytterkromatografi av F190A. Gelen viser ChiB, samt andre proteiner, i brønn 2- 5 **c)** Fraksjonene fra ionebytter- steget som viste ChiB- bånd ble rensset videre ved hjelp av hydrofob interaksjonskromatografi. Figuren viser kromatogrammet fra rensesedyren hvor enzymet ble eluert ut i de to siste toppene. **d)** Viser bilde fra gel- kjøring av fraksjoner samlet under hydrofob ineteraksjonskromatografi. ChiB- bånd vises i brønnene 5-11 og disse fraksjonene ble følgelig analysert videre.

### 7.1.2 Isolering av ChiB-F191A

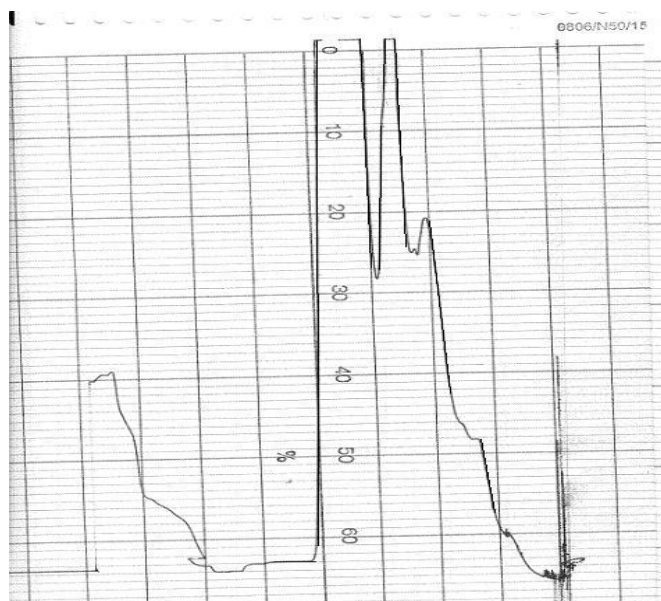


**Figur 7.2:** **a)** Viser kromatogrammet for første trinnet i isolering av ChiB-F191A. Oppsamlingen ble startet ved første topp. **b)** Figuren viser gel- bildet av fraksjonene fra ionebytter- prosedyren. Gelen viser ChiB- bånd i brønn 2-5. **c)** Viser kromatogrammet for det siste rense- steget, hydrofob interaksjonskromatografi, av ChiB-F191A som ble eluert ut i de

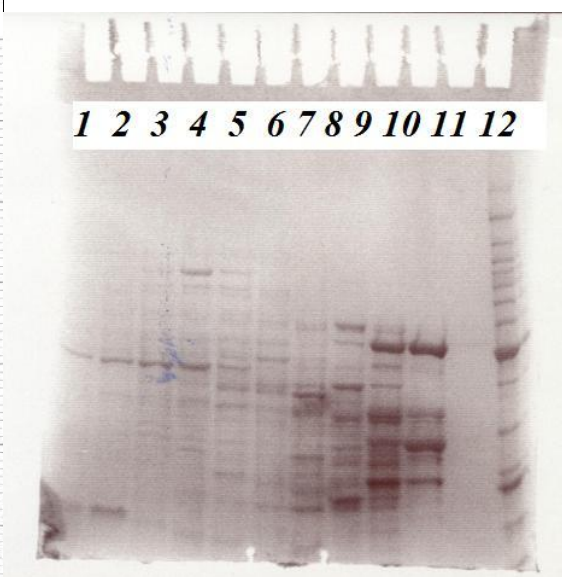
to siste toppene. **d)** Viser bilde fra gel- kjøring av fraksjoner samlet under hydrofob interaksjonskromatografi. ChiB- bånd vises i brønnene 3-7.

### 7.1.3 Isolering av ChiB-D316A

**a)**



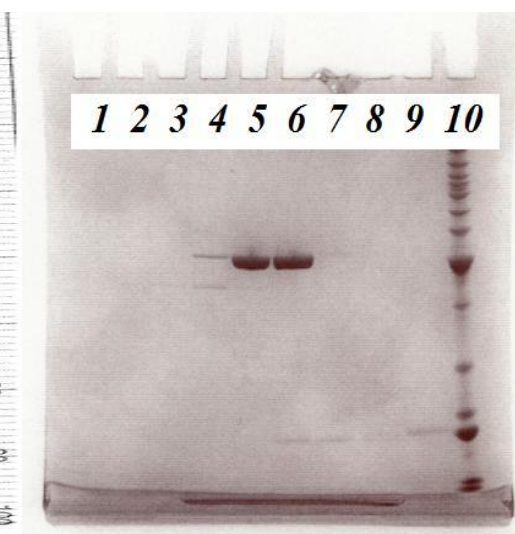
**b)**



**c)**



**d)**

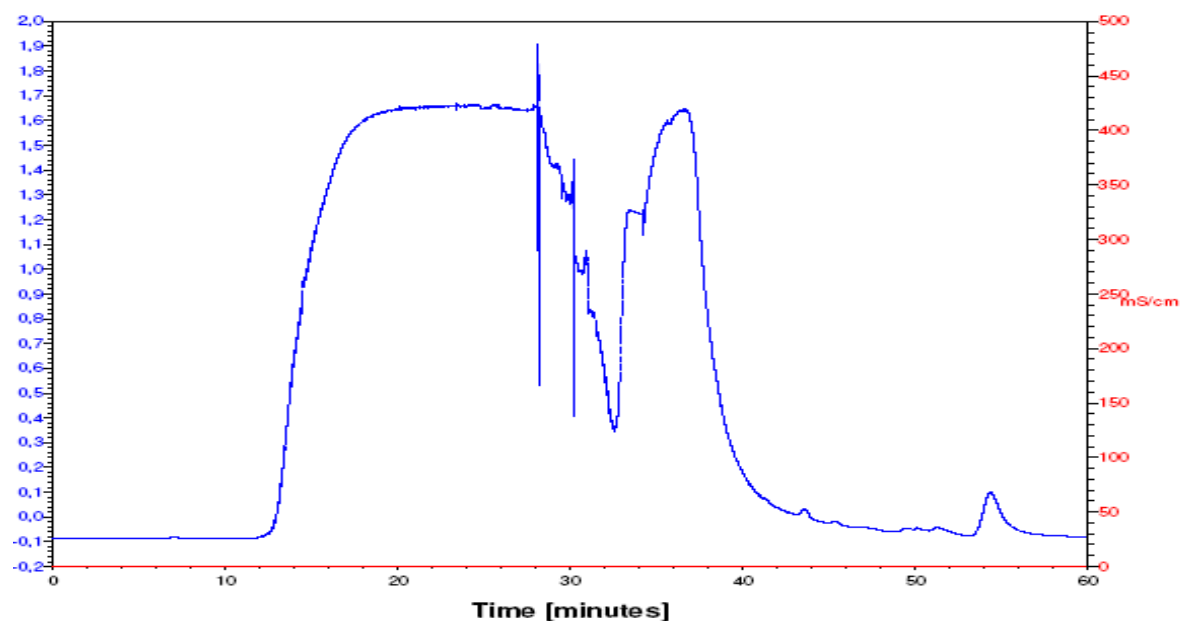


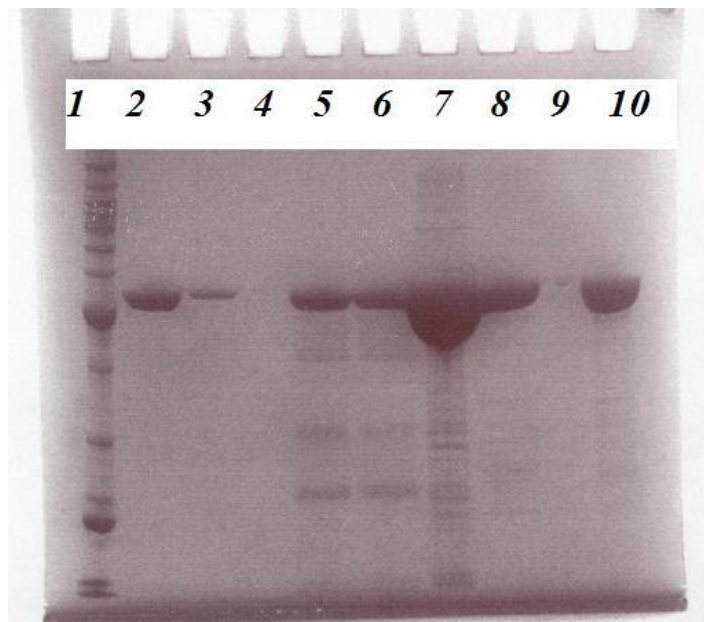


**Figur 7.3:** **a)** Viser resultatet for rensing av ChiB-D316A på ionebytterkolonne. Oppsamlingen ble startet ved første topp. **b)** Figuren viser gel- bildet av fraksjonene fra ionebytter- prosedyren. Gelen viser ChiB- bånd i brønn 9-11. **c)** Viser kromatogrammet for det siste rense- steget, hydrofob interaksjonskromatografi, for D316A. Proteinene eluerte i siste topp. **d)** Figuren viser bilde fra SDS- PAGE av fraksjoner samlet under hydrofob interaksjonskromatografi. De sterkeste ChiB- båndene vises i brønn 5 og 6, men det forekommer også noe protein i brønn 4.

#### 7.1.4 Isolering av ChiB-D316A/ W97A

**a)**

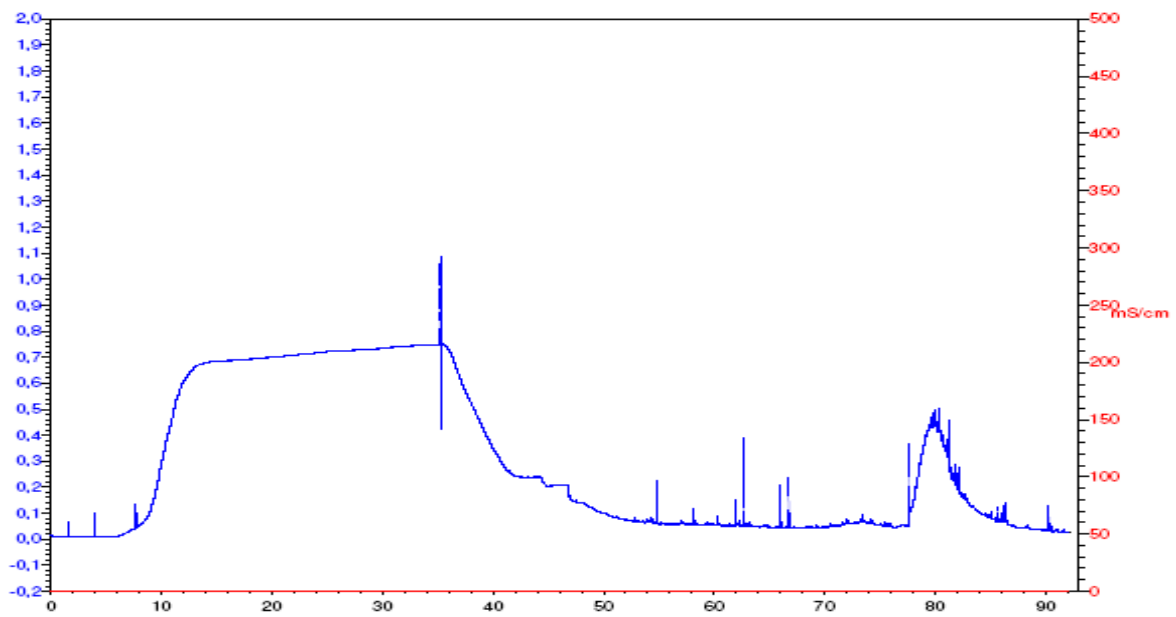


**b)**

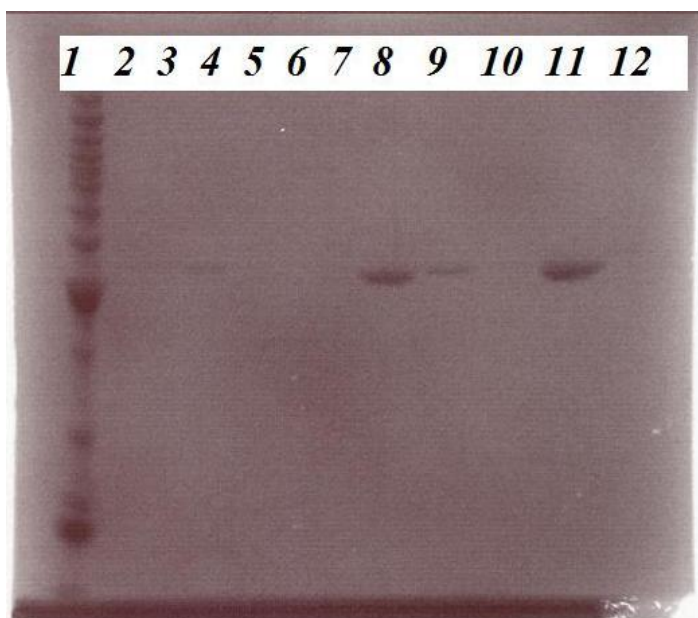
**Figur 7.4:** **a)** Viser resultatet for rensing av ChiB-D316A/ W97A på kitinkolonne. Oppsamlingen ble startet ved første topp etter andre baselinje- innstilling. **b)** Figuren viser gel- bildet av fraksjonene samlet fra rensing av mutanten på kitinkolonne. Prøver ble applisert i brønn 5-8 og samtlige fraksjoner viste tydelige proteinbånd. Fraksjonene ble tatt vare på for videre analyse.

### 7.1.5 Isolering av ChiB-W97A

a)



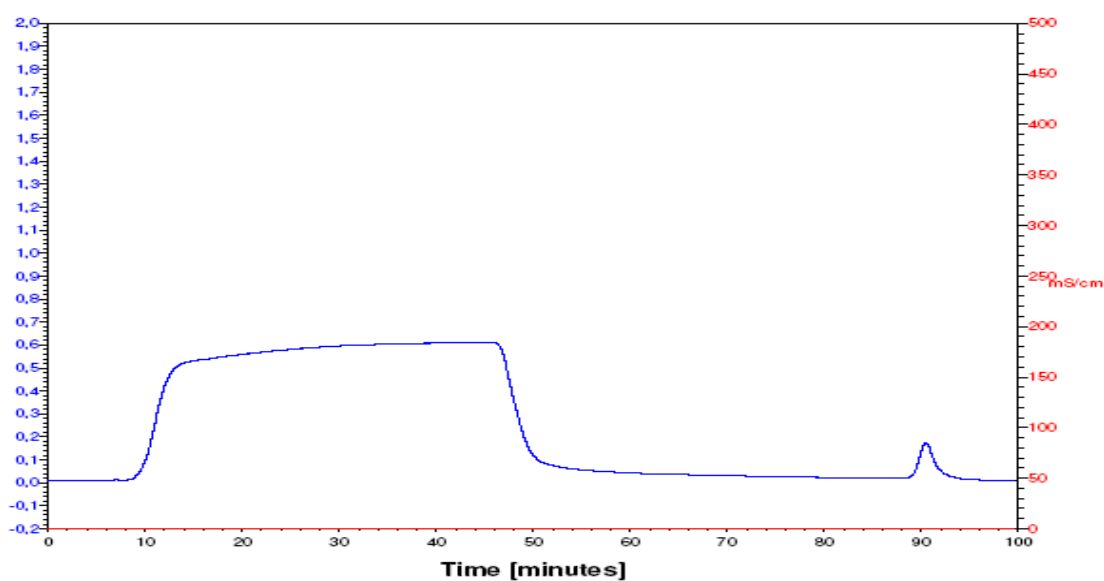
b)



**Figur 7.5:** **a)** Viser resultatet for rensing av ChiB-W97A på kitinkolonne. Oppsamlingen ble startet ved første topp etter andre baselinje- innstilling. **b)** Figuren viser SDS- PAGE for ChiB-W97A. Fraksjoner samlet fra det kromatografiske trinnet ble applisert i brønn 11 og 12, hvorav kun brønn 11 ga proteinbånd.

#### 4.1.6 Isolering av ChiB-W220A

a)



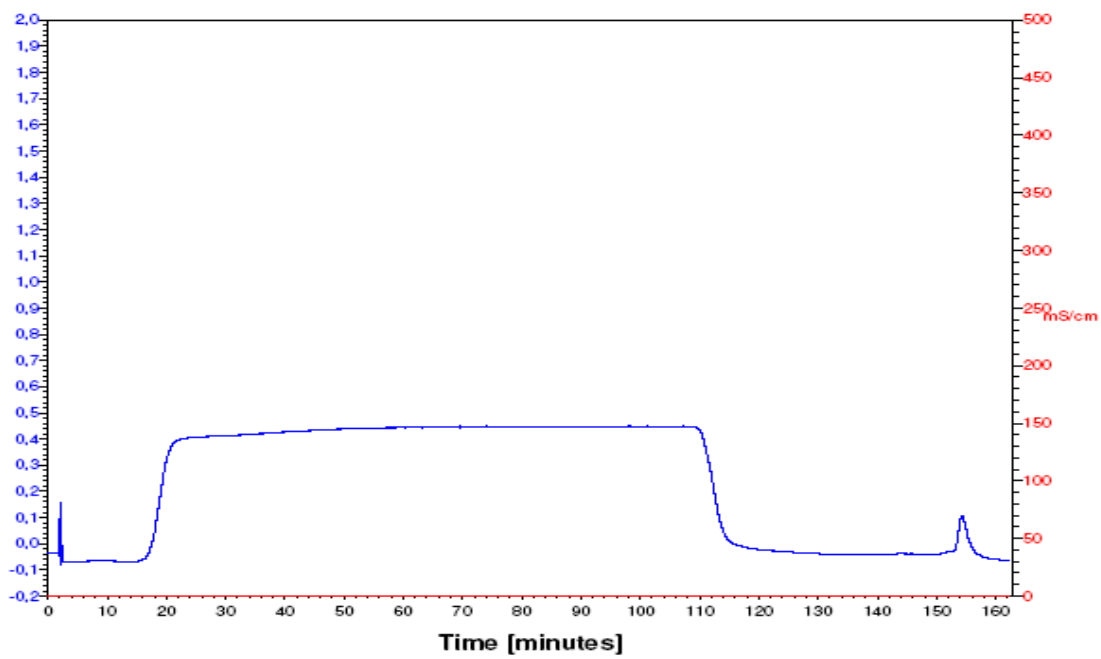
b)



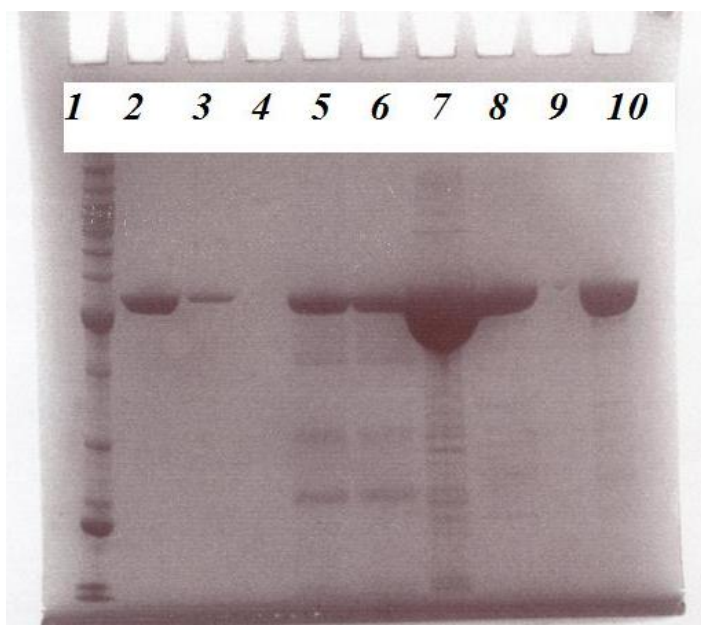
**Figur 7.6: a)** Viser resultatet for rensing av ChiB- W220A på kitinkolonne. Oppsamlingen ble startet ved første topp etter andre baselinje- innstilling. **b)** Figuren viser gel- bildet av fraksjonene fra ionebytter- prosedyren. ChiB-W220- fraksjoner ble applisert i brønnene 7-10, men kun brønn 8 og 9 viste ChiB bånd.

### 7.1.7 Isolering av ChiB- W97A/ W220A

a)



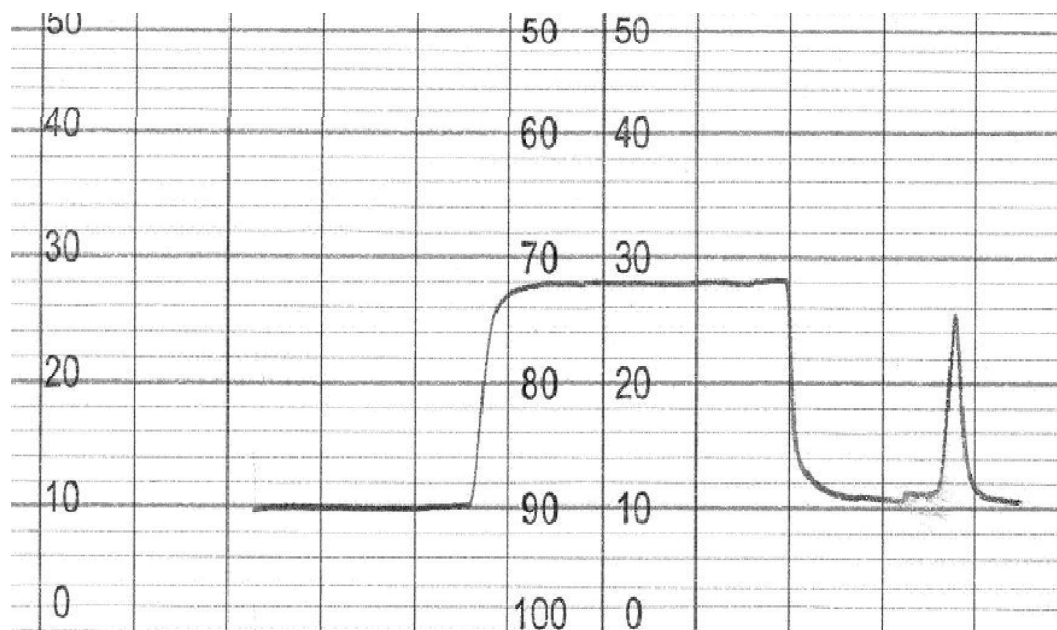
b)



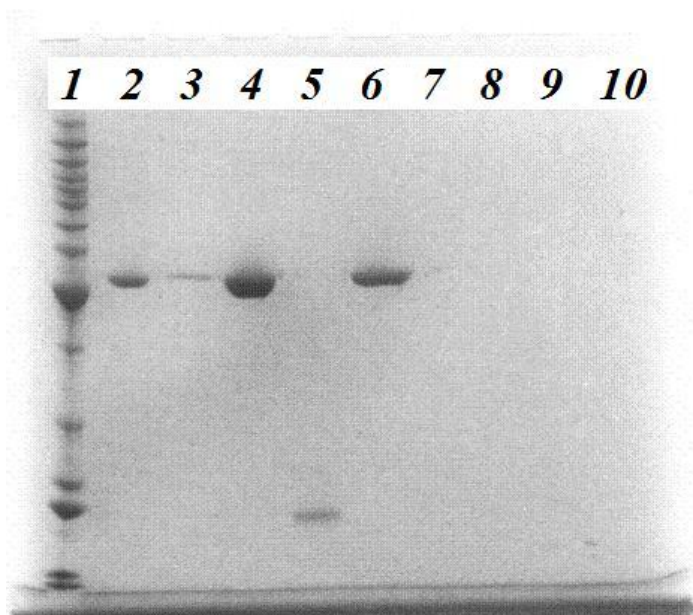
**Figur 7.7:** **a)** Viser resultatet for rensing av ChiB-W97A/ W220A på kitinkolonne. Oppsamlingen ble startet ved første topp etter andre baselinje- innstilling. **b)** Fraksjoner samlet fra rensesteget ble applisert i brønn 1, 2 og 3, hvorav brønn 1 og 2 viste ChiB bånd.

### 7.1.8 Isolering av CBP- 21 protein

**a)**



b)

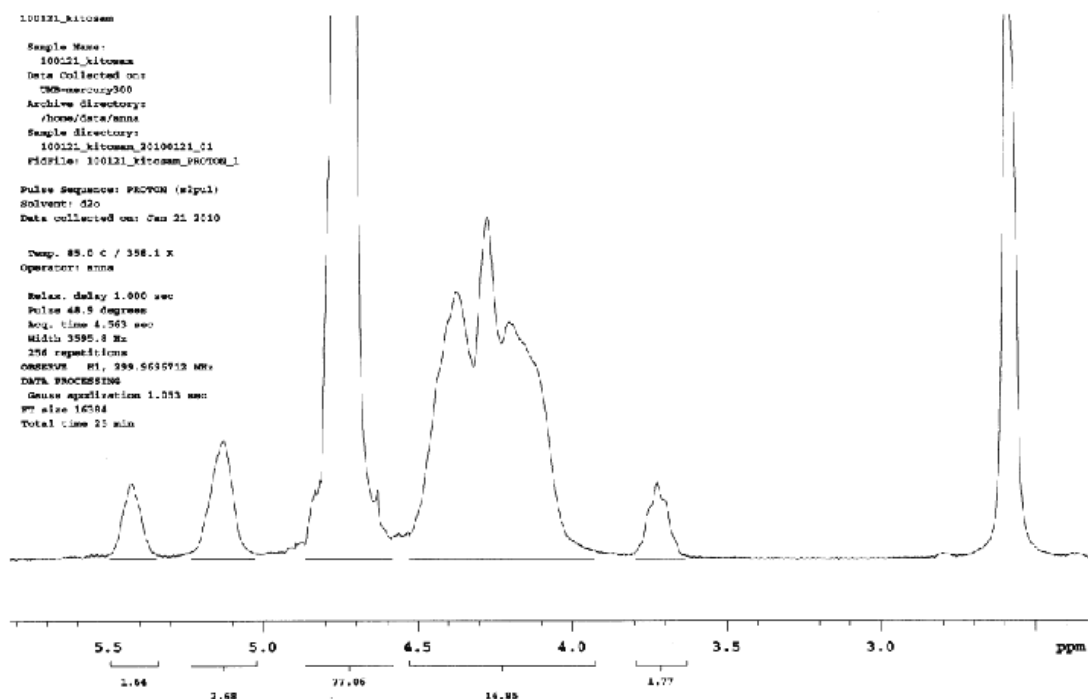


**Figur 7.8: a)** Bildet viser resultatet av rensing av CBP-21 protein i form av et kromatogram. CBP- 21 ble eluert i den siste toppen. **b)** Figuren viser SDS- PAGE av fraksjonen samlet under renseprosedyren. Fraksjonen ble applisert i brønn 5 viser tydelig CBP- 21 bånd og denne prøven ble dermed analysert videre.

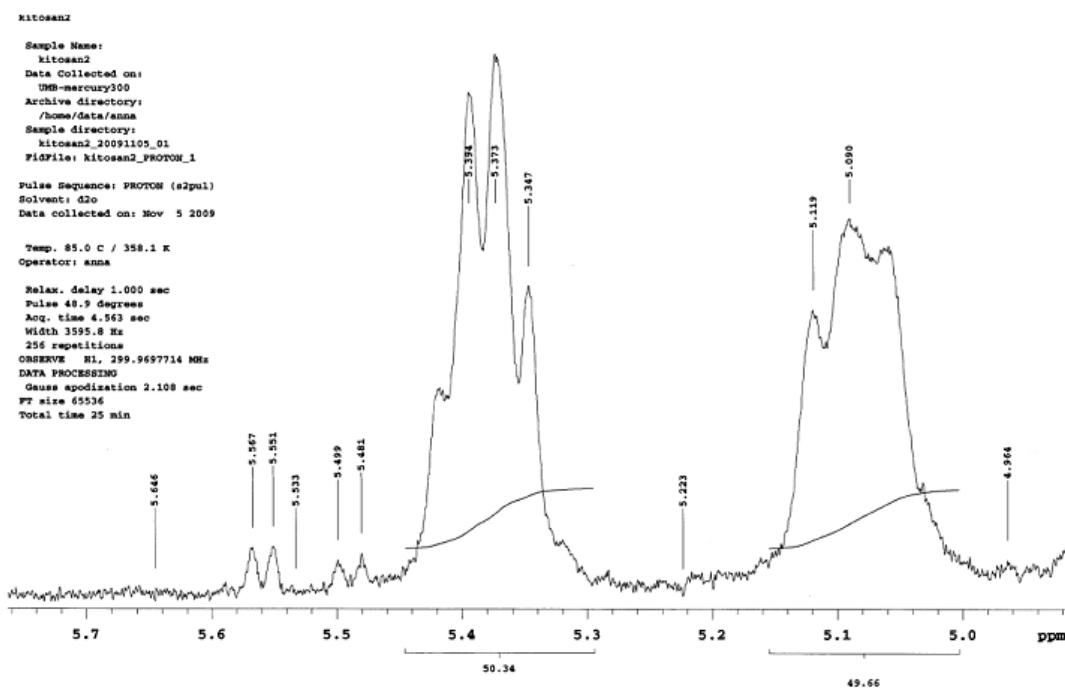
## 7.2 Fremstilling av kitosan

Fremstilling av heteropolymeren kitosan fra kitin ble gjort ved homogen deacetylering av kitin beskrevet i seksjon 3.4. Acetyleringsgraden ble bestemt ved  $^1\text{HNMR}$ - analyse (seksjon 3.5.4).  $F_{A-}$  verdi ble bestemt ved å benytte likning 3.4. Figurene 7.9-7.11 viser  $^1\text{HNMR}$  spektrene for estimering av  $F_{A-}$  verdi for de ulike batchene kitosan som ble fremstilt.

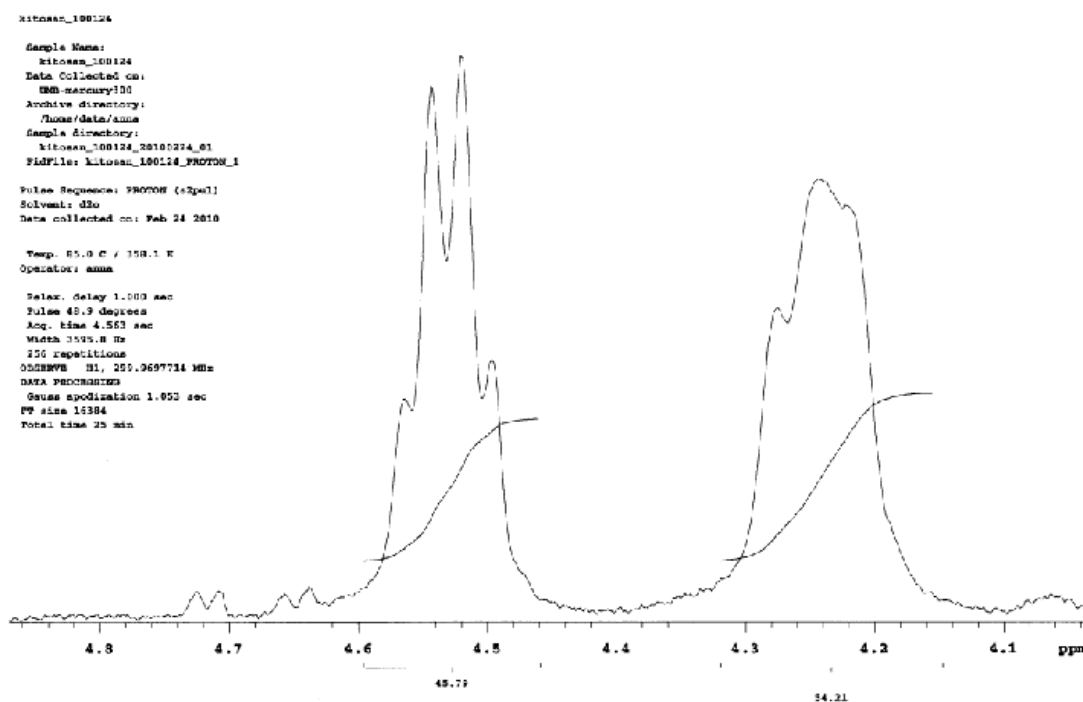




**Figur 7.9:** Viser  $^1\text{HNMR}$ -spekteret for batch 2.1 og 2.2, estimert  $F_A=0,62$ . Grunnet dårlig oppløsning ved  $^1\text{HNMR}$ -analysen viser dette spekteret en annen skala enn spekteret i figur 7.10 og 7.11. Det har blitt tatt utgangspunkt i de to toppene helt til venstre for estimering av acetyleringsgrad.



Figur 7.10: Viser  $^1\text{H}$ NMR- spekteret for batch 3.1 og 3.2 med estimert  $F_A=0,49$ .

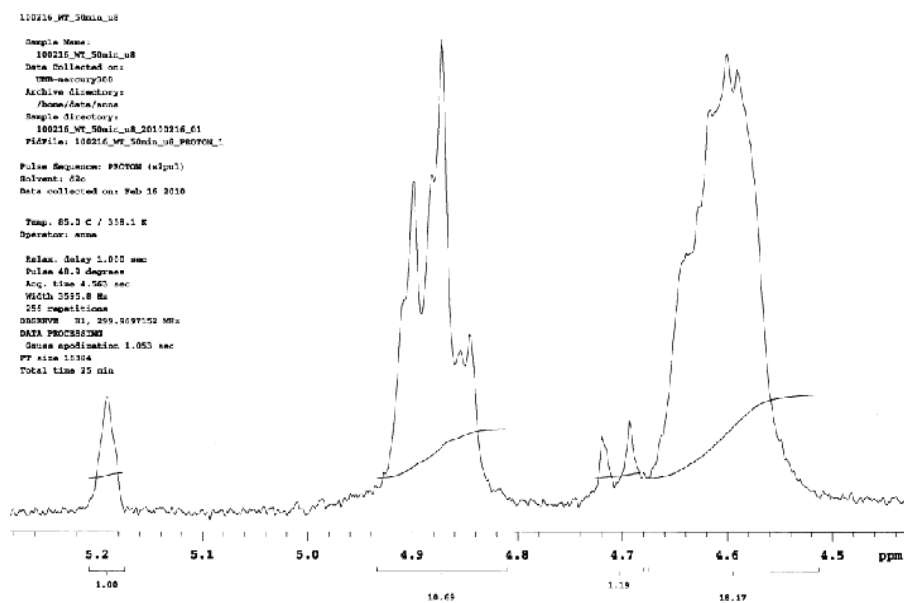


Figur 7.11: Viser  $^1\text{H}$ NMR- spekteret for batch 4.1 og 4.2, estimert  $F_A=0,54$ .

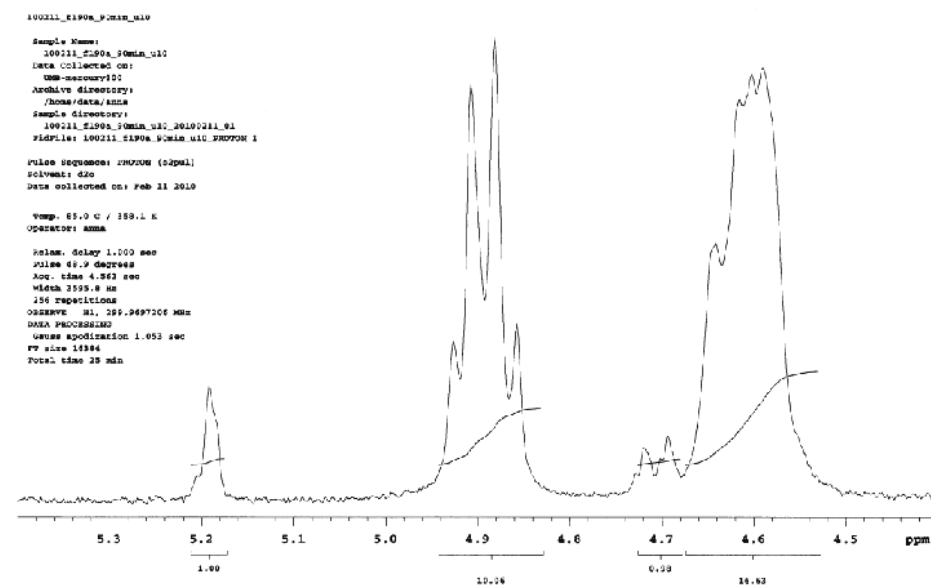
### 7.3 $^1\text{H}$ NMR- analyse

Det ble foretatt hydrolyse av kitosan ved de åtte mutantene samt WT beskrevet i seksjon 4.1. Det ble laget en løsning som inneholdt enzym og substrat hvor det ble gjort uttak til gitte tider. Analyse av uttakene ble gjort ved bruk av  $^1\text{H}$ NMR hvor,  $\alpha$ , nedbrytningsgrad ble estimert.  $\alpha$ , ble funnet ved å bestemme reduserende ender i forhold til interne enheter (seksjon 3.5.5). Prøvene som etter  $^1\text{H}$ NMR- analyse viste en  $\alpha$ - verdi  $\approx 0,05$  ble analysert på SEC, og er vist her i figur 7.12- 7.17.

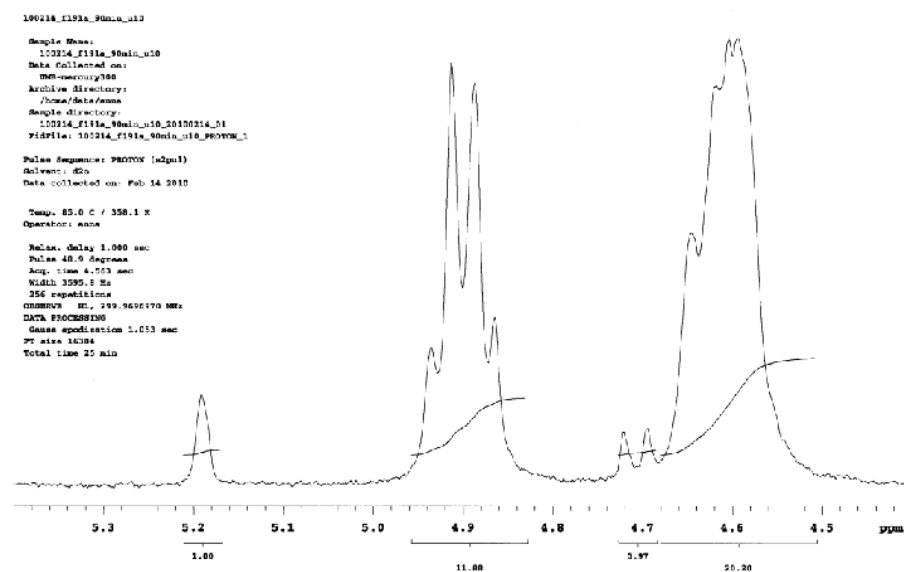
Spekteret for ChiB-R446 viser nedbrytning av kitosan ( $F_A= 0,63$ ) i 70 min ( $\alpha=0,05$ ) er vist i seksjon 3.5.5.



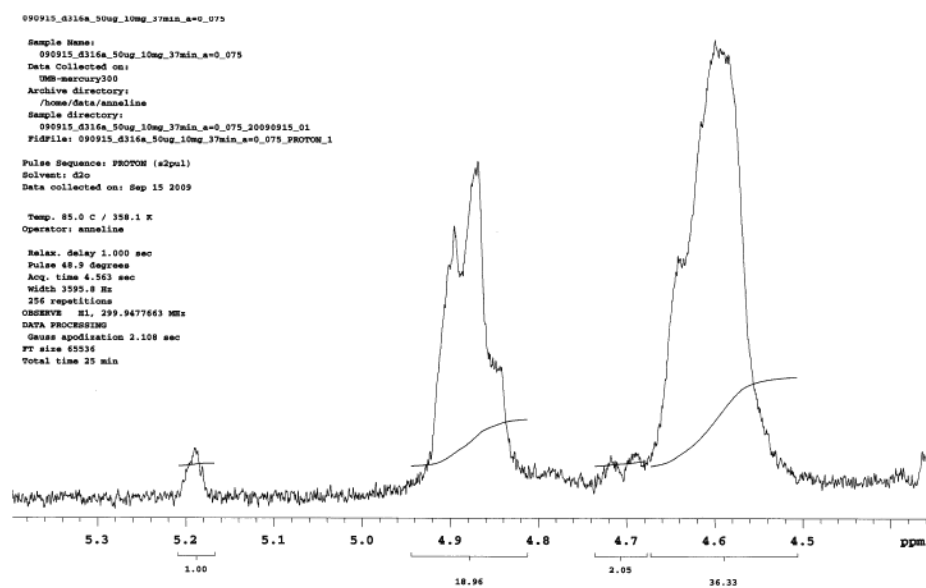
**Figur 7.12:**  $^1\text{H}$ NMR- spekteret viser nedbrytning av kitosan ( $F_A = 0,63$ ) av ChiB-WT, nedbrytningsgrad 0,05.



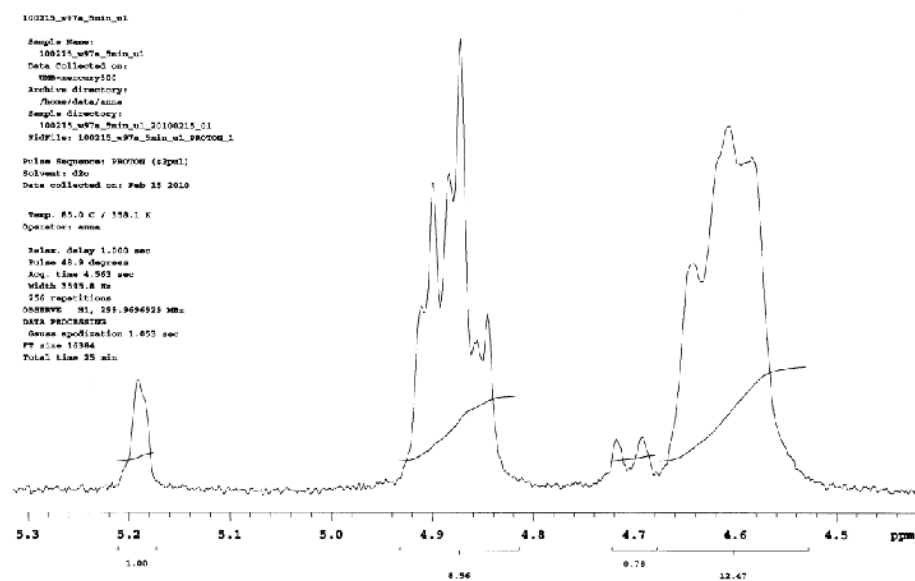
**Figur 7.13:**  $^1\text{H}$ NMR- spekteret viser nedbrytning av kitosan ( $F_A = 0,63$ ) av ChiB-F190A, nedbrytningsgrad 0,05.



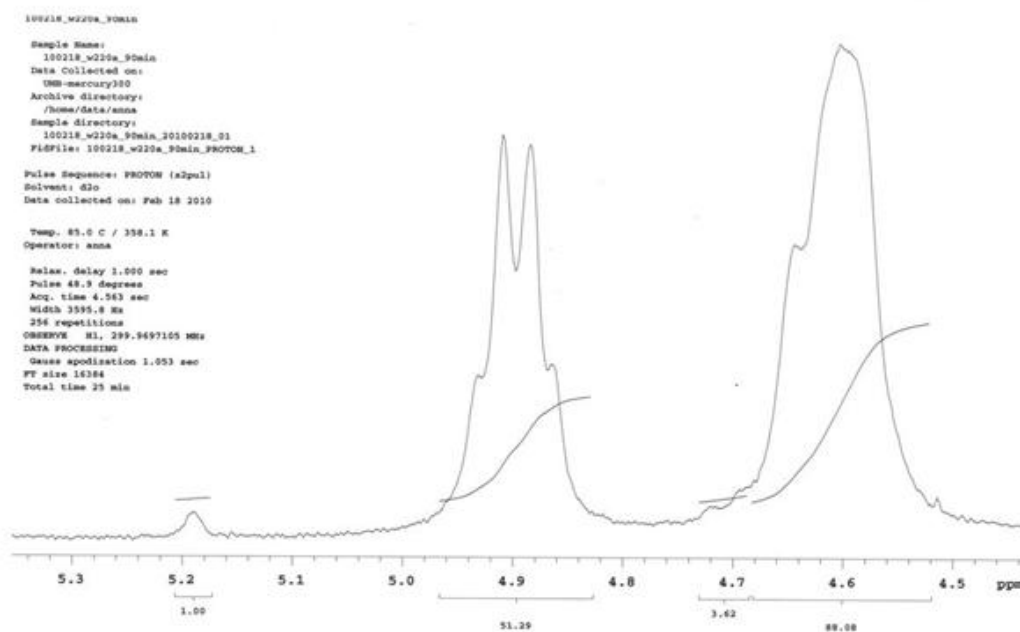
**Figur 7.14:**  $^1\text{H}$ NMR- spekteret viser nedbrytning av kitosan ( $F_A = 0,63$ ) av ChiB-F191A, nedbrytningsgrad 0,05.



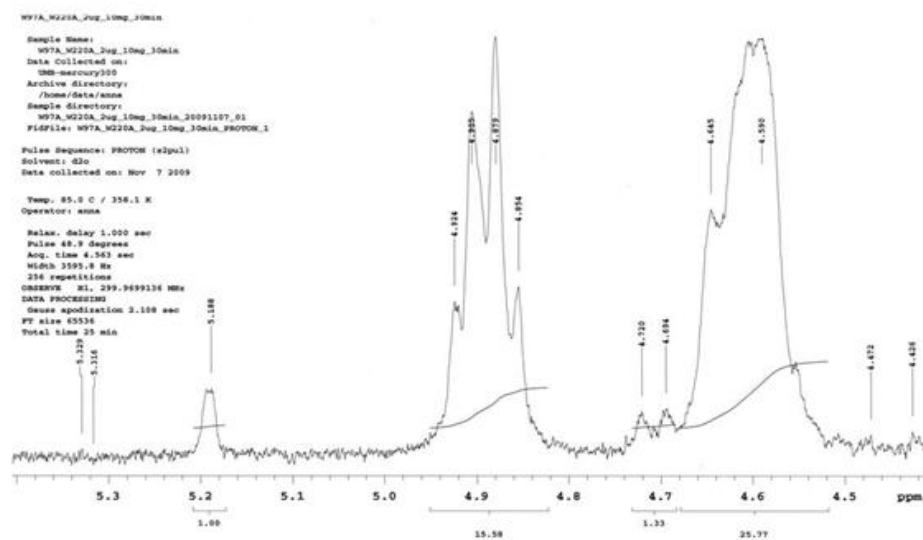
**Figur 7.15:**  $^1\text{H}$ NMR- spekteret viser nedbrytning av kitosan ( $F_A = 0,63$ ) av ChiB-D316A, nedbrytningsgrad 0,05.



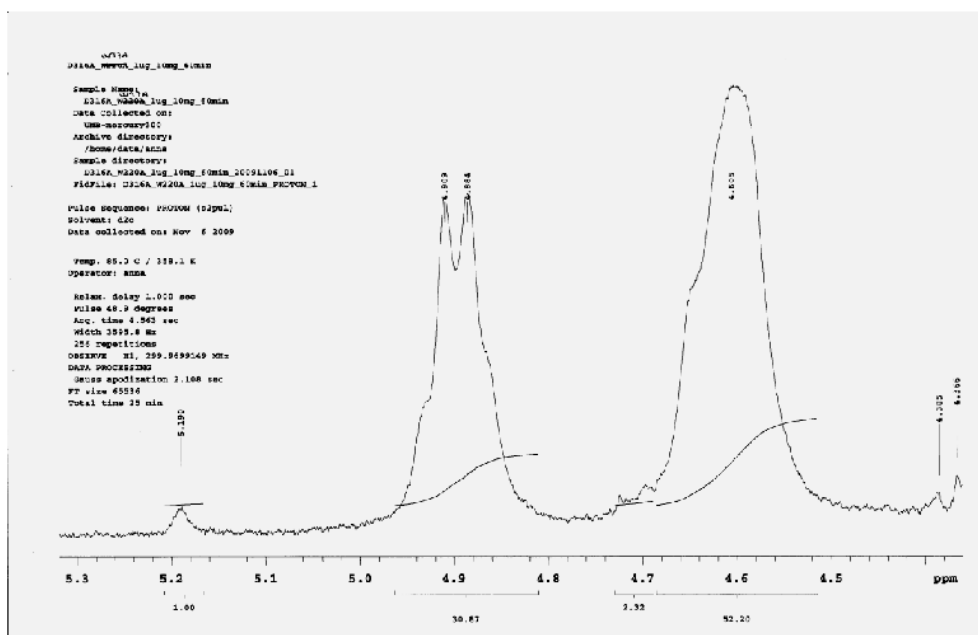
**Figur 7.16:**  $^1\text{H}$ NMR- spekteret viser nedbrytning av kitosan ( $F_A = 0,63$ ) av ChiB-W97A, nedbrytningsgrad 0,07.



**Figur 7.17:**  $^1\text{H}$ NMR- spekteret viser nedbrytning av kitosan ( $F_A = 0,63$ ) av ChiB-W220A, nedbrytningsgrad 0,01.



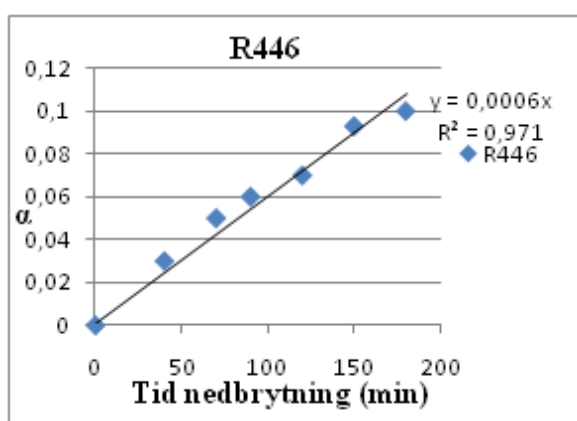
**Figur 7.18:**  $^1\text{H}$ NMR- spekteret viser nedbrytning av kitosan ( $F_A = 0,63$ ) av *ChiB*-W97A/W220A, nedbrytningsgrad 0,05.



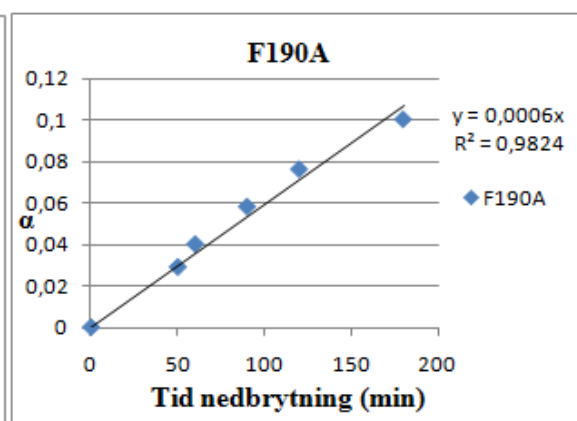
**Figur 7.19:**  $^1\text{H}$ NMR- spekteret viser nedbrytning av kitosan ( $F_A = 0,63$ ) av mutant *W97A/D316A*, nedbrytningsgrad 0,1.

## 7.4 $\alpha$ som funksjon av tid (min)

$\alpha$  ble plottet mot tid (min) for beregning av stingingstallet, dette ble videre ble satt inn i linking 1.6 for estimering av parameteren  $k_{cat}$ . Dette er vist i grafen for ChiB-WT seksjon 4.4.1. Grafene for de resterende mutantene for  $\alpha$  plottet mot tid (min) er vist under i figurene 7.20- 7.27.

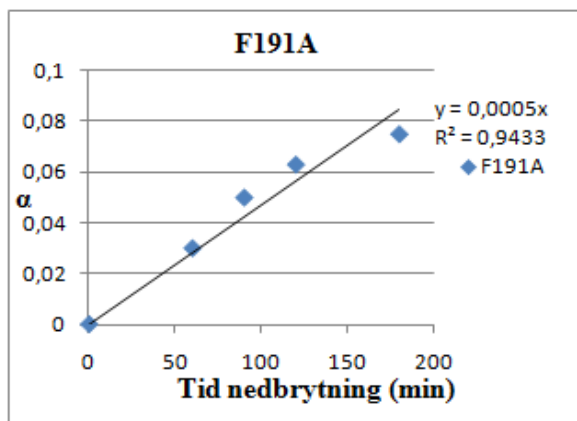


**Figur 7.20:**  $\alpha$  som funksjon av tid (min) for ChiB-R446, samt estimert  $R^2$ -verdi.

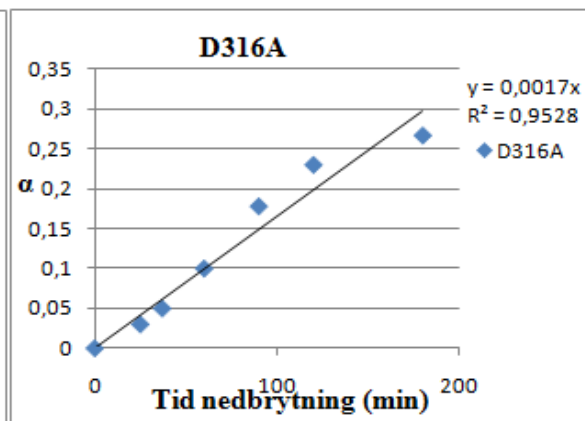


**Figur 7.21:**  $\alpha$  som funksjon av tid (min) for ChiB-F190A, samt estimert  $R^2$ -verdi.

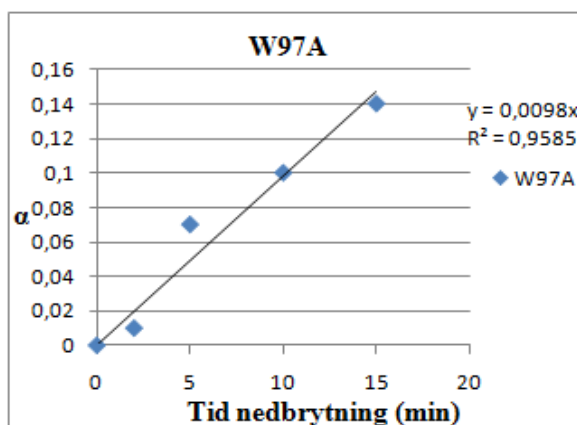




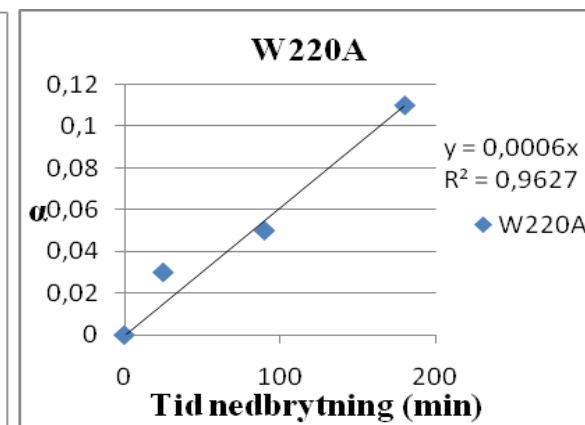
**Figur 7.22:**  $\alpha$  som funksjon av tid (min) for mutant F191A, samt estimert  $R^2$ -verdi.



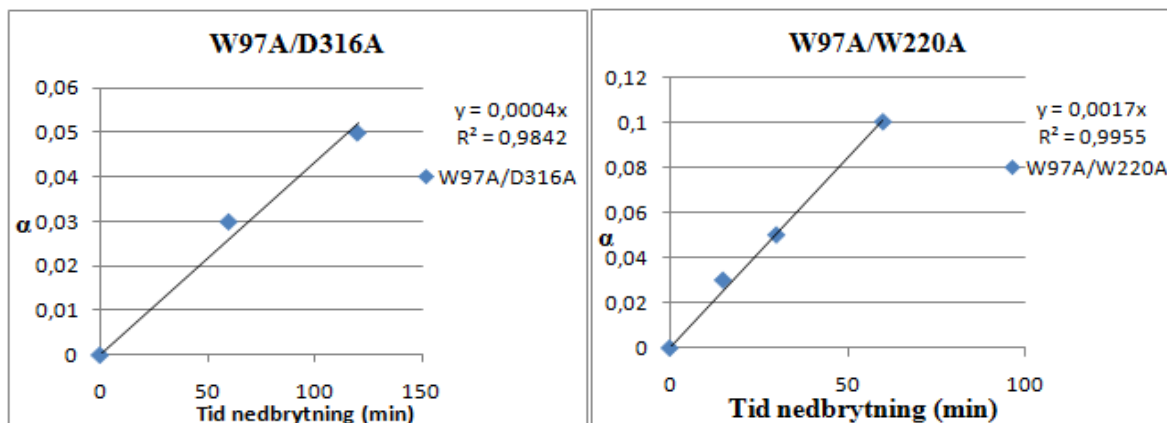
**Figur 7.23:**  $\alpha$  som funksjon av tid (min) for mutant D316A, samt estimert  $R^2$ -verdi.



**Figur 7.24:**  $\alpha$  som funksjon av tid (min) for mutant W97A, samt estimert  $R^2$ -verdi.



**Figur 7.25:**  $\alpha$  som funksjon av tid (min) for mutant W220A, samt estimert  $R^2$ -verdi.



**Figur 7.26:**  $\alpha$  som funksjon av tid (min) for mutant W97A/ D316A, samt estimert  $R^2$ -verdi.

**Figur 7.27:**  $\alpha$  som funksjon av tid (min) for mutant W97A/W220A, samt estimert  $R^2$ -verdi.

## 7.5 MS

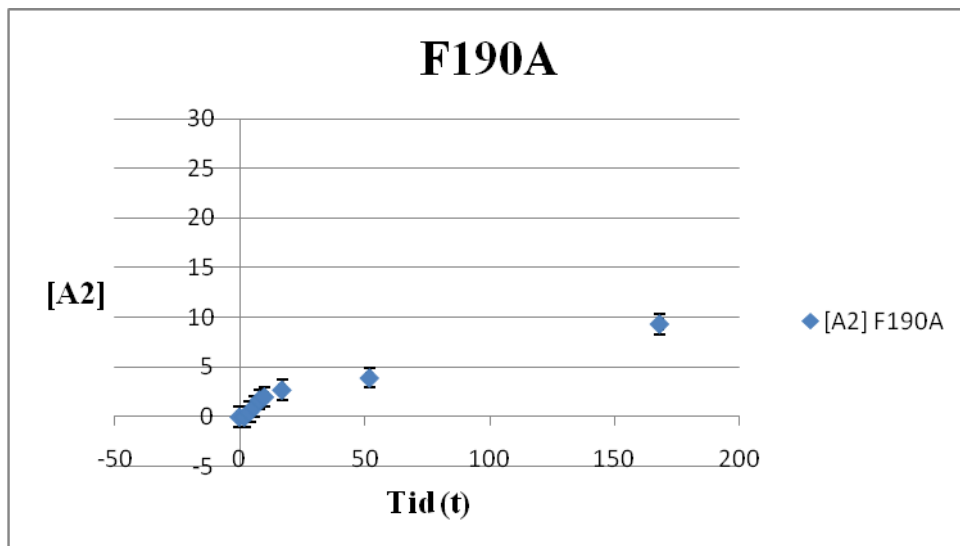
Prøver fra SEC- kromatogrammet ble analysert på MALDI-TOF-MS for å vise forekomsten av hydrolyse av substrat, og hvilke produkter som befant seg i de ulike toppene. Annotering av SEC- toppene ble gjort ved å sammenligne massetoppene i MS-spekteret med masselister for uderivatiserte oligosakkarider. Figur 7.28 viser et utdrag av den første delen av masselisten tilhørende til massespekteret vist i seksjon 4.4.3 for mutant R446.

m/z	S/N	Quality	Fac.	Res.	Intens.	Area
420.551	14.0	472	1320	380.69	166	
424.170	12.1	268	1392	330.57	143	
430.290	15.3	667	833	414.76	295	
438.805	6.6	86	1570	181.95	69	
442.284	28.3	300	570	758.45	807	
445.825	18.3	148	1276	490.92	238	
447.927	144.9	14485	1328	3842.11	1862	
457.853	85.9	11788	1483	2264.54	993	
459.819	6.8	138	1290	186.00	88	
463.601	429.2	14388	2358	11258.10	3202	
481.160	9.2	125	4054	240.37	40	
497.023	7.7	307	7249	200.64	20	
499.020	6.8	187	6625	174.75	19	
499.333	8.0	110	5987	208.04	25	
505.417	9.1	377	3984	229.94	45	
551.107	12.0	417	5612	286.23	42	
567.083	18.2	779	5534	422.98	66	
583.066	11.4	366	3637	258.18	61	
590.335	6.4	182	4965	142.72	26	

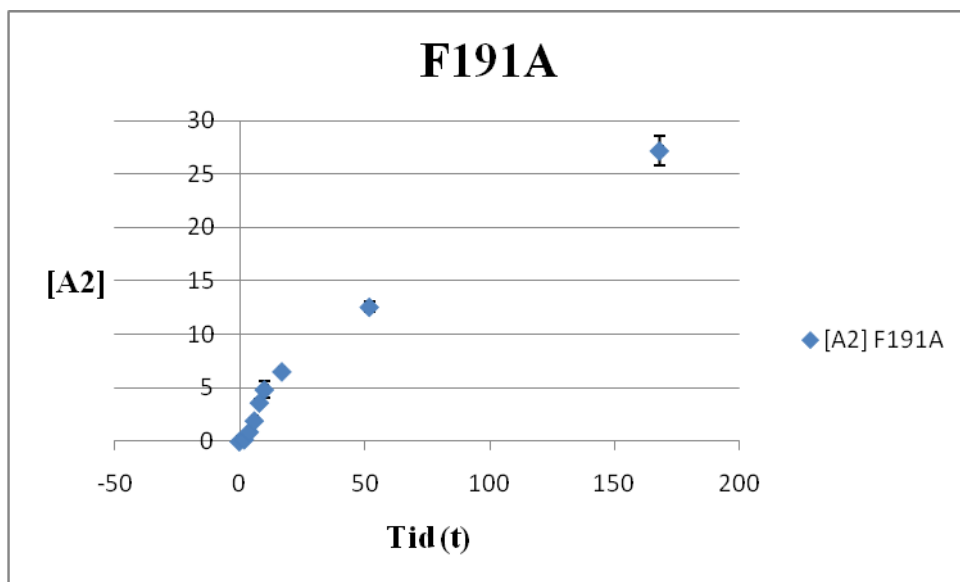
**Figur 7.28:** Et utdrag av den første delen av masselisten tilhørende analyse av mutant R446 på MALDI-TOF MS.

## 7.6 [A2] mot tid

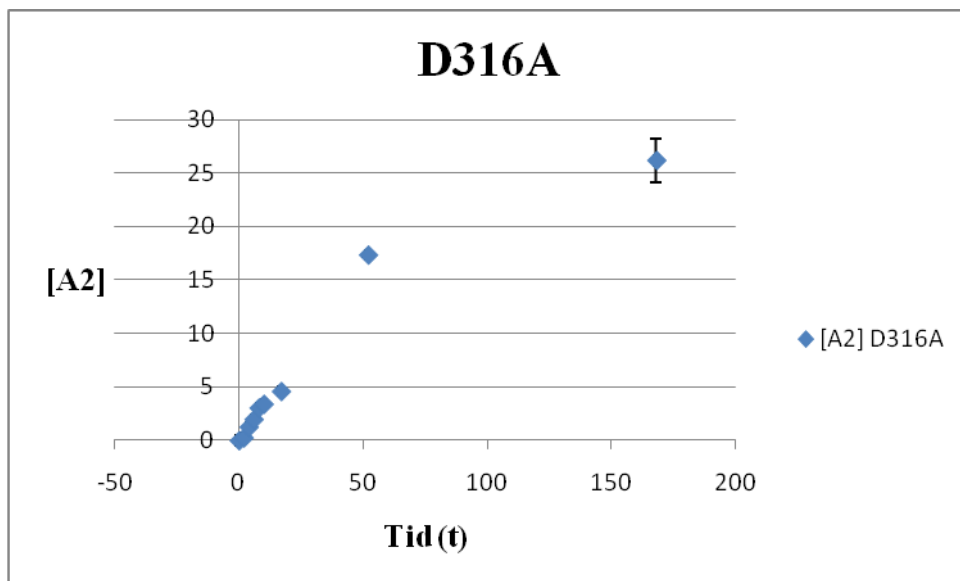
Konsentrasjon av dimer plottet mot tid for de ulike mutantene vises i figurene 7.29 – 7.35.



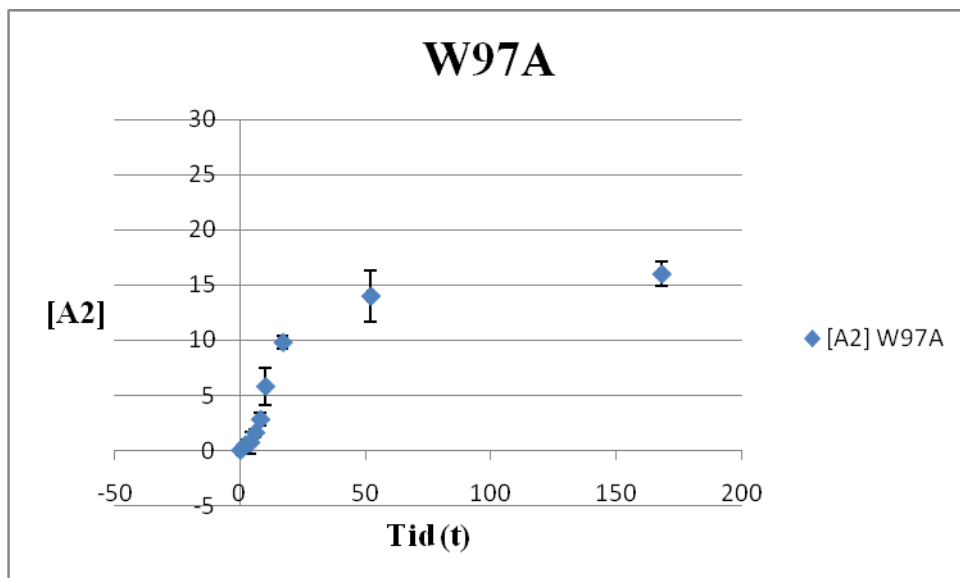
**Figur 7.29:** Konsentrasjon av dimer ([A2]) mot tid for mutant F190A. Stigningstallet i den lineære, initielle fasen ble benyttet for estimering av  $k_{cat}$  (likning 1.1).



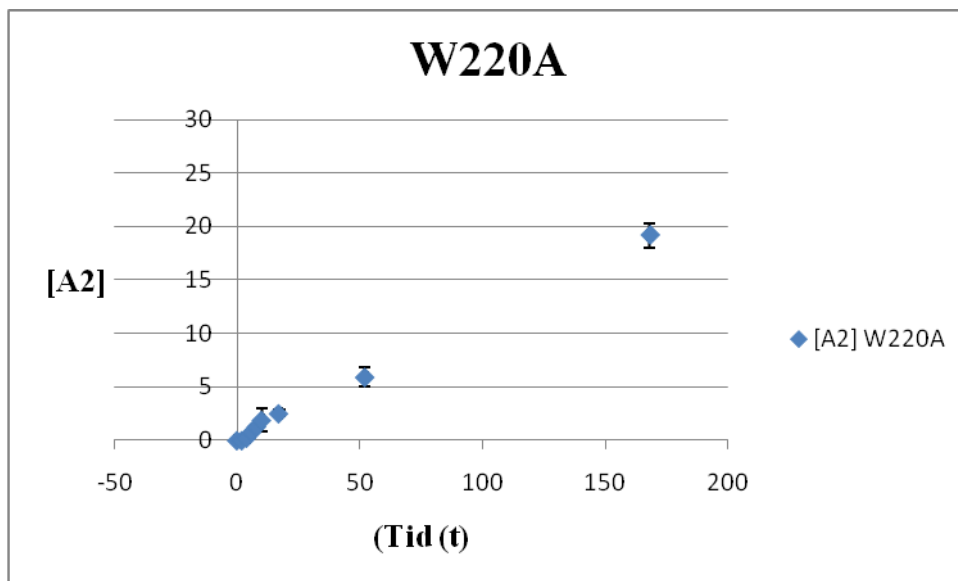
**Figur 7.30:** Konsentrasjon av dimer ([A2]) mot tid for mutant F191A. Stigningstallet i den lineære, initielle fasen ble benyttet for estimering av  $k_{cat}$  (likning 1.1).



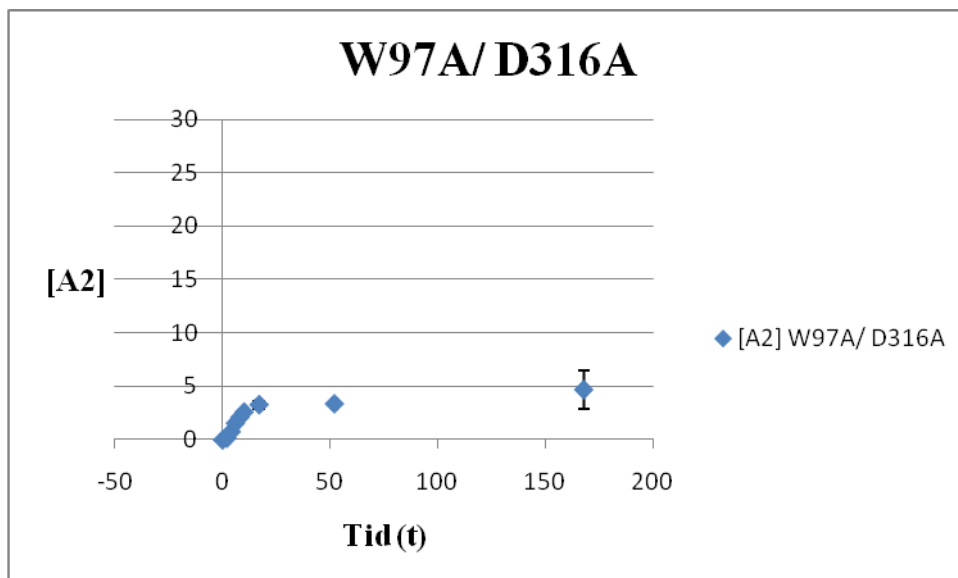
**Figur 7.31:** Konsentrasjon av dimer ( $[A_2]$ ) mot tid for mutant D316A. Stigningstallet i den lineære, initielle fasen ble benyttet for estimering av  $k_{cat}$  (likning 1.1).



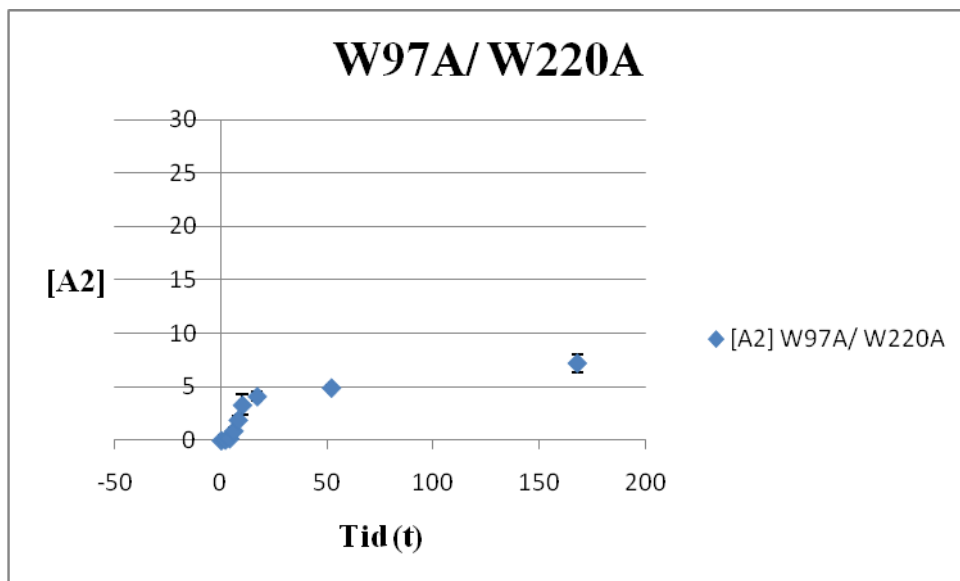
**Figur 7.32:** Konsentrasjon av dimer ( $[A_2]$ ) mot tid for mutant W97A. Stigningstallet i den lineære, initielle fasen ble benyttet for estimering av  $k_{cat}$  (likning 1.1).



**Figur 7.33:** Konsentrasjon av dimer ( $[A_2]$ ) mot tid for mutant W220A. Stigningstallet i den lineære, initielle fasen ble benyttet for estimering av  $k_{cat}$  (likning 1.1).



**Figur 7.34:** Konsentrasjon av dimer ( $[A_2]$ ) mot tid for dobbeltmutant W97A/ D316A. Stigningstallet i den lineære, initielle fasen ble benyttet for estimering av  $k_{cat}$  (likning 1.1).



**Figur 7.35:** Konsentrasjon av dimer ( $[A_2]$ ) mot tid for dobbelmutant W97A/ W220A. Stigningstallet i den lineære, initielle fasen ble benyttet for estimering av  $k_{cat}$  (likning 1.1).