

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP





## Forord

Denne oppgaven har blitt utført ved institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap (IKBM) ved Universitetet for Miljø og Biovitenskap (UMB) våren 2012 og har vært en del av et større forskningsprosjekt om kitinaser i Bioorganisk gruppe sammen med gruppen for Protein Engineering and Proteomics (PEP), ledet av Vincent Eijsink.

Jeg vil takke veilederen min, professor Morten Sørlie for at jeg fikk jobbe i deres forskningsgruppe og for god oppfølging underveis. Jeg vil også takke Anne Grethe Hamre, Anne Line Norberg, Linn Wilhelmsen og Salima Fjeld som har hjulpet meg med alle praktiske spørsmål og veiledning på laboratoriet. Jeg vil også takke Kjersti Grongstad Lundquist for godt samarbeid med fremstilling av kitosan og hyggelige samtaler både faglig og sosialt.

Takk til alle i Bioorganisk gruppe og PEP gruppa på UMB, for at jeg fikk ta del i dette spennende prosjektet.

Ås, Mai 2012

---

Ida Kristine Nielsen

# Innholdsfortegnelse

<i>Forord</i> .....	<i>i</i>
<i>Sammendrag</i> .....	<i>v</i>
<i>Abstract</i> .....	<i>vii</i>
<i>Forkortelser</i> .....	<i>ix</i>
<b>1. Introduksjon</b> .....	<b>1</b>
1.1 Polysakkarider .....	1
1.2 Kitin og kitosan .....	2
1.2.1 Struktur av kitin og kitosan .....	2
1.2.1 Anvendelser av kitin og kitosan .....	3
1.3 Glykosyl hydrolaser .....	4
1.3.1 Klassifisering og struktur av glykosyl hydrolaser .....	4
1.3.2 Virkningsmekanisme til glykosyl hydrolaser .....	5
1.4 Kitinaser .....	8
1.5 Seterettet mutagenese .....	12
1.6 Mål med oppgaven .....	14
<b>2. Utstyrliste</b> .....	<b>16</b>
2.1 Laboratorieutstyr .....	16
2.2 Instrumenter .....	17
2.3 Kjemikalier .....	18
2.4 Buffere og løsninger .....	19
2.5 Proteiner og substrater .....	21
2.6 Bakteriestamme .....	21
2.7 Plasmid .....	21
2.8 Mutageneseprimere .....	21
2.9 Sekvenseringsprimere .....	22
2.10 Kits .....	22
2.11 Programvare .....	24
<b>3. Metoder</b> .....	<b>25</b>
3.1 Design av mutanter .....	25
3.1.1 Tillaging av primere .....	25
3.2 Tillaging av plasmid .....	26
3.2.1 Oppdyrking av bakteriestamme .....	26
3.2.2 Rensing av plasmid .....	26

3.2.3 Kontroll av rensset plasmid med DNA-gel .....	27
3.3 Måling av DNA konsentrasjon ved nanodrop .....	28
3.4 Seterettet mutagenese .....	28
3.4.1 PCR, polymerase chain reaction .....	28
3.4.2 Transformering av XL1-Blue superkompetente celler .....	30
3.4.3 Rensing av plasmid på DNA-gel .....	31
3.5 Sekvensering.....	32
3.5.1 Sekvenserings PCR.....	32
3.5.2 EtOH/EDTA utfelling.....	33
3.5.3 Sekvensering av nytt plasmid .....	34
3.6 Overekspressjon av ChiA.....	35
3.6.1 Vekst av celler .....	35
3.6.2 Tillaging av periplasmatisk ekstrakt.....	35
3.7 Rensing av periplasmatisk ekstrakt på kitinkuler .....	36
3.8 Rensing av periplasmatisk ved IEC.....	37
3.9 Kontroll av rensing med Sodium Dodecyl Sulfate- Polyakrylamid Gel Elektroforese (SDS-PAGE).....	38
3.10 Rensing av periplasmatisk ekstrakt ved HIC.....	39
3.11 Oppkonsentrering av proteinløsning med Amiconrør .....	40
3.12 Bestemmelse av proteinkonsentrasjon ved fluorometrisk måling med Quant-iT™ ....	41
3.13 Bestemmelse av spesifikk enzymaktivitet for kitinaser.....	41
3.14 Tillaging av kitosan .....	43
3.14.1 Fremstilling av kitosan ved homogen <i>N</i> -deacetylering av kitin .....	43
3.14.2 Isolering av kitosan.....	43
3.15 NMR analyse av kitosan for bestemmelse av acetyleringsgrad .....	44
3.16 Nedbryting av kitosan.....	45
3.17 AMAC-derivatisering .....	46
3.18 Rensing av kitooligosakkarider på C-18 kolonne.....	46
3.19 Analyse av AMAC-prøver på MALDI-TOF-TOF-MS/MS .....	47
3.20 Initiell hydrolyse av penta-kitooligosakkarid i H <sub>2</sub> <sup>18</sup> O .....	48
3.21 Analyse på MALDI-TOF-MS av initiell hydrolyse av penta-kitooligosakkarid i H <sub>2</sub> <sup>18</sup> O.....	50
3.22 <sup>1</sup> H-NMR analyse av nedbrutt kitosan .....	50
<b>4. Resultater.....</b>	<b>52</b>

4.1 Tillaging av seterettede mutanter.....	52
4.1.1 DNA-gel.....	52
4.1.2 DNA konsentrasjon målt ved nanodrop.....	53
4.1.3 Sekvensering.....	54
4.2 Produksjon og rensing av villtype og mutante kitinaser.....	55
4.2.1 Rensing av periplasmatisk ekstrakt.....	55
4.2.2 Kontroll av rensing.....	58
4.2.3 Fluorometrisk bestemmelse av proteinkonsentrasjon med Quant-iT™.....	59
4.2.4 Spesifikk enzymaktivitet av isolerte proteiner.....	60
4.3 Fremstilling av kitosan og bestemmelse av acetyleringsgrad.....	61
4.4 Biologisk aktivitet.....	63
4.4.1 Enzymatisk nedbryting av kitosan.....	63
4.4.2 Massespektrometriske analyser av AMAC-derivatisert hydrolyseprodukt.....	64
4.4.3 Massespektrometrisk analyse av initiell nedbrytning av penta-kitooligosakkarid med ChiA mutanter i H <sub>2</sub> <sup>18</sup> O.....	69
<b>5. Diskusjon.....</b>	<b>72</b>
5.1 Mutasjonsanalyse.....	72
5.2 Overekspressjon av ChiA WT og mutanter.....	73
5.3 Biologisk aktivitet.....	73
5.3.1 Nedbrytning av kitosan.....	73
5.3.2 Subsetepreferanser.....	74
5.3.3 Posisjonering av substrat i det aktive setet.....	76
<b>6. Videre studier.....</b>	<b>77</b>
<b>7. Referanser.....</b>	<b>78</b>
<b>8. Vedlegg.....</b>	<b>83</b>

## Sammendrag

I denne oppgaven har det blitt dyrket opp mutanter av enzymet kitinase A (ChiA) fra *Serratia marcescens*. Det har blitt brukt seterettet mutagenese for å innføre mutasjoner på spesifikke aminosyrer i enzymets aktive sete. Dette ble gjort for å undersøke om disse aminosyrene har noen innvirkning på substrat binding og posisjonering. ChiA mutantene som ble laget var R172A, R172Q og K399S. Sekvensering der mutant sekvens ble sammenliknet med WT bekreftet at ønskede mutasjoner var innført. Proteinene ble rensset på kitinkolonne eller ved ionebytter- (IEC) og hydrofob interaksjonskromatografi (HIC). Den spesifikke enzymaktiviteten til hver ChiA mutant og ChiA WT ble bestemt ved spektrofotometri. Mutantene hadde vesentlig lavere enzymaktivitet enn WT.

For en videre karakterisering av mutantene R172A og R172Q, ble det fremstilt kitosan med to ulike acetyleringsgrader ( $F_A$ ) ved homogen *N*-deacetylering av kitin som skulle benyttes som et substrat for å se på effekt av mutasjonene. Ved  $^1\text{H-NMR}$  ble  $F_A$  bestemt til 0,40 og 0,62. Spaltningsgraden for kitosanhydrolyse,  $\alpha$ , ble bestemt ved  $^1\text{H-NMR}$  og var relativt lave sammenliknet med ChiA WT. Dette kan tyde på at Arg172 som ble mutert bort i R172A og R172Q er viktig for produktiv binding av substrat i enzymets aktive sete.

Kitosan med  $F_A$  0,40 og 0,62 nedbrutt med ChiA mutantene R172A og R172Q ble merket på reduserende ender med 2-amino-acridone (AMAC). Videre ble disse analysert på matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-time of flight-massespektrometri/massespektrometri (MALDI-TOF-TOF-MS/MS). Med dette ble det funnet hvilke sekvenser tilstedeværende kitoooligosakkarider hadde som igjen gir informasjon om enzymenes preferanser for acetylerede og deacetylerede enheter i de ulike subsetene i det aktive setet. Det ble observert at preferansen for en acetyleret enhet i subsete -4, -2 og +2 hos ChiA WT ikke lenger var tilstede for R172A og R172Q.

Det ble gjort enzymatisk hydrolyse i  $\text{H}_2\text{O}^{18}$  på ChiA mutantene K399S, R172A og R172Q samt WT for å se hvordan substratet plasseres i det aktive setet. Fra MS spektrene ble det bestemt hvor stor andel av dimere og trimere som var merket med  $\text{O}^{18}$  basert på relativ intensitet av toppene. Fra resultatene er det tydelig at de nye reduserende endene er på dimere for alle mutantene. Dette tyder på at alle tre ChiA mutantene binder majoriteten av substratet fra -2 til +3 i det aktive setet i motsetning til ChiA WT som binder  $(\text{GlcNAc})_5$  like mye fra -2 til +3 som -3 til +2-.



## Abstract

In this study it has been grown mutants of the enzyme chitinase A (ChiA) from *Serratia marcescens*. It has been used seat directed mutagenesis to introduce mutations in specific amino acids in the enzyme's active site. This was done to investigate if these amino acids have any effect on substrate binding and positioning. The ChiA mutants that were made were R172A, R172Q, and K399S. Sequencing in which mutant sequence was compared with WT confirmed the desired mutations were introduced. The protein was purified on chitin column or ion exchange columns (IEC) and hydrophobic interaction chromatography (HIC). The specific enzyme activity of each mutant and wild type was determined by spectrophotometry. Mutants had significantly lower enzyme activity than WT.

For a further characterization of mutants R172A and R172Q, chitosan with two different degrees of acetylation ( $F_A$ ) was made by homogeneous *N*-dacetylation of chitin which was used as a substrate to watch the effect of mutations. By NMR  $F_A$  was determined to 0, 40 and 0, 62. The degree of scission for chitosan hydrolysis,  $\alpha$ , was determined by NMR and was relatively low compared with ChiA WT. This suggests that Arg172 is important for productive binding of substrate in the enzyme's active site, because this amino acid was changed.

Chitosan with  $F_A$  0, 40 and 0, 62 were degraded by mutants R172A and R172Q and the reducing ends were labeled with 2-amino-acridone (AMAC). Analysis on matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-time of flight-mass spectrometry/mass spectrometry (MALDI-TOF-TOF-MS/MS) identified the sequences of the present chitooligosaccharides in solution. From this the enzyme's preferences for acetylated and deacetylated units in the various subsites in the active site was determined. It was observed that the preference for an acetylated unit in subsite -4, -2 and 2 in ChiA WT was no longer present for the R172A and R172Q.

By enzymatic hydrolysis in  $\text{H}_2\text{O}^{18}$  it was determined how the substrate is placed in the active site in ChiA mutants K399S, R172A, R172Q and WT. From the MS spectra it was determined the proportion of dimers and trimers which was labeled with  $\text{O}^{18}$  based on relative intensities of the peaks. From the results it is clear that the new reducing ends are in dimeric for all mutants. These results indicate that all three ChiA mutants bind the majority of the substrate from -2 to +3 subsite in the active site, in contrast with ChiA WT which binds  $(\text{GlcNAc})_5$  as much from -2 to +3 as from -3 to +2.

## Forkortelser

4- MU- (GlcNAc) <sub>2</sub>	4-methylumbelliferyl-β-D-N,N'-diacetylchitobiose
A5	Penta- <i>N</i> -acetylchito-pentaose
A-enhet	Acetykert (GlcNAc) enhet
AMAC	2-amino-acridone
BSA	Bovine serum albumin
ChiA	Kitinase A fra <i>Serratia marcescens</i>
ChiB	Kitinase B fra <i>Serratia marcescens</i>
ChiC	Kitinase C fra <i>Serratia marcescens</i>
D-enhet	Deacetykert (GlcN) enhet
dH <sub>2</sub> O	Sterilt vann (Milli Q)
EtBr	Ethidiumbromid
F <sub>A</sub>	Acetyleringsgrad
GlcNAc	<i>N</i> -acetyl glukosamine
HIC	Hydrophobic interaction chromatography
KOS	Kitooligosakkarider
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MS	Massespektrometri
NMR	Kjernemagnetisk resonans
PMSF	Phenylmetylsulfonyl fluorid
Rpm	Rotasjon pr minutt
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfat Polyakrylamid Gel Elektroforese
TOF	Time Of Flight
WT	Villtype

# 1 Introduksjon

## 1.1 Polysakkarider

Polysakkarider består av lange polymere av sukkerenheter og har to hovedfunksjoner i levende organismer; mat-reservoar og strukturelt element [1].

Planter lagrer polysakkaridet stivelse i cellulære strukturer kalt plastider, for eksempel kloroplast. Ved å syntetisere stivelse kan plantene danne et lager av sukker den har i overskudd som en energireserve. Sukkeret kan senere hydrolyseres, noe som bryter bindingene mellom glukose monomerene. De fleste pattedyr, også mennesker, har enzymene som kan hydrolysere stivelse fra planter og gjøre glukosen tilgjengelig som næringsstoff for cellene. Dyr og mennesker lagrer polysakkaridet glykogen først og fremst i leveren og muskelceller. Hydrolyse av glykogen frigjør glukose når behovet for sukker øker [2].

Organismer kan bygge sterke materialer fra strukturelle polysakkarider [2]. Cellulose er det polysakkaridet som er vanligst i organisk materiale, for eksempel i cellevegger hos planter[1]. Akkurat som stivelse er cellulose en polymer av glukose, men glykosidbindingene i disse to polymerene er forskjellige. Variasjonen i geometri gjør at cellulose og stivelse har forskjellig tredimensjonal struktur og derfor veldig forskjellige egenskaper. Fordøyelsesenzymene i mennesker kan hydrolysere  $\alpha(1\rightarrow4)$  glykosidbindinger, men ikke  $\beta(1\rightarrow4)$  bindinger mellom glukoseenheter. Derfor kan mennesker fordøye stivelse, men ikke cellulose[3].

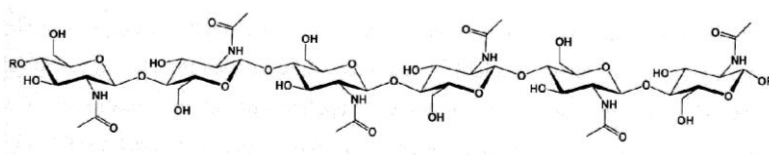
Et annet viktig polysakkarid er kitin. Dette er et karbohydrat brukt av leddyr (insekter, edderkopper, krepsdyr og liknende) til å bygge beskyttende skall. Kitin likner på cellulose, bortsett fra at monomeren i kitin er et aminosukker [2]. Kitin er beskrevet nærmere i kapittel 1.2.

## 1.2 Kitin og kitosan

Kitin og kitosan er lett tilgjengelige biopolymere, kommersielt fremstilt fra reke- og krabbeskall som avfall fra matvareindustrien. Kitin finnes naturlig som et støttesystem i planter og dyr, inkludert virvelløse sjødyr, insekt, sopp og gjær [4]. Selv om kitin ble isolert allerede i 1876 og kitosan avledet i 1895, har de kun blitt kommersielt utnyttet i senere tid. Det var stor interesse rundt nye anvendelser på 1930 tallet og tidlig på 1940 tallet som førte til nesten 50 patenter. På grunn av mangel på tilstrekkelig mengde forsyninger og konkurranse fra syntetiske polymere ble den kommersielle utviklingen hemmet. På 1970 tallet økte interessen igjen da det var ønskelig å finne fornuftige måter å utnytte avfall med kitin fremfor å betale dyre avgifter for å kaste det som følge av nye miljøreguleringer. Dette førte til nye bruksområder. I dag brukes kitin og kitosan i et bredt spekter av produkter [5].

### 1.2.1 Struktur av kitin og kitosan

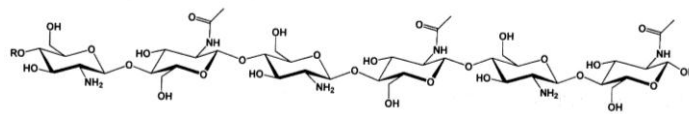
Kitin er et lineært polysakkarid som består av  $\beta$ -1,4 bundet *N*-acetyl glukosamin enheter (GlcNAc;A) som ligger  $180^\circ$  i forhold til hverandre [6], se figur 1.1.



Figur 1.1: Struktur av kitin som viser at enhetene av  $\beta$ -1,4 bundet *N*-acetyl glukosamin ligger  $180^\circ$  i forhold til hverandre. Figuren er hentet fra Norberg, 2011 [7].

Kitin har tre forskjellige strukturer,  $\alpha$ ,  $\beta$  og  $\gamma$ , som varierer i orienteringen av kitinkjedene.  $\alpha$  er den vanligste formen. Der er kjedene orientert antiparallelt, det vil si at de to kjedene på hver side peker i samme retning mens kjeden i midten peker andre vei. Dette er en tettpakket struktur som holdes sammen av inter- og intramolekylære hydrogenbindinger. Dette forklarer hvorfor  $\alpha$ -kitin er vanskelig å løse i vann [8-10]. I  $\beta$ -kitin er kjedene orientert parallelt, dvs. at kjedene peker i samme retning [6, 11, 12]. Dette gir en løsere struktur enn i  $\alpha$ -kitin og finnes derfor i f.eks. deler av insekt som er fleksible og myke [13].  $\gamma$ -kitin har to kjeder ved siden av hverandre som peker samme vei mens den tredje kjeden peker den andre veien [11].

Kitin er uløselig i vann på grunn av sin krystallinske struktur og intra- og intermolekylære hydrogenbindinger [14, 15]. Dette er ofte et problem under studie og degradering av kitin [16]. Kitosan er et deacetyliert derivat av kitin og er vannløselig på grunn av saltformasjon av glukosamin underenheten på C-2 aminogruppen i organiske syrer [17]. I denne vannløselige formen har man flere muligheter for anvendelse og modifiseringer av polymeren. Egenskapene til kitosan kan for eksempel beskrives ved acetyleringsgrad,  $F_A$ , om acetyleringen er tilfeldig eller kommer i blokker samt lengde på polymeren [18]. Et eksempel på struktur av kitosan er gitt i figur 1.2.



Figur 1.2: Strukturen til kitosan som består av  $\beta$ -1,4 bundet *N*-acetyl glukosamin- og glukosamin enheter, orientert  $180^\circ$  i forhold til hverandre. Figuren er hentet fra Norberg, 2011 [7].

### 1.2.2 Anvendelser av kitin og kitosan

Kitin og kitosan viser ulik biologisk aktivitet og brukes blant annet i jordbruk, industri og medisin [19, 20]. Innenfor biomedisin brukes kitin som en potensiell anti-kolesterol medisin, i helbredelse av sår, i belegg på øyebandasjer, i kontaktlinser og tannlim. I personlig pleie brukes kitin i kosmetikk-, hud- og hårprodukter for å lage belegg som holder på fuktighet. I bioteknologi brukes kitin i matriks for å immobilisere enzymer og celler, i filtreringsmembraner for gjenvinning av protein fra produkter og støtte for enzymer og celler i kromatografi. Kitin brukes i rensing av flytende avfall fra industri, rensing i fruktjuice og fermentert drikke og i fjerning av metall og bakterier i svømmebasseng. Innenfor produksjon av tekstiler og papir brukes kitin som belegg og til å binde papir. I jordbruk brukes kitin i behandling av frø og til regulering av vekst, samt som tilsetningsstoff i dyremat [4, 5]. Kitin brukes også som råmaterial for produksjon av glukosamin som igjen brukes i smertestillende medisiner mot gikt og i kosttilskudd [21]. Kitosan inhiberer vekst av patogener i grønnsaker og forbedrer deres utseende. Kitosan kan derfor brukes som konserveringsmiddel i jordbruket [22].

Kitoologosakkarider (KOS) er oligomere fremstilt fra kitosan, kjemisk eller enzymatisk. Kjemisk kan KOS fremstilles ved syre hydrolyse. Vårum *et.al* [23] studerte syre hydrolyse av glykosidbindingen (depolymerisering) og *N*-acetyl bindingen (de-*N*-acetylering) i forskjellige delvis *N*-acetylerede kitosaner i både konsentrert og fortynnet syre. Den syrekatalyserte degraderings hastigheten av kitosan viste seg å være avhengig av  $F_A$ . Ved syre hydrolyse var det veldig spesifikk spaltning av A-A og A-D glykosidbindingene og hastigheten var tre ganger så høy som for spaltning av D-D og D-A bindingene [23]. Denne preferansen ble beskrevet med en kombinasjon av to faktorer. På D-enheten er det en positivt ladet aminogruppe som gjør protonering av det glykosidiske oksygenet ugunstig da dette gir en lavere spaltningshastighet etter D-enheten [24]. Den andre faktoren er at på A-enheten er det en acetamido gruppe nær glykosidbindingen som kan bidra til å gjøre den hydrolytiske mekanismen mer effektiv. Dette fører igjen til høyere spaltningshastighet av glykosidbindingen etter A-enheten [25].

Kitosan kan enkelt fremstilles fra kitin og brukes som substrat i studier for å karakterisere enzym. Ved å studere hvilke kuttsekvenser som finnes etter hydrolyse av kitosan kan det avgjøres hvordan det aktuelle enzymet posisjonerer substratet i det aktive setet. Denne fremgangsmåten ble benyttet av Norberg *et.al* i 2011 [7].

### ***1.3 Glykosyl hydrolaser***

Glykosyl hydrolaser, eller glykosidaser, er en gruppe enzymer som bryter ned polysakkarider ved å hydrolysere O-glykosidbindingen mellom to sukker [26].

#### ***1.3.1 Klassifisering og struktur av glykosyl hydrolaser***

Glykosyl hydrolaser klassifiseres ut fra deres virkningsmekanisme-, som enten endo- eller ekso-enzym. Endo-enzym angriper polymerkjeden på et tilfeldig sted, mens ekso-enzym angriper en av endene på polymerkjeden. Begge typer kan i tillegg være prosessive. Prosessive enzymer forblir knyttet til substratet etter en spaltning. Slik kan flere spaltninger gjøres etter hvert som substratet går gjennom enzymets aktive sete [27, 28]. Prosessivitet er

vanskelig å måle når et uløselig substrat degraderes, som for eksempel kitin, men kan lett måles når kitosan degraderes [16, 29-31].

Ikke-prosessive endo-enzymene har en åpen substratbindende kløft som gjør det mulig å binde på et tilfeldig sted på substratet, spalte det og deretter frigjøre det. Det aktive setet er tunnelformet når substratet hydrolyseres ved ekso-mekanismen og/eller med en prosessiv virkningsmekanisme [32, 33].

Glykosylhydrolaser har flere domener som bidrar til binding av substratet i tillegg til de katalytiske underenhetene som utfører spaltningen av substratet. Det aktive setet som binder substratet i glykosylhydrolaser består av flere subseter som dannes av aminosyrer som interagerer med substratet. Det aktive setet merkes fra  $-n$  til  $+n$  hvor  $-n$  er der den ikke-reduserende enden av sukkerkjeden bindes og  $+n$  er der den reduserende enden bindes.

Spaltning av polymeren skjer mellom substrat bundet i subsetet  $-1$  og  $+1$  [34]. Sukkeret som er bundet i  $-1$  subsetet vil etter hydrolyse bli den nye reduserende enden i et av de hydrolytiske produktene. Sukkeret bundet i subsetet  $+1$  blir den nye ikke-reduserende enden.

### ***1.3.2 Virkningsmekanisme til glykosylhydrolaser***

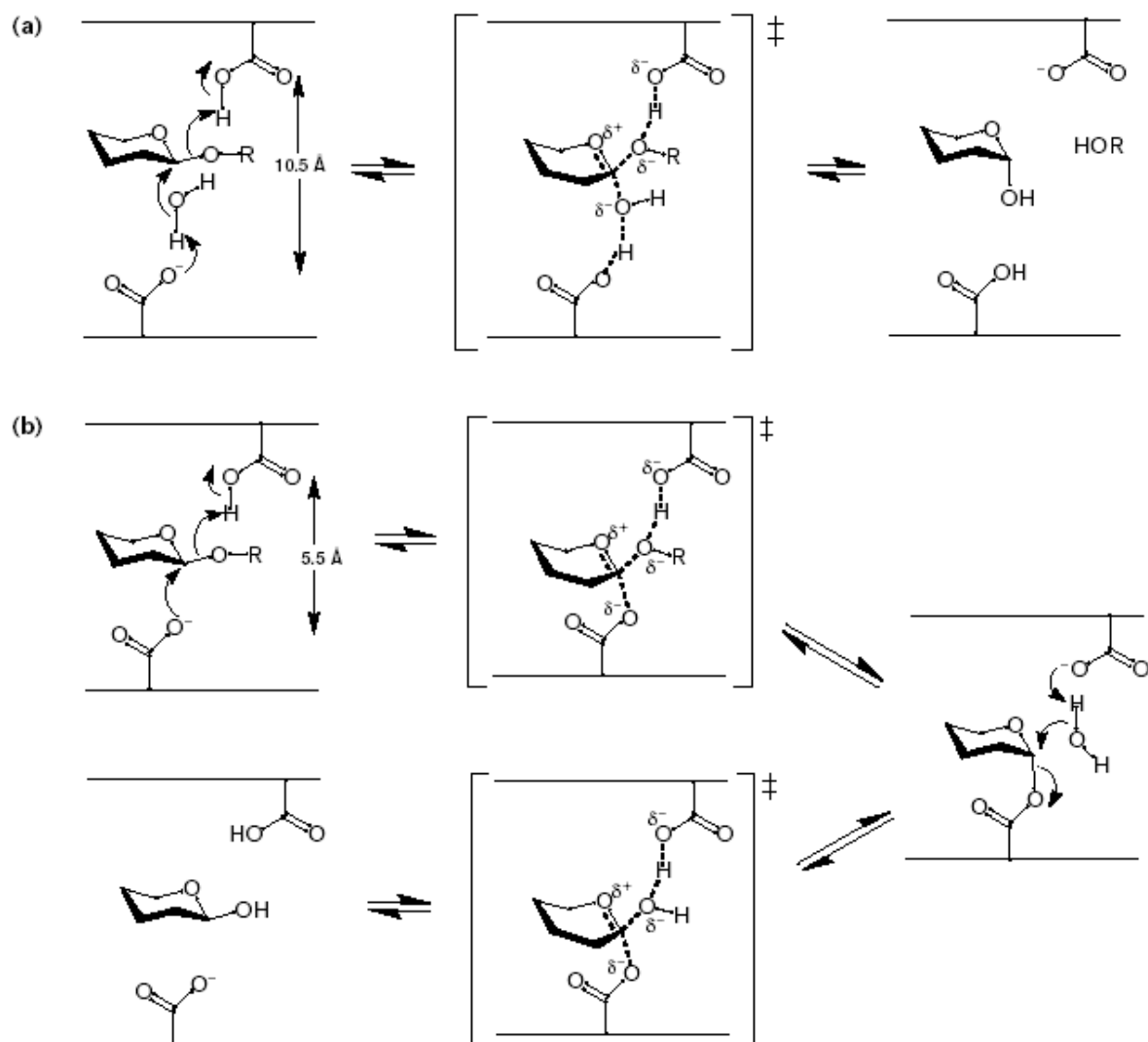
Hydrolysen av glykosidbindingen foregår ved nukleofil substitusjon på det anomeriske karbonet og kan videre føre til enten bevaring eller invertering av den anomeriske konfigurasjonen [35, 36]. Begge disse hydrolysereaksjonene er syrekatalysert og trenger derfor to karboksylsyrer ved det aktive setet. Den ene syren er proton donor og den andre er proton akseptor i den inverterende mekanismen, eller nukleofil i den bevarende mekanismen. I begge mekanismene er protondonoren innenfor avstanden for hydrogenbinding med glykosidoksygenet.

Den inverterende mekanismen er en reaksjon som foregår i ett steg der protonering av glykosidoksygenet skjer samtidig med et nukleofilt angrep på det anomeriske karbonet fra et aktivert vannmolekyl, se del a) figur 1.3. Vannmolekylet er mellom en karboksylsyrergruppe og det anomeriske karbonet og aktiveres av karboksylsyrergruppen som er proton akseptor [37]. Da det er en relativt lang avstand mellom de to katalytiske karboksylsyrer kan



vannmolekylet angriper karbonet herfra, som fører til en inversjon av den anomeriske konfigurasjonen. Denne mekanismen brukes av kitosanaser tilhørende familie 8, 46, 75 og 80 samt kitinaser av familie 19 [32, 38-43].

Den bevarende mekanismen, vist i del b) på figur 1.3, foregår i to steg. Det første steget er en protonering av glykosidoksygenet av den katalytiske syren og et sammenfallende nukleofilt angrep på det anomeriske karbonet av nukleofilen, det vil si den andre syren. Dette angrepet fører til at glykosidbindingen brytes og at det formes en kovalent binding mellom det anomeriske karbonatomet og nukleofilen [44]. Videre blir intermedietet hydrolysert ved at et vannmolekyl angriper det anomeriske karbonet fra en posisjon som er nær der det opprinnelige glykosidoksygenet satt. Dette fører til en bevaring av konfigurasjonen til det anomeriske karbonet. Avstanden mellom de to katalytiske syrene regnes her som kort [32]. Kitinaser av familie 18 og kitosanaser av familie 5 og 7 bruker denne bevarende mekanismen.



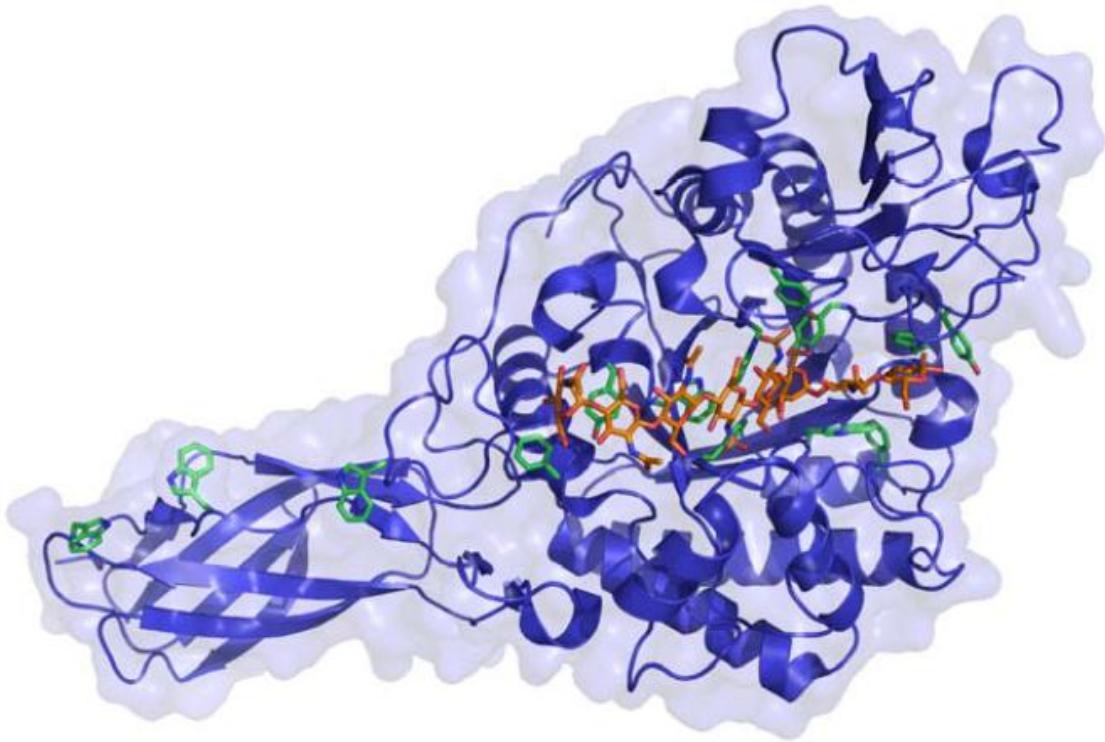
Figur 1.3: Mekanisme for glykosyl hydrolyse. Del a) viser inverterende mekanisme og del b) viser bevarende mekanisme. Figuren er hentet fra Rye, 2000 [45].

## 1.4 Kitinaser

Kitinaser er en type glykosyl hydrolaser som tilhører familie 18 og 19. De katalyserer hydrolyse av  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glykosidbindingen mellom A-A sukkerenheter i kitin. De katalyserer også hydrolyse av kitosan, avhengig av kitosanens  $F_A$  [43]. Kitinasene i familie 18 finnes i blant annet bakterier, sopp, insekter, planter, pattedyr og virus [46, 47]. Den Gram negative jordbakterien *Serratia marcescens* produserer tre kitinaser i familie 18 (ChiA, ChiB og ChiC), en kitobiase og en polysakkarid monooksygenase (CBM familie 33) [48-53].

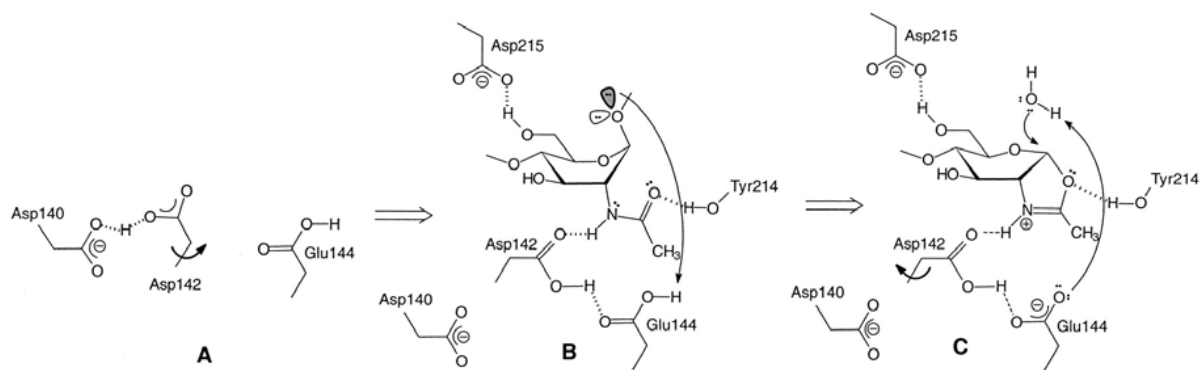
Kitinaser i familie 18 (for eksempel ChiA) har en struktur i det katalytiske domenet som består av åtte  $\alpha$ -helikser og åtte  $\beta$ -plater. Denne kombinasjonen kalles en ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>-tønne eller TIM-tønne (TIM-barrel) [46, 47, 54, 55]. Domenet har en konserverv aminosyresekvens, DXXDXDXE. Glutamaten er den samme som den katalytiske syren [37, 40, 46, 47, 54, 56]. I ChiA er det et ( $\alpha+\beta$ )-domene i ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>-tønningen, som gir en «vegg» og som gjør at enzymet får en dyp kløft. Det aktive setet i denne kløften har seks sub seter fra -4 til +2 [46, 47]. Likevel har det i senere tid blitt gjort undersøkelser som tyder på at det finnes et ekstra sub sete i +3 [7].

I tillegg til det katalytiske domenet har noen kitinaser i familie 18 et domene for substratbinding som antas å bidra til binding av uløselige substrater [31]. ChiA har for eksempel et *N*-terminalt kitinbindende domene, (fibronectin III-liknende) som forlenger kløften for substratbinding mot den ikke-reduserende enden. Dette tyder på at ChiA degraderer substratet fra den reduserende enden mot den ikke-reduserende enden [47]. Figur 1.4 viser struktur av ChiA.



Figur 1.4: Struktur av ChiA, bundet til en acetykert oktamer. Figuren er hentet fra Ellinor Heggsets doktorgradsavhandling [26]. Strukturen ble først publisert i Papanikolau et al 2001[57]. De aromatiske sidekjedene i kløften for substratbinding på det katalytiske domenet eller det substratbindende domenet har grønn farge.

Kitinaser av familie 18 bruker en spesiell variant av den bevarende mekanismen, kalt substrat-assistert hydrolyse. Denne er vist i figur 1.5. Nukleofilen her er karbonyl oksygenet fra *N*-acetyl gruppen til sukkeret bundet i subsetet -1. Dette gir et oksazolinium ion intermediat [56, 58-60]. Dette forklarer hvorfor produktiv substratbinding av kitosan og kitosan oligomere til kitinaser av familie 18 er avhengig av en acetykert sukkerenhet bundet til -1 subsetet [29]. I motsatt tilfelle vil KOS som kan bindes med en D-enhet i underenhet -1 virke som en inhibitor for kitinaser av familie 18 [61].



Figur 1.5: Substrat-assistert hydrolyse. Sukkerenheten i -1 subsetet får en konformasjonsendring fra stol- til båtkonformasjon. Samtidig vil *N*-acetylgruppen foreta et nukleofilt angrep på det anomeriske karbonet (B) og danne et oksazolinium ion intermediat (C). Deretter blir intermediet angrepet av et vannmolekyl som fullfører hydrolysen og gir en bevaring av den  $\beta$ -anomeriske stereokjemien. Siden kitinaser benytter seg av substrat-assistert hydrolyse trengs det kun en katalytisk karboksylsyre, en glutamat. Bildet er hentet fra van Aalten, 2001 [60].

Når ChiA degraderer kitosan med høy  $F_A$  gir det et partalls antall KOS i starten av degraderingsfasen. Dette tyder på et prosessivt degraderingsmønster. Når kitin blir degradert får man dimere, med unntak av første spaltningsprodukt som kan være av hvilken som helst lengde. Dette skyldes at produktiv binding til en acetyllert enhet bare kan skje for annethvert sukker på grunn av at sukkerenhetene er orientert  $180^\circ$  i forhold til hverandre. Når en prosessiv kitinase degraderer kitosan er det mulighet for uproduktiv binding av en D-sukkerenhet i underenhet -1. Det gjør at enzymet vil gli videre med to sukkerenheter av gangen helt til en A-sukkerenhet bindes i subsete -1 [30]. Det kan føre til lengre partalls oligomere.

De aromatiske aminosyrene i den katalytiske kløften og den substratbindende kløften i ChiA antas å ha en viktig rolle i prosessiv hydrolyse. Disse gir en fluid binding, som er nødvendig for at polymerkjeden skal kunne gli gjennom kløften for substratbinding i den prosessive virkningsmekanismen [31, 62-64]. Ved seterettet mutagenese ble det vist at de aromatiske underenhetene i ChiA var viktige for prosessivitet og at den prosessive mekanismen var avgjørende for effektiv degradering av krystallinsk kitin [64].

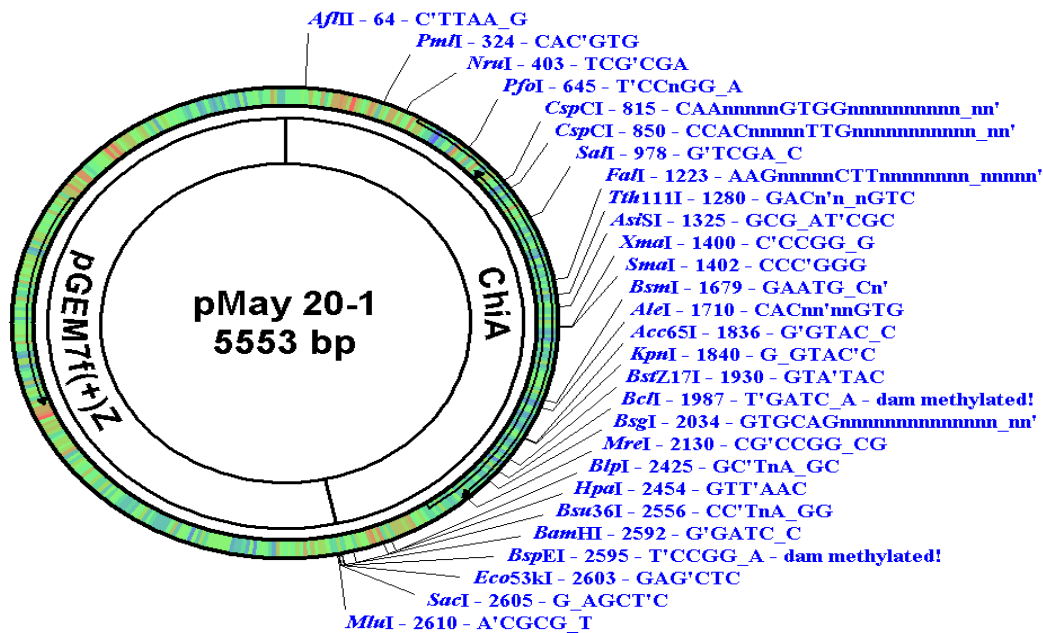
Horn *et al* gjorde forsøk som viste blant annet at kitinaser i familie 18 har en absolutt preferanse for å binde acetylerede enheter i subsete -1. Analyse av KOS fra degradering av kitosan med  $F_A$  0,65 viste at hver oligomer hadde acetylerede enheter på den reduserende enden. I subsete -2 hadde alle enzymer i familie 18 en sterk, men ikke absolutt, preferanse for A-sukkerenheter. Dette gir KOS med AA på den reduserende enden. Den ikke reduserende enden kunne være enten acetyleret eller deacetyleret, det vil si at enzymene i familie 18 ikke viste noen preferanse for hverken A- eller D- sukkerenheter i +1 subsetet[30]. Studier har vist at enzymkonsentrasjon,  $F_A$  til kitosan og spaltningsgrad  $\alpha$ , er avgjørende for å få forskjellige sammensetninger av KOS [29, 30].

Norberg *et. al* [7]viste at det sannsynligvis finnes et +3 subsete. En mulig rolle for +3 subsetet er å bidra til forskyvning av produktet. Under den prosessive hydrolysen må dimeren bundet i +1 og +2 subsetet løsriveres før polymerkjeden kan gli to sukkerenheter og bli det nye substratet. Det kan tenkes at affiniteten i +3 subsetet bidrar til forflytning og videre frigjøring av dimeren. Det er mulig at +3 subsetet bidrar til ChiA sin endo-aktivitet. Tilknytning av substrat er den tidsbegrensende faktoren i enzymatisk degradering av kitin. Det kan tenkes at endo-binding for et typisk ekso-bindingsenzym som ChiA er avhengig av et subsete forbi -2 eller +2 fordi der er mindre sterisk hindring. Ved at enzymet kan binde på en endo-måte, som er mer tilgjengelig enn å binde ekso, gjør at enzymets mulige bindingsmåter på en polymer øker.

Viktige molekylære interaksjoner i -3 subsetet er blant annet Arg172 og Glu473 som interagerer med flere GlcNAc fraksjoner og kan forme sterke elektrostatiske dipol interaksjoner. Trp167 i -3 binder sterkt og bidrar til en ryggrad for proteinet ved at den støtter det intermolekulære interaksjonsnettverket mellom enzymet og substratet. Dette er nødvendig for gjenkjenning og posisjonering av *N*-acetyl gruppene før -1 subsetet hvor de deltar i substratassistert hydrolyse av substratet. Trp167 er også avgjørende for å gi bindingsenergi. Denne er nødvendig for å gjøre energikrevende binding av acetyleret sukker i -1 subsetet til delvis deacetylerede substrater. Ved å fjerne Trp167 kan det føre til en økning i proteindynamikk og forstyrrelser i interaksjoner som er ansvarlige for substratposisjonering, siden det ikke lenger er et feste for proteinets ryggrad gjennom binding med GlcNAc fraksjonen i -3 [7].

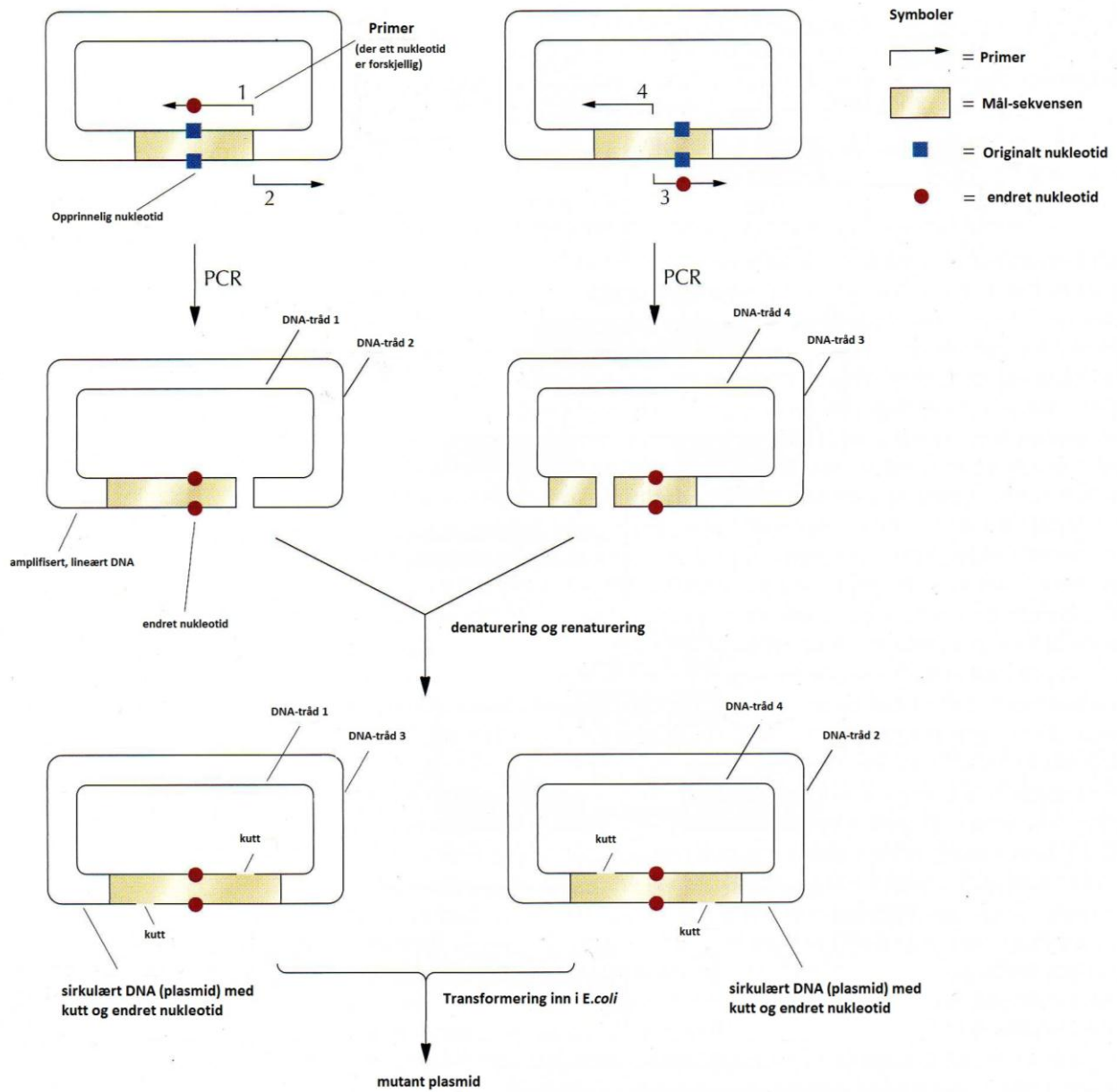
## 1.5 Seterettet mutagenese

For spesifikk seterettet mutagenese benyttes Polymerase Chain Reaction (PCR) der målgenet blir klonet inn i en dobbeltrådet plasmidvektor. Vektoren brukt i denne oppgaven heter pMay20-1 og er vist i figur 1.6.



Figur 1.6: Vektoren pMay 20-1, brukt i seterettet mutagenese i dette prosjektet.

Hvert plasmid får et primersett bestående av en forward og en reverse primer. Der er den ene komplementær til en sekvens i eller nær det klonede gen, mens den andre er komplementær til en annen del av det klonede gen, bortsett fra nukleotidet som skal endres. Til sammen vil plasmidene dekke alle genene. Etter PCR reaksjonen vil derfor de amplifiserte DNA molekylene ha forskjellige ender. Videre i prosedyren vil DNA bitene fra hvert av rørene blandes, denatureres og renatureres. Dette fører til at komplementære DNA tråder, som kommer fra forskjellige primere, vil hybridisere og forme et sirkulært DNA molekyl med to «kutt». Kuttene vil være på motsatt tråd i det sirkulære DNAet, et for hvert av stedene der mutagenesen startet. Kuttene vil repareres in vivo av vertscellens enzymer når plasmidet transformeres inn i *E.coli*. Plasmidet vil nå ha det setespesifikke, muterte nukleotid-baseparet. Figur 1.7 illustrerer dette ved et eksempel der to sett av PCR primere benyttes i hvert sin blanding [65].



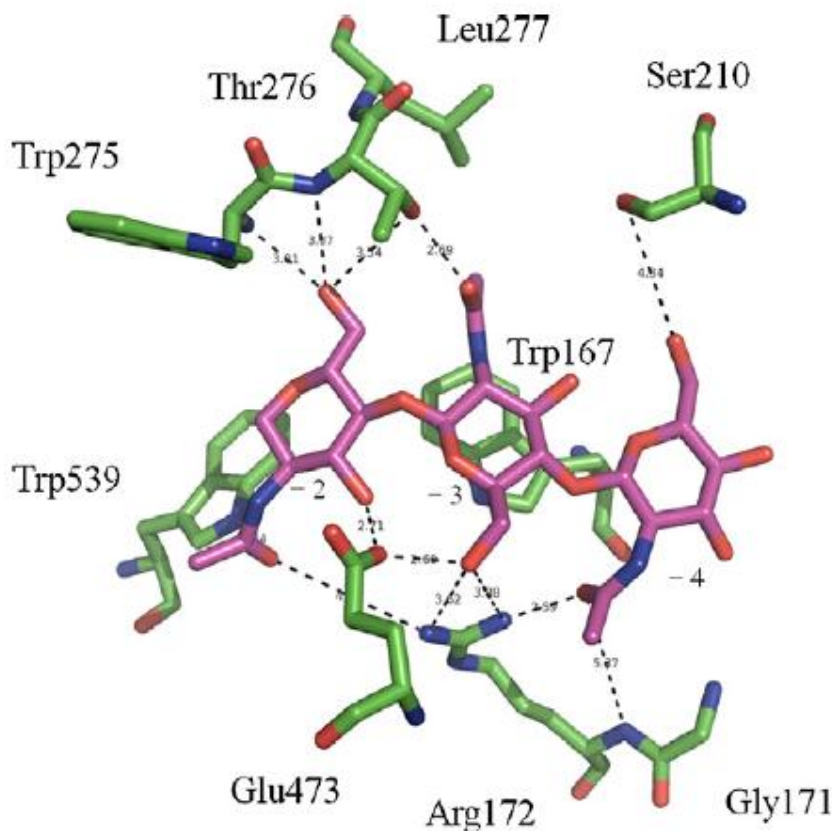
Figur 1.7: Skisse av hvordan seterettet mutagenese foregår ved bruk av PCR.



## 1.6 Mål med oppgaven

Målet med denne oppgaven har vært å finne hvilke aminosyrer som interagerer med substratet i -3 og +3 subsetet i ChiA og hvilken effekt de har. Det er spesielt interessant å se på om disse har innvirkning på substratposisjonering og bindingsstyrke. Seterettet mutagenese benyttes for å se hvilken betydning en spesifikk aminosyre i enzymets aktive sete har under degradering av et substrat.

Arg172 interagerer sterkt med OH i karbon 6 på sukkeret i -3 og *N*-acetylgruppene på sukkerenhetene i -2 og -4 som vist i figur 1.8 [7]. Ved å mutere denne til glutamin (R172Q) og alanin (R172A) skal det undersøkes hvilken effekt R172 har på substratbinding og posisjonering. Lys399 i +3 har blitt identifisert som en mulig kandidat til å interagere med binding av substrat under hydrolyse. For å se hvilken effekt denne har på substratbindingsstyrke ble denne mutert til serin (K399S).



Figur 1.8. Krystallstruktur til ChiA (Papanikolau *et al* Biochemistry 2001) hvor ikke-aromatiske interaksjoner er vist (hentet fra Norberg *et al.* FEBS Lett. 2011).

Det skal fremstilles kitosan ved to ulike acetyleringsgrader som skal brukes i degraderingsforsøk med R172Q og R172A for å bestemme effekten R172 har for substratposisjonering.

Merking med 2-amino-acridone (AMAC) i den reduserende ende av dannede KOS gjør at sekvenser av acetylerede og deacetylerede enheter kan bestemmes ved en MS/MS analyse. Videre vil hydrolyse av for eksempel (GlcNAc)<sub>5</sub> i H<sub>2</sub><sup>18</sup>O, gi svar på i hvilke subsester substratet binder siden en ny reduserende ende vil ha en masseøkning på 2 Da i forhold til en gammel reduserende ende i et MS forsøk.

Ervervet kunnskap vil øke forståelsen på hvordan glykosyl hydrolaser bryter ned uløselige og vanskelig nedbrytbare polysakkarider.

## 2 Utstysrliste

### 2.1 Laboratorieutstyr

Utstyr	Spesifikasjon	Leverandør
Amiconrør	(ultra-15, 10 kDa)	Millipore
C-18 kolonne	Sep-pak C <sub>18</sub>	Waters
Cryorør	2 ml	Sarsted
Dialysepølser	32 mm diameter	Spectrum Laboratories, Inc.
Dyrkningskolber	2 L	BD Falcon
Dyrkningsrør	K16	Bellco
Elektroforeseutstyr	Gelkjøringskammer Spenningskilde	VWR
Eppendorfrør	1,7 og 2 ml	Axygen
Gelkjøringskar for protein-gel	Novex mini-cell	Invitrogen
HIC kolonne		Amersham Biosciences
IEC kolonne		Pharmacia Biotech
Kitinkolonne		BioRad
Kyvette	1x1 cm	VWR
MALDI-plate	MTP 384 ground steel	Bruker Daltonics
Membranfilter	0,8 µm	Millipore
NMR rør	WILMAD <sup>®</sup> NMR tubes 5 mm vegger, 7" lengde	Sigma-Aldrich
Nuncrør	15 ml og 50 ml	Greiner
Parafilm	10 cm og 5 cm bredde	VWR
PCR rør	0,2 ml	VWR
Petriskåler	9 cm	Heger
pH papir		Merck
Protein-gel	NuPAGE <sup>®</sup> Bis-Tris Mini Gels	Novex, Life technologies
Qbit <sup>™</sup> assayrør		Invitrogen
Reagensrør		VWR
Sentrifugerotor	JA-14 og JA-10	Beckmann
Skalpellblad		VWR

Sprøyte	50 ml	VWR
Sprøytefilter	0,2 µM	Sarstedt
Store sentrifugerør	500 ml	Nalgene ®
Veieskip	8x8 cm og 4x4 cm	VWR
Whatman filter	1,2 µm	Fisher scientific

## 2.2 Instrumenter

Instrument	Type	Leverandør
Analysevevter	Sartorius Sartorius CP2P	VWR VWR
Bildetakningskammer med UV lys		BIO RAD
Blåkorkflasker	100, 250, 500 og 1000 ml	Schott
Bordrister	Swip	Edmund Buhler
Bordsentrifuger	HERAEUS PICO 21 Centrifuge 5415 R	Sigma Thermo SCIENTIFIC Eppendorf
Fluorometer	DyNA Quant 200	Hoefer
Fryseskap	Ultradypfryser ved -80 °C	Sanyo
Frysetørkere	Maxi Dry, SPD111V Alpha 2-4 LD Plus	Savant Speed Vac CHRIST
Konduktivitetmåler	TetraCon 4-Electrode	WRW
Magnetrorer	Magnetic stirrer standard unit	Labworld-online.com
MALDI-TOF-MS	Ultra Flex TOF/TOF	Bruker
Nanodrop	ND-1000 Spectrophotometer	Saveen Werner
NMR	Oxford NMR 300	Varian
PCR maskin		VWR
pH-meter	Seven easy Titan	Mettler Toledo Sentron
Pipetter	200-1000 µl, 0,5-10 µl, 5-50 µl, 0,5-5 ml, 2-10 ml	Finnpipette
Pipettespisser		VWR

Qubit™ fluorometer		Invitrogen
Rensesystem	BioLogic LP	BioRad
Risteinkubator		Infors
Sentrifuger	Sorvall® RC 6 Avanti™ J-25 centrifuge	One Med Beckmann Coulter
Sterilbenk	AV-100	Telestar
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf
Vannbad		GFL
Varmeskap	37 °C	Termaks
Vortex	MS2 Minishaker	IKA®

### 2.3 Kjemikalier

Kjemikalium	Leverandør
2-Aminoacridone, AMAC	Fluka
4-methylumbelliferyl- -D-N,N'-diacetylchitobiose (4-MU-(GlcNAc) <sub>2</sub> ) 1 mg/ml	Sigma-Aldrich
Acetonitril, CH <sub>3</sub> CN	Sigma-Aldrich
Agarose	SeaKEM® LE
Ammoniumsulfat, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Sigma
Bacto Agar	Saveen Werner
BenckMark™ Protein Ladder	Invitrogen
Big Dye® Terminator v 3,1 cycle sequencing RR-100	AB
Bovine serum albumin (BSA) 100 x	New England Biolabs
Coomassie Brilliant Blue R-250	BIO RAD
Cyanoboranhidrid	Merck
Deuteriumklorid, DCl	Sigma-Aldrich
Deuteriumoksid, D <sub>2</sub> O	Sigma- Aldrich
dH <sub>2</sub> O, destillert vann av Milli-Q kvalitet	
Dimetylsulfoksid, DMSO	Sigma-Aldrich

DNA Ladder 1 kb 500 µg/ml	New England Biolabs
Eddiksyre, CH <sub>3</sub> COOH	Prolabo
Etanol, EtOH	Arcus
Etanolamin, C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid, EtBr	Sigma- Aldrich
Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA 125 mM	Sigma- Aldrich
Glycerol 87 %	Merck
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Kitin fra krabbeskall	Sigma life science
Kitinkuler, lagret i 20 % etanol	New England Biolabs
Magnesiumklorid, MgCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich
Metanol, CH <sub>3</sub> OH	Sigma-Aldrich
Natriumdeuteriumoksid, NaOD	Sigma-Aldrich
Natriumhydrogenoksid, NaOH	Merck
Natriumnitritt, NaNO <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich
Nitrogen, N <sub>2</sub>	AGA
NuPAGE® Sample Reducing Agent (10x)	Invitrogen
Oxygen-18 water, H <sub>2</sub> <sup>18</sup> O	Medical isotopes
Phenyl Sepharose™ fast flow i 20 % etanol	GE Healthcare
Phenyl-methyl sulfonylfluorid, PMSF	Sigma
Sukrose	VWR

## 2.4 Buffere og løsninger

Buffer	Innhold
Ammoniumacetat, NH <sub>4</sub> AC 20 mM pH 4.2	
Avfargningsløsning til SDS-PAGE	50 ml 10% methanol, 50 ml 10% eddiksyre, 400 ml dH <sub>2</sub> O
Big Dye® Terminator v 1,1 og 3,1 5x sequencing buffer fra AB	
Buffer A IEC	80 ml 0,5 M etanolamin fortynnes til 1 L med dH <sub>2</sub> O

Buffer A kitinkolonne	20 ml 1 M Tris-HCl, 166,7 ml 3M Ammonium Peroxiddisulfat, fortynnes til 1 L med dH <sub>2</sub> O
Buffer B IEC	80 ml 0,5 M etanolamin, 58,44 NaCl, fortynnes til 1 L med dH <sub>2</sub> O
Buffer B kitinkolonne	40 ml isopropanol, 20 ml 1M Tris-HCl, fortynnes til 1 L med dH <sub>2</sub> O
Citrate-phosphate pH 5,2	23,3 ml 0,1 M sitronsyre, 26,7 ml 0,2 M Natriumfosfat, fortynnes til 100 ml med dH <sub>2</sub> O
DHB 10 mg/ml	DHB 10 mg/ml i 50 % EtOH og H <sub>2</sub> <sup>18</sup> O
Etanolamin og NaCl	pH 9,4 Etanolamin 40 mM og NaCl 1M
Fargeløsning til SDS-PAGE	0,25 g (0,1 %) Coomassie Brilliant Blue R-250, 125 ml 50 % metanol, 25 ml 100% eddiksyre (vannfri), 100 ml dH <sub>2</sub> O
Glycine/NaOH 0,3 M pH 10,6	50 ml 0,3 M Glycine, 45,5 ml 0,3 M NaOH, fortynnes til 200 ml med dH <sub>2</sub> O
LB-medium	<p>Tryptone 10 g</p> <p>Gjær ekstrakt 5 g</p> <p>NaCl 10 g</p> <p>Agar 15g</p> <p>Løses i destillert vann opp til 1 L. pH skal være over 7 og kan justeres med NaOH. Løsningen autoklaveres og kjøles deretter ned til 50 °C før 2 ml 50 mg/ml ampicillin tilsettes.</p> <p>Mediet kan helles over i oppbevares deretter ved 4 °C. Tillaging av agarskåler utføres i sterilitet. Det er kun i medie som skal brukes i agarskåler at agar tilsettes.</p>
Loading buffer (gel loading dye blue 6x)	New England Biolabs
NaAc buffer 0,08 M	
NaCl buffer 0,2 M	pH justert til 5,5 med CH <sub>3</sub> COOH
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x) fra Invitrogen	

NuPAGE® MOPS SDS Running buffer (20x) fra Invitrogen	
Spheroplastbuffer	30 ml Tris-HCl pH 8,0, 51,3 g sukrose, 300 µl 0,5 M EDTA, 600 µl PMSF, fortynnes til 300 ml med dH <sub>2</sub> O
TAE Buffer (50x)	VWR
Tris-HCl 1M, 50 mM og 100 mM	1M: 62,4 ml Trizma-base, 33,5 ml 1M HCl, fortynnet til 250 ml med dH <sub>2</sub> O
Tris-HCl og (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	pH 8,0 Tris-HCl 20 mM og (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 M
Tris-HCl og isopropanol	Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, isopropanol 4 %

## 2.5 Proteiner og substrater

Protein/substrat	Leverandør
ChiA WT	Dyrket av Anne Line Norberg
Penta-N-acetylchito-pentaose (A5) 100 µM	Sigma

## 2.6 Bakteriestamme

Stamme	Spesifikasjon	Leverandør
<i>E.coli</i>	XL1-Blue superkompetente celler	Invitrogen

## 2.7 Plasmid

*E.coli*, pMay- 20

## 2.8 Mutageneseprimere

Primer	Sekvens
K399S_f	GCGCCTTCGATCTGAGCAACCTGGGGCATCAG (32)
K399S_r	CTGATGCCCCAGGTTGCTCAGATCGAAGGCGC (32)



R172Q_f	GGGGCGTTTACGGGCAGAATTTACCGTCGAC (32)
R172Q_r	GTCGACGGTGAAATTCTGCCCGTAAACGCCCC (32)
R172A_f	GGGGCGTTTACGGGGCCAATTTACCGTCG (30)
R172A_r	CGACGGTGAAATTGGCCCCGTAAACGCCCC (30)

## 2.9 Sekvenseringsprimere

Primer	Sekvens
ChiA 1-R seq	5'-GCA-CAA-TGC-CAC-CTG-CAT-TTG-ATA-ACG-G-3'
ChiA 2-F seq	5'-CCG-TTA-TCA-AAT-GCA-GGT-GGC-ATT-GTC-C-3'
ChiA 3-R seq	5'-CGA-CCA-CGA-TCT-TGC-CCG-GCT-TGA-3'
ChiA 4-F seq	5'-AGT-TCA-TGA-GCG-GC-G-AGT-GGC-AGT-ATA-C-3'
ChiA 5-F seq	5'-CGC-AGG-ACG-GGG-AAA-CCT-ATG-TGC-TGC-TG-3'
SP6	5'-TAT-TTA-GGT-GAC-ACT-ATA-G-3'
T7	5'-TAA-TAC-GAC-TCA-CTA-TAG-GG-3'

## 2.10 Kits

Kit	Innhold	Leverandør
E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I Spin	Solution I tilsatt RNase A  Solution II Solution III  Equilibration Buffer	VWR

	<p>DNA Wash Buffer (med100 ml ETOH)</p> <p>Buffer HB</p> <p>Elutionbuffer</p> <p>HiBind<sup>®</sup> DNA Minicolumns</p> <p>2 ml collection tubes</p>	
<p>Nucleic Acid and Protein Purification NucleicSpin<sup>®</sup> extract II</p>	<p>Wash buffer NT3</p> <p>Binding buffer NT</p> <p>Elution buffer NE 5 mM Tris-HCl pH 8,5</p>	Macherey-Nagel
<p>Quant-iT<sup>™</sup> Protein Assay Kit</p>	<p>Komponent A Quant-iT<sup>™</sup> protein reagent (200x konsentrat i 1,2 propanediol)</p> <p>Komponent B Quant-iT<sup>™</sup> protein buffer BSA protein standard 0, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 ng/μl</p>	Invitrogen
<p>QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit</p>	<p>Control Primer #1 100 ng/μl</p> <p>Control Primer #2 100 ng/μl</p>	Agilent Technologies

	Dpn 1 10 U/ $\mu$ l	
	dNTP Mix	
	Reaction Buffer 10x	

### ***2.11 Programvare***

<b>Program og versjon</b>	<b>Leverandør</b>
Flex Analysis	Bruker Daltronics
Flex Control 3.3.108	Bruker Daltonics
Nanodrop ND-1000 v 3.3	Saveen Werner
NMR versjon 1,1 Revision D	VnmrJ
BioLogic v 1,03	LP Data View
CLC DNA Workbench 6	CLCbio

## 3 Metoder

### *3.1 Design av mutanter*

Det ble laget ulike mutanter av ChiA rundt det aktive setet til enzymet for å teste hvilken effekt disse mutasjonene kan ha på funksjonen til proteinet, nærmere beskrevet i kapittel 1.6. Mutantene som ble designet var R172Q, R172A, K399S.

#### *3.1.1 Tillaging av primere*

Primerne som ble benyttet i muteringen ble designet på bakgrunn av hvilke mutasjoner som var ønskelige siden disse er helt spesifikke. For å utføre seterettet mutagenese trengs det en ”forward” og en ”reverse” primer som begge inneholder ønsket mutasjon og fusjonerer til samme sekvens i motsatt DNA tråd. Lengden til primerne bør ligge mellom 25 og 45 baser og de bør også ha et smeltepunkt som er 10 °C høyere enn fusjonstemperaturen i PCR programmet. Det vil i dette tilfellet si 78 °C eller høyere. Mutasjonen burde ligge mot midten av primeren med omtrent 10-15 basepar på begge sider.

Primerne ble bestilt fra Eurofins mwg operon på bakgrunn av design gjort av Morten Sørli, Vincent Eijnsink og Sigrid Gåseidnes. Primerne mottas som tørrstoff og løses i dH<sub>2</sub>O til ønsket konsentrasjon. Disse ble lagret ved -20 °C.

## ***3.2 Tillaging av plasmid***

### ***3.2.1 Oppdyrking av bakteriestamme***

#### Utstyr

LB-agarskål

Frysestock ChiA WT

LB-medium

Ampicillin 50 mg/ml

Glyserol 87 %

#### Metode

Det ble pirket ut celler med tannpirker fra frysestocken og disse ble platet ut på LB-agarskåler. Skålene ble inkubert over natt ved 37 °C. 4 ml LB-medium og 4 µl 50 mg/ml ampicillin ble inokulert med en koloni fra agarskålen. Kulturen ble dyrket over natt (12-16 timer) ved 37 °C. Det ble også laget en egen frysestock av 1050 µl cellekultur og 450 µl 87 % glyserol. Dette ble utført i sterilbenk.

### ***3.2.2 Rensing av plasmid***

Plasmid fra bakteriekultur dyrket over natt som beskrevet i kapittel 3.2.1, ble isolert ved bruk av kittet E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I Spin. Kittet bruker en HiBind matriks i kolonnen som spesifikt binder DNA eller RNA og vasker ut andre forurensninger. Nukleinsyrene blir til slutt eluert ut med en buffer med et lavt saltinnhold. Kittet kan isolere 40-75 µg DNA.

#### Utstyr

E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I Spin

Cellekultur

#### Metode

1,5 ml cellekultur ble pelletert ved sentrifugering ved 10 000 x g i 1 minutt ved romtemperatur. Mediet ble deretter helt av. Pelleten ble resuspendert i 250 µl Solution I/RNase A, og dette ble blandet ved vortex eller pipettering. 250 µl Solution II ble tilsatt og

blandet ved å forsiktig snu røret opp ned flere ganger til det ble et klart lysat. 350 µl Solution III ble tilsatt, og løsningen ble blandet umiddelbart ved å snu på røret flere ganger til det ble dannet en hvit utfelling. Deretter ble blandingen sentrifugert ved 13 000 x g i 10 minutter ved romtemperatur.

Miniprep-kolonnen ble klargjort ved å tilsette 100 µl ekvibrasjonsbuffer. Kolonnen ble plassert i et 2 ml oppsamlingsrør og sentrifugert i 1 minutt ved 13 000 x g. Flow-through ble helt av. Den klare supernatanten ble overført til miniprep-kolonnen som var plassert i et 2 ml oppsamlingsrør. Det var viktig at ikke noe av pelleten fulgte med da dette kan tette kolonnen. Kolonnen ble sentrifugert i 1 minutt ved 13 000 x g før flow-through ble helt av. 500 µl Buffer HB ble tilsatt kolonnen og det ble sentrifugert i 1 minutt ved 13 000 x g. Flow-through ble helt av og 700 µl DNA wash buffer ble tilsatt før sentrifugering i 1 minutt ved 13 000 x g. Flow-through ble helt av, og den tomme kolonnen sentrifugert i 2 minutter ved 13 000 x g for å tørke kolonnematriksen. Kolonnen ble plassert i et 1,5 ml eppendorfrør og tilsatt 30 µl Elution Buffer (kan bruke 30-100 µl, men det ble brukt minst mulig for å få høyest mulig konsentrasjon). Kolonnen ble sentrifugert i 1 minutt ved 13 000 x g for å eluere ut DNA. Det rensede plasmidet ble oppbevart ved -20 °C.

### ***3.2.3 Kontroll av rensed plasmid med DNA-gel***

Renhet av plasmid ble kontrollert ved bruk av DNA-gel. Båndene på gelen sammenliknes med vandringslengden til en 1 kb ladder. Det sammenliknes med ladder som viser molekylære vektstandarder for å se om prøven har en DNA sekvens på størrelse med ønsket sekvens [66].

#### Utstyr

SeaKEM<sup>®</sup> LE Agarose

TAE buffer 1x

Ethidiumbromid (EtBr)

Loading buffer (gel loading dyeblue 6x)

DNA Ladder 500 µg/ml 1 kb

### Metode

50 ml 1x TAE buffer og 0,5 g agarose ble blandet i en kolbe med lokk over. Denne ble varmet opp til all agarose var løst før kolben ble avkjølt. Løsningen ble tilsatt 1 µl EtBr. Da gelen var stivnet ble den overført til gelkjøringskar. 1 x TAE buffer ble helt over til den dekket gelen.

10 µl ladder ble påsatt en brønn. Blanding av 1 µl loading buffer, 2 µl prøve og 7 µl dH<sub>2</sub>O ble påsatt en annen brønn. Gelen ble deretter kjørt på 90 V i en time. Til slutt ble det tatt bilde av gelen under UV-lys.

### ***3.3 Måling av DNA konsentrasjon ved nanodrop***

Etter bakteriekultur var dyrket opp, plasmidet isolert og renheten av det var undersøkt på DNA-gel ble konsentrasjonen av DNA i prøvene målt ved nanodrop.

### Metode

Programmet ble innstilt til måling av DNA-konsentrasjon. Instrumentet ble først nullstilt med vann og kalibrert med elueringsbuffer fra kittet E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I Spin. Deretter ble prøve applisert, og konsentrasjon avlest.

### ***3.4 Seterettet Mutagenese***

Plasmid med ønsket mutasjon ble laget ved å bruke QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit fra Stratagene og benytte PCR.

#### ***3.4.1 PCR, polymerase chain reaction***

PCR benyttes for å oppamplifisere spesifikke DNA-sekvenser ved å bruke temperatursykluser. Ved en høy temperatur (95 °C) vil dobbeltrådet DNA denatureres slik at det blir to enkeltråder. Deretter senkes temperaturen (til 55 °C) slik at primerne basepares med sine komplimentærsekvenser. Temperaturen blir så økt til 68 °C. Da vil DNA-polymerase feste seg til primerne og elongere DNA-tråden i begge retninger slik at det blir dannet dobbeltrådet DNA. I PCR programmet ble ekstensjonstiden satt til 5,5 minutter fordi

vektoren med ChiA-genet er 5553 bp (1 minutt pr kb). Det ble benyttet 18 sykluser siden det utføres flere delelsjoner/insersjoner av aminosyrer.

### Utstyr

QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit

Primere

ds DNA template (pMay- 20, E.coli)

### Metode

PCR-reaksjonene ble laget i PCR-rør som stod på kuldeblokk.

Prøvereaksjon:

5 µl 10 x reaksjonsbuffer

5-50 ng dsDNA templat

125 ng primer 1, forward

125 ng primer 2, reverse

1 µl dNTP mix

dH<sub>2</sub>O til et sluttvolum på 50 µl

1 µl PfuUltra HF DNA polymerase

Kontrollreaksjon:

5 µl 10 x reaksjonsbuffer

2 µl pWhitescript 4, 5 kb control plasmid

1, 25 µl oligonucleotide control primer 1

1, 25 oligonucleotide control primer 2

1 µl dNTP mix

38, 5 µl dH<sub>2</sub>O

1 µl PfuUltra HF DNA polymerase



PCR programmet som ble brukt er gitt i tabell 3.1.

Tabell 3.1: PCR programmet som ble brukt for seterettet mutagenese.

<b>Program</b>	<b>Antall sykluser</b>	<b>Temperatur (°C)</b>	<b>Tid</b>
Heating lid	1	110	
Initiell denaturering	18	95	30 sekunder
Denaturering		95	30 sekunder
Annealing		55	1 minutt
Extension	1	68	5,5 minutt
Nedkjøling	1	10	

For å kontrollere PCR-produktet ble det tatt ut 10 µl av hver PCR-reaksjon som ble analysert på DNA-gel.

1 µl Dpn I restriksjonsenzym ble tilsatt hver PCR-reaksjon og det ble blandet forsiktig ved å pipetere opp og ned. Reaksjonsblandingen ble spunnet i 1 minutt og inkubert ved 37 °C i 1 time for å bli kvitt ikke-mutert supercoilet DNA.

### ***3.4.2 Transformering av XL1-Blue superkompetente celler***

Plasmidet ble transformert inn i XL1-Blue superkompetente celler. Denne type celler egner seg ofte godt til å oppbevare DNA og de gir som regel mange kolonier under oppdyrking.

#### Utstyr

LB-medium

LB-ampicillin plater

XL1-Blue superkompetente celler

Kontrollplasmid

## Metode

De XL1-Blue superkompetente cellene ble tint forsiktig på is og 50 µl ble overført til hver sin beholder. 1 µl Dpn I behandlet DNA ble overført til de superkompetente cellene og blandet forsiktig. I transformasjonskontrollen ble det ikke tilsatt Dpn I behandlet DNA, men isteden 1 µl kontrollplasmid. Reaksjonene ble inkubert 30 minutter på is og varmebehandlet i 45 sekunder ved 42 °C i vannbad. Reaksjonene ble inkubert på is i 2 minutter og deretter tilsatt 0,5 ml LB-medium (forvarmet til 42 °C). Reaksjonene ble inkubert ved 37 °C i en time i risteinkubator. Deretter ble 250 µl prøve, 250 µl mutagenesekontroll og 5 µl transformasjonskontroll i 200 µl medium platet ut på hver sine LB-ampicillin plater. For prøven ble det laget to paralleller. Platene ble inkubert ved 37 °C i varmeskap i mer enn 16 timer.

Fra skålene med transformanter ble det valgt ut kolonier som ble dyrket opp. Plasmid ble deretter rensset som beskrevet i kapittel 3.2.2 og renhet kontrollert som beskrevet i kapittel 3.2.3. I tillegg ble det laget frysestock av alle kulturene som beskrevet i kapittel 3.2.1.

### ***3.4.3 Rensing av plasmid på DNA-gel***

I noen tilfeller viste kontrollen av rensset plasmid på DNA-gel at plasmidet ikke var rent. I disse tilfellene ble kittet Nucleic Acid and Protein Purification NucleicSpin<sup>®</sup> extract II brukt for å kutte ønsket bånd ut av DNA-gelen. Denne prosedyren ble fulgt for ChiA WT og mutanten R172Q.

## Utstyr

Nucleic Acid and Protein Purification NucleicSpin<sup>®</sup> extract II

Plasmid

Loadingbuffer

Ladder (1 kb)

## Metode

Plasmid ble tilsatt loadingbuffer i et forhold 10:1 (totalt 30 µl) og påsatt DNA-gel. Gelen ble laget som beskrevet i 3.2.3. Det ble brukt 5 µl ladder (1kb) og gelen ble påført spenning i omtrent 45 minutter. Gelbåndet for hvert plasmid som hadde en ønsket størrelse på 4,9 kb ble

kuttet ut av gelen ved bruk av skalpell under UV-lys. For hver 100 mg gelbit ble 200 µl buffer NT tilsatt. Blandingen ble inkubert i 5-10 minutter i vannbad på 50 °C og vortexet hvert 2-3 minutt til gelbitene var løst. Filtreringskolonner ble satt i oppsamlingsrør og hver prøve ble påsatt hver sin kolonne. Disse ble sentrifugert i 1 minutt ved 11,000 x g. Flow-through ble kastet. 700 µl buffer NT3 ble påsatt kolonnen som så ble sentrifugert i 1 minutt på 11,000 x g. Flow through ble kastet. Kolonnen i oppsamlingsrøret ble sentrifugert i 2 minutter på 11,000 x g for å tørke membranen. Kolonnene ble deretter plassert i nye eppendorfrør og 15 µl buffer NE ble tilsatt kolonnene med påfølgende inkubering i romtemperatur i 1 minutt. Til slutt ble rørene med kolonner sentrifugert i 1 minutt ved 11,000 x g for å eluere DNAet.

DNA konsentrasjonen ble målt ved nanodrop som beskrevet i kapittel 3.3.

### ***3.5 Sekvensering***

Etter seterettet mutagenese ble det gjort sekvensering for å sjekke at mutagenesen var vellykket og at det var laget plasmid med ønsket mutasjon. To ulike metoder ble benyttet. Den ene er beskrevet i kapittel 3.5.1 og ble benyttet for R172Q samt til kontroll av WT. Den andre er beskrevet i kapittel 3.5.3 og ble benyttet til K399S og R172A.

#### ***3.5.1 sekvenserings PCR***

##### Utstyr

Seq buffer

Premix

Plasmid

Primere

##### Metode

Reaksjonene ble laget i PCR rør som stod på kuldeblokk. Det ble benyttet 7 ulike primere, og det ble laget en sekvenseringsreaksjon pr primer.

Prøvereaksjon:

2 µl Premix sequencing RR

4 µl templat

5 pmol primer

3 µl Seq buffer 5x

dH<sub>2</sub>O til et sluttvolum lik 20 µl

PCR reaksjonen for sekvensering er gitt i tabell 3.2.

Tabell 3.2: PCR program brukt under sekvensering

Program	Antall sykluser	Temperatur (°C)	Tid
Heating lid	1	110	
Denaturering	25	95	10 sek
Annealing		50	5 sek
Extension		60	4 min
Nedkjøling	1	10	uendelig

### 3.5.2 EtOH/EDTA utfelling

Etter PCR ble det gjort en oppkonsentrering og utfelling av sekvenseringsproduktet ved bruk av EtOH/EDTA.

#### Utstyr

EDTA 125 mM

EtOH 96 %

EtOH 70 %

#### Metode

2 µl 125 mM EDTA ble tilsatt til hver prøve. 62,5 µl 96 % EtOH ble deretter tilsatt hver prøve før disse ble blandet ved å snu rørene opp og ned 4-5 ganger. Løsningene ble deretter overført til en brønnplate og inkubert ved romtemperatur i 15 minutter. Parafilm ble satt på platen og den ble spunnet ved 2-3000 x g ved 4 °C i 30 minutter. Parafilmen ble fjernet og supernatanten helt av. 60 µl 70 % EtOH ble tilsatt hver prøve. Ny parafilm ble satt på platen

og den ble sentrifugert ved 1650 x g ved 4 °C i 15 minutter. Parafilmen ble fjernet, og supernatanten ble på nytt helt av. Platen ble sentrifugert opp ned ved 185 x g i 1 minutt og deretter inkubert for tørking i sterilbenk i 10-30 minutter. Parafilm ble satt på platen og den ble oppbevart ved -20 °C til den ble sendt til sekvenseringslaboratoriet. Plasmidet ble sekvensert ved bruk av sekvenseringsmaskinen 3100 Genetic Analyzer fra Applied Biosystems.

### ***3.5.3 Sekvensering av nytt plasmid***

Denne metoden ble brukt for sekvensering av mutantene R172A og K399S da sekvenseringsmaskinen som ble benyttet i kapittel 3.5.1 ble tatt ut av bruk underveis i prosjektet.

#### Utstyr

Elueringsbuffer fra E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I Spin

Plasmid

Sekvenseringsprimere

#### Metode

I hver sekvenseringsreaksjon ble det brukt 5 µl plasmid med 80-100 ng/µl konsentrasjon og 5 µl primer med konsentrasjon på 5 pmol/µl. Hvis det var nødvendig med fortykning ble det benyttet elueringsbuffer og dH<sub>2</sub>O. Sekvenseringsreaksjonene ble sendt til GATC.

DNA sekvensering går ut på å se på sekvensen av nukleotidene i DNA. Plasmidet med mutasjonen sammenliknes med plasmidet til WT. For å se om den ønskede mutasjonen har skjedd sjekkes det at de to sekvensene er helt like bortsett fra der mutasjonen sitter. Filer fra sekvenseringene studeres i programmet CLC DNA Workbench6.

### ***3.6 Overekspressjon av ChiA***

Overekspressjon av ChiA ble gjort ved å lage forkultur ved bruk av bakterier fra frysestock. Protein fra det periplasmatiske ekstraktet fra cellene ble brukt i forsøk beskrevet i senere kapitler.

#### ***3.6.1 Vekst av celler***

##### Utstyr

LB medium

Ampicillin 50 mg/ml

Frysestock med ChiA WT og mutanter

##### Metode

Denne jobben ble utført sterilt. I en 2 l dyrkningskolbe ble det tilsatt 300 ml eller 500 ml autoklavert LB-medium og ampicillin til en sluttkonsentrasjon på 50 mg/ml. Det ble pirket ut celler fra frysestock av ChiA og tilsatt dyrkningskolben. Kulturen ble dyrket ved 37 °C over natt ved 220 rpm.

#### ***3.6.2 Tillaging av periplasmatiske ekstrakt***

Da *E.coli* celler som har blitt benyttet er Gram negative vil ChiA mutanter eller WT bli transportert til periplasmaen i cellen etter tillaging. For å få ut proteinene blir derfor først det periplasmatiske ekstraktet isolert. Lysering av celledemembran ble gjort ved bruk av spheroplastbuffer og kald dH<sub>2</sub>O.

##### Utstyr

Spheroplastbuffer

MgCl<sub>2</sub> 20 mM

Iskaldt dH<sub>2</sub>O

Phenyl-methyl sulfonylfluorid (PMSF)

## Metode

Cellene ble høstet ved sentrifugering ved 4 °C i 10 minutter på 8000 rpm. Supernatanten ble dekantert og pelleten ble fordelt utover bunnen av sentrifugerøret. 30 mL kald spheroplastbuffer ble tilsatt og cellene knust ved å blande med en sprøyte. Suspensjonen ble inkubert i 5 minutter på is før den ble sentrifugert ved 4 °C i 10 minutter ved 8000 rpm. Supernatanten ble dekantert og pelleten inkubert i 10 minutter ved romtemperatur. Pelleten ble resuspendert i 25 ml iskaldt dH<sub>2</sub>O, inkubert på is i 45 sekunder og tilsatt 1,25 mL 20 mM MgCl<sub>2</sub>. Suspensjonen ble sentrifugert ved 4 °C i 10 minutter på 8000 rpm. Supernatanten ble sterilfiltrert med 0,2 µm filter på sprøyte over i nuncrør. Til slutt ble 2 µl PMSF pr ml periplasmatiske ekstrakt tilsatt for å forhindre at proteaser bryter ned enzymet. Det periplasmatiske ekstraktet ble oppbevart ved 4 °C.

### ***3.7 Rensing av periplasmatiske ekstrakt på kitinkuler***

De to ChiA mutantene K399S og R172A og ChiA WT ble rensert på kitinkolonne. Denne metoden er mindre tidkrevende enn rensing ved ionebytterkromatografi (IEC) og hydrofob interaksjons kromatografi (HIC) som er beskrevet i kapittel 3.8 og 3.9. ChiA bindes optimalt til kolonnematriksen bestående av kitinkuler i 20 % etanol ved pH 6,3. Enzymet elueres ved pH lavere enn 6,3 da bindingen til kitinkulene vil bli svakere.

## Utstyr

Kitinkuler

Tris-HCl 1 M

Buffer A; 50 mM Tris-HCl pH 8

Buffer B; 20 mM eddiksyre

Vaskebuffer; 0,3 M NaOH

## Metode

Først ble kolonnen pakket med 5-10 ml kitinkuler i 20 % etanol. Det periplasmatiske ekstraktet ble tilsatt 1M Tris-HCl til en konsentrasjon på 50 mM. Buffer A ble påført kolonnen med flow på 2,5 ml/minutt til baselinjen var stabil. Omtrent 50 ml periplasmatiske ekstrakt ble så injisert. Da all prøve var applisert på kolonnen ble buffer A applisert til baselinjen igjen var stabil. Buffer B ble deretter applisert for å eluere ut prøven og denne fraksjonen ble samlet opp. Det ble benyttet UV-detektor og BioLogic system. Kolonnen ble til slutt regenerert med lut og instrumentet ble vasket med etanol for å unngå vekst.

### ***3.8 Rensing av periplasmatiske ekstrakt ved IEC***

Denne metoden ble brukt for å rense ChiA mutanten R172Q. ChiA har isoelektrisk punkt, pI, lik 8 så ved en høyere pH vil proteinet deprotoneres, det vil si at det får negativ ladning, og kan derfor renses på en anionbytter. Som stasjonærfase ble anionbyttermaterialet Sepharose Q benyttet. Mobilfasen og det periplasmatiske ekstraktet ble justert til pH 9,4 slik at ChiA R172Q ble retardert av den positivt ladde stasjonærfasen. Alle andre proteiner og urenheter som ikke har samme ladning som ChiA R172Q vil komme ut i første topp, kalt voidtoppen.

## Utstyr

Periplasmatiske ekstrakt

Sepharose Q

Mobilfase; 40 mM Etanolamin pH 9,4

Elueringsbuffer; 40 mM Etanolamin pH 9,4, 1 M NaCl

BioLogic LP system

## Metode

0,5 M etanolamin ble tilsatt det periplasmatiske ekstraktet til en sluttkonsentrasjon på 40 mM. Mobilfase ble applisert til baselinja var stabil. Periplasmatiske ekstrakt ble applisert på kolonna og mobilfase ble applisert til rett baselinje ble oppnådd. Det ble benyttet en flow på 4 ml/minutt. Proteiner som var retardert på kolonnen ble eluert ved hjelp av gradienteluering med en sluttkonsentrasjon av elueringsbuffer (40 mM Etanolamin, 1 M NaCl, pH 9,4) på 100 %. Chi A WT og de fleste mutantene eluerer mellom 10-40 % elueringsbuffer. Alle

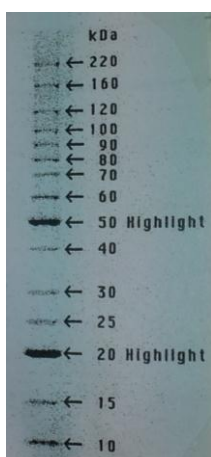


fraksjoner, helt fra applisering, ble samlet opp og oppbevart ved 4 °C. Det ble benyttet UV-detektor og BioLogic system.

Fraksjonene ble kontrollert ved Sodium Dodecyl Sulfate- Polyakrylamid Gel Elektroforese (SDS-PAGE) som beskrevet i kapittel 3.9 for å identifisere hvilke fraksjoner som inneholdt ønsket protein. Disse fraksjonene ble tatt med videre i HIC prosedyren beskrevet i kapittel 3.10.

### ***3.9 Kontroll av rensing med Sodium Dodecyl Sulfate- Polyakrylamid Gel Elektroforese (SDS-PAGE)***

Denne teknikken brukes til å separere proteiner ut ifra deres elektroforetiske mobilitet i polyakrylamid gel. Proteinprøven blir tilsatt negativt ladet sodium dodecyl sulfat som gjør at proteinene denaturerer og får negativ ladning. Når de denaturerte proteinene blir påsatt gelen og påført et elektrisk felt vil de trekke mot den positive elektroden på grunn av sin negative ladning. Polyakrylamid gelen består av et nettverk av akrylamid så hastigheten på hvert molekyl gjennom gelen vil være avhengig av molekylets størrelse. Store molekyler vil retarderes mest [67]. En proteinstandard, med kjent molekylvekt, påsettes også gelen. Ved å sammenlikne proteinets vandringsvei med standarden kan man si noe om proteinets vekt, se figur 3.1. ChiA WT og mutanter vil ha en vekt på 58 kDa.



Figur 3.1: Bilde av ladder som brukes under SDS-PAGE til å sammenlikne proteinets vandringsvei. Bildet er hentet fra Invitrogen [68].

Etter rensing på kitinkolonne eller IEC kontrolleres renheten av proteinet med SDS-PAGE gel. I tillegg brukes SDS-PAGE gel etter rensing på IEC for å finne ut hvilke fraksjoner som inneholder ønsket protein og skal renses på HIC.

#### Utstyr

BenckMark™ Protein ladder

MOPS SDS Running buffer

NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)

NuPAGE® Reducing Agent (10x)

Fargeløsning

Avfargningsløsning

#### Metode

13 µl prøve ble blandet med 5 µl NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x) og 2 µl NuPAGE® Reducing Agent (10x). Løsningen ble deretter inkubert i vannbad på 70 °C i 10 minutter. 1x SDS MOPS Running buffer ble fylt i gelkaret. 20 µl prøve, samt 10 µl BenckMark™ Protein ladder ble påsatt hver sin brønn på gelen. Gelen ble kjørt på 200 V i 50 minutter. Da gelen var ferdig ble den lagt over i fargeløsning i omtrent 20 minutter på forsiktig risting og deretter avfargningsløsning i 30 minutter på forsiktig risting. Dersom gelen ikke var godt nok avfarget ble avfargningsløsning byttet etter omtrent 30 minutter og gelen ble inkubert over natt på forsiktig risting. Gelen ble fotografert i et fotokammer med UV-lys.

### ***3.10 Rensing av periplasmatisk ekstrakt ved HIC***

Fraksjoner som var renses ved IEC, beskrevet i kapittel 3.8 og som i kontroll på SDS-PAGE, beskrevet i kapittel 3.9, viste å inneholde protein med ønsket størrelse ble renses ved HIC.

#### Utstyr

Fraksjoner fra IEC

Phenyl Sepharose™

Mobilfase; 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 og 0,5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Elueringsbuffer; 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 / 4 % isopropanol

Ammoniumsulfat

Tris HCl 1M

### Metode

Tris HCl og  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ble tilsatt til utvalgte fraksjoner fra IEC til en sluttkonsentrasjon på henholdsvis 20 mM og 0,5 M. Enzymet ble applisert på kolonna med en flow på 1,5 ml/minutt. Da alt enzym var applisert ble det byttet over til mobilfase med en flow på 3,0 ml/minutt til baselinja var rett. Proteinet ble eluert ved gradienteluering med 0-100 % elueringsbuffer og samlet opp. Det ble benyttet UV-detektor og BioLogic system under rensing.

### ***3.11 Oppkonsentrering av proteinløsning med Amiconrør***

Oppkonsentrering av proteinløsningene ble gjort ved å bruke sentrifugefilter av typen Amicon Ultra 15. Dette filteret separerer de ønskede proteinene fra resten av løsningen ved at forbindelser mindre enn 10 000 Da slipper gjennom. ChiA har en molar masse større enn 10 000 Da og vil derfor bli igjen i sentrifugefilteret til slutt.

### Utstyr

Amiconrør (ultra-15, 10 kDa)

Proteineluat fra rensing

Storgare buffer for ChiA; 100 mM Tris-HCl pH 8

### Metode

Proteineluatet ble overført til Amiconrør og ble etterfylt hvis nødvendig med storage buffer til røret var fullt. Røret ble sentrifugert ved 4 °C og 4300 rpm til det var omtrent 1,5 ml væske igjen i filteret. Eluatet ble helt av. Hvis ikke alt proteineluat fikk plass i røret på første kjøring ble røret etterfylt og trinnet gjentatt til alt proteineluat var overført. Røret ble så fylt opp med storage buffer og sentrifugert ved 4 °C og 4300 rpm til det var omtrent 1,5 ml væske igjen. Dette trinnet ble gjentatt fire ganger slik at all elueringsbuffer fra renseprosedyren ble byttet ut med Tris-HCl pH 8. Proteinløsningen som var igjen i filteret etter sentrifugeringen ble overført til eppendorfrør og lagret ved 4 °C.

### ***3.12 Bestemmelse av proteinkonsentrasjon ved fluorimetrisk måling med Quant-iT™***

Quant-iT™ protein assay er en nøyaktig konsentrasjonsbestemmelse i proteiner basert på fluorimetrisk måling. Når Quant-iT™ protein reagent tilsettes prøven binder den proteinene slik at det dannes en fluorescerende forbindelse som eksiteres ved 470 nm og emitterer lys ved 570 nm. Lyset måles av et Qubit™ instrument innenfor et konsentrasjonsområde på 0,25-5 µg.

#### Utstyr

Proteinløsning

Quant-iT™ Protein Assay Kit

Qubit™ instrument

#### Metode

Kittet ble først romtemperert og deretter ble 1 µl Quant-iT™ protein reagent (A) blandet med 199 µl Quant-iT™ protein Buffer (B) til en arbeidsløsning pr prøve. 198 µl arbeidsløsning ble tilsatt 2 µl proteinløsning og den ble blandet godt. Løsningen ble inkubert ved romtemperatur i 15 minutter. Konsentrasjonen ble målt i et Qubit™ fluorometer med en ferdiglaget kalibreringskurve. Måloområdet går til omtrent 23 µg/ml protein. Hvis konsentrasjonen var over denne verdien eller i grenseland ble prøven fortynnet mer.

### ***3.13 Bestemmelse av spesifikk enzymaktivitet for kitinaser***

Enzymaktiviteten til ChiA mutantene R172A, R172Q og K399S samt ChiA WT ble bestemt ved et assay der 4-methylumbelliferyl-β-D-N'-diacetylchitobiose (4-MU-(GlcNAc)<sub>2</sub>) brukes som substrat [69]. Denne forbindelsen spaltes til N, N'-diacetylchitobiose og 4-methylumbelliferyl (4-MU) ved hydrolyse. Siden den er fluorescerende, som betyr at den sender ut lys, kan konsentrasjonen males i et fluorometer.

## Utstyr

Rent protein

BSA 100 x

Glycine 0,3 M /NaOH pH 10,6

Citrate-phosphate buffer pH 5,2

4-MU 1  $\mu$ M

4-MU-(GlcNAc)<sub>2</sub> 1 mg/ml

dH<sub>2</sub>O

## Metode

4,95 ml Citrate-phosphate buffer og 50  $\mu$ l 100 x BSA ble blandet. 87  $\mu$ l av denne blandingen ble blandet med 8  $\mu$ l 1 mg/ml 4-MU-(GlcNAc)<sub>2</sub> i et reagensrør for hver parallell av hvert enzym som skulle testes. Det ble brukt tre paralleller for hvert enzym. Rørene ble satt i vannbad på 37 °C med risting. 5  $\mu$ l enzym ble tilsatt hvert av rørene og blindprøven ble tilsatt 5  $\mu$ l Citrate-phosphate /BSA blanding. Etter 10 minutter ble reaksjonene stoppet ved å tilsette 1,9 ml 0,3 M Glycine/NaOH.

De fluorometriske målingene ble gjort ved å nullstille med 1,9 ml 0,3 M Glycine/NaOH. 100  $\mu$ l 1  $\mu$ M 4-MU-(GlcNAc)<sub>2</sub> ble tilsatt kyvetten og løsningen ble blandet. Instrumentet ble kalibrert, prøven ble overført til kyvetten og aktiviteten ble lest av på fluorometeret.

Den spesifikke enzymaktiviteten ble regnet ut fra følgende formel:

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

Vol (l): Volum i kyvetten,  $1 \cdot 10^{-5}$  l

Gjennomsnittlig abs: avlest på fluorometeret

Tid (minutter): tid for prøvetakning fra protein var tilsatt, 10 minutter

Enzym volum: 5  $\mu$ l

mg/ml: enzymkonsentrasjon

### **3.14 Tillaging av kitosan**

Det ble laget kitosan med to forskjellige  $F_A$ . Disse ble laget for å karakterisere mutante enzym gjennom å analysere deres brytningsmønster.

#### **3.14.1 Fremstilling av kitosan ved homogen N-deacetylering av kitin**

##### Utstyr

Kitin fra krabbeskall

NaOH 40 %

$N_2$

##### Metode

4 g kitin ble veid ut og tilsatt 100 g kald 40 % w/w NaOH for deesterifisering av N-acetylbindingene. Løsningen ble inkubert ved 4 °C over natt for at deacetyleringen ikke skulle starte før det var ønskelig. 300 g is ble tilsatt under kraftig røring med glasstav og løsningen ble satt på magnetrøring til all is var oppløst og løsningen var homogen. Løsningen ble holdt kald hele tiden. Deretter ble den sentrifugert den ved 10 000 rpm i 15 minutter ved 4 °C. Supernatanten ble boblet med  $N_2$  i 10 minutter for avgassing. Suspensjonen av oppløst kitin ble inkubert ved 25 °C på risting i henholdsvis 48 timer og 96 timer for å oppnå ønsket  $F_A$ .

#### **3.14.2 Isolering av kitosan**

##### Utstyr

Kald 1 M HCl

Dialysepølser

Konduktivitetmåler

dH<sub>2</sub>O

##### Metode

Etter deacetylering av kitinet, ble prøven avkjølt ved å tilsette 280 g (70g/g kitin) prefryst is under omrøring. Kald, konsentrert HCl ble tilsatt under sakte omrøring til pH var omtrent 7.

Det var viktig at prøven ble oppbevart på is underveis slik at temperaturen holdt seg under 5 °C for å unngå ytterligere deacetylering. pH ble avslutningsvis justert til 4,5 med 1 M HCl.

Isolert kitosan ble overført til dialysepølser, som var vasket med dH<sub>2</sub>O. Pølsene ble fylt opp til omtrent 2/3 av volumet og lagt i dH<sub>2</sub>O. Vannet ble byttet jevnlig samtidig som konduktiviteten ble målt. Når konduktiviteten ble målt til omtrent 3 µS ble dialysen endt. pH i kitosanløsningen ble justert til 4,5 med 1 M HCl. Det var viktig at kitosanet var på kloridform for økt løselighet. Løsningen ble vakuumfiltrert gjennom Whatman filter (1,2 µm) og Membranfilter (0,8 µm) og deretter frysetørket.

### ***3.15 NMR analyse av kitosan for bestemmelse av acetyleringsgrad***

En prøve fra hver batch med fremstilt kitosan ble analysert på NMR for å finne  $F_A$ .  $F_A$  er konsentrasjonen av acetylerede enheter (A) delt på konsentrasjonen av monomere (A+D) i polymeren.

#### Utstyr

D<sub>2</sub>O

NaNO<sub>2</sub>

DCl 1 M

NaOD

#### Metode

20 mg kitosan ble løst i 2 ml D<sub>2</sub>O og satt til risting i inkubatorskap ved 37 °C. Ved endt tid ble 30 µl NaNO<sub>2</sub> og 150 µl 1 M DCl tilsatt. Løsningen ble pakket inn i aluminiumsfolie og satt til risting ved 37 °C i 2 timer. pH ble deretter justert til 4,5 med NaOD og overført til NMR rør. Acetyleringsgrad ble bestemt av spekter fra NMR analyse og bruk av følgende formel:

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

A: antall acetylerede enheter i sukkerkjeden eller på ikke-reduserende ende

A $\alpha$ : antall acetylerede  $\alpha$ -anomere på reduserende ende

A $\beta$ : antall acetylerede  $\beta$ -anomere på reduserende ende

D: antall deacetylerede enheter inni sukkerkjeden eller på ikke- reduserende ende

D $\alpha$ : antall deacetylerede  $\alpha$ - anomere på reduserende ende

Acetylerede  $\alpha$ -anomere og acetylerede  $\beta$ -anomere på reduserende ende ble lagt sammen med acetyleret enhet inni eller på ikke-reduserende ende. Dette ble deretter dividert på det totale antall reduserende og ikke-reduserende ender.

### ***3.16 Nedbryting av kitosan***

Kitosan med to ulike acetyleringsgrader, F<sub>A</sub> 0,40 og F<sub>A</sub> 0,63, ble degradert til KOS av ChiA mutantene R172Q og R172A.

#### Utstyr

NaAcetat buffer pH 5,5 0,08 M

NaCl 0,2 M

Kitosan F<sub>A</sub> 0,40 og F<sub>A</sub> 0,63

BSA

D<sub>2</sub>O

HCl 1 M

#### Metode

10 mg kitosan ble blandet med 500  $\mu$ l NaAc buffer, 500  $\mu$ l NaCl, 100  $\mu$ l BSA og 500  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O. Løsningen ble inkubert i risteinkubator på 200 rpm ved 37 °C til alt kitosanet var løst. Dette ble gjort med begge batchene av kitosan. 1,5  $\mu$ g av henholdsvis ChiA mutantene R172Q og R172A ble tilsatt prøvene og inkubert ved 37 °C og 200 rpm i risteinkubator i en uke.

Reaksjonen ble stoppet ved å senke pH til 2,5 ved tilsetning av 1 M HCl. Prøvene ble deretter kokt i 2 minutter og frysetørket over natt.



### ***3.17 AMAC-derivatisering***

Nedbrytningsproduktene fra enzymatisk hydrolyse av kitosan ble merket på reduserende ende ved reaksjon med 2-aminoacridone (AMAC). Denne gruppen gir en tillegg i masse på 194,1 g/mol. I en MS-analyse vil ekstramassen identifisere den reduserende enden på oligomerene og sekvensere dem [61, 70].

#### Utstyr

Dimetylsulfoksid (DMSO)

Eddiksyre

AMAC 0,1 M

Metanol 70 %

Cyanoboranhidrid 1M

#### Metode

10 µl 0,1 M AMAC ble tilsatt 50 µl frysetørket sukkerprøve som tilsvarer 0,5 mg.

Opparbeiding av sukkerprøve er forklart i kapittel 3.16. AMAC er lysømfintlig så prøven ble oppbevart mørkt. Prøven ble tilsatt 30 µl 1M cyanoboranhidrid, den ble blandet godt og inkubert i 30 minutter i vannbad på 90 °C. Reaksjonen ble stoppet ved å sette prøven i -80 °C i 5 minutter og deretter frysetørke den i 30 minutter.

Prøven ble løst i 100 µl 70 % metanol og sentrifugert ved 10 000 rpm i 30 minutter.

Supernatanten ble deretter overført til nye rør og frysetørket til den var tørr. Prøven ble oppbevart ved -20 °C.

### ***3.18 Resning av kitooligosakkarider på C-18 kolonne***

#### Utstyr

Prøver med nedbrutt kitosan

C-18 kolonne

Metanol

dH<sub>2</sub>O

Acetonitril

Acetonitril 80 %

Metanol 50 %

### Metode

Opparbeiding av prøvene som ble rensert er beskrevet i kapittel 3.17. Reagensrør ble satt i et vakuumkammer som ble koblet til vakuumpumpe. I ventilen over reagensrørene ble C-18 kolonnen satt. 5 ml 100 % metanol, 5 ml dH<sub>2</sub>O, 5 ml 100 % acetonitril, 5 ml dH<sub>2</sub>O, prøven løst i dH<sub>2</sub>O og 5 ml dH<sub>2</sub>O ble tilsatt i denne rekkefølgen. Mellom hver tilsetning ble væsken sluppet gjennom kolonnen og ned i reagensrøret. Kolonna gikk aldri tørr underveis. C-18 kolonnen ble så flyttet over til en ny ventil med et rent reagensrør under. Prøven ble eluert ut med 2 ml 80 % acetonitril og overført til et 2 ml eppendorfrør som ble frysetørket over natt.

### ***3.19 Analyse av AMAC-prøver på MALDI-TOF-TOF-MS/MS***

Prøvene ble analysert på MALDI-TOF-TOF-MS/MS for å identifisere KOS, vise at hydrolyse av sukkerne har skjedd og finne ut hvilke produkter som finnes i løsningen. Ved MALDI måles molekylvekten for biomolekyler ved at prøven bombarderes med laser. Prøven løses i en matriks som absorberer laserlyset og energien overføres indirekte til prøven. Prøven blir da spaltet opp uten å brytes ned [71]. Matriksen som ble brukt under prøveoppbeidelsen var 2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB) som absorberer UV-lys ved 337 nm. DHB har fenolgrupper som gir protoner fra matriksen til prøven, noe som er viktig for å få full ionisering [72].

### Utstyr

MALDI-TOF-MS instrument

Flex control og flex analysis program

DHB matriks

AMAC-prøver

### Metode

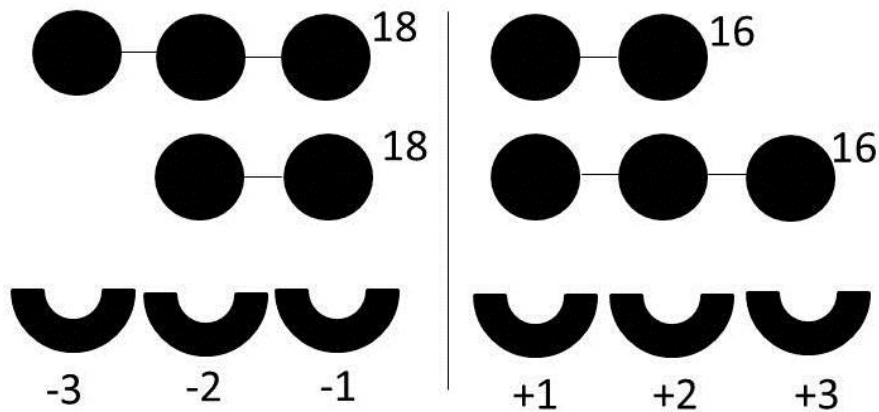
Kitosan ble derivatisert ved tilsetning av AMAC og cyanoboranhidrid. Prøven ble deretter løst i 70 % metanol som beskrevet i kapittel 3.17. Deretter ble prøven rensert på C-18 kolonne som beskrevet i kapittel 3.18.

50 µl 50 % metanol ble tilsatt prøvene og de ble sentrifugert ved 13000 rpm i 10 minutter. 1 µl supernatant ble blandet med 1 µl DHB (løst i 50 % etanol) og fordelt på to brønner pr prøve på MALDI-platen. AMAC prøvene ble først analysert med MS1 for å se hvilke KOS som fantes i løsningen. Deretter ble det gjort MS2 for å fragmentere KOS. Disse toppene har tilsvarende masse som indentifiserte topper med utregnet, teoretisk masse. Det ble kun fragmentert oligomere opp til heksamere fordi kjeder som er lenger enn dette er vanskelig å bestemme sekvens på. Instrumentet ble innstilt med akselerasjonspotensiale på 20 kV i reflektor modus. Forløperioner ble akselerert med 8 kV og fragmentioner fra forløperne ble akselerert med 19 kV. Det ble brukt en standard oligosakkaridmiks med oligomere fra 2-6 for å kalibrere instrumentet. Programmet Flex control ble benyttet under analysen. Programmet Flex analysis ble brukt for å prosessere data og fremstille masselister.

MS1 spektrene ble tolket ved å sammenlikne  $m/z$  for toppene med  $m/z$  for identifiserte KOS. Dette ble gjort med alle topper som hadde høy nok intensitet til at de lot seg fragmentere med MS2. De ulike fragmentene i hver prøve ble puslet sammen til mulige sekvenser av heksamere.

### ***3.20 Initiell hydrolyse av penta-kitooligosakkarid i $H_2^{18}O$***

Initiell hydrolyse av penta-KOS i et løsemiddel som inneholder  $H_2^{18}O$  gjør det mulig å bestemme og sammenlikne posisjoneringen av penta-KOS i det aktive setet til ChiA WT og ChiA mutantene K399S, R172Q og R172A. Ved å gjøre hydrolyse av KOS i et løsemiddel som inneholder  $H_2^{18}O$  vil nye reduserende ender få inkorporert  $^{18}O$  isotop fra løsemiddelet ved hydrolyse, mens de originale reduserende endene vil ha  $^{16}O$  på reduserende ende. Fordelingen av isotoper på nye reduserende ender vil avsløre bindingsmønsteret til penta-KOS i det aktive setet til ChiA WT og de forskjellige mutantene [73]. Figur 3.2 viser en illustrasjon av bindingsmønsteret til ChiA WT der en pentamer bindes 50 % fra -3 til +2 subsetet og 50 % fra -2 til +3 subsetet i det aktive setet. Figuren viser også mulige kuttsekvenser med henholdsvis  $^{18}O$  og  $^{16}O$  i reduserende ender.



Figur 3.2: Bindingsmønsteret i det aktive setet i ChiA WT. Figuren illustrerer at binding av en pentamer er 50 % fra -3 til +2 subsetet og 50 % fra -2 til +3 subsetet.

### Utstyr

Protein 5  $\mu\text{M}$  (K399S var 0,26  $\mu\text{M}$ )

Ammoniumacetat pH 4,2 20 mM

dH<sub>2</sub>O

H<sub>2</sub><sup>18</sup>O

A5 100  $\mu\text{M}$

DHB 10 mg/ml i 50 % EtOH i H<sub>2</sub><sup>18</sup>O

MALDI plate

### Metode

Først ble prosedyren gjort med dH<sub>2</sub>O for å finne riktig konsentrasjonsområde for å studere initiell nedbrytning. Deretter ble den gjort helt likt, med foretrukket proteinkonsentrasjon, i buffer med H<sub>2</sub><sup>18</sup>O. 100  $\mu\text{M}$  A5 ble blandet med 20 mM natriumacetat i et rør for hver mutant. Rørene ble satt i risteinkubator med 600 rpm på 37 °C. Først ble det tatt ut en nullprøve på 1  $\mu\text{l}$  fra hvert av rørene som hver ble blandet med 1  $\mu\text{l}$  DHB og påført to brønner på MALDI platen. Deretter ble 5  $\mu\text{M}$  protein (0,26  $\mu\text{M}$  for K399S) tilsatt blandingen med A5 og natriumacetat og samme prosedyre med prøveuttakning som for nullprøven ble gjort ved 30, 60, 120 og 180 sekunder. Prøvene på MALDI-platen ble så analysert på MALDI-TOF-MS som beskrevet i kapittel 3.21.

### ***3.21 Analyse på MALDI-TOF-MS av initiell hydrolyse av penta-kitooligosakkarid i $H_2^{18}O$***

Massespektrometriske analyser gjør det mulig å skille nye, isotopmerkede reduserende ender fra originale reduserende ender. Fra dette resultatet kan det avgjøres hvordan sukkeret var bundet i det aktive setet på enzymet da det ble kuttet.

#### Utstyr

MALDI-TOF-MS instrument

Flex control og flex analysis program

#### Metode

Prøvene som ble påført MALDI-platen etter initiell hydrolyse av penta-kitooligosakkarid i  $H_2^{18}O$  beskrevet i kapittel 3.20 ble analysert på MALDI-TOF-MS. Instrumentet ble innstilt med akselerasjonspotensiale på 20 kV i reflektor modus. Forløperioner ble akselerert med 8 kV og fragmentioner fra forløperne ble akselerert med 19 kV.

### ***3.22 $^1H$ -NMR analyse av nedbrutt kitosan***

NMR-spektroskopi er en teknikk som utnytter de magnetiske egenskapene til visse atomkjerner. Fra disse bestemmes fysiske og kjemiske egenskaper til atomer eller molekyler som inneholder disse atomkjernene [74]. For å bestemme graden av hydrolyse til kitosanpolymeren ved degradering med forskjellige ChiA mutanter ble spaltningsgraden,  $\alpha$ , bestemt ved  $^1H$ -NMR.  $\alpha$  er et mål på fraksjonen av glykosidbindinger i kitosanpolymeren som er kuttet av enzymet.  $\alpha$  bestemmes ved å sammenlikne økning i resonans av reduserende ender sammenliknet med resonans av interne anomere protoner.

Denne NMR analysen ble gjort på kitosan med  $F_A$  0,40 og  $F_A$  0,63 nedbrutt med ChiA mutantene R172Q og R172A. Prøvene løses først i  $D_2O$  for å hindre at signalet av  $H_2O$  blir for sterkt i forhold til signal fra prøvene slik at det ikke overlapper signalet fra OH i sukkeret.

## Utstyr

Prøve med nedbrutt kitosan

D<sub>2</sub>O

NaNO<sub>2</sub>

DCl

NaOD

WILMAD<sup>®</sup> NMR rør 5 med mm vegger og 7" lengde

Oxford NMR 300

## Metode

Nedbrutt kitosan ble løst i 500 µl D<sub>2</sub>O og pD ble justert til 4,5 med DCl og NaOD. Prøvene ble frysetørket. Prosedyren ble gjentatt to ganger for å minimere mengde H<sub>2</sub>O i prøvene før analyse. Prøvene ble overført til NMR-rør og analysert ved 85 °C og 300 MHz. Det ble gjort 256 scans med en blokkstørrelse på 8, pulsvinkel på 10,5 og spektralvidde på 3595,8.

Fra NMR spektrene ble DP<sub>n</sub> og  $\alpha$  regnet ut fra følgende likninger som beskrevet i [29].

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

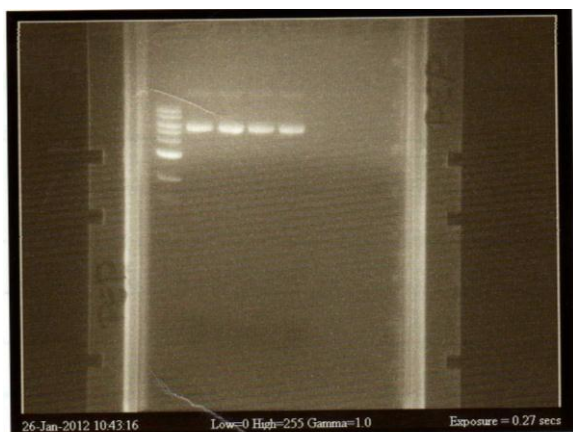
$$\alpha = 1/DP_n$$

## 4 Resultater

### 4.1 Tillaging av seterettede mutanter

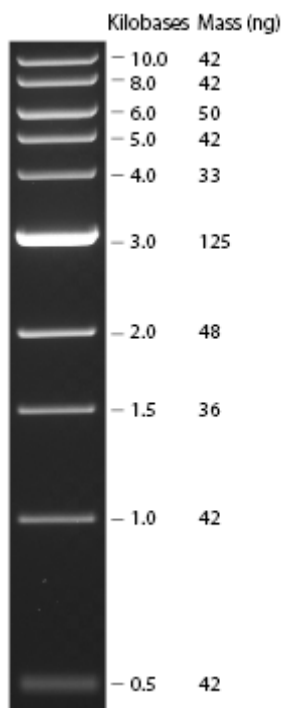
#### 4.1.1 DNA-gel

Etter en ChiA mutant eller WT var dyrket opp og plasmidet rensset ble det brukt DNA-gel for å sjekke renheten av plasmidet, som beskrevet i kapittel 3.2.3. DNA-gel ble også benyttet etter PCR, beskrevet i kapittel 3.4.1 for å sjekke renheten av PCR produktet. Etter transformering inn i *E.coli*, beskrevet i kapittel 3.4.2 ble DNA-gel brukt for å sjekke om størrelsen på plasmidet stemmer overens med størrelsen på det ønskede genen på 4,9 kb. I figur 4.1 er det vist et eksempel av en DNA-gel fra rensset plasmid av ChiA WT.



Figur 4.1: bilde av en DNA-gel fra rensset plasmid fra ChiA WT

Størrelsen på plasmidet sjekkes ved å sammenlikne vandringslengden av prøven på gelen med en 1 kb ladder, vist i figur 4.2.



Figur 4.2: 1 kb ladder brukt på DNA-gel. Massetallet i ng vist på laddereren gjelder når det er påført 10  $\mu$ l ladder. 3 kb fragmentet er spesielt tydelig for å være en referanse for andre bånd [66]. Bildet er hentet fra New England Biolabs.

#### 4.1.2 DNA konsentrasjon målt ved nanodrop

Etter ChiA mutant eller WT plasmid var rensset og renheten undersøkt på DNA-gel ble konsentrasjonen av DNA i prøven målt. Dette ble gjort ved nanodrop som beskrevet i kapittel 3.3. I tabell 4.1 er målt DNA konsentrasjon for de ulike enzymene gitt.

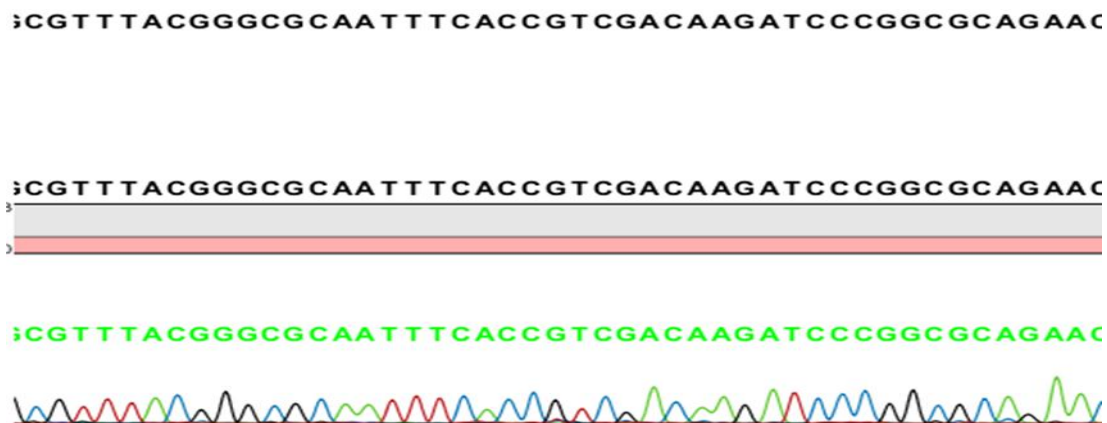
Tabell 4.1: DNA konsentrasjoner i ChiA WT og mutanter, målt ved nanodrop.

Enzym	Konsentrasjon (ng/ $\mu$ l)
WT 1	78
WT 2	84,2
R172A	95,1
R172Q	70
K399S	84

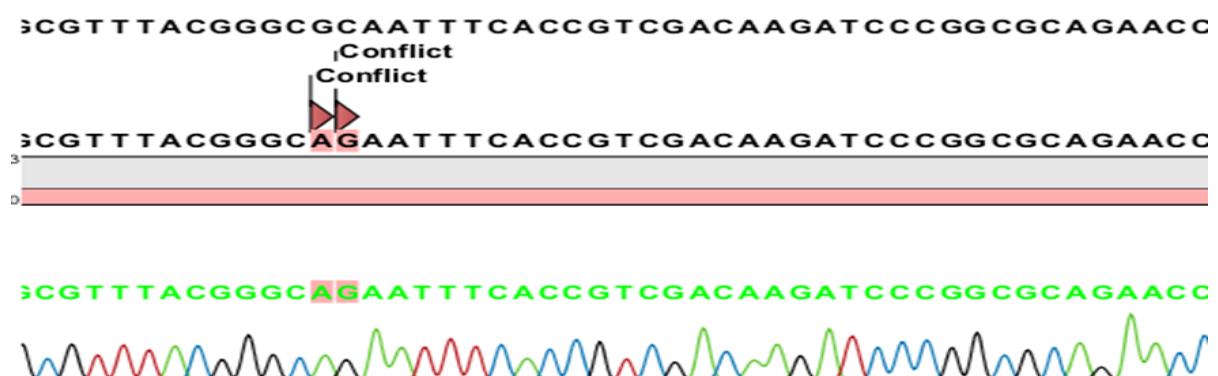


### 4.1.3 Sekvensering

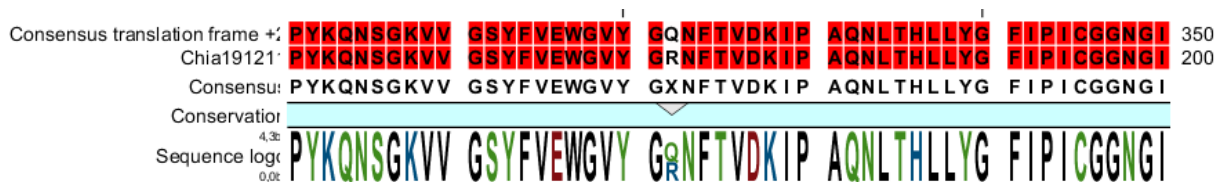
Etter prøvene hadde blitt sekvensert, som beskrevet i kapittel 3.5 ble mutasjonene sjekket i programmet CLC DNA Workbench 6 for å finne ut om ønsket mutasjon var oppnådd og om det eventuelt var kommet uønskede mutasjoner. Dette ble gjort ved å sammenlikne sekvensen til ChiA mutant med ChiA WT. Figur 4.3 og 4.4 viser nukleotidsekvens for henholdsvis ChiA WT og ChiA mutanten R172Q. Figur 4.5 viser aminosyresekvensen for ChiA mutanten R172Q.



Figur 4.3: Nukleotidsekvens for ChiA WT, Resultat av sekvensering. Hentet fra programmet CLC DNA Workbench 6.



Figur 4.4: Nukleotidsekvens for mutant R172Q, resultat av sekvensering. Hentet fra programmet CLC DNA Workbench 6.



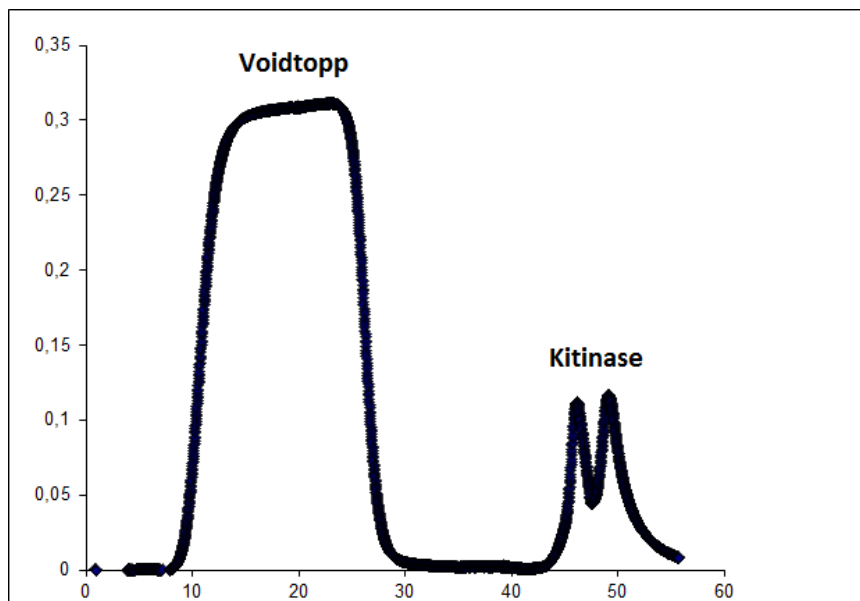
Figur 4.5: Aminosyresekvens for R172Q, resultat av sekvensering. Hentet fra programmet CLC DNA Workbench 6.

## 4.2 Produksjon og rensing av villtype og mutante kitinaser

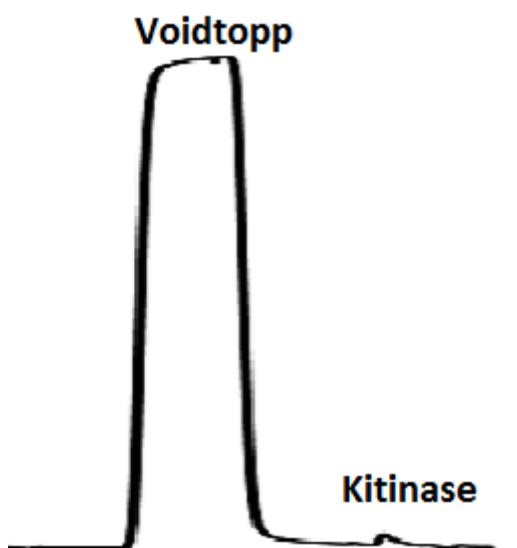
### 4.2.1 Rensing av periplasmatisk ekstrakt

Kitinaser generelt kan renses i to trinn ved hjelp av IEC og HIC eller ett trinn ved bruk av kitinkolonne. Fordelen med totrinns metoden er at større volum og relativt inaktive mutanter kan renses. Ulempen er at det er to trinn. Bruk av kitinkolonne har en fordel av at det kun er ett trinn, men relativt inaktive mutanter elueres ikke og relativt små mengder kan appliseres om gangen [75]. Begge metoder ble utprøvd for å finne ut om disse ga ønsket resultat med rent enzym.

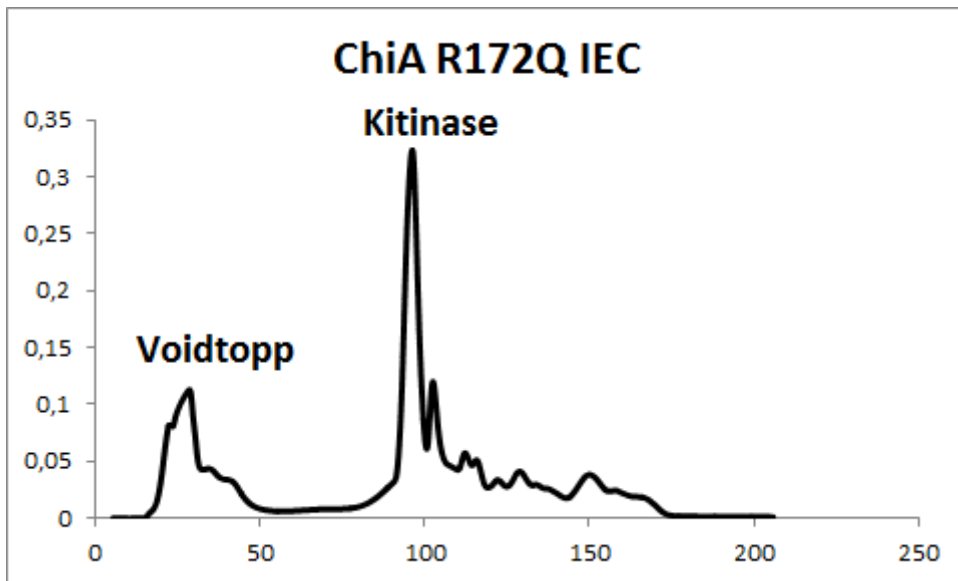
Det periplasmatiske ekstraktet av ChiA mutantene K399S og R172A samt WT ble renses på kitinkolonne som beskrevet i kapittel 3.7. Det periplasmatiske ekstraktet av ChiA mutanten R172 Q ble renses på IEC og HIC som beskrevet i kapittel 3.8 og 3.10. Kromatogram fra rensing av ChiA WT og K399S på kitinkolonne er gitt i henholdsvis figur 4.6 og 4.7. Kromatogram fra rensing av R172Q på henholdsvis IEC og HIC er gitt i figur 4.8 og 4.9. Kromatogrammene er hentet fra programmet LP Data View.



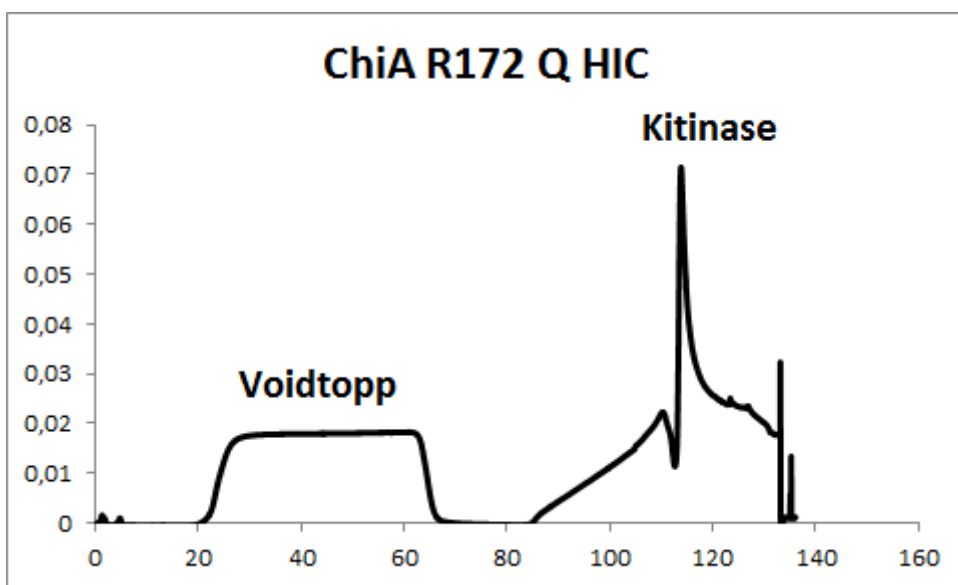
Figur 4.6: Kromatogram fra rensing av ChiA WT på kitinkolonne, hentet fra programmet LP Data View.



Figur 4.7: Kromatogram fra rensing av K399S på kitinkolonne, hentet fra programmet LP Data View.



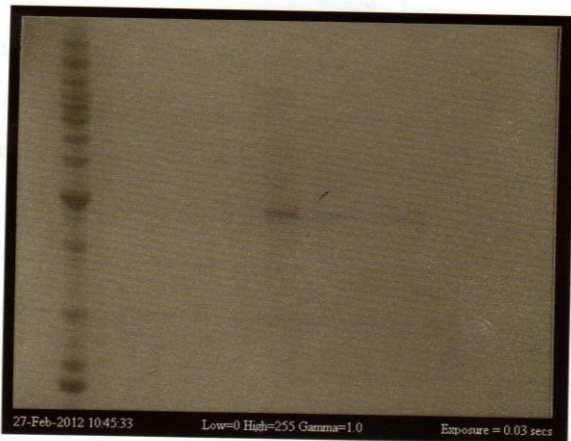
Figur 4.8: Kromatogram fra rensing av R172Q på IEC, hentet fra LP Data View.



Figur 4.9: Kromatogram fra rensing av R172Q på HIC, hentet fra LP Data View.

#### 4.2.2 Kontroll av rensing

Etter protein var rensset på kitinkolonne eller IEC og HIC, som beskrevet i kapittel 3.7, 3.8 og 3.10 ble alle fraksjoner kontrollert ved å analysere proteinet på SDS-PAGE som beskrevet i kapittel 3.9. I tillegg brukes SDS-PAGE etter rensing på IEC for å finne ut hvilke fraksjoner som inneholder ønsket protein og skal renses videre på HIC. Riktig protein ble valgt utifra størrelsen til proteinene ved å sammenlikne vandrelengden i gelen med vandrelengden til ladder. Det er kjent at mutanten skal ha en størrelse på rundt 58 kDa da dette er størrelsen til ChiA WT. Figur 4.10 viser bilde av gel fra rensing av ChiA mutant R172Q. Det er et tydelig bånd i den ene brønnen om inneholder prøve rensset på HIC og ligger på forventet vandringslengde for proteinet, sammenliknet med ladder.



Figur 4.10: Bilde av proteingel fra rensing av ChiA mutant R172Q på IEC og HIC. Brønnen med et tydelig bånd, er fraksjonen rensset på HIC.

### 4.2.3 Fluorimetrisk bestemmelse av proteinkonsentrasjon med Quant-iT™

Proteinkonsentrasjonen ble bestemt ved fluorimetrisk måling med Quant-iT™ som beskrevet i kapittel 3.12. Det ble renset to paralleller av hvert enzym og det ble målt tre paralleller for hver av dem. Gjennomsnittlig konsentrasjon i disse tre er gitt i tabell 4.2.

Tabell 4.2: Gjennomsnittlig proteinkonsentrasjon i tre paralleller av hvert enzym, målt spektrofotometrisk ved bruk av Quant-iT™.

<b>Enzym</b>	<b>Proteinkonsentrasjon (mg/ml)</b>
K399S-1	0,305
K399S-2	0,150
R172Q-1	0,530
R172Q-2	1,240
R172A-1	0,701
R172A-2	1,047
WT 2	1,193
WT 1	0,984

#### 4.2.4 Spesifikk enzymaktivitet av isolerte proteiner

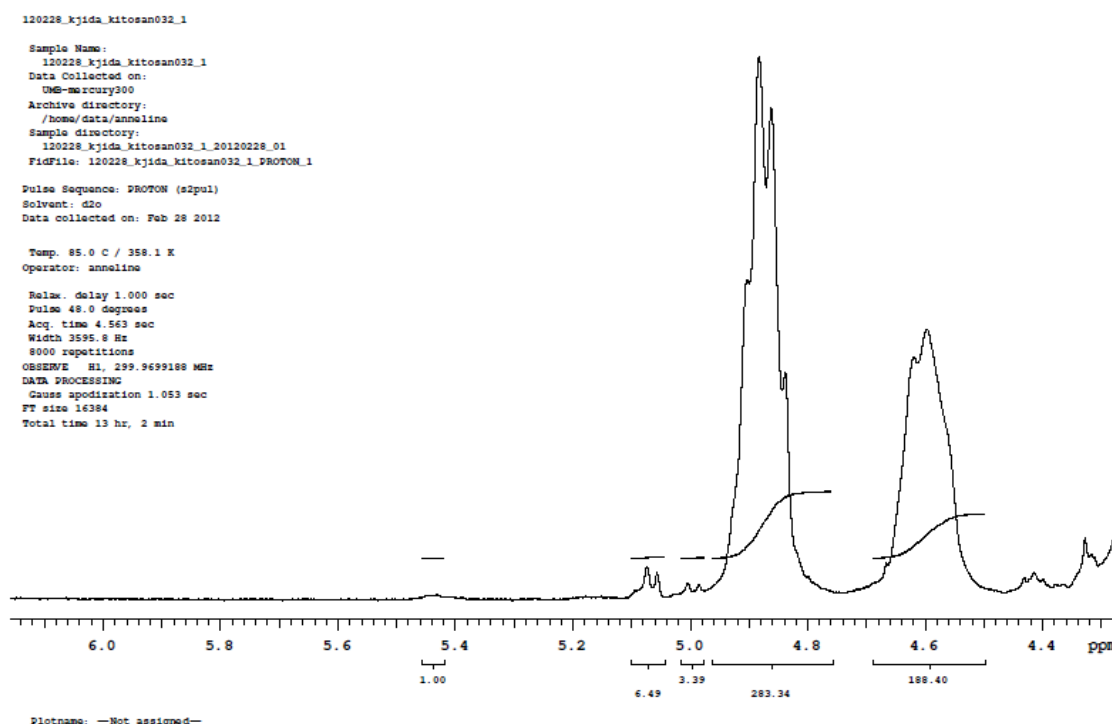
Enzymaktiviteten til mutantene R172A, R172Q og K399S ble bestemt som beskrevet i kapittel 3.13. Målt aktivitet på spektrofotometeret for gjennomsnitt av tre paralleller av hver ChiA mutant, samt kontroll, er gitt i tabell 4.3 og ble regnet ut fra formelen gitt i metodebeskrivelsen. Proteinkonsentrasjoner er hentet fra tabell 4.2 der det er R172A-1, R172Q-1 og K399S-1 som ble brukt for å undersøke enzymaktivitet.

Tabell 4.3: Spesifikk enzymaktivitet for ChiA mutanter målt spektrofotometrisk.

<b>Enzym</b>	<b>Spesifikk aktivitet (fluorescens pr tid pr mengde enzym)</b>
Kontroll-1	0
Kontroll-2	0
WT-1	37329
WT-2	642
WT-3	8140
WT-4	1851
WT-5	6681
WT-6	6567
R127A-1	14,32
R172A-2	14,29
R172A-3	14,29
R172Q-1	0,75
R172Q-2	0,79
R172Q-3	0,72
K399S-1	32,7
K399S-2	32,5
K399S-3	32,7

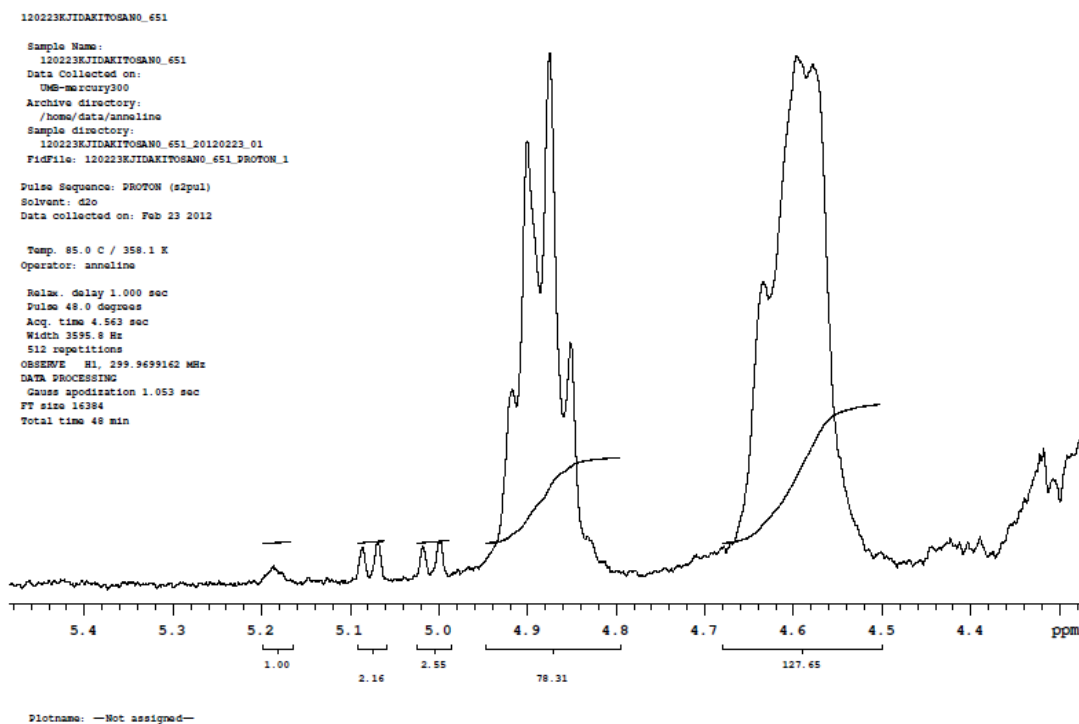
### 4.3 Fremstilling av kitosan og bestemmelse av acetyleringsgrad

Kitosan ble fremstilt ved homogen *N*-deacetylering av kitin og isolert som beskrevet i kapittel 3.14. Det ble fremstilt kitosan inkubert i to ulike tider i vannbad ved 25 °C. Dette skal teoretisk gi to ulike  $F_A$ . En prøve fra hver batch med fremstilt kitosan ble analysert på  $^1\text{H}$ -NMR for å bestemme acetyleringsgraden, som beskrevet i kapittel 3.15.  $^1\text{H}$ -NMR-spektrene er gitt i figur 4.11 og 4.12.



Figur 4.11: NMR spekter fra nedbrutt kitosan inkubert i 96 timer i vannbad på 25 °C.





Figur 4.12: NMR spekter av nedbrutt kitosan inkubert i 48 timer i vannbad ved 25 °C.

$F_A$  til kitosan inkubert i to ulike tider i vannbad på 25 °C ble regnet ut fra formelen gitt i metodebeskrivelsen og verdiene i NMR-spekterene.  $F_A$  og utbytte er gitt i tabell 4.4

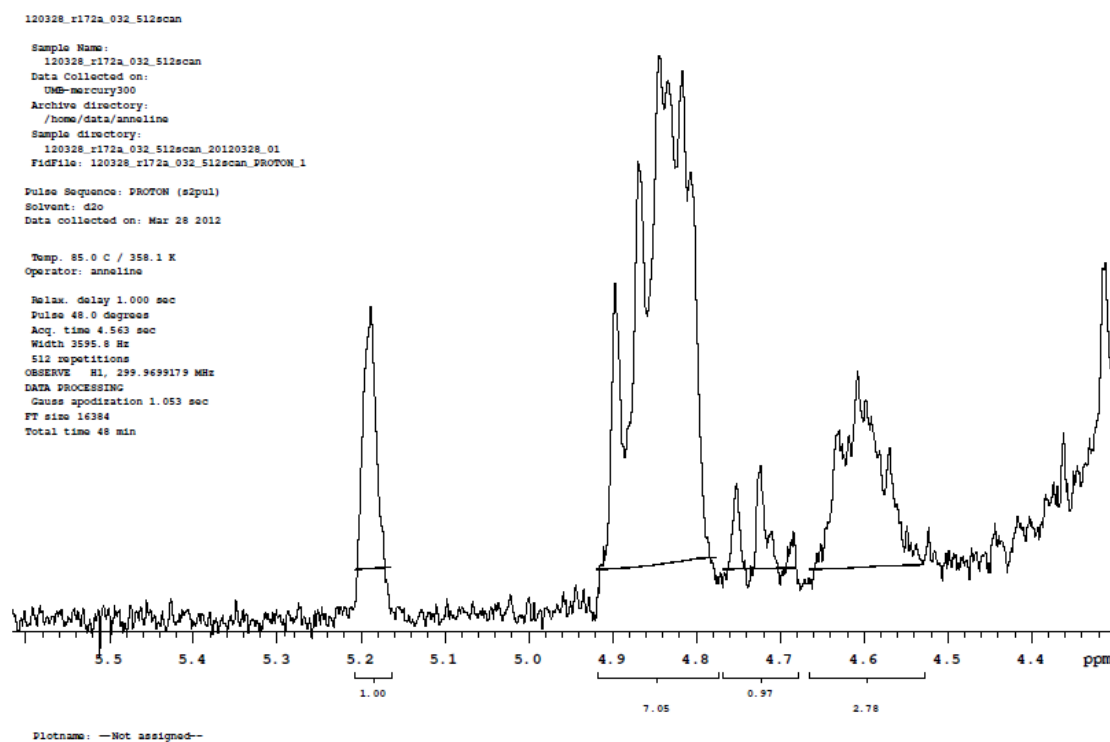
Tabell 4.4:  $F_A$  og utbytte for kitosan inkubert ved ulik tid i vannbad på 25 °C.

Inkuberingstid 25 °C i vannbad (t)	$F_A$	Utbytte (% g)
96	0,40	18
48	0,62	15

## 4.4 Biologisk aktivitet

### 4.4.1 Enzymatisk nedbryting av kitosan

Kitosan med  $F_A$  0,40 og 0,62 ble nedbrutt ved hydrolyse med ChiA mutantene R172Q og R172A, beskrevet i kapittel 3.16 til antatt maksimal nedbrytning.  $\alpha$  ble bestemt ved NMR som beskrevet i kapittel 3.22. Figur 4.13 viser NMR spekter for kitosan med  $F_A$  0,40 nedbrutt med ChiA mutanten R172A. Tilsvarende spekter ble også tatt opp for kitosan med  $F_A$  0,40 nedbrutt med ChiA mutanten R172Q og kitosan med  $F_A$  0,62 nedbrutt med henholdsvis ChiA mutantene R172A og R172Q.



Figur 4.13: NMR spekter for kitosan med  $F_A$  0,40 nedbrutt med ChiA mutanten R172A.

Fra NMR spektrene av nedbrutt kitosan ble  $\alpha$  regnet ut og er gitt i tabell 4.5.  $F_A$  til kitosan er hentet fra tabell 4.4 i kapittel 4.3.

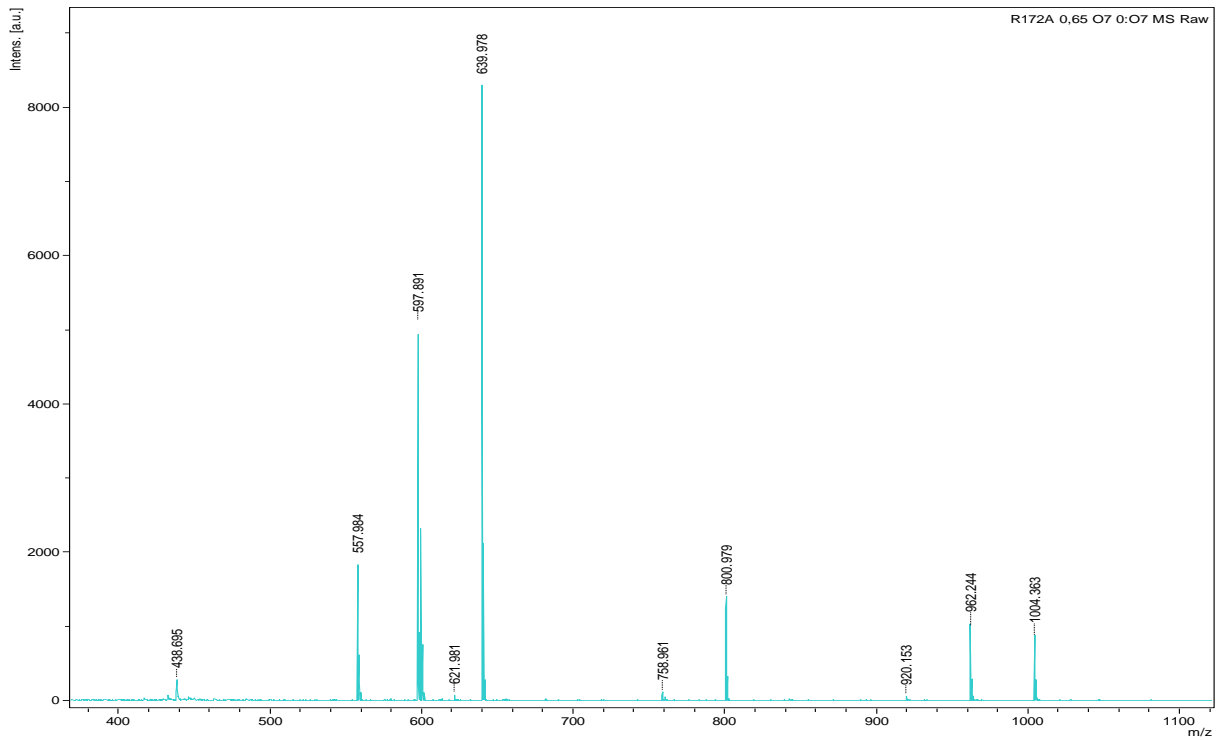
Tabell 4.5: Acetyleringsgrad  $F_A$  og spaltningsgraden  $\alpha$  til kitosan nedbrutt med ChiA mutantene R172Q og R172A.

<b>ChiA mutant</b>	<b><math>F_A</math></b>	<b><math>\alpha</math></b>
R172Q	0,62	0,11
R172Q	0,40	0,11
R172A	0,62	0,25
R172A	0,40	0,17

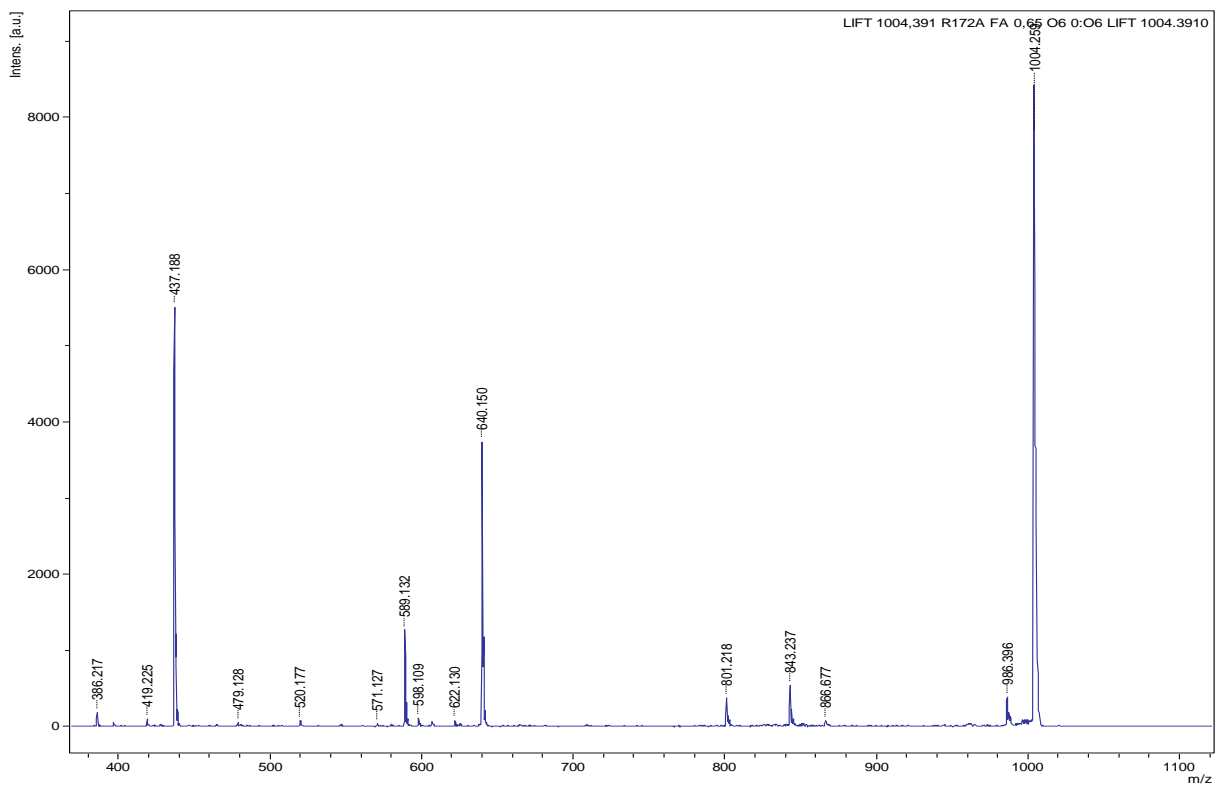
#### ***4.4.2 Massespektrometriske analyser av AMAC-derivatisert hydrolyseprodukt***

Kitosan med  $F_A$  0,40 og 0,62 ble hydrolysert med ChiA mutantene R172A og R172Q og hydrolyseproduktene ble derivatisert med AMAC som beskrevet i kapittel 3.16 til 3.18. For å bestemme sekvens av hydrolyseproduktene ble hvert enkelt identifiserte KOS fragmentert og analysert med MALDI-TOF-TOF-MS/MS som beskrevet i kapittel 3.19.

Som eksempler er spekter fra MS1 for kitosan med  $F_A$  0,62 nedbrutt med ChiA mutanten R172A vist i figur 4.14 og spekter fra MS2 for topp med  $m/z$  1004,391 fra ChiA mutanten R172 A med  $F_A$  0,62 vist i figur 4.15. Tilsvarende spekter ble også tatt opp for hydrolyse ved de andre mutantene.



Figur 4.14: MS1 spekter av kitosan med  $F_A$  0,62 nedbrutt med ChiA mutanten R172A.



Figur 4.15: MS2 spekter fra for topp med  $m/z$  1004,391 av kitosan med  $F_A$  0,62 nedbrutt av ChiA mutanten R172 A.

Observerte KOS ved MS1 for R172A er presentert i tabell 4.6.

Tabell 4.6: Kitoooligosakkarider funnet ved MS1 i kitosan med  $F_A$  0,40 og  $F_A$  0,62 nedbrutt med ChiA mutanten R172A.

KOS	<i>m/z</i>	
	$F_A$ 0,40	$F_A$ 0,62
A	438,57	438,70
AD	559,02	597,89
A2	640,02	639,98
D3	719,04	-
D2A	-	758,96
A2D	801,03	800,98
D2A2	962,37	962,24
D3A1	922,26	920,15
D1A3	1004,43	1004,39
D4A1	1081,70	-
D3A2	1123,87	1123,82
D2A3	1166,05	1165,97
D5A1	1243,46	-
D4A2	1285,74	1285,59
D3A3	1327,91	1327,84
D2A4	-	1370,08
D4A3	1447,72	-
D3A4	1490,05	1489,93
D4A4	1652,39	-

Fra analysene med MS2, ble det satt opp mulige kuttesekvenser for mutanten R172A ved nedbrytning av kitosan med  $F_A$  0,40 og  $F_A$  0,62. Sekvenser med hensyn til deacetylerede enheter (D) og acetylerede enheter (A) for observerte penta-KOS og tilhørende *m/z* er gitt i tabell 4.7. Tabell over bestemte kuttesekvenser finnes i vedlegg 1.

Tabell 4.7: Sekvensbestemmelse for hydrolyseprodukt fra kitosan med  $F_A$  0,40 og  $F_A$  0,62 hydrolysert med ChiA mutanten R172A og tilhørende  $m/z$ .

	$F_A$ 0,40			$F_A$ 0,62		
	$m/z$	KOS	Sekvens	$m/z$	KOS	Sekvens
Pentamer	1084,05	D3A2	DDDAA	1123,58	D3A2	DDDAA
			ADDDA			DADAD
DADDA			ADDDA			
DDADA			DADDA			
Pentamer	1166,15	D2A3	DDAAA	1165,80	D2A3	DDAAA
			ADDAA			ADDAA
			DADAA			DADAA
			AADDA			AADDA
			DAADA			ADADD
			ADADA			ADDAD
						DDAAA
						ADDAA
						DADAA
						AADDA
	ADADA					
	AAADD					
	DAAAD					
	ADAAD					
	AADAD					

Fra sekvensene gitt i tabell 4.7 kan indikasjoner gis på hvilke preferanser ChiA mutanten R172A hadde for sukkerenhet A eller D i subsete -3 til +3 under hydrolyse av kitosan med  $F_A$  0,40 og  $F_A$  0,62 ved at de tre siste residuene mot reduserende ende i observerte pentamerer vil ha hatt en produktiv binding fra henholdsvis -3 til -1 og de tre første residuene fra den ikke-reduserende enden vil ha hatt en produktiv binding fra henholdsvis +1 til +3.

Produktene fra nedbrytning med ChiA mutanten R172Q ble analysert med MS. Data fra MS1 analyse av nedbrutt kitosan med  $F_A$  0,40 og  $F_A$  0,63 er gitt i tabell 4.8.

Tabell 4.8: Kitoooligosakkarider funnet ved MS1 i kitosan med  $F_A$  0,40 og  $F_A$  0,62 nedbrutt med ChiA mutanten R172Q.

<b>KOS</b>	<i>m/z</i>	
	<b><math>F_A</math> 0,40</b>	<b><math>F_A</math> 0,63</b>
A	438,29	438,31
AD	599,03	599,05
A2	641,19	641,21
D2A	760,43	-
A2D	802,44	802,46
A3	-	844,47
D3A1	921,42	-
D2A2	963,38	963,42
D1A3	1005,36	1005,39
A4	-	1047,37
D3A2	1124,36	1123,84
D2A3	1166,38	1166,42
D3A3	1327,76	1327,80
D2A4	1369,94	1370,00

Fra analysene med MS2 ble det satt opp mulige kuttesequenser for mutanten R172Q. Dette ble gjort for nedbrytning av kitosan med  $F_A$  0,40 og  $F_A$  0,62. Sekvensene av pentamer er gitt i tabell 4.9. Fullstendig tabell over alle kuttesequenser finnes i vedlegg 2.

Tabell 4.9: Sekvensbestemmelse for hydrolyseprodukt fra kitosan med  $F_A$  0,40 og  $F_A$  0,62 hydrolysert med ChiA mutanten R172Q.

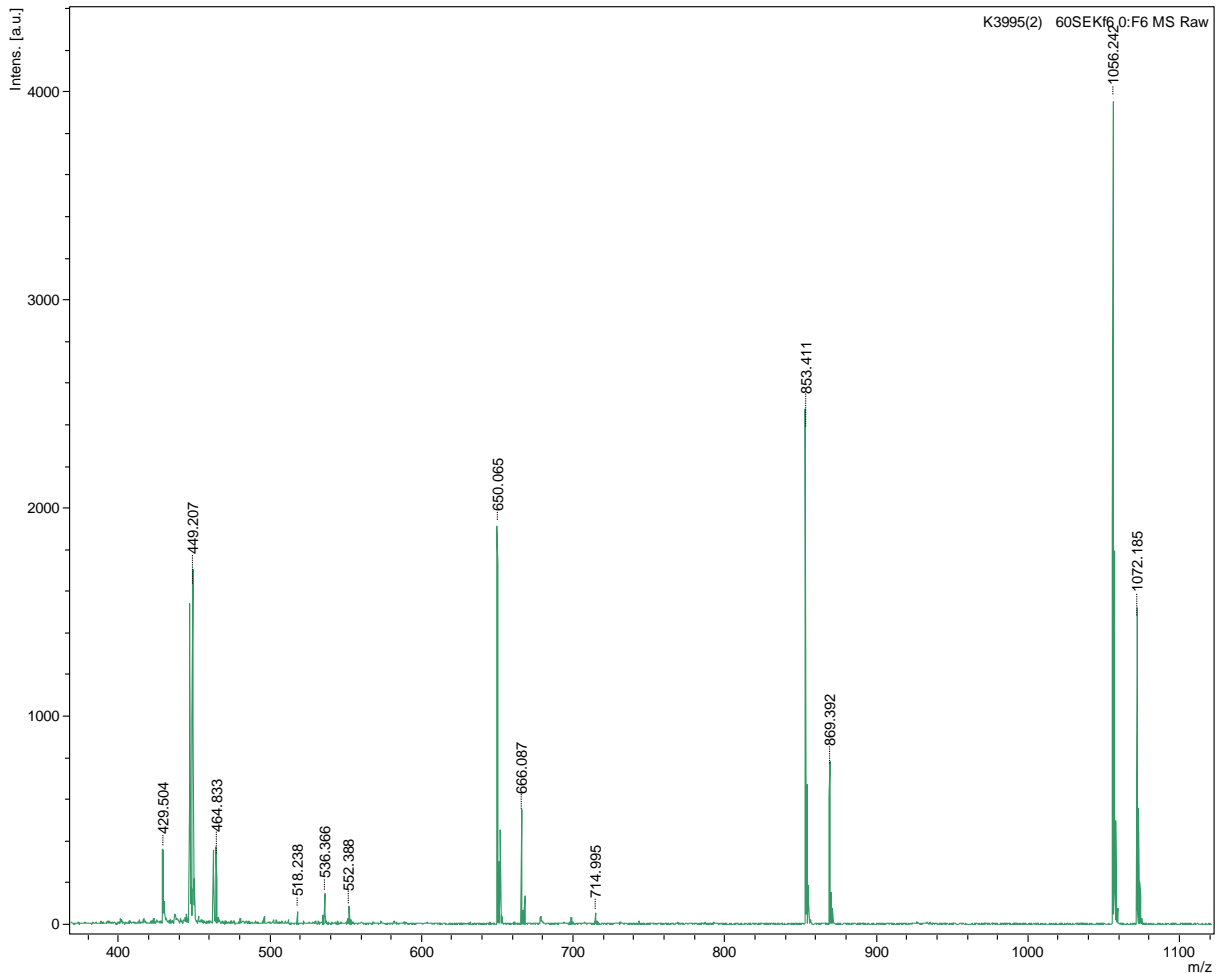
	$F_A$ 0,40			$F_A$ 0,62		
	<i>m/z</i>	KOS	Sekvens	<i>m/z</i>	KOS	Sekvens
Pentamer	1123,76	D3A2	DDDAA	1123,82	D3A2	DDDAA
			ADDDA			ADDDA
			DADDA			DADDA
			DDADA			DDADA
	1165,96	D2A3	DDAAA	1165,90	D2A3	DDAAA
			ADDAA			ADDAA
			DADAA			AADDA
			AADDA			DAADA
			DAADA			ADADA
			ADADA			DADAA

Fra sekvensene gitt i tabell 4.9 ble det bestemt hvilke preferanser ChiA mutanten R172Q hadde for sukkerenhet A eller D i subsete -3 til +3 under hydrolyse av kitosan med  $F_A$  0,40 og  $F_A$  0,62.

#### ***4.4.3 Massespektrometrisk analyse av initiell nedbrytning av penta-kitoooligosakkarid med ChiA mutanter i $H_2^{18}O$***

Initiell nedbrytning av penta-KOS med ChiA WT og mutantene R172A, R172Q og K399S i  $H_2^{18}O$  ble studert ved hjelp av MALDI-TOF-MS for å bestemme hvordan substratet posisjoneres i det aktive setet under hydrolyse som beskrevet i kapittel 3.20 og 3.21. MS-spekter fra ChiA mutanten K399S ved 60 sekunder er gitt i figur 4.16.





Figur 4.16: MS spekter fra analyse av initiell nedbrytning av penta-KOS med ChiA mutanten K399S i  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  etter 60 sekunder.

Fra MS spektrene ble det bestemt hvor stor andel av trimere ioner som er merket med  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  basert på relativ intensitet av toppene. For hver mutant ble det valgt ut en prøve til sammenlikning der den relative intensiteten mellom trimer og pentamer var rundt 0,5. WT var totalt nedbrutt. Tabellene med andel av trimere ioner for villtype, K399S, R172A og R172Q som er merket med  $^{16}\text{O}$  eller  $^{18}\text{O}$  er gitt i tabell 4.10.

Tabell 4.10: Andel av trimere ioner i prøver nedbrutt med ChiA mutantene R172Q, R172A, K399S og ChiA WT som er merket med  $^{16}\text{O}$  eller  $^{18}\text{O}$ . Den relative intensiteten mellom trimer og pentamer for mutantene var rundt 0,5. WT var totalt nedbrutt.

Ion	Enzym			
	R172Q	R172A	K399S	WT
$[\text{A3+Na}]^+$	90 %	91 %	91 %	70 %
A3+Na i $\text{H}_2^{18}\text{O}$	10 %	9 %	9 %	30 %

## 5 Diskusjon

I dette studiet har det blitt dyrket opp mutanter av ChiA der det er innført spesifikke mutasjoner i enzymets aktive sete ved seterettet mutagenese. Valg av residuer er basert på inspeksjon av hvilke residuer som interagerer med substratet i -3 subsetet. Dette er igjen basert på krystallstrukturen til ChiA mot substratet (GlcNAc)<sub>8</sub> og modellert substrat i +3 subsete [7, 57]. Målet har vært å undersøke om disse mutasjonene har noen innvirkning på posisjonering av substrat og hvilke preferanser mutantene har for acetylerede og deacetyerte sukkerenheter i de ulike subsetene.

For å gjøre dette har det blitt fremstilt kitosan med to ulike acetyleringsgrader ( $F_A$ ) ved homogen *N*-deacetylering av kitin til bruk som substrat for å kunne karakterisere mutantene, samt å inkubere framstilte enzymer med (GlcNAc)<sub>5</sub> for å få et relativt mål for det bestemte residuets bindingsstyrke sammenliknet med native residuer.

Prosjektets mål har vært å få mer kunnskap rundt hvilke faktorer som spiller inn i binding og posisjonering av substrat.

### 5.1 Mutasjonsanalyse

Mutantene av ChiA som ble laget var R172A, R172Q og K399S. Tillaging av disse ble sammenliknet med villtype ChiA. Konsentrasjon av DNA i disse, målt ved nanodrop, var henholdsvis 95,1 ng/μl, 70 ng/μl og 84 ng/μl. Mutantene hadde ganske lik DNA konsentrasjon som WT der det ble målt 78 ng/μl og 84,2 ng/μl. Videre ble mutanter og WT sekvensert, og det ble bekreftet at ønskede mutasjoner var innført i mutantene ved å sammenlikne mutert sekvens med WT sekvens.

## 5.2 Overekspresjon av ChiA WT og mutanter

Periplasmatisk ekstrakt som inneholdt de aktuelle proteinene ble rensset på kitinkolonne eller IEC og HIC, og SDS-PAGE ble benyttet for å bekrefte at minst en fraksjon inneholdt protein på 58 kDa da dette er størrelsen til ønsket protein.

Den spesifikke enzymaktiviteten til WT og mutantene ble bestemt ved spektrofotometrisk måling og utregning ved formel som beskrevet i metoden. Det ble målt tre paralleller av hver prøve der verdier er gitt i tabell 4.3. Den gjennomsnittlige spesifikke aktiviteten til hvert enzym ble bestemt til 10201 for WT, 14,3 for R172A, 0,75 for R172Q og 32,6 for K399S. Mutantene hadde vesentlig lavere enzymaktivitet enn ChiA WT.

## 5.3 Biologisk aktivitet

### 5.3.1 Nedbrytning av kitosan

Kitosan med  $F_A$  0,40 og 0,62 ble nedbrutt ved hydrolyse med ChiA mutantene R172Q og R172A.  $\alpha$  ble bestemt ved utregning og verdier i  $^1\text{H-NMR}$ -spekter. Kitosan med  $F_A$  0,62 og  $F_A$  0,40 nedbrutt med R172Q hadde en  $\alpha$  på henholdsvis 0,11 og 0,105. Kitosan med  $F_A$  0,62 og  $F_A$  0,40 nedbrutt med R172A hadde en  $\alpha$  på 0,254 og 0,17.

Sammenliknet med studier gjort av Horn *et.al* i 2006 [76] der  $\alpha$  ble funnet til å være 0,35 ved nedbrytning av kitosan med  $F_A$  0,65 med ChiA, er verdiene for  $\alpha$  for R172A og R172Q relativt lave. Dette tyder på at det er vanskeligere for ChiA mutantene å bryte ned kitosan enn for ChiA WT. Grunnen til dette kan være at mutasjonen av Arg172 gjør binding til substrat svakere og substratposisjonering i det aktive setet vanskeligere, i tråd med at Arg172 har mange interaksjoner mot substratet som vist i figur 1.8.

### 5.3.2 Subsetepreferanser

KOS som oppstod etter nedbrytningen av kitosan med ChiA mutantene R172A og R172Q ble merket med AMAC og analysert ved MALDI-TOF-TOF-MS/MS. I MS1 ble det funnet hvilke ioner som fantes i løsningen etter nedbrytning og de tilhørende toppene i MS spekteret ble fragmentert. Fra MS2 ble det funnet mulige kuttesequenser med sukkerenhetene A og D for hvert enzym som videre ble brukt til å avgjøre enzymenes preferanser for A og D i de ulike subsetene i det aktive setet. Det ble observert at preferansen for en acetyllert enhet i subsete -4, -2, +2 hos ChiA WT (Tabell 5.1) ikke lenger var tilstede for R172A og R172Q.

For nedbrytning av kitosan med R172Q ( $F_A$  0,40 og  $F_A$  0,62) og R172A ( $F_A$  0,40) stemte godt overens med den absolutte preferansen for en A i subsete -1 som observert for ChiA WT [7]. Det var derfor meget overraskende å observere at nedbrytning av  $F_A$  0,62 ved R172A også ga nye reduserende ender med en D. Det er vanskelig å forstå hvordan en D på den reduserende enden kan oppstå. Det blir derfor viktig å gjøre dette forsøket på nytt for å se om resultatet er reproducerbart.

Tabell 5.1: Mulige pentamersekvenser for kitosan med  $F_A$  0,40 og 0,62 hydrolysert med ChiA mutantene R172A og R172Q. ChiA WT sekvenser er hentet fra Norberg *et al*, 2011. [7].

		R172A $F_A$ 0,40		R172A $F_A$ 0,62		R172Q $F_A$ 0,40		R172Q $F_A$ 0,62		ChiA WT		
Pentamer	KOS	$m/z$	Sekvens	$m/z$	Sekvens	$m/z$	Sekvens	$m/z$	Sekvens	Sekvens		
D3A2		1084,05	DDDAA	1123,58	DDDAA	1123,76	DDDAA	1123,82	DDDAA	-		
			ADDDA		DADAD		ADDDA		ADDDA			
			DADDA		ADDDA		DADDA		DADDA			
			DDADA		DADDA		DDADA		DDADA			
					DDADA							
					AADDD							
					DAADD							
					DDAAD							
					ADADD							
					ADDAD							
		D2A3		1166,15	DDAAA	1165,80	DDAAA	1165,96	DDAAA	1165,90	DDAAA	DADAA
					ADDAA		ADDAA		ADDAA		ADDAA	
					DADAA		DADAA		DADAA		AADDA	
					AADDA		AADDA		AADDA		DAADA	
					DAADA		ADADA		DAADA		ADADA	
					ADADA		AAADD		ADADA		DADAA	
							DAAAD					
							ADAAD					
					AADAD							

### ***5.3.3 Posisjonering av substrat i det aktive setet***

Det ble gjort initiell hydrolyse av (GlcNAc)<sub>5</sub> i H<sub>2</sub><sup>18</sup>O med ChiA mutantene K399S, R172A og R172Q samt ChiA WT. Prøvene fra disse forsøkene ble analysert på MALDI-TOF-MS for å se hvordan substratet plasseres i det aktive setet. Det ble tatt opp MS spekter fra prøver tatt ut ved 0, 30, 60, 120 og 180 sekunders inkubasjon. Fra MS spektrene ble det bestemt hvor stor andel av trimere som er merket med H<sub>2</sub><sup>18</sup>O basert på relativ intensitet av toppene. For hver mutant ble det valgt ut en prøve til sammenlikning der den relative intensiteten mellom startsubstratet pentamer og produktet trimer var rundt 0,5 for mutantene. WT var totalt nedbrutt. For alle mutantene viser inkorporering av <sup>18</sup>O i dannede (GlcNAc)<sub>3</sub> molekyler at 90 % av (GlcNAc)<sub>5</sub> binder fra -2 til +3. For R172 mutantene er dette ikke overraskende. Som tidligere beskrevet er det mange og sterke interaksjoner mellom R172 og sukkerenhetene i de negative subsetene. Ved fjerning av disse interaksjonene, vil det sterke +3 subsetet bli mer dominerende enn -3 subsetet. Det er derimot overraskende at endring av et potensielt interagerende lysin til serin i +3 skulle gi enda sterkere binding i +3 enn for villtypen. Flere mutasjoner i nøkkelresiduer i +3 subsetet må utføres for å bekrefte om dette kan være en riktig trend.

## 6. Videre studier

Det bør gjøres nye AMAC-forsøk for å undersøke om R172A ved nedbrytning av kitosan med  $F_A$  0,62 skiller seg ut fra de andre prøvene konsekvent. Denne prøven hadde flere tilfeller av D i -1 subsetet selv om kitinaser i familie 18 har en absolutt preferanse for A. Her bør det derfor gjøres nye forsøk for å undersøke avviket.

Videre er det flere nøkkelresiduer i både +3 og fra -2 til -4 som bør muteres. Dette bør gjøres for å bekrefte observert trend at det er en rekke ikke-aromatiske residuer som er essensielle for binding og posisjonering av substratet, slik at en sukkerenhet med en *N*-acetylgruppe kommer riktig posisjonert i -1 subsetet og substratassistert hydrolyse kan gjennomføres.



## 7. Referanser

- [1] Dewick, P. M. (2009). *Medicinal natural products; A biosynthetic approach* b. 3: John Wiley & Sons Ltd.
- [2] Campbell, N. A. (1996). *Biology*, b. 4: The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc.
- [3] Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Danrell, J. E. (2000). *Molecular Cell biology* 4utg.: W.H Freeman and Company
- [4] Knorr, D. (1984). Use of chitinous polymers in food- A challenge for food research and develoment. *Food Technology*, 38 (1): 85-.
- [5] Muzzarelli, R. A. A. (1983). Chitin and Its derivatives:New trends of Applied Research. *Carbohydrate Polymers*: 53-75.
- [6] Gardner, K. H. & Blackwell, J. (1975). Refinement of structure of beta-chitin. *Biopolymers*, 14 (8): 1581-1595.
- [7] Norberg, A. L., Dybvik, A. I., Zakariassen, H., Mormann, M., Peter-Katalinic, J., Eijnsink, V. G. H. & Sørli, M. (2011). Substrate positioning in chitinase A, a processive chito-biohydrolase from *Serratia marcescens*. *FEBS Letters*, 585 (14): 2339-2344.
- [8] Carlstrom, D. (1957). The crystal structure of alpha-chitin (poly-N-acetyl-D-glucosamine). *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 3 (5): 669-683.
- [9] Hackman, R. H. & Goldberg, M. (1965). Studies on chitin. 6. Nature of alpha- and beta-chitins. *Australian Journal of Biological Sciences*, 18 (4): 935-&.
- [10] Minke, R. & Blackwell, J. (1978). Structure of alpha-chitin. *Journal of Molecular Biology*, 120 (2): 167-181.
- [11] Rudall, K. M. (1963). *The Chitin/Protein Complexes of Insect Cuticles*. Advances In Insect Physiology, b. 1. London: Academic Press Inc.
- [12] Blackwel.J. (1969). Structure og beta-chitin or parallel chain systems of poly-beta-(1-4)-N-acetyl-D-glucosamine. *Biopolymers*, 7 (3): 281-&.
- [13] Merzendorfer, H. & Zimoch, L. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology*, 206 (24): 4393-4412.
- [14] Muzzarelli, R. A. A. (1977). *Chitin*. Oxford: Pergamon Press.
- [15] Nagai, T., Sawayanagi, Y. & Nambu, N. (1984). *Application of chitin and chitosan to pharmaceutical preparation*. Chitin, chitosan and related enzyme. New York: Academic Press.

- [16] Eijsink, V. G. H., Vaaje-Kolstad, G., Vårum, K. M. & Horn, S. J. (2008). Towards new enzymes for biofuels: lessons from chitinase research. *Trends in Biotechnology*, 26 (5): 228-235.
- [17] Tanigawa, T., Tanaka, Y., Sashiwa, H., Saimoto, H. & Shigemasa, Y. (1992). Various biological effects of chitin derivatives. I: Brine, C. H., Sandford, P. A. & Zikakis, J. P. (red.) *Advances in chitin and chitosan*, s. 206-215. London and New York: Elsevier applied science.
- [18] Kurita, K. (2006). Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology*, 8 (3): 203-226.
- [19] Nishimura, K., Nishimura, S., Nishi, H., Saiki, I., Tokura, S. & Azuma, I. (1984). Immunological activity of chitin and its derivatives. *Vaccine* (2): 93-99.
- [20] Suzuki, K., Mikai, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S. & Suzuki, M. (1986). Antitumor effect of hexa-N-acetyl chitohexanose and chitohexanose. *Carbohydr. Res* (151): 403-408.
- [21] Sandford, P. A., Vårum, K. M., Domard, A. & Smidsrød, O. (2002). Commercial sources of chitin & chitosan and their utilization. I: b. VI *Advances in Chitin Science*. Trondheim, Norway.
- [22] Ghaouth, A. E., Arul, J. & Asselin, A. (1992). Potential use of chitosan in osthharvest presentation of fruits and vegetables. I: Brine, C. H., Sandford, P. A. & Zikakis, J. (red.) *Advances in chitin and chitosan*, s. 440-452. London and New York: Elsevier applied science.
- [23] Vårum, K. M., Ottøy, M. H. & Smidsrød, O. (2001). Acid hydrolysis of chitosans. *Carbohydrate Polymers*, 46 (1): 89-98.
- [24] Moggridge, R. C. G. & Neuberger, A. (1938). Methylglucosaminide: Its Structure, and the Kinetics of its Hydrolysis by Acids. I: *J. Chem. Soc*, s. 745-750.
- [25] Piszkiw.D & Bruice, T. C. (1968). Glycoside hydrolysis .3. Intramolecular acetamido group participation in specific acid catalyzed hydrolysis of methyl 2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranoside. *Journal of the American Chemical Society*, 90 (21): 5844-&.
- [26] Heggset, E. B. (2012). *Enzymatic Degradation of Chitosans- A study of the mode of action of selected chitinases and chitosanases*. Trondheim: Norwegian University of Science and Technology, Faculty of Natural Sciences and Technology, Department of Biotechnology. 94 s.
- [27] Robyt, J. F. & French, D. (1967). Multiple attack hypothesis of alpha-amylase action- Action of porcine pancreatic human salivary and *Aspergillus oryzae* alpha-amylases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 122 (1): 8-&.
- [28] Robyt, J. F. & French, D. (1970). Multiple attack and polarity of action of porcine pancreatic alpha-amylase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 138 (2): 662-&.

- [29] Sørbotten, A., Horn, S. J., Eijsink, V. G. H. & Vårum, K. M. (2005). Degradation of chitosans with chitinase B from *Serratia marcescens* - Production of chito-oligosaccharides and insight into enzyme processivity. *FEBS Journal*, 272 (2): 538-549.
- [30] Horn, S. J., Sørbotten, A., Synstad, B., Sikorski, P., Sørli, M., Vårum, K. M. & Eijsink, V. G. H. (2006). Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. *The FEBS Journal*, 273 (3): 491-503.
- [31] Horn, S. J., Sikorski, P., Cederkvist, J. B., Vaaje-Kolstad, G., Sørli, M., Synstad, B., Vriend, G., Vårum, K. M. & Eijsink, V. G. H. (2006). Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (48): 18089-18094.
- [32] Davies, G. & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3 (9): 853-859.
- [33] Henrissat, B. & Davies, G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*, 7 (5): 637-644.
- [34] Davies, G. J., Wilson, K. S. & Henrissat, B. (1997). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal*, 321: 557-559.
- [35] Koshland, D. E. & Stein, S. S. (1954). Correlation of bond breaking with enzyme specificity- cleavage point of invertase. *Journal of Biological Chemistry*, 208 (1): 139-148.
- [36] Sinnott, M. L. (1990). Catalytic mechanisms of enzymatic glycosyl transfer. *Chemical Reviews*, 90 (7): 1171-1202.
- [37] McCarter, J. D. & Withers, S. G. (1994). Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology*, 4 (6): 885-892.
- [38] Fukamizo, T., Honda, Y., Goto, S., Boucher, I. & Brzezinski, R. (1995). Reaction-mechanism of chitosanase from *Streptomyces* sp N174. *Biochemical Journal*, 311: 377-383.
- [39] Iseli, B., Armand, S., Boller, T., Neuhaus, J. M. & Henrissat, B. (1996). Plant chitinases use two different hydrolytic mechanisms. *FEBS Letters*, 382 (1-2): 186-188.
- [40] Brameld, K. A. & Goddard, W. A. (1998). The role of enzyme distortion in the single displacement mechanism of family 19 chitinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (8): 4276-4281.
- [41] Adachi, W., Sakihama, Y., Shimizu, S., Sunami, T., Fukazawa, T., Suzuki, M., Yatsunami, R., Nakamura, S. & Takenaka, A. (2004). Crystal structure of family GH-8 chitosanase with subclass II specificity from *Bacillus* sp K17. *Journal of Molecular Biology*, 343 (3): 785-795.

- [42] Cheng, C. Y., Chang, C. H., Wu, Y. J. & Li, Y. K. (2006). Exploration of glycosyl hydrolase family 75, a chitosanase from *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Biological Chemistry*, 281 (6): 3137-3144.
- [43] Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. & Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, 37: D233-D238.
- [44] Vocadlo, D. J., Davies, G. J., Laine, R. & Withers, S. G. (2001). Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature*, 412 (6849): 835-838.
- [45] Rye, C. S. & Withers, S. G. (2000). Glycosidase mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4 (5): 573-580.
- [46] Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A. B., Chet, I., Wilson, K. S. & Vorgias, C. E. (1994). Crystal-structure of a bacterial chitinase at 2,3-Angstrom resolution. *Structure*, 2 (12): 1169-1180.
- [47] van Aalten, D. M. F., Synstad, B., Brurberg, M. B., Hough, E., Riise, B. W., Eijsink, V. G. H. & Wierenga, R. K. (2000). Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1,9-angstrom resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (11): 5842-5847.
- [48] Fuchs, R. L., McPherson, S. A. & Drahos, D. J. (1986). Cloning of a *Serratia marcescens* gene encoding chitinase. *Applied and Environmental Microbiology*, 51 (3): 504-509.
- [49] Tews, I., Vincentelli, R. & Vorgias, C. E. (1996). N-acetylglucosaminidase (chitobiase) from *Serratia marcescens*: Gene sequence, and protein production and purification in *Escherichia coli*. *Gene*, 170 (1): 63-67.
- [50] Suzuki, K., Suzuki, M., Taiyoji, M., Nikaidou, N. & Watanabe, T. (1998). Chitin binding protein (CBP21) in the culture supernatant of *Serratia marcescens* 2170. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 62 (1): 128-135.
- [51] Suzuki, K., Sugawara, N., Suzuki, M., Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N. & Watanabe, T. (2002). Chitinases A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: Enzymatic properties and synergism on chitin degradation. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 66 (5): 1075-1083.
- [52] Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., van Aalten, D. M. F., Synstad, B. & Eijsink, V. G. H. (2005). The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (31): 28492-28497.
- [53] Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Horn, S. J., Liu, Z. L., Zhai, H., Sørli, M. & Eijsink, V. G. H. (2010). An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides. *Science*, 330 (6001): 219-222.

- [54] Vanscheltinga, A. C. T., Kalk, K. H., Beintema, J. J. & Dijkstra, B. W. (1994). Crystal-structures of hevamine, a plant defense protein with chitinase and lysozyme activity, and its complex with an inhibitor. *Structure*, 2 (12): 1181-1189.
- [55] Fusetti, F., von Moeller, H., Houston, D., Rozeboom, H. J., Dijkstra, B. W., Boot, R. G., Aerts, J. & van Aalten, D. M. F. (2002). Structure of human chitotriosidase - Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (28): 25537-25544.
- [56] Tews, I., vanScheltinga, A. C. T., Perrakis, A., Wilson, K. S. & Dijkstra, B. W. (1997). Substrate-assisted catalysis unifies two families of chitinolytic enzymes. *Journal of the American Chemical Society*, 119 (34): 7954-7959.
- [57] Papanikolau, Y., Prag, G., Tavlas, G., Vorgias, C. E., Oppenheim, A. B. & Petratos, K. (2001). High resolution structural analyses of mutant chitinase A complexes with substrates provide new insight into the mechanism of catalysis. *Biochemistry*, 40 (38): 11338-11343.
- [58] Vanscheltinga, A. C. T., Armand, S., Kalk, K. H., Isogai, A., Henrissat, B. & Dijkstra, B. W. (1995). Stereochemistry of chitin hydrolysis by a plant chitinase lysozyme and x-ray structure of a complex with allosamidin- evidence for substrate assisted catalysis. *Biochemistry*, 34 (48): 15619-15623.
- [59] Brameld, K. A. & Goddard, W. A. (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*, 120 (15): 3571-3580.
- [60] van Aalten, D. M. F., Komander, D., Synstad, B., Gåseidnes, S., Peter, M. G. & Eijsink, V. G. H. (2001). Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (16): 8979-8984.
- [61] Cederkvist, F. H., Parmer, M. P., Vårum, K. M., Eijsink, V. G. H. & Sørlie, M. (2008). Inhibition of a family 18 chitinase by chitooligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 74 (1): 41-49.
- [62] Divne, C., Stahlberg, J., Teeri, T. T. & Jones, T. A. (1998). High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50 angstrom long tunnel of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Journal of Molecular Biology*, 275 (2): 309-325.
- [63] Varrot, A., Frandsen, T. P., von Ossowski, I., Boyer, V., Cottaz, S., Driguez, H., Schulein, M. & Davies, G. J. (2003). Structural basis for ligand binding and processivity in cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens*. *Structure*, 11 (7): 855-864.
- [64] Zakariassen, H., Aam, B. B., Horn, S. J., Vårum, K. M., Sørlie, M. & Eijsink, V. G. H. (2009). Aromatic Residues in the Catalytic Center of Chitinase A from *Serratia marcescens* Affect Processivity, Enzyme Activity, and Biomass Converting Efficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (16): 10610-10617.

- [65] Glick, B. R. & Pasternak, J. J. (1998). *Molecular Biotechnology Principles and applications of recombinant DNA*. 2. utg. Washington, D.C.: ASM PRESS
- [66] Biolabs, N. E. *DNA-ladder*. Tilgjengelig fra:  
<http://www.neb.com/nebecomm/products/productn3232.asp>.
- [67] Ahuja, S. (2003). *Chromatography and separation science*.
- [68] Invitrogen. *Protein ladder*. Tilgjengelig fra:  
<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/10747012.pdf>.
- [69] Synstad, B., Gåseidnes, S., van Aalten, D. M. F., Vriend, G., Nielsen, J. E. & 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): 253-262.
- [70] Bahrke, S., Einarsson, J. M., Gislason, J., Haebel, S., Letzel, M. C., Peter-Katalinic, J. & Peter, M. G. (2002). Sequence analysis of chitooligosaccharides by matrix-assisted laser desorption ionization postsorce decay mass spectrometry. *Biomacromolecules*, 3 (4): 696-704.
- [71] Williams, D. H. & Fleming, I. (1995). Mass spectra. I: *Spectroscopic methods in organic chemistry*, s. 175-176. Berkshire, England: McGraw-Hill publishing company.
- [72] K., D. (2004). *Mass Spectrometry; A Foundation Course*: RSC Publishing.
- [73] Hekmat, O., Lo Leggio, L., Rosengren, A., Kamarauskaite, J., Kolenova, K. & Stalbrand, H. (2010). Rational Engineering of Mannosyl Binding in the Distal Glycone Subsites of Cellulomonas fimi Endo-beta-1,4-mannanase: Mannosyl Binding Promoted at Subsite-2 and Demoted at Subsite-3. *Biochemistry*, 49 (23): 4884-4896.
- [74] Williams, D. H. & Fleming, I. (2008). Nuclear magnetic resonance spectra. I: *Spectroscopic methods in organic chemistry*, s. 62-179. Berkshire, England: McGraw-Hill Higher Education.
- [75] Synstad, B., Vaaje-Kolstad, G., Cederkvist, H., Saua, S. F., Horn, S. J., Eijsink, V. G. H. & Sorlie, M. (2008). Expression and characterization of endochitinase C from Serratia marcescens BJL200 and its purification by a one-step general chitinase purification method. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 72 (3): 715-723.
- [76] Horn, S. J., Sørbotten, A., Synstad, B., Sikorski, P., Sørlie, M., Vårum, K. M. & Eijsink, V. G. H. (2006). Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by Serratia marcescens. *The FEBS journal* (273): 491-503.

## **8. Vedleggsliste**

8.1 Vedlegg 1: Tabell 8.1 fullstendig oversikt over sekvensbestemmelse for hydrolyseprodukt fra kitosan med  $F_A$  0,40 og  $F_A$  0,62 hydrolysert med ChiA mutanten R172A.

8.2 Vedlegg 2: Tabell 8.2 fullstendig oversikt over sekvensbestemmelse for hydrolyseprodukt fra kitosan med  $F_A$  0,40 og  $F_A$  0,62 hydrolysert med ChiA mutanten R172Q.

## Vedlegg 1

Tabell 8.1: Sekvensbestemmelse for hydrolyseprodukt fra kitosan med  $F_A$  0,40 og  $F_A$  0,62 hydrolysert med ChiA mutanten R172A.

	$F_A$ 0,40			$F_A$ 0,62			
	<i>m/z</i>	KOS	Sekvens	<i>m/z</i>	KOS	Sekvens	
Dimer	640,02	A2	AA	597,77	AD	DA	
	559,09	AD	DA			AD	
				640,02	AA	AA	
Trimer	719,04	D3	DDD	800,90	A2D	DAA	
	800,89	A2D	ADA			ADA	
			DAA			AAD	
Tetramer	923,39	D2A2	DDAA	1004,26	D1A3	DAAA	
			DADA			ADAA	
			ADDA			AADA	
	1106,01	D1A3	DAAA			AAAD	
			ADAA				
			AADA				
Pentamer	1084,05	D3A2	DDDAA	1123,58	D3A2	DDDAA	
			ADDDA			DADAD	
			DADDA			ADDDA	
			DDADA			DADDA	
			DDAAA			DDADA	
	1166,15	D2A3	ADDAA			AADDD	
			DADAA			DAADD	
			AADDA			DDAAD	
			DAADA			ADADD	
			ADADA			ADDAD	
							DDAAA
							ADDAA
			1165,80	D2A3	DDAAA		
					ADDAA		



						DADAA AADDA ADADA AAADD DAAAD ADAAD AADAD
Heksamer	1285,44	D4A2	DDDDAA DADDDA DDADDA DDDADA ADDDDA	1285,28	D4A2	DDDDAA ADDDDA DADDDA DDADDA DDDADA
	1328,04	D3A3	DADADA DDDAAA DADDAA DAADDA DDADAA ADDCAA AADDAA DDAADA			AADDDD DAADDD DDAADD DDDAAD ADDDAD DADDAD DDADAD
				1328,83	D2A4	DDAAAA AADDAA ADDAAA AAADDA DAAADA ADAADA AADADA AAAADD DAAAAD ADAAAD AADAAD AAADAD

## Vedlegg 2

Tabell 8.2: Sekvensbestemmelse for hydrolyseprodukt fra kitosan med  $F_A$  0,40 og  $F_A$  0,62 hydrolysert med ChiA mutanten R172Q.

	$F_A$ 0,40			$F_A$ 0,62							
	<i>m/z</i>	KOS	Sekvens	<i>m/z</i>	KOS	Sekvens					
Dimer	640,07	AA	AA	597,86	AD	DA					
	597,86	AD	DA	640,02	AA	AA					
Trimer	800,96	A2D	ADA DAA	800,97	A2D	DAA ADA					
	760,99	D2A	DDA	844,47	A3	AAA					
Tetramer	965,56	D1A3	DAAA AADA ADAA	1004,32	D1A3	DAAA ADAA AADA					
			962,22	D2A2	DDAA DADA ADDA						
	1047,37	A4		1047,37	A4	AAAA					
Pentamer	1123,76	D3A2	DDDAA ADDDA DADDA DDADA	1123,82	D3A2	DDDAA ADDDA DADDA DDADA					
			1165,96			D2A3	DDAAA ADDAA DADAA AADDA DAADA ADADA	1165,90	D2A3	DDAAA ADDAA AADDA DAADA ADADA	
	Hexamer	1327,64	D3A3	DDDDAAA	1352,31	D2A4	DDDDAAA				

	DADDAA	ADDAAA
	DADADA	AADDAA
	DDADAA	DAAADA
	ADDCAA	ADAADA
	AADDDA	AADADA
	DAADDA	
	AADDDA	
	DDAADA	