

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



Forord

Denne masteroppgaven er utført ved Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap ved Universitetet for miljø – og biovitenskap. Studien har vært en del av et større prosjekt under Bioorganisk forskningsgruppe i samarbeid med Protein Engineering and Proteomics (PEP) gruppa.

Jeg vil rette en stor takk til min veileder Morten Sørlie for god hjelp under hele prosessen. Takk for god veiledning, kunnskap og oppmuntring. Jeg vil også takk mine medveiledere Kristine B. Eide, Anne Grethe Hamre og Anne Line Nordberg for uvurderlig hjelp på laben, oppmuntring og kloke ord underveis. I tillegg vil jeg takke mine kjære studievenninner Nicole Reppert og Silje B. Lorentzen for høy trivselsfaktor både på og utenfor laben. Til slutt vil jeg takke familie og venner for støtte og oppmuntring underveis.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag.....	VII
Abstract.....	IX
Forkortelser	XI
1. Introduksjon.....	1
1.1 Karbohydrater	1
1.2 Kitin	2
1.2.1 Struktur	2
1.2.2 Anvendelse.....	3
1.2.3 Kitooligosakkarider (KOS).....	4
1.3 Glykosylhydrolaser	4
1.3.1 Klassifisering	4
1.3.2 Struktur	5
1.3.2.1 Lomme/krater.....	5
1.3.2.2 Kløft/grop.....	6
1.3.2.3 Tunnel	6
1.3.3 Mekanisme.....	7
1.3.3.1 Inverterende mekanisme	7
1.3.3.2 Bevarende mekanisme	8
1.3.4 Prosessivitet	9
1.4 Kitinaser	9
1.4.1 Kitinaser fra <i>Serratia marcescens</i>	10
1.5 Eyringanalyse.....	15
1.5.1 Enzymkinetikk	15
1.5.2 Overgangstilstander og aktiveringsenergi.....	17
1.5.3 Teori eyringanalyse.....	18
1.5.4 Termodynamiske parametre.....	19
1.6 Mål med oppgaven.....	20
2. Materialer	21
2.1 Laboratorieutstyr.....	21

2.2 Kjemikaler.....	23
2.3 Programvare.....	25
2.4 Enzymer og substrater.....	25
3. Metode.....	27
3.1 Overekspresjon av ChiA, ChiB og CBP21	27
3.2 Tillaging av periplasmatisk ekstrakt	28
3.3 Overekspresjon av ChiC	29
3.4 Rensing av periplasmatisk ekstrakt på kitinkuler	30
3.5 Sodium Dodecyl Sulfate-Polyakrylamid Gel Elektroforese (SDS-PAGE)	31
3.6 Oppkonsentrering av rensset protein	33
3.7 Proteinkonsentrasjonsbestemmelse, fluorometrisk metode	34
3.8 Spesifikk enzymaktivitet.....	35
3.9 Nedbrytning av kitin	36
3.9.1 Substratmetningsanalyse for ChiA, ChiB og ChiC.....	36
3.9.2 Eyringanalyse for ChiA, ChiB og ChiC	38
3.9.3 Eyringanalyse med CBP21 som hjelpeenzym	39
3.10 Tillaging av standard (GlcNAc) ₂	41
3.11 Kvantifisering av dimere ved HPLC	41
3.12 Bearbeiding av data.....	43
3.12.1 Bearbeiding av data fra Chromeleon	43
3.12.2 Substratmetningsanalyse.....	43
3.12.3 Eyringanalyse.....	43
4 Resultater	45
4.1 Renseprosedyre for diverse kitinaser	45
4.2 SDS-Gel	46
4.3 Bestemmelse av proteinkonsentrasjon.....	47
4.4 Bestemmelse av spesifikk enzymaktivitet	47
4.5 Substratmetningsanalyse for ChiA, ChiB og ChiC.....	48
4.5.1 Metningsplott for 180 µm β-kitin pH 6,1.....	49
4.5.2 Metningsplott for 3 µm β-kitin, pH 6,1.....	50
4.5.3 Metningsplott 180 µm β-kitin pH 8,0	51
4.5.4 Metningsplott 3µm β-kitin pH 8,0	52
4.6 Eyringanalyse.....	53

4.6.1 Eyringplott 3 μm β -kitin pH 8,0	54
4.6.2 Eyringplott 3 μm β -kitin pH 6,1	55
4.6.3 Eyringplott 180 μm β -kitin pH 6,1	56
4.7 Aktiveringsparametre.....	58
4.7.1 Aktiveringsparametre for 180 μm β -kitin pH 6,1	59
4.7.2 Aktiveringsparametre for 3 μm β -kitin pH 6,1	60
4.7.3 Aktiveringsparametre 3 μm β -kitin pH 8,0.....	61
5. Diskusjon	63
5.1 Nedbrytningsforsøk.....	63
5.1.1 Substratmetningsanalyse 3 μm β -kitin.....	63
5.1.2 Substratmetningsanalyse 180 μm β -kitin.....	64
5.1.3 Nedbrytning av 180 μm β -kitin ved pH 6,1	64
5.2 Aktiveringsparametre.....	66
5.2.1 Forandring i Gibbs frie energi - ΔG^\ddagger	66
5.2.2 Aktiveringsparametre for ChiA og ChiB.....	66
5.2.2.1 Aktiveringsparametre 180 μm β -kitin pH 6,1	68
5.2.2.2 Aktiveringsparametre 3 μm β -kitin pH 6,1	68
5.2.3 Aktiveringsparametre for ChiC.....	68
5.2.4 Hastighetskonstanten k_{cat}	69
5.3 pH-avhengighet.....	70
5.4 Oppsummering.....	71
6. Videre arbeid.....	73
7. Referanser.....	75
8. Vedlegg.....	79
8.1 SDS-Gel.....	79

Sammendrag

Denne studien har tatt utgangspunkt i enzymatisk hydrolyse av det uløselige substratet kitin. Hovedmålet har vært å bestemme aktiveringsparametre for denne reaksjonen og bruke disse som et mål på endoaktivitet. Videre har det vært et delmål å undersøke hvordan ulikt substrat og pH påvirker reaksjonen. Kitin er en uløselig biopolymer som er bygget opp av β -(1,4)-bundet *N*-acetylgluksoaminenheter. Kitin inngår blant annet som strukturell komponent i celleveggen til sopp og fungerer som energikilde for enkelte bakterier og er en viktig forbindelse i naturen.

Kitinaser er enzymer som hydrolyserer bindingene mellom *N*-acetylglukosaminenheter i kitin og degraderer på denne måten substratet til mindre fragmenter. *Serratia marcescens* er en bakterie som produserer flere kitinolytiske enzymer og har på bakgrunn av dette blitt nøye studert. Bakterien produserer blant annet enzymene Kitinase A (ChiA) og Kitinase B (ChiB) som er prosessive eksoenzymer, Kitinase C (ChiC), et ikke-prosessivt endoenzym samt et kitinbindende protein kalt CBP21. CBP21 bryter glykosidbindinger i krystallinsk kitin og gjør substratet mer tilgjengelig ved å danne nye ender på substratet.

Det har blitt utført nedbrytningsforsøk på to typer β -kitin med ulik størrelse, henholdsvis 3 og 180 μm og ved ulik pH, henholdsvis 6,1 og 8,0. Kitinet har blitt brutt ned av ChiA, ChiB og ChiC hver for seg og i enkelte tilfeller også med CBP21 til stede for å studere effekten av dette hjelpeenzymet. Produktene fra nedbrytningen, som hovedsakelig er dimerer, ble kvantifisert ved hjelp av High pressure liquid chromatography (HPLC). Ved å utføre nedbrytningsforsøkene ved substratmetning og ved ulike temperaturer har det vært mulig å bestemme k_{cat} for reaksjonene og videre beregne $\ln(k_{cat}/T)$ og $1/T$. Disse verdiene ble så plottet mot hverandre i et Eyringplott. Lineær regresjonsanalyse ble utført og ved hjelp av stigningstallet og apparent k_{cat} har aktiveringsparameterne ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger og $-T\Delta S^\ddagger$ blitt bestemt.

Aktiveringsparametrene fra de ulike reaksjonene har ikke vist noen tydelige trender. Det er vanskelig å se at bruk av Eyringanalyse kan være et godt mål for endoaktivitet basert på resultater som er fremskaffet under dette arbeidet. På tross av dette har det nå muligens blitt lagt et grunnlag for videre analyse av aktiveringsparametre for disse reaksjonene og videre forskning på området kan kanskje være av interesse på et senere tidspunkt.

Abstract

This paper has been based on enzymatic hydrolysis of the insoluble substrate chitin. The overall goal was to determine the activation parameters for this reaction and use this as a measurement of the enzymes endo-activity. Furthermore the goal was also to examine how substrates and different pH levels affects the reaction. Chitin is an insoluble β -(1,4)-linked biopolymer of *N*-acetyl glucosamine. It is an important compound in nature that occurs in the cell wall of fungus and functions as an energy source for some bacteria.

Chitinases are enzymes that degrade chitin. *Serratia marcescens* is an effective chitin-degrading bacterium and is therefore the most studied chitinolytic bacteria. The bacteria produce enzymes including Chitinase A (ChiA) and Chitinase B (ChiB) that are exoacting processive enzymes, Chitinase C (ChiC), an endoactive non-processive enzyme, and a chitin binding protein, CBP21. CBP21 cleaves glycosidic bonds in crystalline chitin and thereby increases the substrate accessibility for normal glycosyl hydrolases.

β -chitin of 3 and 180 μm in size was degraded using ChiA, ChiB and ChiC at different pH levels, respectively pH 6,1 and 8,0. CBP21 was also added to some of the experiments to study the effect of this enzyme. Oligomer products, mostly dimers, were quantified using High Pressure Liquid Chromatography (HPLC). Substrate saturation was assumed and chitin was degraded at six different temperatures. The values of $\ln(k_{cat}/T)$ and $1/T$ were calculated and fitted to an Eyring plot. Linear regression was performed to determine the activation parameters ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger and $-T\Delta S^\ddagger$.

Activation parameters of the various reactions show no clear trends. It is difficult to determine endo-activity based on the results obtained by an Eyring analysis under this work. In spite of this, a good foundation has now been made for further analysis of the activation parameters for the reaction. Further research on this field may be of interest later.

Forkortelser

4-MU	4-metylumbelliferyl
4-MU- (GlcNAc) ₂	4-metylumbelliferyl-β-D- <i>N,N</i> -diacetylchitobiose
A, GlcNAc	<i>N</i> -acetyl-D-glucosamine
BSA	Bovint Serum Albumin
CBP	Kitinbindende protein
ChiA	Kitinase A
ChiB	Kitinase B
ChiC	Kitinase C
D	Aspartat
Da	Dalton
dH ₂ O	Sterilt vann (Milli-Q)
E	Glutamat
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
HPLC	High pressure liquid chromatography
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
k _{cat}	Hastighetskonstanten for enzymreaksjon
KOS	Kitooligosakkarider
K _M	Michaelis konstanten
LB	Luria-Bertani
M	Molar
MOPS	3-(<i>N</i> -morfolin) propansvovelsyre
M _w	Molekylvekt
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OD	Optical density
pK _a	Syrekonstant
PMSF	Phenyl-methyl sulfonylfluorid
Rpm	Rotasjoner per minutt
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfat Polyakrylamid Gel Elektroforese
V	Volt
V _{max}	Den maksimale hastigheten for en reaksjon
X	Hvilken som helst aminosyre

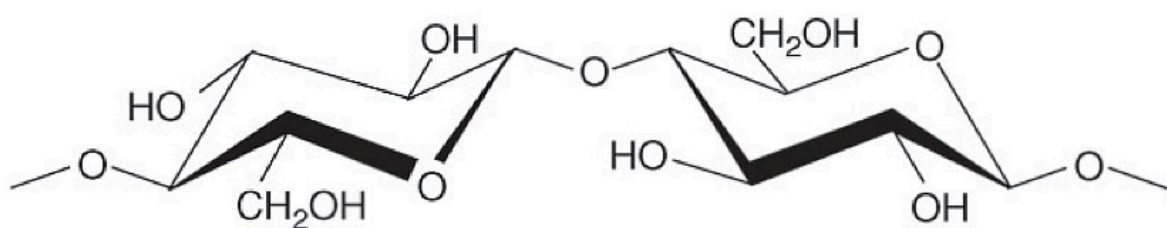
Å	Ångström (1Å = 0,1 nm)
α	Alfa
β	Beta
ΔG	Frienergiendringer
ΔH	Entalpiendring
ΔS	Entropiendring
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar

1. Introduksjon

1.1 Karbohydrater

Karbohydrater er kjemiske forbindelser som finnes hos alle planter og dyr og som er sentrale stoffer i viktige prosesser i naturen. Mange karbohydrater, som for eksempel glukose, sukrose og laktose, benyttes som energikilde. Cellulose er det vanligste polysakkaridet i naturen. Det har en stødig struktur og benyttes i stor grad som strukturell komponent i planter og trær. Karbohydrater inngår også i viktige biokjemiske prosesser sammen med andre forbindelser (Bernatek & Uggerud 2013), (Mathews et al. 2000).

Karbohydrater klassifiseres ofte som monosakkarider, oligosakkarider og polysakkarider på bakgrunn av størrelse og struktur. Monosakkarider er de minste karbohydratene og inkluderer enkle sukkerarter som for eksempel glukose. De har som regel ringstruktur hvor den vanligste er pyranose som består av fem karbonatomer og et oksygenatom. Monosakkarider kan bindes sammen av glykosidbindinger og danne større sakkarider, henholdsvis oligo- og polysakkarider. Oligosakkarider består som regel av et fåtall monosakkarider, hvor den minste formen er et disakkarid. Et viktig disakkarid er sukrose som utnyttes i stor grad både kommersielt og i naturen. Polysakkarider kan bestå av flere tusen monosakkarider og kan brytes ned til mindre enheter ved hydrolyse av glykosidbindingene (Hart et al. 2012).



Figur 1.1 Kjemisk struktur av cellulose (Eijsink, V. G.H. et al. 2008).

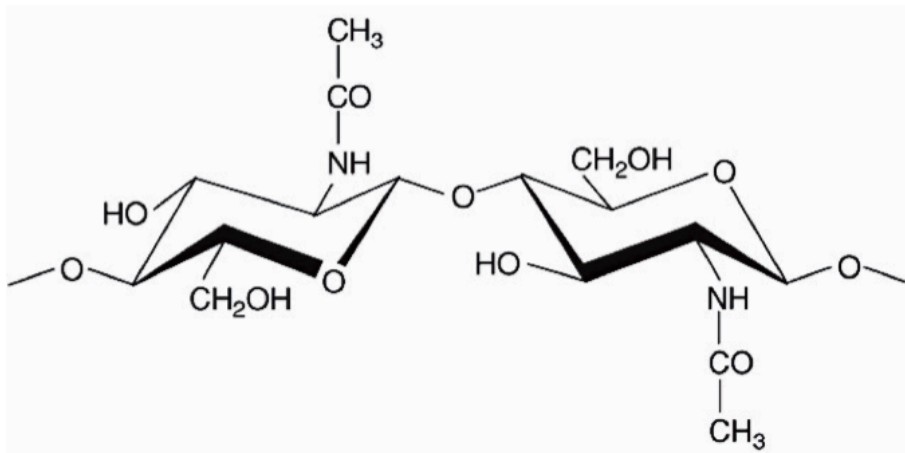
1.2 Kitin

Kitin er et polysakkarid som produseres av flere organismer. Molekylstrukturen ligner cellulose og etter cellulose er kitin den vanligste polymeren som finnes i naturen. Kitin er en viktig forbindelse og finnes blant annet som strukturell komponent i det ytre skjelettet til insekt og skalldyr og i celleveggen til enkelte sopparter. Det blir også utnyttet som energikilde av noen bakterier. Kitin har stor kommersiell betydning og den vanligste kilden til industriell fremstilling av kitin er krabbe – og rekeskall (Rinaudo 2006), (Kumar 2000).

1.2.1 Struktur

Kitin er en uløselig og lineær biopolymer som består av lange kitinkjeder som er bundet sammen av hydrogenbindinger. Hver kitinkjede er bygget opp av β -(1,4)-bundet *N*-acetylgluksoaminenheter (GlcNAc) som er rotert 180° i forhold til hverandre. Lengden på kitinfragmentene avhenger av hvilken organisme det stammer fra. Kitin som finnes i gjær består av rundt hundre *N*-acetylgluksoaminenheter, men i krabbe kan fragmentene bli flere tusen enheter lange (Synowiecki & Al-Khateeb 2003).

Kitin opptrer hovedsakelig i to ulike former etter hvordan kitintrådene orienterer seg i forhold til hverandre og disse kalles α – og β -kitin. α -kitin er den vanligste formen og i denne strukturen er kitintrådene orientert antiparallelt. Det vil si at annenhver kitintråd ligger motsatt retning i forhold til hverandre. Dette er den mest rigide formen for kitin ettersom trådene er tett pakket med sterke intra – og intermolekylære hydrogenbindinger. I β -kitin ligger kitintrådene orientert samme vei, det vil si de ligger parallelt i forhold til hverandre. β -kitin er lettere å bryte ned enn α -kitin ettersom bindingene mellom kitintrådene ikke er like sterke (Rinaudo 2006).



Figur 1.2 Kjemisk struktur av kitin. To *N*-acetylgluksoaminenheter rotert 180° i forhold til hverandre, bundet sammen av en glykosidbinding (Eijsink, V. G. H. et al. 2008)

1.2.2 Anvendelse

Kitin har nyttige egenskaper som gjør det anvendelig innen ulike fagfelt. Det er blant annet bionedbrytbart, har lav toksisitet og distribueres i stor grad i naturen hos flere organismer (Rinaudo 2006). Kitin har flere bruksområder innen medisin og helse. Fibrer laget av kitin kan eksempelvis få sår til å gro raskere og kan benyttes i bandasjer og andre sårdekkende materialer (Gupta et al. 2009). Ettersom kitin har antimikrobiell effekt kan det brukes til å hemme vekst av bakterier og sopp. Kitin, kitosan og andre kitinderivater kan også brukes til å rense forurenset vann noe store deler av verdens kitinproduksjon benyttes til. Innen jordbruk har kitin vist seg å gi raskere plantevekst og blir brukt for å hindre vekst av sopp på planter. I tillegg er kitin også mye brukt innen matvareindustrien (Dutta et al. 2004).

Kitosan er et vannløselig derivat av kitin. Det finnes naturlig blant annet i celleveggen til enkelte sopparter, men fremstilles også industrielt gjennom deacetylering av *N*-acetylglukosaminene i kitin. Byggesteinene i kitosan er *N*-acetylgluksoaminenheter og glukosaminenheter som er bundet sammen av β -(1,4)- bindinger. Løseligheten til kitosan øker med økende grad av deacetylering (Synowiecki & Al-Khateeb 2003). Kitosan er ofte mer anvendelig enn kitin på grunn av løseligheten. I tillegg har den reaktive amino – og hydroksylgrupper tilgjengelig. Kitosan kan benyttes som fuktgiver i kremer og andre kosmetiske produkter, samt innen medisin, jordbruk og industri (Dutta et al. 2004).

1.2.3 Kitoooligosakkarider (KOS)

Kitins uløselighet er en stor begrensning i forhold til anvendelse. På bakgrunn av dette er derivater av kitin ofte mer anvendelige. Kitoooligosakkarider er korte fragmenter av kitin eller kitosan. De kan dannes av enzymatisk hydrolyse eller ved kjemisk fremstilling og kan benyttes som inhibitorer for kitinaser. Inhibering av kitinaser har vist seg å være nyttig innen behandling av astma og betennelser og for sopp – og insektshemmende midler. På grunn av dette er det ønskelig med effektive inhibitorer som ikke er giftige, er lette å bryte ned og som har høy spesifisitet (Cederkvist et al. 2008). Kitoooligosakkarider har vist seg å være nyttige til dette formålet og er derfor interessante oligomerer å forske på (Aam et al. 2010).

1.3 Glykosylhydrolaser

I naturen finnes det et stort mangfold karbohydrater som utnyttes til viktige biologiske funksjoner av flere organismer. På grunn av dette har det utviklet seg et stort antall glykosylhydrolaser, også kalt glykosidaser. Dette er enzymer som hydrolyserer glykosidbindingen mellom sukkerenheter i karbohydrater og gjør det mulig for organismer å utnytte karbohydrater til blant annet energi og som strukturell komponent (Davies & Henrissat 1995).

1.3.1 Klassifisering

Det store antallet glykosylhydrolaser har gjort det nødvendig med en systematisk og oversiktlig inndeling av enzymene. Det finnes flere systemer for klassifisering av glykosylhydrolaser. Union of Biochemistry (IUB) deler eksempelvis enzymene inn på bakgrunn av substratspesifisitet og molekylær mekanisme. Denne klassifiseringen reflekterer derimot ikke de strukturelle egenskapene til enzymer. I tillegg er den ikke godt nok tilpasset enzymer som viser stor variasjon i substratspesifisitet, noe glykosylhydrolasene nettopp gjør (Henrissat 1991).

Det ble derfor utviklet en ny klassifisering basert på likhet i aminosyresekvens. Denne inndelingen ble først presentert av Henrissat i 1991 og er sammenfattet i databasen Carbohydrate Active Enzymes (CAZy). Sekvens og folding henger nøye sammen og ved

sekvensbasert inndeling vil proteiner i samme familie dermed ha store likheter i tertiærstruktur. På bakgrunn av dette kan man ved hjelp av aminosyresekvens estimere viktig informasjon om enzymeres struktur, mekanisme og funksjon. Sekvensbasert klassifisering kan også gi informasjon om den evolusjonære utviklingen av glykosylhydrolasene (Henrissat 1991), (Davies & Henrissat 1995).

1.3.2 Struktur

Mange glykosylhydrolaser har en struktur som består av et katalytisk domene samt flere ikke-katalytiske domener. De fleste ikke-katalytiske domenene har ukjent funksjon, men det er kjent at noen deltar i substratbinding. Katalytiske domener kan ha flere ulike typer foldinger og det er her det aktive setet er lokalisert (Davies & Henrissat 1995). Subsetene i det aktive setet nummereres fra $-n$ til $+n$ hvor $-n$ representerer ikke-reduserende ende og $+n$ reduserende ende. Hos glykosidaser forekommer kutting av glykosidbindingen mellom subsete -1 og $+1$ (Davies et al. 1997).

Det aktive setet til glykosylhydrolasene kan ha én av tre mulige strukturer. De tre strukturene er lomme, kløft og tunnelstruktur og illustreres i figur 1.3. Ofte vil topologien til det aktive setet gjenspeile hvordan enzymet bindes til substrat. Dersom enzymet degraderer substratkjeden fra den reduserende eller ikke-reduserende enden kalles dette eksoaktivitet. Eksoaktivitet krever en struktur som gjør det lett for enzymet å binde seg til enden av substratkjeden. Endoaktive enzymer katalyserer hydrolyse på tilfeldige steder langs polymerkjeden og har vanligvis en mer åpen struktur enn eksoaktive enzymer (Davies & Henrissat 1995).

1.3.2.1 Lomme/krater

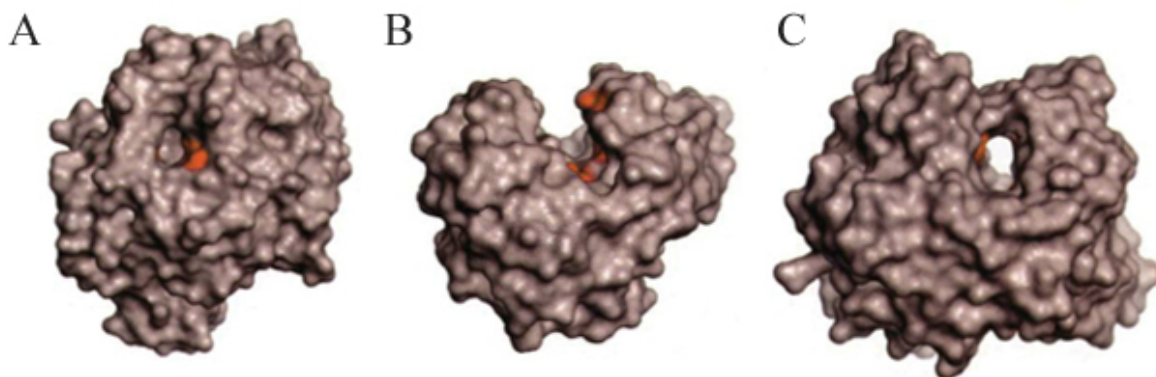
Lomme eller krater topologien er optimal for gjenkjennelse av sakkarider med mange reduserende og ikke-reduserende ender tilgjengelige på overflaten. Disse enzymene er derfor lite effektive på substrater med få frie ender som for eksempel cellulose (Davies & Henrissat 1995).

1.3.2.2 Kløft/grop

Denne topologien er en åpen struktur som tillater binding på tilfeldige steder på substratkjeden. Strukturen er ofte funnet hos endoaktive glykosylhydrolaser som lysozymer og kitinaser (Davies & Henrissat 1995).

1.3.2.3 Tunnel

Tunneltopologien er gunstig for binding på enden av substratkjeden ettersom det er en lukket struktur. Enzymer med tunnelstruktur i det aktive setet kan frigi produkt samtidig som det forblir bundet til substrat. Dette gir rette forhold for prosessiv hydrolyse (Davies & Henrissat 1995).



Figur 1.3 Fremstilling av topologien til det aktive setet hos glykosylhydrolaser med katalytiske residuer farget rødt. A viser lommestruktur B kløftstruktur og C tunnelstruktur (Davies & Henrissat 1995).

1.3.3 Mekanisme

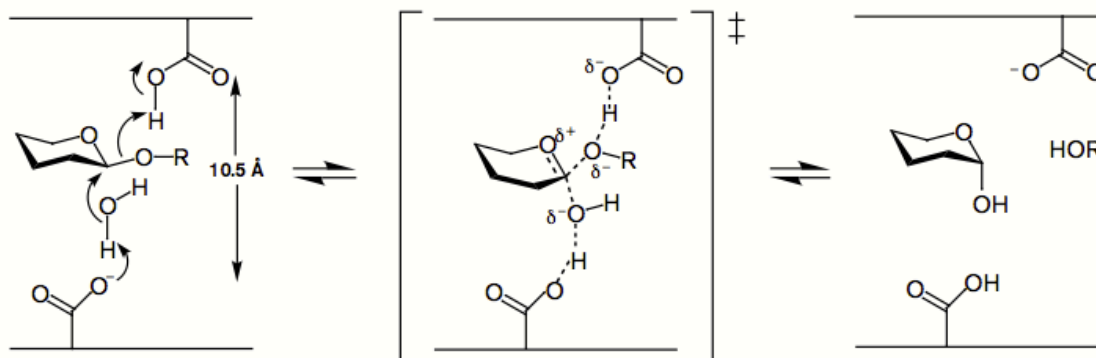
Hydrolyse av glykosidbinger forekommer via to ulike mekanismer, inverterende og bevarende. Begge er avhengige av to viktige karboksylsyreresiduer i det aktive setet, hvor en opptrer som en base og den andre som en syre. Forskjellen mellom de to mekanismene er blant annet avstanden mellom karboksylsyrerne (Rye & Withers 2000).

I den bevarende mekanismen sitter basen i det aktive setet nær det anomerske karbonet i sukkeret. Hos inverterende glykosylhydrolaser er derimot basen mer distansert fra karbonet. Inverterende enzymer er dermed avhengige av et vannmolekyl lokalisert mellom sukkeret og basen for at hydrolyse skal kunne skje (Davies & Henrissat 1995).

1.3.3.1 Inverterende mekanisme

Den inverterende mekanismen skjer ved en direkte forskyvningsmekanisme.

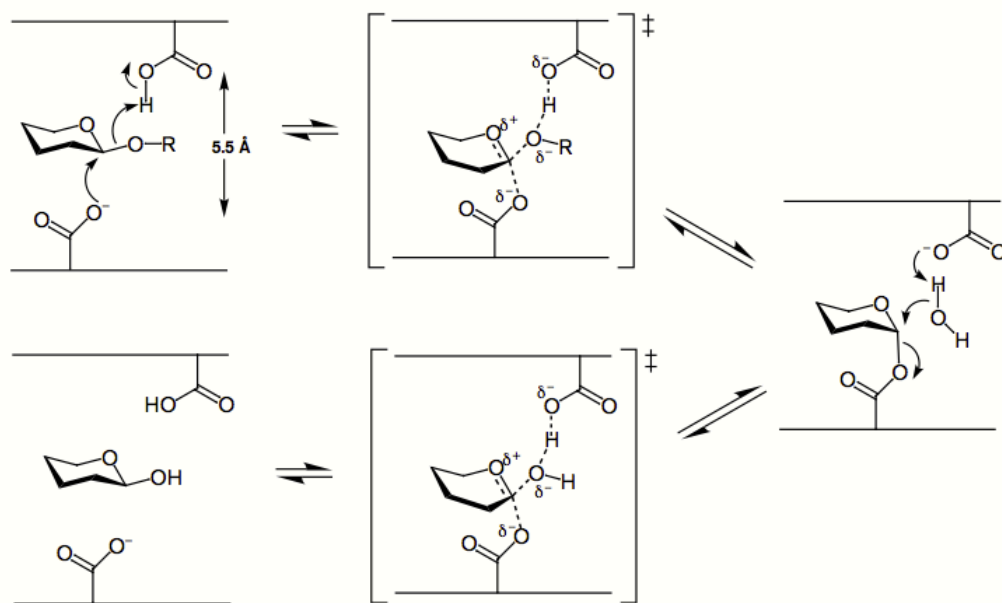
Karboksylsyreresiduen sitter omtrent 10 Å fra hverandre i enzymets aktive sete (Davies & Henrissat 1995). Avstanden mellom de to gjør at et vannmolekyl får plass mellom sukkeret og den ene karboksylsyreren. Vannmolekylet reagerer som en nukleofil. Den ene karboksylsyreren reagerer som en base ved å trekke til seg et proton fra vannmolekylet. Dette forsterker det nukleofilske angrepet. Den andre reagerer som en syre for å bryte glykosidbindingen. Resultatet av hydrolysen er en ny konfigurasjon på det anomere karbonet (Withers 2001), (Sinnott 1990). Figur 1.4 viser den inverterende mekanismen.



Figur 1.4 Mekanisme for inverterende glykosylhydrolaser. Det anomere karbonet endrer konfigurasjon etter hydrolysen har inntruffet (Rye & Withers 2000).

1.3.3.2 Bevarende mekanisme

Den bevarende hydrolysen skjer gjennom to trinn ved en dobbel forskyvningsmekanisme. Konfigurasjonen på det anomere karbonet bevares, det vil si den er lik før og etter hydrolysen. De katalytiske karboksylsyrene sitter omtrent 5,5 Å fra hverandre i det katalytiske setet (Davies & Henrissat 1995). I det første trinnet bryter den ene karboksylsyren glykosidbindingen gjennom en generell syrekatalyse og protonerer samtidig oksygenet i bindingen. Den andre karboksylsyren reagerer som en base og danner det første av to mellomstadier hvor enzym og substrat er kovalent bundet. I det andre trinnet vil den første karboksylsyren fungere som en base og deprotonere det innkommende vannmolekylet som angriper det anomere karbonet. Det andre mellomstadiet dannes, karboksylsyren som er kovalent bundet til substratet spaltes av og en OH-gruppe sitter igjen på det anomere karbonet (Withers 2001), (Rye & Withers 2000). Den bevarende mekanismen illustreres i figur 1.5.



Figur 1.5 Skjematisk fremstilling av bevarende mekanisme for glykosylhydrolaser. Det anomere karbonet opprettholder sin konfigurasjon etter hydrolyse (Rye & Withers 2000).

1.3.4 Prosessivitet

Enkelte enzymer har evnen til å forbli festet til substrat mellom påfølgende hydrolytiske kutt. Disse enzymene kalles prosessive (Davies & Henrissat 1995). Prosessivitet er en vanlig mekanisme for glykosylhydrolaser som bryter ned krystallinske polysakkarider som cellulose og kitin. Enzymer uten denne egenskapen må få tilgang til en enkelt substratkjede for hver hydrolyse. Prosessive enzymer unngår denne energetisk ugunstige prosessen. På bakgrunn av dette anses prosessivitet å gi en mer effektiv hydrolyse av substrat (Sørli et al. 2012).

En felles egenskap til prosessive glykosidaser er en overvekt av aromatiske sidegrupper lokalisert i det substratbindende setet. Aromatiske aminosyrer binder til begge sider av sukkerringen gjennom hydrofobe bindinger. I motsetning til hydrogenbindinger vil hydrofobe interaksjoner gjøre det lettere for enzymet å bevege seg langs sukkerkjeden ettersom det er uspesifikke bindinger som involverer store områder av overflaten. En slik egenskap er forenelig med prosessivitet (Eijsink, V. G. H. et al. 2008), (Sørli et al. 2012).

1.4 Kitinaser

Kitinaser er enzymer som hydrolyserer β -1,4-bindingene i kitin. De deles inn i familie 18 og 19 av glykosylhydrolasene på bakgrunn av struktur og mekanisme. Familie 18 glykosylhydrolaser finnes hovedsakelig i bakterier, sopp og insekter. Kitinaser fra familie 19 finnes som regel i ulike planter (Fukamizo 2000). Bakterier og sopp trenger kitinaser for å bryte ned og utnytte kitin. Enkelte planter benytter kitinaser som forsvar mot sopp og andre patogene organismer. Enzymene har stor kommersiell betydning ettersom de bryter ned kitin til nyttige komponenter og kan hemme vekst av patogene organismer som inneholder kitin (Brurberg et al. 2000).

Som tidligere nevnt, opptrer glykosylhydrolaser hovedsakelig gjennom to ulike mekanismer for hydrolyse av glykosidbindinger, inverterende og bevarende. Det tyder på at familie 18 kitinasene foretar en retensjon av konfigurasjonen via en substrat-assistert mekanisme hvor mellomstadiet som opptrer stabiliseres av et karboksylsyreresidu og N-acetylgruppen til sukkeret i motsetning til to karboksylsyreresiduer. Polymerkjeden kløyves mellom subsete -1 og +1 for glykosylhydrolaser. På bakgrunn av dette er substrat-assistert mekanisme avhengig

av at sukkerets N-acetylgruppe er lokalisert i det aktive setet i subsete -1 (Fukamizo 2000), (Tews et al. 1997), (van Aalten et al. 2001).

1.4.1 Kitinaser fra *Serratia marcescens*

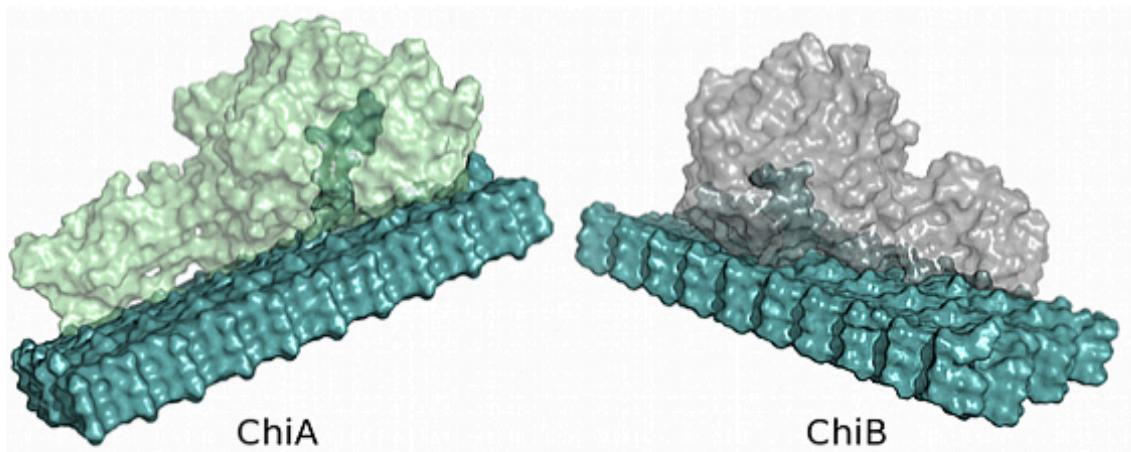
Serratia marcescens er en av de mest studerte kitinolytiske bakteriene. Det er en gram-negativ bakterie som tilhører *Enterobacteriaceae* familien. *S. marcescens* produserer tre kitinaser, ChiA, ChiB og ChiC, et kitinbindende protein, CBP21 og en kitobiase. ChiA, ChiB og ChiC tilhører familie 18 av glykosylhydrolasene. CBP21 er et overflateaktivt enzym som depolymeriserer kitinkjeder gjennom en oksidativ mekanisme. Enzymet tilhører familie CBM33 og klassifiseres ofte som en Lytisk polysakkarid monooksygenase (LPMO) på bakgrunn av mekanismen. Kitobiase omdanner hovedsakelig dimerer fra enzymatisk hydrolyse av kitin til monomerer (Vaaje-Kolstad et al. 2013).

Glykosylhydrolaser fra familie 18 inneholder et karakteristisk katalytisk domene som består av en $(\beta/\alpha)_8$ -struktur (Perrakis et al. 1994), (van Aalten et al. 2000). Denne strukturen kalles også TIM-tønne og er en vanlig struktur hos flere enzymer. Den består av åtte β -plater og åtte α -helikser som danner en sylindrerform som kan minne om en tønne (Lesk 2010). Den fjerde β -platen danner et sekvensmotiv, DXXDXDXE, som er høyst konservert og som finnes hos ChiA, ChiB og ChiC. Sekvensmotivet inneholder viktige residuer, blant annet et glutamatresidu (E) som fungerer som det katalytiske karboksylsyreresiduet i den substrat-assisterte mekanismen (Perrakis et al. 1994), (van Aalten et al. 2000), (Payne et al. 2012).

1.4.1.1 ChiA og ChiB

ChiA og ChiB har i tillegg til $(\beta/\alpha)_8$ strukturen et $\alpha+\beta$ domene lokalisert mellom den syvende β -platen og den syvende α -heliksen. Dette domenet danner en vegg som utgjør en dyp substratbindende kløft. Kløftstrukturen er typisk for eksoenzymer og både ChiA og ChiB viser eksoaktivitet mot kitin (Horn 2006). ChiB har blitt omtalt som et "ekte" eksoenzym ettersom strukturen er lukket i enden, noe som gir det en tunnelaktig struktur som er forenelig med eksoaktivitet. ChiA har en mer åpen struktur enn ChiB og har dermed en struktur som også kan gi mulighet for endoaktiv hydrolyse (Brurberg et al. 2000). Det har blitt påvist endoaktivitet for ChiA og ChiB mot det vannløselige kitinderivatet kitosan (Sikorski et al.

2006). Studier har vist at de to enzymene bryter ned kitin fra motsatte ender. Ved hjelp av mikroskopi og merking av endene til substratet ble det vist at ChiA degraderer kitin fra den reduserende enden og ChiB fra den ikke-reduserende enden (Hult et al. 2005). Figur 1.6 viser en modell av ChiA og ChiB.



Figur 1.6 Struktur til ChiA og ChiB. Figuren viser at enzymene degraderer substrat fra enden av kjeden (Payne et al. 2012).

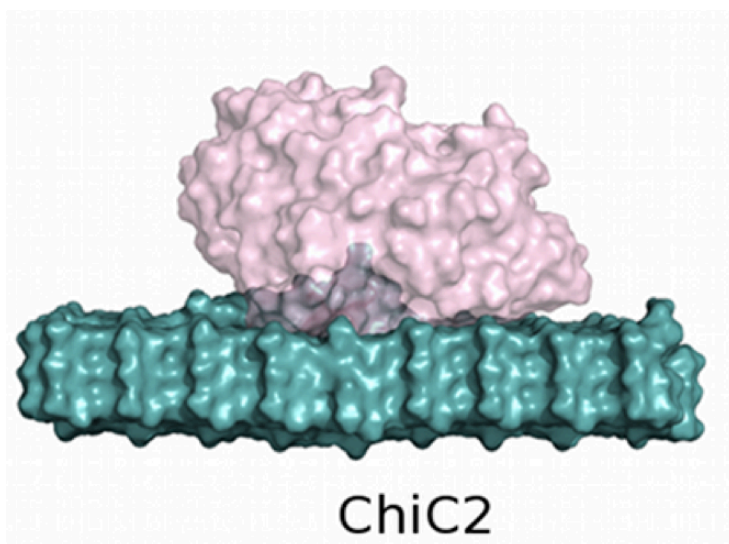
ChiA og ChiB er prosessive enzymer. Det vil si de forblir festet til substratet mellom hver hydrolyse og produktet av nedbrytningen er dimerer. De har begge en dyp substratbindende kløft som er typisk for prosessive enzymer. I tillegg er den substratbindende kløften og overflaten dekket med aromatiske residuer, hovedsakelig tryptofan. Som tidligere nevnt kan aromatiske residuer være gunstig for bindingen mellom enzym og substrat i forhold til prosessivitet (Sørli et al. 2012). Prosessiv hydrolyse av kitin resulterer i dimerer. Hver sukkerenhet i kitinkjeden er rotert 180° i forhold til hverandre. På bakgrunn av den substrat-assisterte mekanismen vil produktiv binding kun skje for hver andre sukkerenhet og produktet er dermed dimerer (Horn et al. 2006a).

ChiA og ChiB har et bredt pH-optimum som ligger mellom pH 4 -10. ChiB viser høyere aktivitet ved lav pH enn ved høy, mens ChiA opprettholder 80 % av maksimal aktivitet ved pH 4-11. Optimal temperatur for aktivitet er ved 60°C og ved høyere temperatur enn dette blir aktiviteten svekket (Suzuki et al. 2002).

1.4.1.2 ChiC

ChiC består av et katalytisk domene og to kitinbindende domener. *S. marcescens* kan produsere to ulike former for ChiC. Den ene kalles ChiC1 og er proteinet i sin helhet. Den andre formen kalles ChiC2 og består kun av det katalytiske domenet (Horn et al. 2006b). Figur 1.7 viser strukturen til ChiC2.

ChiC inneholder ikke $\alpha+\beta$ domenet i $(\beta/\alpha)_8$ -strukturen. $\alpha+\beta$ domenet utgjør en vegg i den substratbindende kløften hos ChiA og ChiB. Ettersom ChiC mangler dette domenet har det en mer åpen struktur enn ChiA og ChiB. En slik struktur gjør det mulig for enzymet å degradere substrat på tilfeldige steder langs substratkjeden og følgelig er ChiC et endoaktivt enzym. I tillegg til å være endoaktivt er ChiC et ikke-prosessivt enzym (Horn et al. 2006b), (Brurberg et al. 2000). Produktet fra degradering av β -kitin er hovedsakelig dimerer, men små mengder monomerer, trimerer og tetramerer kan også observeres (Horn et al. 2006b). Optimal temperatur for hydrolytisk aktivitet for ChiC ligger mellom 65 – 70 °C, altså litt høyere enn for ChiA og ChiB. I tillegg viser ChiC høyere aktivitet ved lavere temperatur enn de to andre kitinasene. ChiC viser høyere aktivitet ved lav pH enn ved høy, men har likevel et bredt pH-optimum fra pH 4-10 (Suzuki et al. 2002).



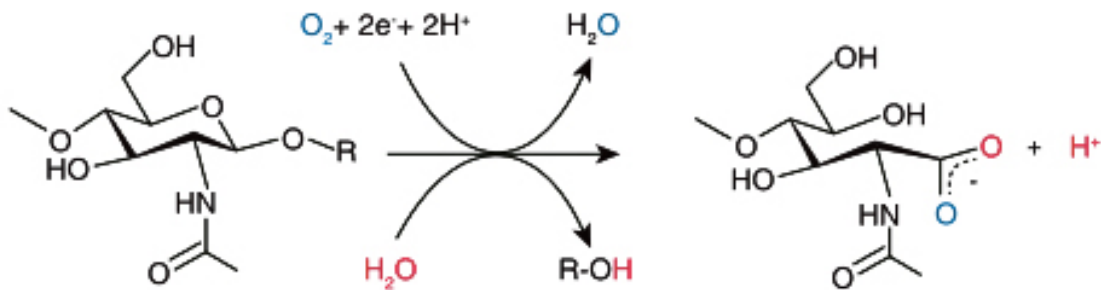
Figur 1.7 Strukturen til ChiC2 som består av et katalytisk domene. ChiC1 har det samme domenet, men også to kitinbindende domener i tillegg (Payne et al. 2012).

1.4.1.3 Lytisk polysakkarid monooksygenase

CBP21 er et enzym som produseres av *S. marcescens*. Det er et lite kitinbindende protein på størrelse med 21 kDa. CBP21 bryter glykosidbindinger i krystallinsk kitin og danner nye ender på substratet. Slik blir substratet mer tilgjengelig for videre hydrolyse. Funksjonen til CBP21 var lenge ukjent, men gjennom flere studier fra 2005 til 2010 ble funksjonen og mekanismen oppdaget (Vaaje-Kolstad et al. 2010).

CBP21 bryter glykosidbindinger gjennom to trinn, henholdsvis et oksiderende og hydrolyserende. Gjennom studier ved hjelp av henholdsvis $^{16}\text{O}_2$ versus $^{18}\text{O}_2$ og H_2^{16}O versus H_2^{18}O ble det vist at oksygenatomet som benyttes i det oksiderende trinnet kommer fra molekylært oksygen og at et oksygen i produktet ble inkorporert via hydrolyse. Mekanismen fører til en oksidert ende ved C1-karbonet, som vist i figur 1.8. Studiene til Vaaje-Kolstad *et.al* viste også at nærværet av en reduktant økte effektiviteten til CBP21 drastisk.

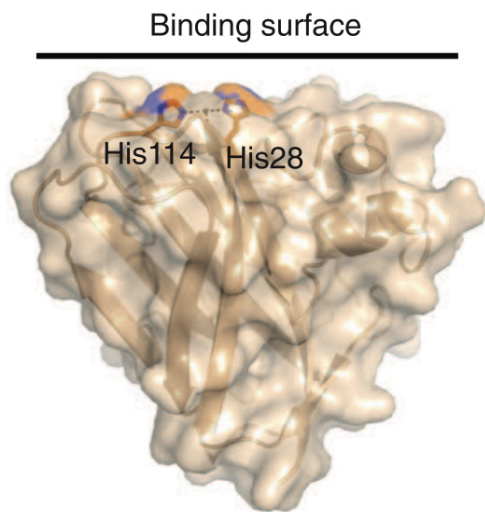
Askorbinsyre er en effektiv reduktant som er mye brukt i forbindelse med forsøk med CBP21 (Vaaje-Kolstad et al. 2010).



Figur 1.8 Den enzymatiske reaksjonen som katalyseres av CBP21. To oksygenatomer kreves i det oksiderende trinnet, hvor et stammer fra molekylært oksygen og et blir inkorporert via hydrolyse (Vaaje-Kolstad et al. 2010).

CBP21 består av en β -sandwich som er bygd opp av to β -plater. β -platene stabiliseres av to disulfidbroer og en hydrofob kjerne. Kjernen består hovedsakelig av aromatiske aminosyrer, vanligvis tryptofan. Mellom β -plate en og to befinner det seg tre α -helikser som utgjør mesteparten av overflaten av enzymet. Heliksene består av konserverte residuer som tar del i

substratbinding og det aktive setet. I det substratbindende området befinner det seg flere polare residuer som har vist seg å være en viktig del av substratbinding (Vaaje-Kolstad et al. 2005), (Vaaje-Kolstad et al. 2013). En viktig del av strukturen til CBP21 er en høyst konservert N-terminal histidingruppe (His28). Mellom His28 og et annet histidinresidu (His114) dannes det et sete for metallbinding hvor kobber kan bindes (Aachmann et al. 2012). Figur 1.9 viser strukturen til CBP21.



Figur 1.9 Strukturen til CBP21. De to histidinresiduene His114 og His28, som binder kobber, er markert nær bindingsoverflaten (Vaaje-Kolstad et al. 2010).

1.5 Eyringanalyse

1.5.1 Enzymkinetikk

Enzymer er biologiske katalysatorer som øker hastigheten til kjemiske reaksjoner. Enzymer er ofte nødvendige for å få viktige reaksjoner til å gå raskere. For å forstå mekanismen til kjemiske reaksjoner er det nødvendig å studere kinetikk. Man kan slik bestemme hastigheten til en reaksjon og studere hvordan en reaksjon avhenger av ulike parametere som konsentrasjon, pH og temperatur (Chang 2005).

Den enkleste kjemiske reaksjonen er omdannelsen av en reaktant A til et produkt B ($A \rightarrow B$). Reaksjonshastigheten (v) kan defineres som mengde produkt dannet over tid eller mengde reaktant brutt ned over tid. Man kan også beskrive hastigheten ved hjelp av hastighetskonstanten k_1 , som vist i likning 1 (Mathews et al. 2000).

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = \frac{d[B]}{dt} = k_1[A] \quad (1)$$

Den enkleste formen for enzymkatalyserte reaksjoner beskrives i reaksjon 2, med ett substrat (S), produkt (P) og enzym (E). I 1913 kom forskerne Leonor Michaelis og Maud Menten frem til en teori angående enzymkatalyserte reaksjoner med utgangspunkt i denne reaksjonen. k_1 , k_{-1} og k_2 er hastighetskonstanter for de ulike trinnene i katalysen og ES er et kompleks av bundet enzym og substrat som ofte kalles Michaelis-Menten komplekset (Mathews et al. 2000).



Michaelis & Menten antok at dannelse av ES-komplekset går betydelig raskere enn dannelsen av produkt fra komplekset. Det vil si at $k_1 \gg k_2$ og $k_{-1} \gg k_2$. Dette betyr at selve katalysen, dannelsen av produkt, er det hastighetsbestemmende trinnet. Det hastighetsbestemmende trinnet er en førsteordensreaksjon og hastigheten kan defineres som vist i likning 3.

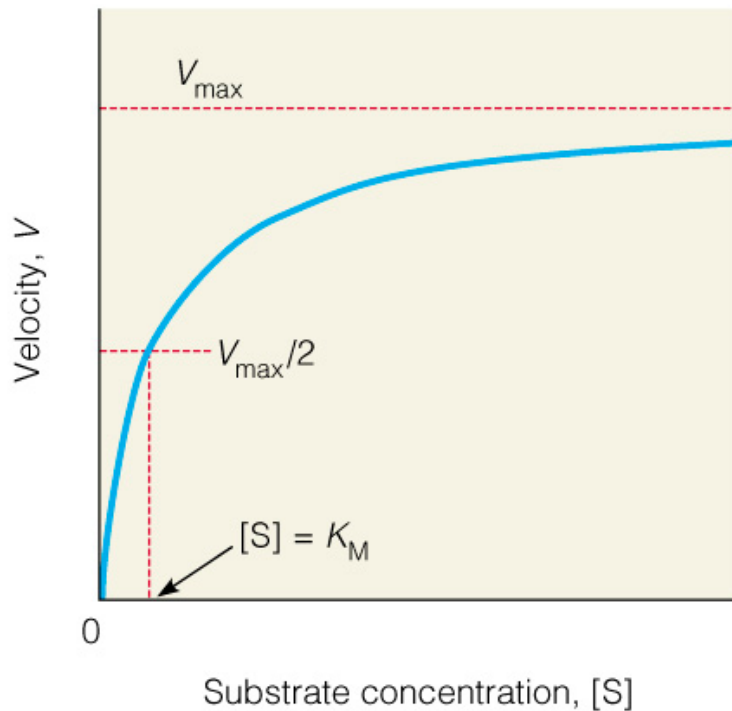
$$v = k_2[ES] \quad (3)$$

Ulempen med denne likningen er at man ikke kan måle konsentrasjonen til ES-komplekset. Dersom man vil finne k_2 for likningen må den omdannes slik at kjente verdier kan benyttes. Total enzymkonsentrasjon i reaksjonen er summen av fritt enzym og bundet enzym i ES-komplekset. $[E]_T = [E] + [ES]$. Ved veldig høye konsentrasjoner av substrat vil alt enzym være i komplekset ES, det vil si at alle enzymene er mettet med substrat. Det vil dermed ikke være noe fritt enzym og $[E]_T = [ES]$ (Mathews et al. 2000). Ved så høy substratkonsentrasjon vil reaksjonen nå maksimal hastighet, V_{max} . Likning 3 kan dermed skrives slik:

$$v_{max} = k_{cat}[E] \quad (k_{cat} = k_2) \quad (4)$$

k_{cat} er en konstant som benyttes for å angi antall substratmolekyler som blir omdannet til produkt per tidsenhet og som gjelder ved substratmetning. En annen konstant som er mye brukt ved karakterisering av enzymer er K_M . K_M kalles ofte Michaelis-Menten konstanten og er lik $(k_2 + k_{-1})/k_1$ og er definert som substratkonsentrasjonen ved halv V_{max} . Konstanten er et mål på enzymets affinitet til substrat (Mathews et al. 2000).

Michaelis-Menten kinetikk følger en spesifikk form, som vist i figur 1.10. Av grafen kan man se at hastigheten v øker med økende substratkonsentrasjon. I starten er hastigheten avhengig av konsentrasjonen av substrat. Ved høy substratkonsentrasjon vil hastigheten nå maksimal fart og forbli konstant, uavhengig av økende substratkonsentrasjon. Ved maksimal hastighet (V_{max}) vil enzymet være mettet med substrat og reaksjonen kan ikke gå fortere (Mathews et al. 2000).



Figur 1.10 Grafen viser et plott av Michaelis-Menten likningen. Den viser hvordan hastigheten avhenger av substratkonsentrasjonen til reaksjonen når maksimal hastighet, V_{max} (Mathews et al. 2000).

1.5.2 Overgangstilstander og aktiveringsenergi

Det er utviklet flere teorier for å forstå mer om hvordan kjemiske reaksjoner foregår og hva som avgjør verdien til k_{cat} . Blant disse teoriene finnes overgangsfaseteorien, kanskje bedre kjent som "Transition state theory". Denne teorien ble utviklet av kjemikeren Henry Eyring *et.al* i 1930. Teorien tar utgangspunkt i et aktivt kompleks som dannes ved bimolekylære reaksjoner. Komplekset og alle parametre som omhandler komplekset betegnes ‡ . Det aktiverte komplekset har meget høy energi og er et overgangskompleks mellom reaktanter og produkt (Chang 2005).

1.5.3 Teori eyringanalyse

Et eyringplott er en graf hvor $\ln(k_{cat}/T)$ plottes mot $(1/T)$. Eyrings likning er utledet fra transitionstate-teorien. På bakgrunn av eyrings likning og plottet kan man finne verdier for frienergiendringer (ΔG^\ddagger), entalpiendringer (ΔH^\ddagger) og entropiendringer (ΔS^\ddagger) ved transition state. Frienergiendringer for det aktiverte komplekset relateres til likevektskonstanten K^\ddagger som vist i likning 5 (Chang 2005).

$$\Delta G^\ddagger = -RT \ln K^\ddagger \quad (5)$$

En antakelse i transitionstate-teorien er at reaktantene og det aktiverte komplekset alltid er i likevekt. Gjennom denne antakelsen kan man definere likevektskonstanten K^\ddagger som, gjennom statistisk termodynamikk, kan relateres til hastighetskonstanten, k , som vist i likning 6 hvor h er Planks konstant, k_B er Boltzmans konstant og T er temperaturen i Kelvin (Chang 2005).

$$K^\ddagger = \left(\frac{kh}{k_B T} \right) \quad (6)$$

Dersom substrat er i overskudd i forhold til tilgjengelig enzym kan k_{cat} erstatte k i likning 6. Ved hjelp av k_{cat} kan man dermed beregne aktiveringsparameteren ΔG^\ddagger ved hjelp av likning 5 og 6 som vist i likning 7 (Chang 2005).

$$\Delta G^\ddagger = -RT \ln \left(\frac{k_{cat} h}{k_B T} \right) \quad (7)$$

Ettersom entalpiendringer kan relateres til temperatur vil stigningstallet til et plott av $\ln(k_{cat}/T)$ mot $(1/T)$ definere ΔH^\ddagger som vist i likning 8.

$$a = - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \quad (8)$$

Videre vil man på bakgrunn av at $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$ kunne definere ΔS^\ddagger for et aktiverte kompleks (Chang 2005). På denne måten kan man ved hjelp av eyringteori definere

ulike aktiveringsparametre som videre kan være til hjelp ved eksempelvis karakterisering av enzymer.

1.5.4 Termodynamiske parametre

ΔG er forandring i fri energi for en reaksjon under konstant trykk og temperatur. ΔG kalles også for Gibbs frie energi og er et produkt av entalpi (ΔH) – og entropiforandringer (ΔS). For en spontan eller energetisk gunstig prosess er ΔG negativ. Det betyr at den frie energien er lavere for produktet enn reaktantene og at produktet er mer stabilt. Positive verdier for ΔG viser til en ikke-spontan prosess som krever energi fra omgivelsene for at reaksjonen skal kunne skje (Mathews et al. 2000).

ΔH er forandring i entalpi og sier noe om en reaksjon avgir eller tar opp varme. Dersom ΔH er en positiv verdi betyr det at et system tar opp varme fra omgivelsene, det vil si den er endoterm. Dersom en verdi for ΔH for en spesifikk reaksjon er negativ er reaksjonen eksoterm (Mathews et al. 2000).

ΔS er forandring i entropien til et system og er et mål på graden av uorden eller tilfeldighet. ΔS inngår i termodynamikkens andre lov som sier at for et isolert system vil graden av entropi (uorden) alltid øke (Mathews et al. 2000). I forhold til proteiner kan man si at entropi er et mål på konformell frihet (Lesk 2010).

1.6 Mål med oppgaven

ChiA, ChiB og ChiC degraderer kitin og hører til samme familie glykosylhydrolaser. ChiA og ChiB er prosessive eksoenzymer og ChiC er et ikke-prosessivt endoaktivt enzym. På bakgrunn av disse forskjellene er det tenkelig at aktiveringsparametre for enzymatisk nedbrytning av kitin kan gi nyttig informasjon om enzymenes egenskaper. Ettersom aktiveringsparametre for disse kitinasene ikke har blitt sammenlignet tidligere er forskjeller og likheter i disse parameterne mellom kitinasene blitt studert i denne oppgaven. Hovedmålet med oppgaven er å se om man på bakgrunn av resultatene kan si noe om forskjeller mellom enzymene og om aktiveringsparametrene kan brukes som et mål på endoaktivitet.

For å studere egenskapene ved ulik ytre påvirkning ble det benyttet β -kitin med ulik størrelse henholdsvis 3 og 180 μm i størrelse. Forsøkene ble også utført ved ulik grad av pH. Et delmål i oppgaven var å se om denne typen ytre påvirkning har noe å si for nedbrytningen av kitin og eventuelt hvorfor.

2. Materialer

2.1 Laborieutstyr

Utstyr	Spesifikasjon	Leverandør
Amiconrør	Ultra-15, 10kDa	Millipore
Automatpipetter	Finnpipette	Thermo Scientific
Avtrekkskap	AV-100	Telstar
Blåkorkflasker	1000 mL 500 mL 250 mL 100 mL 50 mL	VWR
Ristebord	Swip	Edmund Bühler
Blåkorkrør	Cellstar® tubes 50 ml 15 mL	Greiner bio-one
Bordsentrifuge	Sigma 1-14	Labex
BioLogic LP	Kromatografisystem	BioRad
Elektroforeseutstyr	Gelkjøringskammer Spenningskilde Gelkniv	Invitrogen VWR
Filter	0,22 µm Steritop 0,45 µm Hydrophilic Low protein binding	Millipore Multiscreen®
Fluorometer	DyNA Quant 200 Qubit™ fluorometer Cell density meter	Hofer Invitrogen WPA
HPLC	Ultimate 3000 RSLC systems Autoinjektor Pumpe UV/VIS Detektor	Dionex

2. Materialer

	Rør og lokk	VWR
HPLC kolonne	Rezex RFQ-Fast Fruit H+ 7,8 x 100 mm	Phenomenex
HPLC forkolonne	Carbo-H 4 x 3,0 mm	Phenomenex
Inkubator	Multitron Standard	Infors
Magnetrører	Magnetic stirrer Standard unit	IKA
Mikroplater		Greiner bio-one
Mikrovekt	CP2P	Sartorius
pH-meter	MP 220	Mettler-Toledo
Qubit™ assayrør		Invitrogen
Risteinkubator		Infors
Sentrifuge	Sorvall RC6 SLA 3000 (rotor) Centrifuge 5430R 5430/5430R Rotor	OneMed Eppendorf
Sentrifugerør	500 mL	Nalgene
Sterilbenk	AV-100	Telstar
Thermomixer	Thermomixer comfort 1,5 mL	Eppendorf
Vakuumpumpe		Millipore
Vannbad	OLS 200 GFL	Grant GFL®
Vekt	Extend Sartorius	Sartorius Sartorius
Whirlmixer	Vortex Genie 2	Scientific industries

2.2 Kjemikaler

Utstyr	Leverandør
4-metylbelliferyl	Sigma-Aldrich
4-methylumbelliferyl- β -D- <i>N,N'</i> -diacetylchitobiose	Sigma-Aldrich
Ammoniumsulfat, (NH ₄)SO ₄	Life Science
Ampicillin	Sigma
Askorbinsyre, C ₆ H ₈ O ₆	KEBO Lab
Bacto™ Gjærekstrakt	Difco Laboratories
Bacto™ Tryptone	Difco Laboratories
Coomassie® Brilliant Blue R-250	BioRad
Destillert vann, dH ₂ O	
di- <i>N</i> -Acetyl Glucosamine	Megazym
Eddiksyre, CH ₃ COOH	Sigma-Aldrich
Etylendiamintetraeddiksyre (EDTA), C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	Sigma-Aldrich
Etanol, C ₂ H ₅ OH	VWR
Glysin, H ₂ NCH ₂ COOH	AppliChem
Hydrogenklorid, HCl	Sigma-Aldrich
Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), C ₉ H ₁₈ O ₅ S	Sigma
Kitinkuler	BioLabs inc
Kobberdiklorid, CuCl ₂	Sigma-Aldrich
Magnesiumklorid heksahydrat, MgCl ₂ x 6H ₂ O	Sigma-Aldrich
Metanol, CH ₃ OH	Sigma-Aldrich
3-(<i>N</i> -morfolin) propansvovelsyre (MOPS) SDS Running Buffer, 20x	Invitrogen

2. Materialer

Natriumacetat, $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$	Sigma-Aldrich
Natriumdihydrogenfosfat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich
Natriumhydrogenfosfat, $\text{NaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich
Natriumhydroksid, NaOH	VWR
Natriumkarbonat, NaCO_3	Sigma-Aldrich
Natriumklorid, NaCl	Sigma-Aldrich
NuPAGE [®] 10 % Bis-Tris Gel 1,0mm x 10 well	Invitrogen
NuPAGE [®] Sample reducing agent (10x)	Invitrogen
NuPAGE [®] Samplebuffer (4x)	Invitrogen
Phenyl-methyl sulfonylfluorid (PMSF), $\text{C}_7\text{H}_7\text{FO}_2\text{S}$	Sigma-Aldrich
Quant-It [™] Proteinstandard	Invitrogen
Quant-It [™] Protein Buffer	Invitrogen
Quant-It [™] Protein Reagent	Invitrogen
Sakkarose, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	VWR ProLabo [™]
Sitronsyre, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{H}_2\text{O}$	VWR ProLabo [™]
Trizma-Base, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$	Sigma

2.3 Programvare

Programvare	Leverandør
HPLC programvare	Chromeleon [®] 7 Chromatography Data System
Bearbeiding av data	Origin 7.0 Microsoft Excel
BioLogic LP DataView	BioRad

2.4 Enzymer og substrater

Enzym/substrat	Leverandør
Bench Mark [™] Protein Ladder	Invitrogen
Bovine Serum Albumin (BSA) purified 100 x 10 mg/mL	BioLabs
Enzym:	
- Kitinase A villtype (ChiA)	Selvlaget
- Kitinase B villtype (ChiB)	Selvlaget
- Kitinase C villtype (ChiC)	Selvlaget
- Kitin-bindende Protein villtype (CBP21)	Selvlaget
Substrat:	
- 180 µm β-kitin	France chitin
- 3 µm β-kitin	Seikagaku, Japan

3. Metode

3.1 Overekspressjon av ChiA, ChiB og CBP21

Bakteriestammer fra den gram-negative bakterien *Escheria coli* (*E. coli*) ble dyrket opp for å produsere ønsket enzym slik at dette kan isoleres. Cellene ble dyrket i Luria-Bertani (LB)-medium som inneholder trypton, gjærekstrakt og natriumklorid og som er et vanlig medium for oppdyrking av *E.coli*-celler. Mediet inneholder ulike næringsstoffer som er nødvendig for optimal bakterievekst (ExpTec 2003). Ampicillin ble tilsatt mediet for å beskytte mot vekst av uønskede bakterier.

Materialer:

- LB-medium
 - 10 g Trypton
 - 5 g Gjærekstrakt
 - 10 g Natriumklorid (NaCl)
 - dH₂O til 1L og autoklaveres før bruk
- Ampicillin 50 mg/mL stock
- Frysestock av ønsket kitinase

Metode:

500 mL LB-medium ble tilsatt 500 µL ampicillin i en 2 L dyrkningskolbe. Dette ble utført i sterilitet for å unngå kontaminering. LB/ampicillin-løsningen ble inokulert med ønsket frysestock. Cellene ble videre inkubert ved 37 °C og 200 rpm over natt. Cellene ble så høstet ved sentrifugering i SLA3000 rotoren ved 4 °C og 8000 rpm i 10 min før det ble laget periplasmatiske ekstrakt.

3.2 Tillaging av periplasmatisk ekstrakt

I celleveggen til gram-negative bakterier finnes det et område som kalles periplasma. Periplasma ligger mellom den ytre membranen og plasmamembranen. I dette området befinner det seg enzymer og transportproteiner (Tortora et al. 2007). For å få tilgang på ChiA, ChiB, ChiC og CBP21 påføres bakteriene osmotisk sjokk. Sukkerbalansen i løsningen rundt bakteriene forandres brått ved tilsetning av spheroplastbuffer. Dette fører til at vann trekkes ut av bakteriecellene. Videre vil tilsetning av iskaldt vann lysere bakteriene slik at cellulære komponenter frigis og det dannes et periplasmatisk ekstrakt. For å hindre at proteinene ble brutt ned, samt forlenge lagringstiden til proteinene, ble PMSF tilsatt ekstraktet. PMSF er en proteasehemmer som inhiberer vekst av proteolytiske enzymer (Sigma-Aldrich 2013b).

Materialer:

- 0,2 µm sterifilter
- 20 mM MgCl₂
- Iskaldt sterilt dH₂O
- Nedspunnede celler
- PMSF
- Sentrifuge m/rotor
- Spheroplastbuffer
 - 30 mL 1M Tris-HCl pH 8
 - 51,3 g sukrose
 - 300 µL 0,5 M EDTA pH 8
 - 600 µL PMSF
 - dH₂O til et sluttvolum på 300 mL
- Sentrifugerør

Metode:

Høstede celler ble resuspendert i 50 mL iskald spheroplastbuffer. Suspensjonen ble satt på is i 5 minutter før rørene ble sentrifugert i SLA3000 rotoren ved 4 °C og 8000 rpm i 10 minutter. Etter endt sentrifugering ble supernatanten helt av og pelleten inkubert ved romtemperatur i 10 minutter. Deretter ble pelleten resuspendert i 25 mL iskaldt vann og inkubert på is i 45 sekunder. 1,25 mL MgCl₂ ble så tilsatt hvert rør for å stabilisere proteinet. Suspensjonen ble videre sentrifugert ved 4 °C og 8000 rpm i 10 minutter. Etter siste sentrifugering ble supernatanten sterilfiltrert med 0,2 µm filter. 2 µL PMSF per mL periplasmatiske ekstrakt ble tilsatt. Det periplasmatiske ekstraktet ble oppbevart i kjøleskap ved 4 °C fram til rensing.

3.3 Overekspressjon av ChiC

Bakteriestammer fra den gram-negative bakterien *E.coli* ble dyrket opp for å produsere ChiC slik at dette kan isoleres. Genet som koder for ChiC er under kontroll av lac operon. IPTG er en syntetisk laktoseanalog som fremmer uttrykkelsen av lac-genene og som dermed bidrar til at ChiC-genene uttrykkes (Sigma-Aldrich 2013a).

Materialer:

- 1 M IPTG
- Ampicillin 50 mg/mL stock
- Frysestock av ChiC
- LB-medium

Metode:

Det ble laget en forkultur med ønsket frysestock, bestående av 5 mL LB-medium tilsatt 5 µL ampicillin som ble dyrket over natt. Kulturen ble så inokulert i en løsning bestående av 500 mL LB-medium tilsatt 500 µL ampicillin. Cellene ble videre dyrket ved 37 °C og 200 rpm til OD var omtrent 0,6. Kulturen ble deretter indusert med 1M IPTG til en konsentrasjon på 500 µM. Videre ble kulturen dyrket over natt ved 30 °C. Cellene ble så høstet ved sentrifugering i

10 minutter ved 4 °C og 8000 rpm. Periplasmatisk ekstrakt ble deretter laget som beskrevet i kapittel 3.2.

3.4 Rensing av periplasmatisk ekstrakt på kitinkuler

I periplasmatisk ekstrakt vil det, i tillegg til ønsket kitinase, være flere uønskede proteiner tilstede. Det er derfor nødvendig å utføre en rensemethode. Rensing på kitinkuler er en rask og enkel teknikk som er mye brukt. Kolonnematerialet består av kitinkuler i 20 % etanol. Aktive kitinaser har affinitet til kitin og vil følgelig feste seg til kolonnematerialet. Andre proteiner vil elueres igjennom kolonnen. Periplasmatisk ekstrakt av ChiA, ChiB, ChiC og CBP21 ble rensset på kitinkuler.

Materialer:

- 20 % Etanol
- Buffer A:
 - 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 for ChiA, ChiB og ChiC
 - 1M ammoniumsulfat, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 for CBP21
- Buffer B
 - 20 mM Eddiksyre
- Periplasmatisk ekstrakt
- 0,3 M Natriumhydroksid
- Kitinkuler

Metode:

Periplasmatisk ekstrakt ble justert til buffer A slik at det fikk en pH lik 8,0. Kolonnen ble pakket med 5 mL kitinkuler og koblet til systemet. Programvaren BioLogic LP DataView ble åpnet og et kromatogram ble brukt til å kontrollere rensingen. Flowen ble satt til 2,5

mL/minutt og buffer A ble satt på til baselinjen ble stabil. Periplasmatisk ekstrakt ble satt på og eluatet ble samlet i eget rør. Noe av det ønskede enzymet kan elueres ut dersom konsentrasjonen er så høy at ikke alt enzym får festet seg til kolonnematerialet. Buffer A ble satt på til stabil baselinje, og eluatet ble ikke lenger samlet. Buffer B ble så ført gjennom systemet. Proteinene ble eluert ut, samlet i eget rør og oppbevart i kjøleskap frem til oppkonsentrering og konsentrasjonsmåling. Kolonnematerialet ble til slutt regenerert ved hjelp av natriumhydroksid og systemet ble vasket med 20 % etanol.

3.5 Sodium Dodecyl Sulfate-Polyakrylamid Gel Elektroforese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE ble benyttet for å kontrollere proteinets renhet etter rens. SDS-PAGE er en rask og enkel teknikk som er mye brukt til blant annet å kontrollere proteinuttrykk og renhet. Metoden separerer proteiner med hensyn på molekylvekt.

Sodium dodecyl sulfate (SDS) er en detergent som binder seg til proteiner og gir dem en negativt ladd overflate. Ved varmebehandling og ved påvirkning av SDS vil proteinene denaturere slik at tertiærstrukturen ødelegges. Proteinene appliseres i en polyakrylamidgel som påsettes et elektrisk felt. Den negative ladningen til proteinene gjør at de vandrer gjennom gelen mot den positive polen. At proteinene separeres med hensyn på størrelse avhenger blant annet av egenskapene til gelen. Polyakrylamidgelen består av et nettverk av små porer. Etter hvert som proteinene trekkes mot den positive polen vil store molekyler hemmes mer enn små og proteinene vil dermed separeres (Lesk 2010). En standard av proteiner med kjent molekylvekt kan benyttes til å identifisere molekylvekten til proteinene som analyseres.

Coomassie Brilliant Blue er et fargestoff som bindes til proteinets aminosyrer ved elektrostatiske og hydrofobe bindinger. Fargestoffet bindes sterkere til proteinene enn gelen. Ved avfarging får man dermed lav bakgrunn og tydelige proteinbånd på gelen (Miller et al. 2006)

3. Metode

Materialer:

- dH₂O
- MOPS SDS Running Buffer (1x)
- NuPAGE[®] 10 % Bis-Tris Gel 1,0 mm x 10 well
- NuPAGE[®] Sample reducing agent (10x)
- NuPAGE[®] Samplebuffer (4x)
- Proteinløsning
- Proteinstandard: Bench Mark Ladder

- Fargeløsning
 - 0,1 % Coomassie Brilliant Blue
 - 10 % Metanol
 - 10 % Eddiksyre

- Avfargingsløsning
 - 10 % Metanol
 - 10 % Eddiksyre

Metode:

5 µL Sample buffer, 2 µL Sample reducing agent, 3 µL dH₂O og 10 µL proteinløsning ble blandet og denaturert ved 70 °C 10 minutter. Gelen ble plassert i kjørekammeret og dannet, sammen med en veggplate, et indre bufferkammer. Det indre kammeret ble fylt til randen med MOPS SDS Running Buffer og kammeret rundt ble fylt halvfullt med samme buffer. Det ble applisert 5 µL proteinstandard og 20 µL proteinprøve i brønnene. Gelen ble påsatt en spenning på 200 V i 50 minutter. Gelen ble etter endt separering inkubert i fargeløsning på ristebrett i 30 minutter. Etter farging ble gelen avfarget ved hjelp av avfargingsløsning på ristebrett.

3.6 Oppkonsentrering av rensset protein

Amicon Ultra-15 er et sentrifugefilter som ble benyttet til oppkonsentrering av rensset proteinløsning og til å bytte bufferen proteinene befinner seg i. Ved sentrifugering vil forbindelser med molekylvekt lavere enn 10 000 Da slippe gjennom filteret. Molekyler som er større vil bli værende i filteret. Denne typen filter har flere egenskaper og kan blant annet benyttes til rensing av makromolekylære forbindelser og til å avsalte prøver (Millipore 2013).

Materialer:

- Amicon-rør (Ultra-15, 10 kDa)
- Proteineluat fra rensing
- 20 mM Tris-HCl

Metode:

Ønskete proteinfraksjoner ble overført til amiconrør og sentrifugert ved 4 °C og 4300 rpm til det var rundt 1,5 mL væske igjen i filteret. Rørene ble deretter fylt med ”oppbevaringsbuffer”, 20 mM Tris-HCl, og sentrifugert ved 4 °C og 4300 rpm til 1,5 mL væske var igjen i filteret. Prosessen ble gjentatt fire ganger. Dette for å sikre at proteinet ble oppbevart i 20 mM Tris-HCl. Proteinløsningen i filteret ble så overført til eppendorfrør og oppbevart i kjøleskap ved 4 °C.

3.7 Proteinkonsentrasjonsbestemmelse, fluorimetrisk metode

Quant-iT™ Assay kit inneholder fluorescerende fargestoffer som er spesifikke for DNA, RNA eller protein. Når fargestoffene bindes til protein øker fluorescenssignalet. Dette gir et sterkt signal og lite bakgrunn, som gir god sensitivitet. Intensiteten av fluorescensen som måles i fluorometeret avhenger av mengden protein som befinner seg i løsningen. Metoden er nøyaktig og rask og er mye brukt til konsentrasjonsbestemmelse av proteiner (*Invitrogen* 2013)

Materialer:

- Proteinløsning
- Qubit™-fluorometer
- Quant-iT™ Protein Assay Kit:
 - Quant-iT™ protein buffer
 - Quant-iT™ protein reagent
 - Quant-iT™ proteinstandarder

Metode:

En arbeidsløsning av Quant-iT reagent og Quant-iT buffer i forholdet 1:200 ble tillaget. Videre ble en standardkurve, for å kalibrere instrumentet, laget. Tre standarder med konsentrasjoner på henholdsvis 0, 200 og 400 ng/μL ble benyttet. Standardene ble fortynnet med arbeidsløsning i forholdet 1:20. Proteinløsningen ble så blandet godt sammen med arbeidsløsningen i forholdet 1:100 og inkubert ved romtemperatur i 15 minutter. Prøvene ble deretter målt med et Qubit™-fluorometer. Det ble målt tre paralleller av hver proteinprøve.

3.8 Spesifikk enzymaktivitet

4-methylumbelliferyl-b-D-*N-N'*-diacetylchitobiose (4-MU (GlcNAc)₂) er et substrat bestående av to sukkerenheter, (GlcNAc)₂, bundet til en fluoriserende gruppe, 4-methylumbelliferyl. Dette kunstige substratet benyttes ofte til aktivitetsbestemmelse av familie 18 kitinaser. Ved enzymatisk hydrolyse spaltes den fluoriserende gruppen av trimeren og danner *N-N'*-diacetylchitobiose og 4-MU. Den frie fluorescerende gruppen absorberer lys ved en gitt bølgelengde og avgir fluorescens som detekteres av et fluorometer. Fluorescensen som måles kan benyttes til å beregne spesifikk enzymaktivitet (Synstad et al. 2004).

Materialer:

- 0,2 M Natriumkarbonat
- 1,0 μM 4-MU
- 4-MU-(GlcNAc)₂
- 10 mg/mL BSA
- McIlvain buffer pH 5,2
 - 23,3 mL 0,1 M Sitronsyre
 - 26,7 mL 0,2 M Natriumfosfatfortynnet til 100 mL
- Fluorometer
- Protein

Metode aktivitetsassay:

En arbeidsløsning bestående av 4,95 mL McIlvain buffer og 50 μL 10 mg/mL BSA ble blandet i et 15 mL blåkorkrør. Reagensrør ble merket og tre paralleller for hvert protein i tillegg til en nullprøve ble klargjort. Hvert rør ble tilsatt 87 μL arbeidsløsning og 8 μL 1 mg/mL 4-MU-(GlcNAc)₂. Rørene ble satt på vannbad ved 37 °C og risting. 5 μL proteinløsning ble så tilsatt hvert rør. Nullprøven ble tilsatt 5 μL arbeidsløsning. Etter

nøyaktig 10 minutter ble reaksjonene stoppet ved tilsetning av 1,9 mL 0,2 M Natriumkarbonat til et totalvolum på 2 mL.

Metode fluorimetrisk måling:

Fluorometeret ble først nullstilt med 1,9 mL natriumkarbonat. Videre ble instrumentet kalibrert ved å tilsette 100 μL 1,0 μM 4-MU til natriumkarbonatløsningen. Kyvetten ble så tømt og vasket med dH_2O før prøven ble tilsatt og fluorescensen lest av. Den spesifikke enzymaktiviteten ble beregnet ut fra følgende formel:

$$(\text{vol}(l) \times \frac{\text{Gjennomsnittslig fluorescens}}{10}) / \text{Tid}(\text{min}) / (\text{enzymvolum} \times \text{mg/mL})$$

3.9 Nedbrytning av kitin

Kitin ble brutt ned over tid og konsentrasjon av dimerer $(\text{GlcNac})_2$ ble kvantifisert ved hjelp av High Performance Liquid Chromatography (HPLC). To ulike typer β -kitin, henholdsvis 3 μm og 180 μm , ble degradert ved hjelp av tre ulike kitinaser, ChiA, ChiB og ChiC. I noen tilfeller ble også CBP21 tilsatt kitinløsningen for å se på effekten av dette hjelpeenzymet. For å undersøke om pH har noen effekt på nedbrytningen og eventuelt i hvilken grad ble forsøkene utført ved både pH 6,1 og 8,0.

3.9.1 Substratmetningsanalyse for ChiA, ChiB og ChiC

For å kunne beregne en enzymhastighet som er så nær V_{max} som mulig er det nødvendig at enzymene er mettet med substrat, det vil si at substratet er i overskudd i forhold til tilgjengelig enzym. Ved å finne V_{max} er det mulig å videre beregne en hastighetskonstant som er så nær k_{cat} som mulig. For å undersøke hvilken konsentrasjon av substrat som gir overskudd ble det utført substratmetningsanalyse og laget metningsplott. Et metningsplott viser nedbrytningshastigheten mot økende konsentrasjon av substrat. Ved å studere hvordan hastigheten varierer med substratkonsentrasjonen er det mulig å bestemme metningspunkt.

Ulike konsentrasjoner av kitin ble brutt ned over tid for å finne metningspunkt. Analysen ble utført forsøk med 170 nM ChiA og ChiC og 156 nM ChiB. Det ble laget prøver til substratmetningsanalyse for β -kitin med to ulike grader krystallinitet. Kitinet som ble benyttet var henholdsvis 3 μm og 180 μm i størrelse. Forsøket ble i tillegg utført ved ulike pH, henholdsvis 6,1 og 8,0 for å studere påvirkningen av pH. Prøver ble tatt ut over tid og reaksjonen ble stoppet ved hjelp av svovelsyre. Dimerkonsentrasjonen ble kvantifisert ved hjelp av HPLC.

Materialer:

- 10 mg/mL BSA
- Substrat
 - 180 μm β -kitin
 - 3 μm β -kitin
- Enzym
 - 170 nM ChiA
 - 156 nM ChiB
 - 170 nM ChiC
- 20 mM Svovelsyre
- 50 mM Natriumacetatbuffer pH 6,1
- 20 mM Tris-HCl buffer pH 8,0

Metode:

Buffer ble tilsatt BSA til en sluttkonsentrasjon på 0,1 mg/mL og substrat ble tilsatt løsningen. Ulike konsentrasjoner av substrat ble benyttet, henholdsvis 10 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL og 50 mg/mL. I noen tilfeller ble det også laget prøver med konsentrasjon på 70 mg/mL. Alle forsøk ble utført med minst to paralleller. Prøvene ble satt på risteinkubator ved 37 °C og 800 rpm. Før enzymtilsetning ble en nullprøve ($t=0$) tatt ut. Deretter ble enzym tilsatt. Ulike

enzymene krevde ulike konsentrasjoner. Forsøk med ChiA og ChiC ble utført med en sluttkonsentrasjon på 170 nM. Ved forsøk på ChiB ble det benyttet en sluttkonsentrasjon på 156 nM. Enzym ble tilsatt og det ble tatt ut prøver fra løsningen etter nøyaktig 0, 4, 8, 12 og 16 minutter. 75 µL ble tatt ut hver gang og løsningen ble blandet med 75 µL 20 mM svovelsyre for å stoppe reaksjonen. Prøvene ble deretter filtrert med 0,45 µm filter for å fjerne partikler. Prøvene ble oppbevart ved 20 °C frem til HPLC-analyse.

3.9.2 Eyringanalyse for ChiA, ChiB og ChiC

Ved hjelp av en Eyringanalyse er det mulig å bestemme aktiveringsparametrene ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger og ΔS^\ddagger for en reaksjon. Det ble laget prøver til bestemmelse av k_{cat} for hvert enzym ved seks ulike temperaturer. På bakgrunn av dette kan man bestemme $\ln(k_{cat}/T)$ og plote disse verdiene mot verdier for $1/T$. Forsøket ble utført ved å bryte ned kitin over tid ved en konsentrasjon på 20 mg/mL etter påvist metning ved denne konsentrasjonen. 3 µm β-kitin ble brutt ned ved pH 6,1 og pH 8,0. 180 µm β-kitin ble brutt ned ved pH 6,1. Eyringanalyse ble utført for ChiA, ChiB og ChiC.

Materialer:

- 10 mg/mL BSA
- 50 mM Natriumacetatbuffer pH 6,1
- 20 mM Tris-HCl buffer pH 8,0
- Enzym
 - 170 nM ChiA
 - 156 nM ChiB
 - 170 nM ChiC
- Kitin
 - 180 µm β-kitin
 - 3 µm β-kitin
- 20 mM Svovelsyre

Metode:

Buffer ble tilsatt BSA til en sluttkonsentrasjon på 0,1 mg/mL. Videre ble substrat tilsatt løsningen til en konsentrasjon på 20 mg/mL. Prøvene ble satt i en risteinkubator ved 800 rpm. Før enzymtilsetning ble en nullprøve ($t=0$) tatt ut. Ulike enzymer krevde ulik konsentrasjon. Forsøk med ChiA og ChiC ble utført med en sluttkonsentrasjon på 170 nM. Ved forsøk på ChiB ble det benyttet en sluttkonsentrasjon på 156 nM. Enzym ble tilsatt og det ble tatt ut prøver fra løsningen etter 0, 4, 8, 12 og 16 minutter som tidligere beskrevet. Forsøket ble utført ved seks ulike temperaturer, henholdsvis 18, 23, 26, 30, 33 og 37 °C og alle forsøk ble utført med minst to paralleller. Prøvene ble så filtrert med 0,45 µm filter for å fjerne partikler. Prøvene ble deretter oppbevart ved - 20 °C frem til HPLC-analyse.

3.9.3 Eyringanalyse med CBP21 som hjelpeenzym

CBP21 er, som tidligere nevnt, et enzym som hydrolyserer kitinkjeden slik at det dannes flere frie ender på substratet. Dette gjør substratet mer tilgjengelig for hydrolyse av ChiA, ChiB og ChiC. På bakgrunn av dette ble det laget prøver til eyringanalyse med CBP21 for å undersøke effekten av dette hjelpeenzymet. CBP21 fungerer mer effektivt ved tilstedeværelsen av en reduktant og askorbinsyre ble dermed benyttet i løsningen. Divalente kationer ble tilsatt løsningen ettersom CBP21 er et metallavhengig enzym (Vaaje-Kolstad et al. 2010). Forsøket ble utført med ChiA på 3 µm β-kitin pH 6,1 og pH 8,0 og 180 µm β-kitin ved pH 6,1. I tillegg ble det laget prøver til eyringanalyse med CBP21 for ChiB ved 3 µm β-kitin pH 8,0.

Materialer:

- 10 mg/mL BSA
- 20 mM Svovelsyre
- 0,2 M Askorbinsyre
- 50 mM Natriumacetatbuffer pH 6,1
- 20 mM Tris-HCl buffer pH 8,0
- Kitin

3. Metode

- 180 μm β -kitin
- 3 μm β -kitin
- 1 mM Kobberklorid
- 1 M Magnesiumklorid
- Enzym
 - 170 nM ChiA
 - 156 nM ChiB
 - 1 μM CBP21

Metode:

Buffer ble tilsatt BSA til en sluttkonsentrasjon på 0,1 mg/mL. I tillegg ble det tilsatt askorbinsyre til sluttkonsentrasjon på 1mM, magnesiumklorid til konsentrasjon på 5 mM og kobberklorid til en konsentrasjon på 3 μM . CBP21 ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 1 μM . Løsningen ble inkubert i 24 timer på risteinkubator ved 37 °C og 800 rpm. Etter 24 timer ble ønsket temperatur stilt inn og enzym ble tilsatt. Forsøket ble utført ved seks ulike temperaturer, henholdsvis 18, 23, 26, 30, 33 og 37 °C. Det ble benyttet 170 nM ChiA og 156 nM av ChiB i forsøket. Prøver ble tatt ut etter 0, 4, 8, 12 og 16 minutter som beskrevet tidligere. Prøvene ble filtrert med 0,45 μm filter og oppbevart ved - 20 °C frem til HPLC-analyse.

3.10 Tillaging av standard (GlcNAc)₂

En standard inneholder kjent konsentrasjon av en spesifikk forbindelse. Det benyttes for å identifisere og beregne konsentrasjon til ukjente prøver. Standardene som ble benyttet til HPLC-analysen består av kjent mengde (GlcNAc)₂ (A2). De ble brukt til å beregne konsentrasjonen av A2 i de ukjente prøvene. Det ble laget to standarder med ulik konsentrasjon, henholdsvis 200 og 400 µM.

Materialer:

- Di-*N*-Acetyl-glucosamine (A2)
- 20 mM Tris-HCl pH 8,0

Metode:

En stamløsning på 1000 µM A2 ble tillaget ved å løse 0,424 mg Di-*N*-Acetyl-glucosamine i Tris-HCl pH 8,0 til et totalvolum på 1000 µL. Med utgangspunkt i stamløsningen ble standarder på henholdsvis 200 og 400 µM laget. Standardene ble videre fortynnet med 20 mM svovelsyre i forholdet 1:1 før HPLC-analyse.

3.11 Kvantifisering av dimerer ved HPLC

HPLC er en kromatografisk separasjons – og analysemetode. Metoden baserer seg på at stoffer som analyseres fordeles mellom en stasjonær og mobil fase. Ulike kjemiske forbindelser vil ha ulik affinitet til den stasjonære fasen. Etter hvert som mobilfasen beveger seg gjennom stasjonærfasen vil noen stoffer holdes mer tilbake enn andre. Komponentene som analyseres vil elueres ut av kolonnen til ulik tid og kan analyseres hver for seg (Miller 2005).

Ved hjelp av HPLC ble mengde (GlcNAc)₂ i prøvene fra nedbrytningsforsøkene kvantifisert. Det ble benyttet en kolonne som heter Rezex RFQ-Fast Fruit H+. Kolonnematerialet består av sulfonert styrene-divinyl benzene (SDVB). SDVB er negativt ladet og har H⁺- ioner bundet

3. Metode

til seg. Dimerene som kvantifiseres blir positiv ladet av H⁺-ioner donert fra svovelsyren. H⁺ fra kolonnematerialet byttes ut med dimerer fra prøven. Dimerene fester seg til kolonnematerialet og elueres ut av kolonnen etter en bestemt tid.

Materialer:

- Mobilfase: 5 mM Svovelsyre
- Standard
 - 200 µM A2
 - 400 µM A2
- Prøver fra nedbrytningsforsøk
- Kolonne: Rezex RFQ-Fast Fruit H⁺ 7,8 x 100 mm
- Forkolonne: Carbo-H 4 x 3,0 mm

Metode:

Ved hjelp av en autoinjektor ble 8 µL prøve injisert på en Rezex RFQ-Fast Fruit H⁺ kolonne. Kitoologosakkaridene i prøven ble eluert isokratisk ved 85 °C. Mobilfasen, 5 mM svovelsyre, ble satt til en flow på 1 mL/min. Dimerene ble detektert av en UV-detektor ved 195 nm. Programvaren Chromeleon ble benyttet til å analysere kromatogrammene. Konsentrasjonen av dimerer i de ulike prøvene ble bestemt ved hjelp av standarder med kjent konsentrasjon, henholdsvis 200 og 400 µM.

3.12 Bearbeiding av data

3.12.1 Bearbeiding av data fra Chromeleon

Programvaren Chromeleon oppgir resultatene fra HPLC-analysen i et kromatogram. Ettersom dimerene i prøven har samme retensjonstid vil en spesifikk topp i kromatogrammet representere konsentrasjonen av dimere i prøven. Programmet oppgir arealet under toppen. Ved hjelp av standardene, som har kjent konsentrasjon, er det mulig å beregne areal om til konsentrasjon for de ukjente prøvene.

3.12.2 Substratmetningsanalyse

Ulike konsentrasjoner av kitin ble brutt ned for å bestemme metningspunkt. For hver substratkonsentrasjon ble minst to paralleller tatt ut ved 0, 4, 8, 12 og 16 minutter. For hver av disse prøvene ble dimerkonsentrasjonen bestemt ved hjelp av HPLC. Dimerkonsentrasjonen ble plottet mot tid i et diagram og et eget diagram ble laget for hver substratkonsentrasjon. Ved hjelp av lineær regresjonsanalyse ble det laget en trendlinje basert på datapunktene uavhengig av hverandre. På denne måten kan man finne et gjennomsnittlig stigningstall for hver substratkonsentrasjon. Stigningstallet er et mål på dimerkonsentrasjon per tid ($\mu\text{M}/\text{min}$) og sier noe om nedbrytningshastigheten, v , ved hver substratkonsentrasjon. Nedbrytningshastigheten for hver konsentrasjon av substrat ble videre plottet mot substratkonsentrasjon i et metningsplott. Ved substratmetning vil hastigheten holdes konstant ved økende substratkonsentrasjon.

3.12.3 Eyringanalyse

20 mg/mL substrat ble brutt ned over tid ved seks ulike temperaturer. Prøver ble tatt ut ved 0, 4, 8, 12 og 16 minutter ved hver temperatur. Minimum to paralleller ble tatt ut. For hver temperatur ble dimerkonsentrasjonen i prøvene bestemt og plottet mot tid i et diagram. Et eget diagram ble laget for hver temperatur og lineær regresjonsanalyse ble utført. Regresjonsanalysen genererer en lineær trendlinje med et stigningstall og standardavvik. Ettersom enzym er mettet med substrat vil stigningstallet være et mål på maksimal

3. Metode

nedbrytningshastighet, V_{max} . V_{max} ble funnet for hver temperatur og ble, sammen med enzymkonsentrasjonen, benyttet til å beregne apparent k_{cat} , som vist i likning 9. Videre ble verdier for $\ln(k_{cat}/T)$ og $1/T$ bestemt og plottet mot hverandre. En trendlinje ble lagt til de seks datapunktene på formelen $y = -ax + b$. Ved hjelp av stigningstallet til linjen ble ΔH^\ddagger bestemt som vist i ligning 10. ΔG^\ddagger ble bestemt ut i fra k_{cat} ved hjelp av ligning 11. Ved hjelp av ligning 12 ble verdiene til ΔG^\ddagger og ΔH^\ddagger benyttet til å bestemme $-T\Delta S^\ddagger$

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]} \quad (9)$$

$$a = -\frac{\Delta H^\ddagger}{R} \quad (10)$$

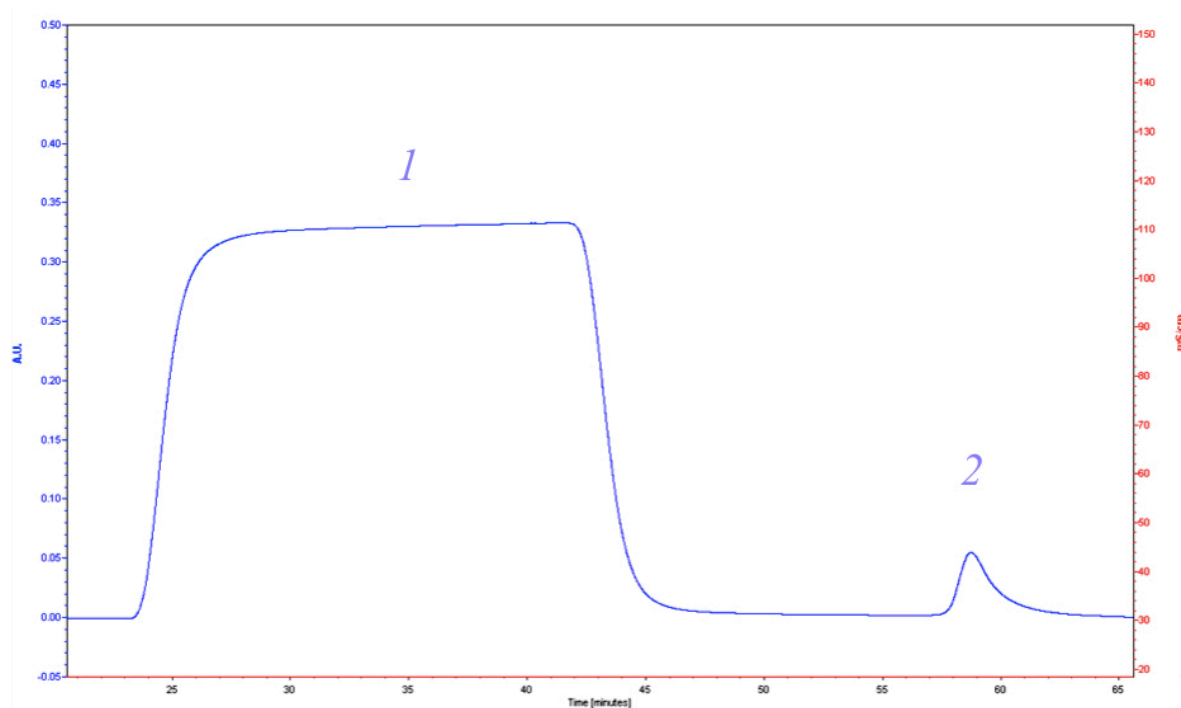
$$\Delta G^\ddagger = -RT \ln\left(\frac{k_{cat}h}{k_bT}\right) \quad (11)$$

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (12)$$

4 Resultater

4.1 Renseprosedyre for diverse kitinaser

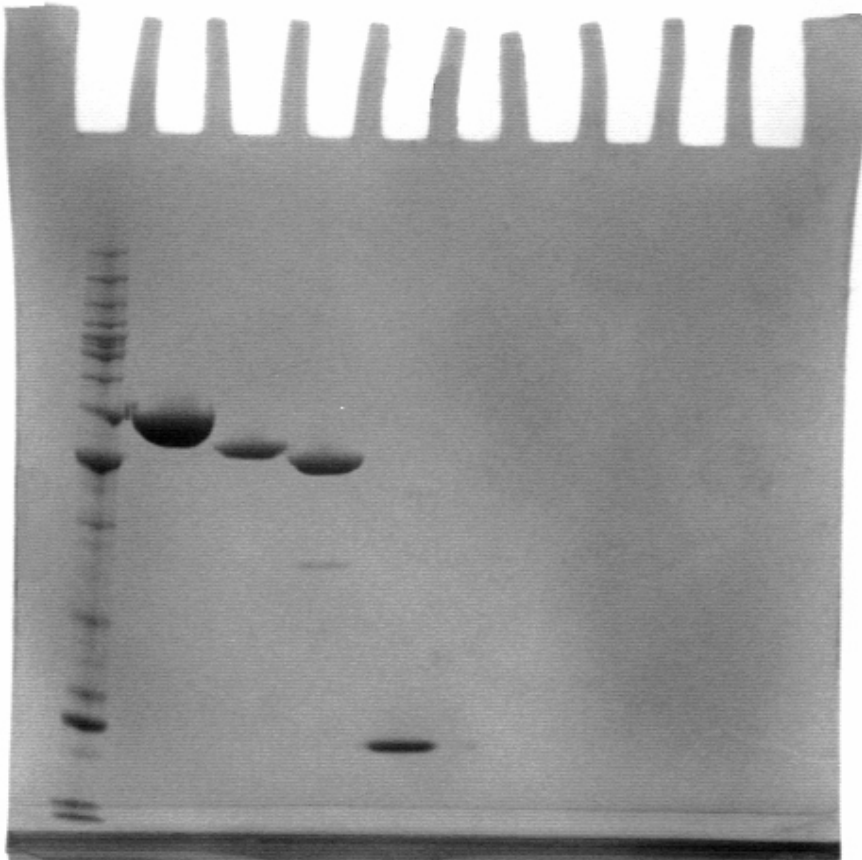
Som tidligere nevnt i kapittel 3.4 ble alle enzymer rensert ved hjelp av kitinkuler. All løsnings som elueres ut av kolonnen detekteres av en UV-lampe. I figur 4.1 presenteres et typisk kromatogram fra rensing ved hjelp av kitinkuler.



Figur 4.1. Kromatogram fra rensing av ChiB ved hjelp av kitinkuler. Til venstre i kromatogrammet vises voidtoppen (1) hvor ulike komponenter fra periplasmatiske ekstrakt elueres ut. Toppen til høyre (2) viser rent protein.

4.2 SDS-Gel

For å sjekke renheten til de rensede kitinasene ble SDS-gelelektroforese utført. Figur 4.2 viser gelbilde av de oppkonsentrerte kitinasene, henholdsvis ChiA, ChiB, ChiC og CBP21. Gelbilde fra hvert enzym før og etter rensing foreligger som vedlegg 1 i kapittel 8.2.



Figur 4.2 Figuren viser gelelektroforese av proteinstandard i brønn 1 fra venstre og videre de ulike proteinene, henholdsvis ChiA, ChiB, ChiC og CBP21.

4.3 Bestemmelse av proteinkonsentrasjon

Proteinkonsentrasjon ble, som tidligere nevnt, målt ved hjelp av et Qubit-fluorometer. Tre paralleller av hvert enzym ble målt. Tabell 4.1 viser en oversikt over gjennomsnittet av de målte enzymkonsentrasjonene og volumet av oppkonsentrert enzymløsning.

Tabell 4.1 Konsentrasjon i mg/mL for hvert enzym og volum av proteinløsningen

Enzym	Konsentrasjon (mg/mL)	Volum (mL)
ChiA	5,2	3,5
ChiB	1,1	3
ChiC	3,1	7
CBP21	1,3	3

4.4 Bestemmelse av spesifikk enzymaktivitet

Som tidligere beskrevet i metodedelen ble enzymenes aktivitet målt fluorometrisk. Det lineære området til fluorometeret ligger i området 0 – 5000 nm. På bakgrunn av dette ble proteinprøvene fortynnet, slik at det avgitte fluorescenssignalet lå innenfor det lineære området. Ulike proteiner krevde ulik fortynning. ChiA ble fortynnet 1:10 000, ChiB 1:1000 og ChiC 1:100. Resultatene fra aktivitetsmålingen er presentert i tabell 4.2. ChiA viste høyest spesifikk aktivitet, henholdsvis 30276 nm/min/mg, fulgt av ChiB og ChiC med aktivitet på 4760 og 356 nm/min/mg. Den spesifikke enzymaktiviteten ble beregnet ut fra følgende formel:

$$(\text{vol}(l) \times \frac{\text{Gjennomsnittslig fluorescens}}{10}) / \text{Tid (min)} / (\text{enzym volum} \times \text{mg/mL})$$

Volumet i hvert rør er 2 mL, tiden er 10 minutter, det ble benyttet 5 µL enzymløsning og mg/mL er enzymkonsentrasjon for det aktuelle enzymet.

Tabell 4.2: Absorpsjon og spesifikk enzymaktivitet for de ulike kitinasene, henholdsvis ChiA, ChiB og ChiC. Fortynningen for de ulike enzymene er presentert i parenteser. Spesifikk aktivitet benevnes nm/min/mg

Enzym	Målt fluorescens i nm (gj.snitt)	Spesifikk aktivitet (nm/min/mg)
ChiA (1:10 000)	3898	30276
ChiB (1:1000)	1309	4760
ChiC (1:100)	2757	356

4.5 Substratmetningsanalyse for ChiA, ChiB og ChiC

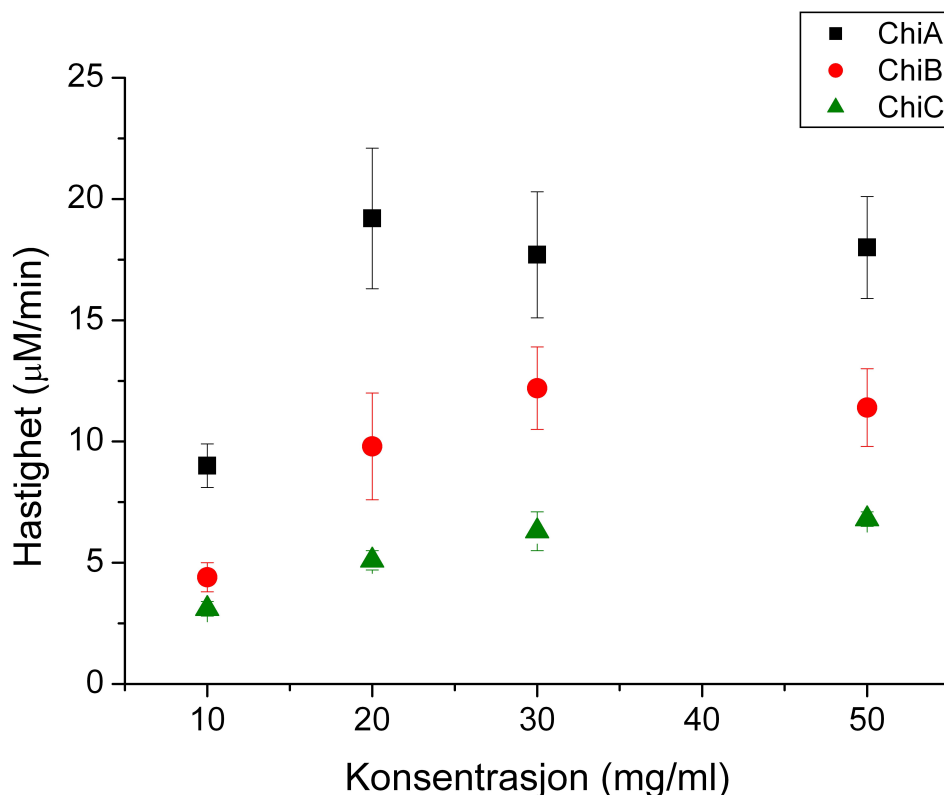
I en Eyringanalyse for en enzymkatalysert reaksjon er det viktig at hastighetskonstanten som bestemmes er nær en k_{cat} som mulig. Ettersom kitin er uløselig er det ikke mulig å benytte et Michaelis-Menten plott for å finne k_{cat} . For å finne en løsning på dette problemet er det viktig at hastigheter som måles er så nær V_{max} som mulig. Dette har vi når substratet er i overskudd i forhold til tilgjengelig enzym. Dette ble undersøkt ved metningsplott. Plottene ble laget ved å bryte ned kitin over tid med ulik konsentrasjon av substrat og lik mengde enzym.

Metningsplottene ble laget ved lineær regresjonsanalyse i Microsoft Excel. Grafene ble utarbeidet i programmet Origin 7.0. X-aksen representerer konsentrasjon av kitin i mg/mL, mens y-aksen representerer stigningstallet. Stigningstallet er et mål på hastighet av kitinbrytning og har benevnelse $\mu\text{M}/\text{min}$.

4.5.1 Metningsplott for 180 μm β -kitin pH 6,1

Substratmetningsanalyse ble utført for ChiA, ChiB og ChiC med ulik konsentrasjon, henholdsvis 170 nM for ChiA og ChiC og 156 nM for ChiB. Resultatet fra analysen vises i figur 4.3. 180 μm β -kitin ble benyttet i forsøket. Ulike substratkonsentrasjoner ble benyttet, henholdsvis 10, 20, 30 og 50 mg/mL. Forsøket ble utført ved bruk av 50 mM natriumacetatbuffer ved pH 6,1. Errorbars indikerer standardavvik for hvert individuelt punkt.

Fra 10 til 20 mg/mL kitin øker nedbrytningshastigheten for både ChiA, ChiB og ChiC. Fra 20 til 50 mg/mL kan man se at hastigheten ikke forandrer seg signifikant. Dette tyder på at hastigheten er konstant og at ChiA, ChiB og ChiC er mettet med substrat ved en konsentrasjon på 20 mg/mL.

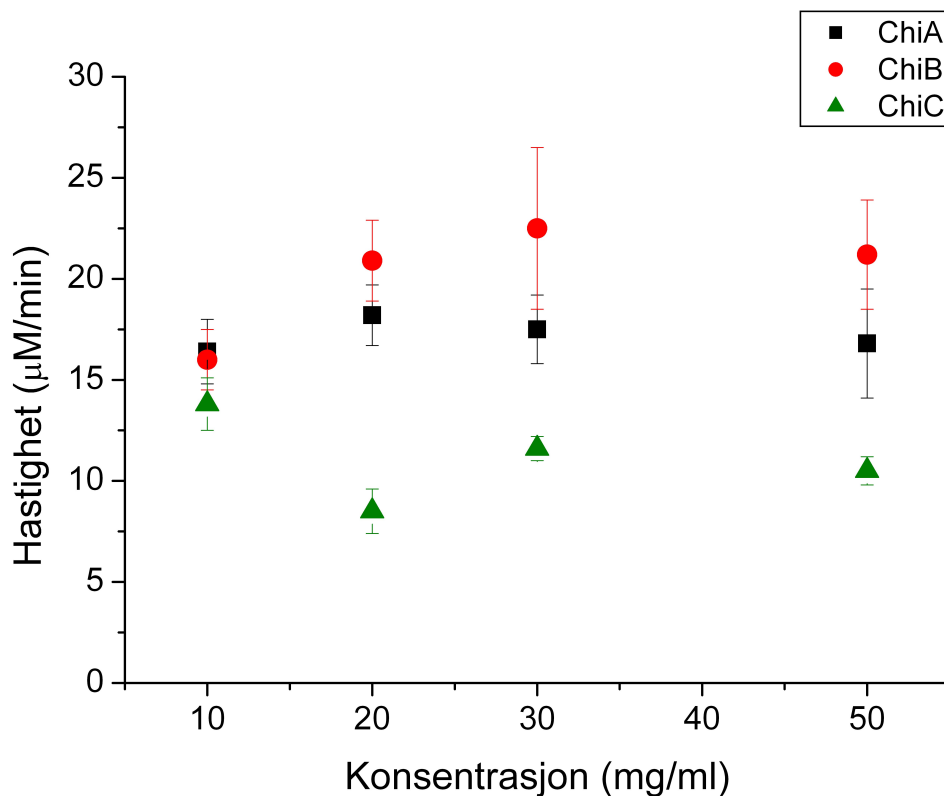


Figur 4.3 Metningsplott laget ved bruk av 180 μm β -kitin, henholdsvis 10, 20, 30 og 50 mg/mL. 50 mM natriumacetatbuffer ved pH 6,1 ble benyttet og 170 nM ChiA og ChiC samt 156 nM ChiB.

4.5.2 Metningsplott for 3 μm β -kitin, pH 6,1

Substratmetningsanalyse ble utført for ChiA med ulik konsentrasjon, henholdsvis 170 nM for ChiA og ChiC og 156 nM for ChiB. Resultatet fra analysen vises i figur 4.4. 3 μm β -kitin ble benyttet i forsøket. Ulike substratkonsentrasjoner ble benyttet, henholdsvis 10, 20, 30 og 50 mg/mL. Forsøket ble utført ved bruk av 50 mM natriumacetatbuffer ved pH 6,1.

Fra 10 til 20 mg/mL kitin øker nedbrytningshastigheten for ChiA og ChiB. For ChiC går hastigheten ned. Prøvene som er opphav til punktet for 10 mg/mL kitin ble analysert en annen dag enn prøvene til de resterende punktene på grunn av problemer med HPLC-instrumentet. På bakgrunn av dette og at synkende enzymhastighet ikke er normalt ved økende substratkonsentrasjon ble dette punktet sett bort fra ved tolkningen av resultat. Fra 20 til 50 mg/mL holdes hastigheten konstant for ChiA og ChiB. For ChiC går hastigheten litt opp fra 20 til 30 mg/mL og forblir konstant til 50 mg/mL. Metningspunkt ble satt til 20 mg/mL for ChiA, ChiB og ChiC.

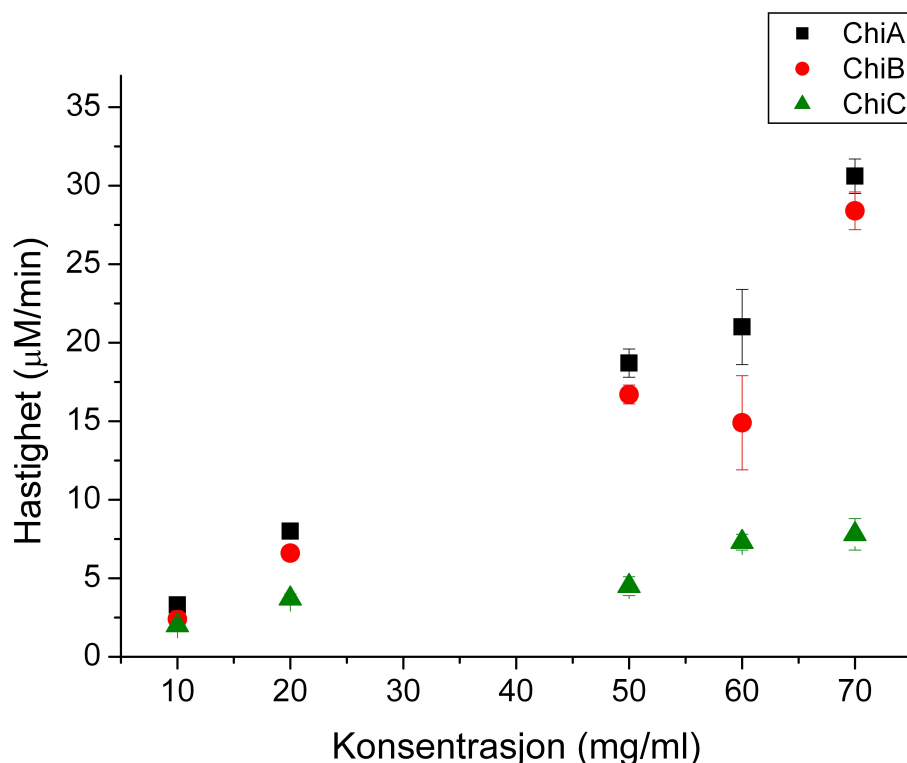


Figur 4.4 Metningsplott laget ved bruk av 3 μm β -kitin,, henholdsvis 10, 20, 30 og 50 mg/ml. 50 mM natriumacetatbuffer ved pH 6,1 ble benyttet og 170 nM ChiA og ChiC samt 156 nM ChiB.

4.5.3 Metningsplott 180 μm β -kitin pH 8,0

Substratmetningsanalyse ble utført for tre ulike kitinaser med ulik konsentrasjon, henholdsvis 170 nM for ChiA og ChiC og 156 nM for ChiB. Resultatet fra analysen vises i figur 4.5. 180 μm β -kitin ble benyttet i forsøket. Ulike substratkonsentrasjoner ble benyttet, henholdsvis 10, 20, 50, 60 og 70 mg/mL. Det ble benyttet en buffer med pH 8,0, henholdsvis 20 mM Tris-HCl.

Hastigheten på nedbrytningen øker omtrent lineært med økende substratkonsentrasjon. Dette gjelder for ChiA, ChiB og ChiC, men stigningen er størst for ChiA og ChiB. Av grafen kan man ikke se noen antydning på at hastigheten avtar ved økende substratkonsentrasjon. På bakgrunn av dette viser ingen av de tre kitinasene tegn til substratmetning ved konsentrasjon ≤ 70 mg/mL.

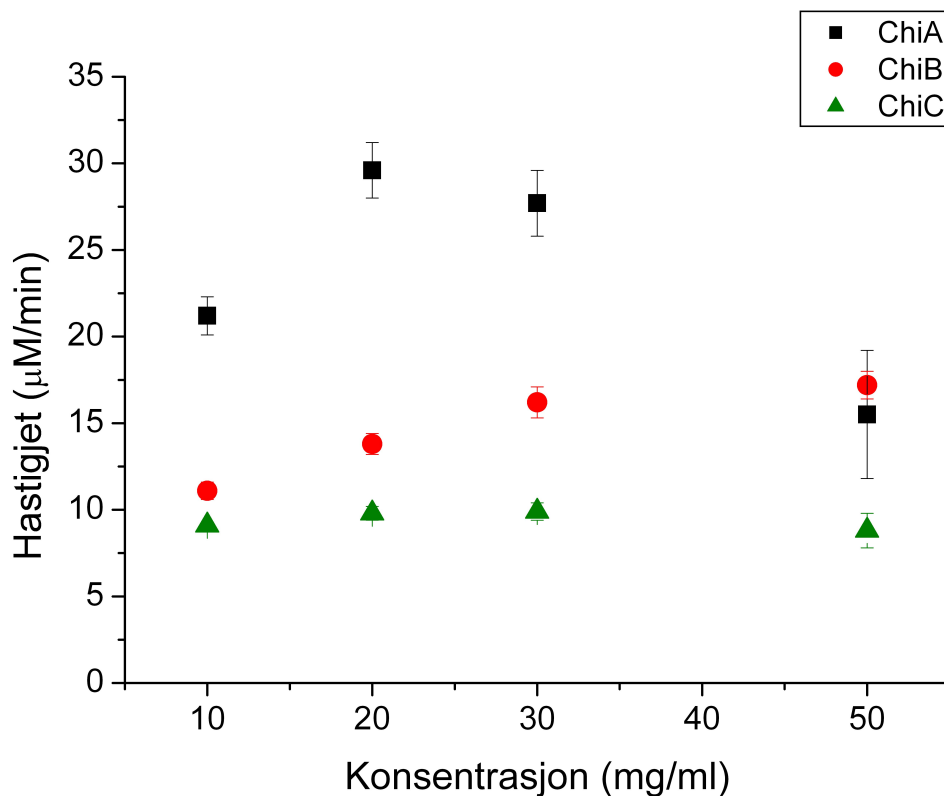


Figur 4.5 Metningsplott laget ved bruk av 180 μm β -kitin, henholdsvis 10, 20, 50, 60 og 70 mg/mL. 20 mM Tris-HCl buffer ved pH 8,0 ble benyttet og 170 nM ChiA og ChiC samt 156 nM ChiB.

4.5.4 Metningsplott 3 μ m β -kitin pH 8,0

Substratmetningsanalyse ble utført for tre ulike kitinaser med ulik konsentrasjon, henholdsvis 170 nM for ChiA og ChiC og 156 nM for ChiB. Resultatet fra analysen vises i figur 4.6. 3 μ m β -kitin ble benyttet i forsøket. Ulike substratkonsentrasjoner ble benyttet, henholdsvis 10, 20, 30 og 50 mg/mL. Det ble benyttet en buffer med pH 8,0, henholdsvis 20 mM Tris-HCl.

For ChiA og ChiB øker nedbrytningshastigheten fra 10 til 20 mg/mL substrat. Fra 20 til 50 mg/mL flater hastigheten ut for ChiB og metningspunktet ligger ved 20 mg/mL. For ChiA avtar hastigheten ut fra 20 til 50 mg/mL. Hastigheten skulle optimalt flatet ut og ikke avtatt, men metningspunkt settes ved 20 mg/mL ettersom hastigheten ikke øker fra dette punktet. Hastigheten for nedbrytning av ChiC er stabil ved økende substratkonsentrasjon og metning kan antas å ligge ved 10 mg/mL kitin. I videre forsøk ble 20 mg/mL benyttet for lettere å kunne sammenligne de ulike forsøkene.



Figur 4.6 Metningsplott laget ved bruk av 3 μm β -kitin, henholdsvis 10, 20, 30 og 50 mg/mL. 20 mM Tris-HCl buffer ved pH 8,0 ble benyttet og 170 nM ChiA og ChiC samt 156 nM ChiB.

4.6 Eyringanalyse

For å kunne utlede aktiveringsparameterene ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger og $-T\Delta S^\ddagger$ for enzymatisk nedbrytning av kitin var det nødvendig å lage eyringplott. Ved hjelp av et eyringplott kan man se på sammenhengen mellom hastighetskonstanten til en reaksjon og temperaturen den er utført ved. Punktene i plottet danner en rett linje på formen $y = -ax + b$ hvor stigningstallet a er $\frac{-\Delta H^\ddagger}{R}$.

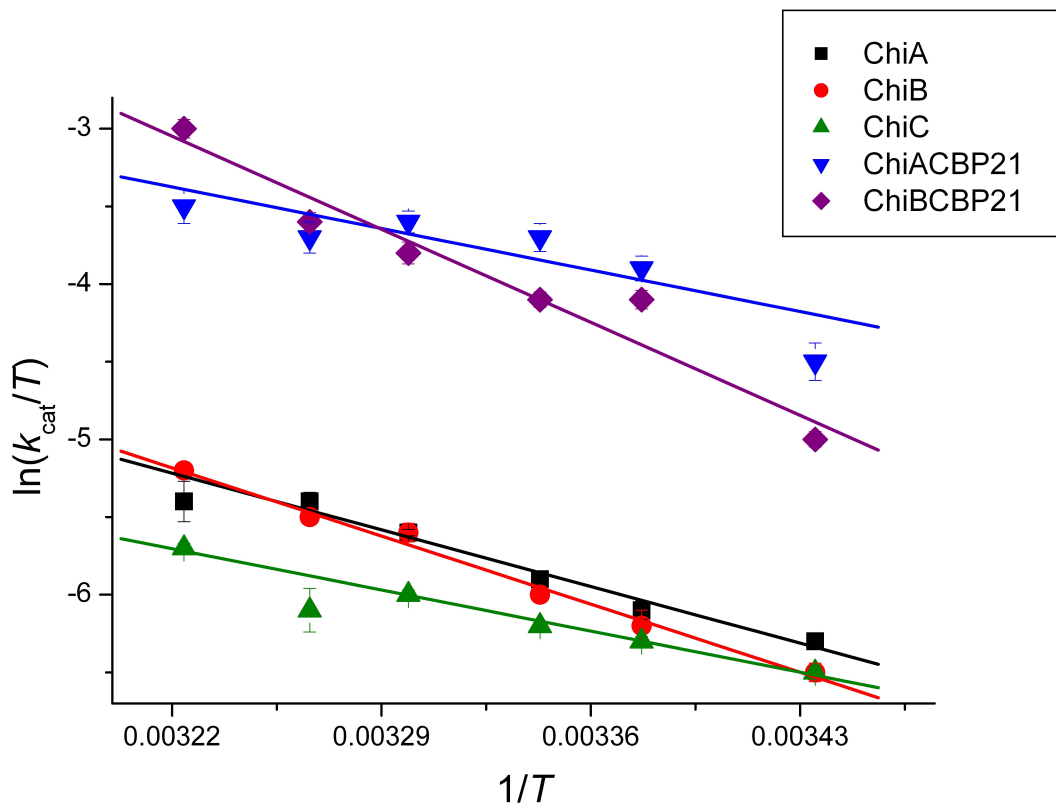
Analysen ble, som tidligere nevnt i kapittel 3.9.2, utført ved å bryte ned kitin ved seks ulike temperaturer og ta ut prøver ved 0, 4, 8, 12 og 16 min. Forsøket ble utført på β -kitin med ulik krystallinsk grad, henholdsvis 3 μm og 180 μm . Det ble også benyttet ulik pH, henholdsvis pH 6,1 og 8,0 for å undersøke pH-avhengighet. Eyringanalyse ble utført for ChiA, ChiB og ChiC. I tillegg ble analysen utført for ChiA med tilstedeværelsen av CBP21 og i et tilfelle også for ChiB med CBP21.

Eyringplottene ble laget ved lineær regresjonsanalyse i Microsoft Excel. Regresjonsanalysen ble benyttet for å bestemme stigningstall og standardavvik. Grafene ble laget i programmet Origin 7.0 ved å plote $\ln(k_{cat}/T)$ mot $1/T$. Formelen til de ulike plottene samt R^2 -verdi presenteres i tabellform under grafene.

4.6.1 Eyringplott 3 μm β -kitin pH 8,0

Eyringanalyse ble utført for tre ulike kitinaser med ulik konsentrasjon, henholdsvis 170 nM for ChiA og ChiC og 156 nM for ChiB. Ved bruk av CBP21 ble det benyttet en sluttkonsentrasjon på 1 μM . ChiA og ChiB ble analysert med tilstedeværelsen av CBP21. Eyringplottet som ble laget vises i figur 4.7. Forsøket ble utført på 3 μm β -kitin. Det ble benyttet en buffer med pH 8,0, henholdsvis 20 mM Tris-HCl.

Man ser av figur 4.7 at punktene som representerer ChiA og ChiB med CBP21 ligger høyest opp i grafen. Punktene for ChiA, ChiB og ChiC ligger lengre nede ChiA og ChiB overlapper hverandre, til dels også ChiC, men ikke i like stor grad.



Figur 4.7 Eyringplott for ChiA (170 nM), ChiB (156 nM) og ChiC (170 nM) samt ChiA og ChiB med 1 μM CBP21. Forsøket er utført ved bruk av 3 μm β -kitin og 20 mM Tris-HCl buffer pH 8,0.

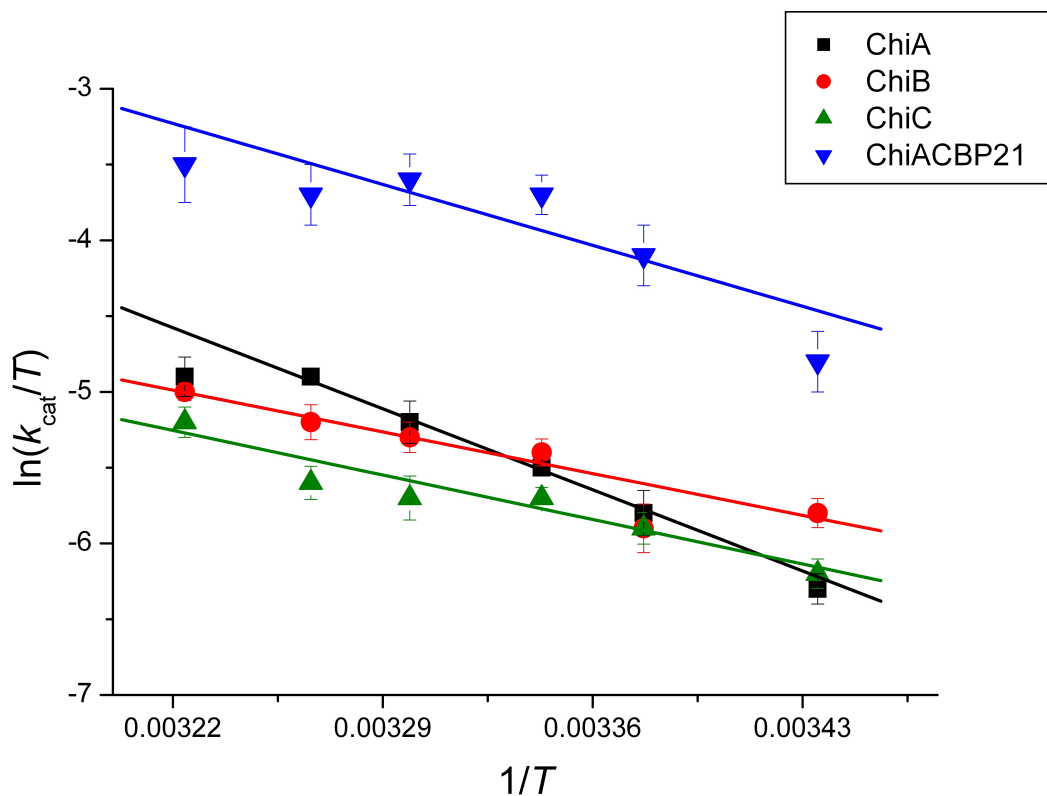
Tabell 4.3 Formel og R^2 -verdi for den lineære trendlinjen for hvert enzym ved 3 μm β -kitin pH 8,0

Enzym	Formel	R^2
ChiA	$y = -5213x + 11,6$	0,97
ChiB	$y = -6267x + 14,9$	0,99
ChiC	$y = -3788x + 6,5$	0,99
ChiA m/CBP21	$y = -3820x + 8,9$	0,73
ChiB m/CBP21	$y = -8560x + 24,5$	0,95

4.6.2 Eyringplott 3 μm β -kitin pH 6,1

Eyringanalyse ble utført for tre ulike kitinaser med ulik konsentrasjon, henholdsvis 170 nM for ChiA og ChiC og 156 nM for ChiB. Ved bruk av CBP21 ble det benyttet en sluttkonsentrasjon på 1 μM . ChiA ble analysert med tilstedeværelsen av CBP21. Eyringplottet som ble laget vises i figur 4.8. 3 μm β -kitin og 50 mM natriumacetatbuffer ved pH 6,1 ble benyttet.

Som forsøket over ligger punktene for ChiA med CBP21 høyere opp enn ChiA, ChiB og ChiC. Punktene for ChiA, ChiB og ChiC ligger ganske nær hverandre, men har noe ulikt stigningstall.



Figur 4.8 Eyringplott for 170 nM ChiA og ChiC og 156 nM B samt 170 nM ChiA med 1 μ M CBP21. Det ble benyttet 3 μ m β -kitin og 50 mM natriumacetatbuffer ved pH 6,1.

Tabell 4.4 Formel og R²-verdi for den lineære trendlinjen for hvert enzym ved 3 μ m β -kitin pH 6,1.

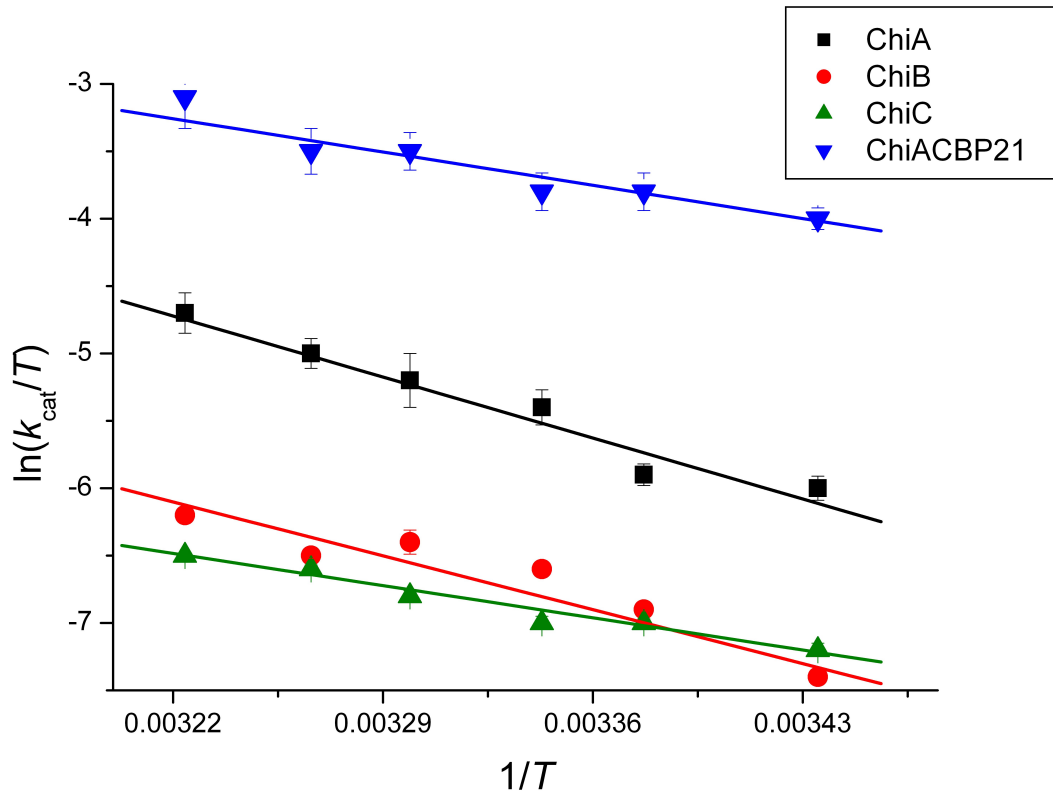
Enzym	Formel	R ²
ChiA	$y = -7644x + 20,0$	0,97
ChiB	$y = -3936x + 7,7$	0,94
ChiC	$y = -4198x + 8,3$	0,92
ChiA m/CBP21	$y = -5747x + 15,3$	0,72

4.6.3 Eyringplott 180 μ m β -kitin pH 6,1

Eyringanalyse ble utført for tre ulike kitinaser med ulik konsentrasjon, henholdsvis 170 nM for ChiA og ChiC og 156 nM for ChiB. Ved bruk av CBP21 ble det benytte en sluttkonsentrasjon på 1 μ M. ChiA ble analysert med tilstedeværelsen av CBP21. Eyringplottet

som ble laget vises i figur 4.9. Det ble benyttet β -kitin av typen 180 μm og 50 mM natriumacetatbuffer ved pH 6,1.

I dette plottet ligger også punktene for ChiA med CBP21 høyst oppe. ChiB og ChiC ligger nær hverandre og overlapper mot slutten. ChiA ligger litt høyere enn ChiB og ChiC.



Figur 4.9 Eyringplott for 170 nM ChiA og ChiC og 156 nM ChiB samt 170 nM ChiA med 1 μM CBP21. Det ble benyttet 180 μm β -kitin og 50 mM natriumacetatbuffer ved pH 6,1.

Tabell 4.5 Formel og R^2 -verdi for den lineære trendlinjen for hvert enzym ved 180 μm β -kitin pH 6,1.

Enzym	Formel	R^2
ChiA	$y = -6467x + 16,1$	0,94
ChiB	$y = -5715x + 12,3$	0,92
ChiC	$y = -3415x + 4,5$	0,98
ChiA m/CBP21	$y = -3528x + 8,1$	0,94

4.7 Aktiveringsparametre

Med utgangspunkt i Eyringanalysen er det mulig å bestemme en rekke aktiveringsparametre, henholdsvis k_{cat}^{app} , ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger og $-T\Delta S^\ddagger$. Parameterene ble funnet ved hjelp av følgende likninger:

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]} \quad (9)$$

$$a = -\frac{\Delta H^\ddagger}{R} \quad (10)$$

$$\Delta G^\ddagger = -RT \ln\left(\frac{k_{cat}h}{k_bT}\right) \quad (11)$$

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (12)$$

k_{cat} er hastigheten på den enzymatiske nedbrytelsen, V_{max} er maksimale hastigheten på reaksjonen. ΔG^\ddagger den frie energien til det aktiverte komplekset, ΔH^\ddagger er aktiveringsentalpien, ΔS^\ddagger er aktiveringsentropien, h er Planks konstant, k_b er Boltzmanns konstant, R er gasskonstanten og T er den absolute temperaturen. Ved hjelp av likning 9, enzymkonsentrasjon og målt hastighet ble k_{cat} bestemt. ΔG^\ddagger ble bestemt ved hjelp av likning 11. Videre ble ΔH^\ddagger bestemt ved hjelp av stigningstallet, a , til linjen i Eyringplottet som er vist i likning 10. $-T\Delta S^\ddagger$ ble bestemt ved hjelp av likning 12. Aktiveringsparametrene presenteres i tabell 4.6 - 4.8.

4.7.1 Aktiveringsparametre for 180 μm β -kitin pH 6,1

Tabell 4.6 inneholder aktiveringsparametrene basert på eyringanalyse på 180 μm β -kitin ved pH 6,1. For ChiA, ChiB og ChiC samt ChiA med CBP21 presenteres verdier for k_{cat}^{app} , ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger og $-T\Delta S^\ddagger$.

Verdien for k_{cat} er størst for ChiA med CBP21, og deretter ChiA fulgt av ChiB og ChiC. ΔG^\ddagger er lik for ChiA, ChiB, ChiC og litt lavere for ChiA med CBP21. ChiA og ChiB har like verdier for ΔH^\ddagger og $-T\Delta S^\ddagger$ og har en stor entalpisk straff på henholdsvis $12,8 \pm 1,3$ og $11,4 \pm 0,2$. Det entropiske bidraget er litt mindre med verdier for $-T\Delta S^\ddagger$ på $4,7 \pm 1,3$ og $7,1 \pm 0,2$. ChiC har motsatte verdier for de to parameterene på henholdsvis $6,8 \pm 0,4$ for ΔH^\ddagger og $-T\Delta S^\ddagger$ på $11,8 \pm 0,4$. ChiA med CBP21 er like mye entalpisk drevet som entropisk og har omtrent like verdier som ChiC.

Tabell 4.6 Aktiveringsparametre for ChiA, ChiB og ChiC samt ChiA med CBP21. Parameterne er beregnet med utgangspunkt i eyringplottene for 180 μm β -kitin ved pH 6,1

Enzym	k_{cat}^{app} ^a	ΔG^\ddagger ^{b,c}	ΔH^\ddagger ^b	$-T\Delta S^\ddagger$ ^{b,c}
<i>180 μm β-kitin pH 6,1</i>				
ChiA	$2,7 \pm 0,4$	$17,6 \pm 0,1$	$12,8 \pm 1,3$	$4,7 \pm 1,3$
ChiB	$0,6 \pm 0,03$	$18,49 \pm 0,03$	$11,4 \pm 0,2$	$7,1 \pm 0,2$
ChiC	$0,5 \pm 0,01$	$18,61 \pm 0,01$	$6,8 \pm 0,4$	$11,8 \pm 0,4$
ChiA m/CBP21	$13,7 \pm 3,5$	$16,6 \pm 0,1$	$7,0 \pm 1,5$	$9,6 \pm 1,5$

^a s^{-1} ^bkcal/mol ^c $T=310,15K$, 50 mM natriumacetatbuffer pH 6,1

4.7.2 Aktiveringsparametre for 3 μm β -kitin pH 6,1

Tabell 4.7 inneholder aktiveringsparametrene basert på eyringanalyse på 3 μm β -kitin ved pH 6,1. For ChiA, ChiB og ChiC samt ChiA med CBP21 presenteres verdier for k_{cat}^{app} , ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger og $-T\Delta S^\ddagger$.

ChiA med CBP21 gir størst verdi for k_{cat} med en verdi på $9,2 \pm 2,7$. ChiA, ChiB og ChiC har lik k_{cat} som er signifikant lavere enn for ChiA med CBP21. Verdien for ΔG^\ddagger er ikke signifikant forskjellig for ChiA, ChiB og ChiC ($17,7 \pm 0,1$, $17,75 \pm 0,03$ og $17,8 \pm 0,1$), mens den er noe lavere for ChiA med CBP21 ($16,8 \pm 0,2$). ChiB og ChiC og har tilnærmet like verdier for både ΔH^\ddagger og $-T\Delta S^\ddagger$. ChiA og ChiA med CBP21 viser stor liket i verdier for både ΔH^\ddagger og $-T\Delta S^\ddagger$. ChiA med CBP21 har en litt større verdi for $-T\Delta S^\ddagger$ enn ChiA alene, men dersom man ser på verdiene sammen med standardavvikene kan man se at verdiene ikke er signifikant forskjellige.

Tabell 4.7 Aktiveringsparametre for ChiA, ChiB og ChiC samt ChiA med CBP21. Parameterne er basert på eyringanalyse for 3 μm β -kitin ved pH 6,1

Enzym	k_{cat}^{app} ^a	ΔG^\ddagger ^{b,c}	ΔH^\ddagger ^b	$-T\Delta S^\ddagger$ ^{b,c}
<i>3 μm β-kitin pH 6,1</i>				
ChiA	$2,2 \pm 0,3$	$17,7 \pm 0,1$	$15,2 \pm 1,0$	$2,5 \pm 1,0$
ChiB	$2,0 \pm 0,1$	$17,75 \pm 0,03$	$7,8 \pm 1,0$	$9,9 \pm 1,0$
ChiC	$1,8 \pm 0,2$	$17,8 \pm 0,1$	$8,3 \pm 1,2$	$9,5 \pm 1,2$
ChiA m/CBP21	$9,2 \pm 2,7$	$16,8 \pm 0,2$	$11,4 \pm 2,5$	$5,4 \pm 2,5$

^a s^{-1} ^b kcal/mol ^c $T=310,15\text{K}$, 50 mM natriumacetatbuffer pH 6,1

4.7.3 Aktiveringsparametre 3 μm β -kitin pH 8,0

Tabell 4.8 inneholder aktiveringsparametrene basert på eyringanalyse på 3 μm β -kitin ved pH 8,0. For ChiA, ChiB og ChiC samt ChiA og ChiB med CBP21 presenteres verdier for k_{cat}^{app} , ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger og $-T\Delta S^\ddagger$.

k_{cat} er størst for forsøkene med CBP21, noe som tyder på at CBP21 har en gunstig effekt på nedbrytningen av kitin. Videre er k_{cat} lavest for ChiC og litt høyere for ChiA og ChiB som har lik k_{cat} . Dette er forventet ettersom ChiA og ChiB degraderer kitin med en prosessiv mekanisme og har høyere spesifikk aktivitet mot kitin enn ChiC. Verdien for ΔG^\ddagger er lik for ChiA, ChiB og ChiC og litt lavere for forsøkene med CBP21. Videre er ΔH^\ddagger og $-T\Delta S^\ddagger$ like for ChiA og ChiB. ChiC har omtrent motsatte verdier for ΔH^\ddagger og $-T\Delta S^\ddagger$ i forhold til ChiA og ChiB. ChiA med CBP21 har like aktiveringsparametre som ChiC. ChiB med CBP21 skiller seg mest ut med en negativ verdi for $-T\Delta S^\ddagger$ og en stor entalpisk straff på $17,0 \pm 0,6$.

Tabell 4.8 Aktiveringsparametre for ChiA, ChiB og ChiC samt ChiA med CBP21 og ChiB med CBP21. Parameterne er basert på eyringanalyse for 3 μm β -kitin ved pH 8,0

Enzym	$k_{cat}^{app\ a}$	$\Delta G^\ddagger\ b,c$	$\Delta H^\ddagger\ b$	$-T\Delta S^\ddagger\ b,c$
<i>3 μm β-kitin pH 8,0</i>				
ChiA	$1,4 \pm 0,2$	$18,0 \pm 0,1$	$10,4 \pm 0,5$	$7,6 \pm 0,5$
ChiB	$1,70 \pm 0,05$	$17,85 \pm 0,02$	$12,5 \pm 0,6$	$5,4 \pm 0,6$
ChiC	$1,00 \pm 0,03$	$18,18 \pm 0,02$	$7,5 \pm 0,4$	$10,7 \pm 0,4$
ChiA m/CBP21	$9,4 \pm 1,1$	$16,8 \pm 0,1$	$7,6 \pm 1,2$	$9,2 \pm 1,2$
ChiB m/CBP21	$15,0 \pm 0,9$	$16,51 \pm 0,04$	$17,0 \pm 0,6$	$-0,5 \pm 0,6$

^a s^{-1} ^bkcal/mol ^c $T=310,15\text{K}$, 20 mM Tris-HCl buffer pH 8,0

5. Diskusjon

I denne oppgaven ble β -kitin med ulik krystallinsk grad, henholdsvis 180 og 3 μm i størrelse, brutt ned av tre kitinaser, ChiA, ChiB og ChiC. ChiA og ChiB er prosessive eksoenzymmer og ChiC er et ikke-prosessivt endoaktivt enzym. Målet med oppgaven var å bestemme aktiveringsparametre for enzymatisk nedbrytning av kitin og se om man på bakgrunn av resultatene kan si noe om forskjeller enzymene i mellom og om aktiveringsparameterne kan brukes som et mål på endoaktivitet. En tanke kan være at siden et endoenzym ikke er avhengig av å finne en kjedeende for nedbrytning av en polymer kan det tenkes at denne vil ha en lavere entropisk straff i overgangstilstanden i forhold til et eksoenzym. I et tidligere arbeid har Zakariassen *et al.* vist at ChiA mot 180 μm β -kitin har en større entropisk straff enn den entalpiske som i så henseende kan tolkes med at eksoenzymmer har stor grad av orden i transition state når binding til substratet, hvilket er det hastighetsbestemmende trinn, skjer. I tillegg var det i forbindelse med dette aktuelt å undersøke om ulikt substrat og ulik pH påvirker aktiveringsparametrene og eventuelt i hvilken grad. Resultatene i denne oppgaven har vært utfordrende å tolke. Noen resultater har vist en tydelig trend, andre ikke.

5.1 Nedbrytningsforsøk

Substratmetningsanalyse ble utført for å bestemme metningspunkt til videre utførelse av eyringanalyse. Metning er viktig for å bestemme V_{max} og videre beregne k_{cat} . Dersom enzymet ikke er mettet med substrat er ikke målt hastighet lik maksimal hastighet og k_{cat} kan få en feilaktig verdi. Forsøket ble utført på 180 og 3 μm β -kitin. 180 μm er mye brukt tidligere og var derfor interessant å bruke videre. Ettersom 3 μm sannsynligvis har mindre krystallinsk grad er det lettere å bryte ned og ble derfor brukt for å sammenligne med 180 μm kitin. Forsøkene ble gjort ved to ulike grader av pH, henholdsvis 6,1 og 8,0.

5.1.1 Substratmetningsanalyse 3 μm β -kitin

Metningsplott ble laget for 3 μm kitin ved pH 6,1 og pH 8,0. Begge forsøkene som ble utført på 3 μm viste metning ved 20 mg/mL kitin for ChiA, ChiB og ChiC. Forsøket ved pH 6,1 viste tydeligere metning for ChiA og ChiB ved 20 mg/mL enn ved pH 8,0.

5.1.2 Substratmetningsanalyse 180 μm β -kitin

Substratmetningsanalyse viste metning ved 20 mg/mL for ChiA, ChiB og ChiC, ved bruk av 180 μm kitin, pH 6,1. Metningsplott for 180 μm kitin ved pH 8,0 viste ikke metning ved konsentrasjoner under 70 mg/mL. Det ble derfor ikke gjort videre forsøk ved disse betingelsene. Det ble observert en tydeligere metning ved 20 mg/mL ved pH 6,1 enn pH 8,0 ved bruk av 3 μm kitin og ingen metning ved pH 8,0 for 180 μm kitin. På bakgrunn av dette tyder det på at pH påvirker enzym og/eller substrat slik at metning ikke kan observeres. At metning inntreffer for 3 μm kitin ved pH 8,0 og ikke for 180 μm kitin skyldes muligens at 3 μm generelt er lettere å degradere enn 180. Ettersom ChiA, ChiB og ChiC har brede pH – og temperaturoptimum i forhold til aktivitet er det overraskende at forskjell i pH gir så stor forskjell i resultatet.

5.1.3 Nedbrytning av 180 μm β -kitin ved pH 6,1

Enzymatisk nedbrytning av 180 μm β -kitin ved pH 6,1 ved hjelp av ChiA er blitt studert tidligere av Zakariassen *et al* (Zakariassen *et al.* 2010). Resultatene fra Zakariassen *et al.* samsvarer ikke med resultatene som har kommet fram i denne oppgaven. Se tabell 5.1 for sammenligning av verdier. Den entropiske straffen er høyere og det entalpiske bidraget er lavere. I tillegg viser resultatene en fem ganger så lav apparent k_{cat} . Verdien for ΔG^\ddagger er omtrentlig like i begge forsøkene. I tillegg viser ChiA tydelig substratmetning ved 10 mg/mL i Zakariassen sine forsøk. Dette substratmetningsforsøket ble utført på vannbad ved 26,5 °C uten risting. Etter tilsatt enzym ble rørene blandet manuelt med jevne mellomrom. Forsøkene som ble utført i denne oppgaven ble utført på thermomikser ved 800 rpm og 37 °C. På bakgrunn av dette tyder det på at de ytre forholdene er årsaken til de ulike resultatene. ChiA har et bredt temperaturoptimum. At en forskjell i temperatur på 10 grader gir så store variasjoner er lite trolig. En faktor som muligens kan påvirke resultatet er dermed ristingen/blandingen.

Tabell 5.1 Aktiveringsparametre for ChiA ved hydrolyse av 180 μm β -kitin pH 6,1.Sammenligning av verdier fra Zakariassen *et. al.* og denne oppgaven

Enzym	$k_{cat}^{app\ a}$	$\Delta G^{\ddagger\ b,c}$	$\Delta H^{\ddagger\ b}$	$-T\Delta S^{\ddagger\ b,c}$
<i>180 μm β-kitin pH 6,1</i>				
ChiA Zakariassen*	$0,54 \pm 0,04$	$18,6 \pm 0,1$	$4,7 \pm 0,5$	$13,9 \pm 0,4$
ChiA	$2,7 \pm 0,4$	$17,6 \pm 0,1$	$12,8 \pm 1,3$	$4,7 \pm 1,3$

^a s^{-1} ^bkcal/mol ^c $T=310,15K$, 50 mM natriumacetatbuffer pH 6,1* Verdier er hentet fra Zakariassen *et. al* 2010

Det er benyttet samme konsentrasjon av enzym, og samme substrat og buffer i de to forsøkene. På bakgrunn av det er det sannsynlig at forskjeller i utførelse av metoden er årsaken til ulikhetene. Dersom rørene ikke blir ristet skikkelig er det mulig at substratet blir liggende oppå hverandre i bunnen av røret. Dette kan muligens føre til at en del av ChiA-molekylene ikke har fått tilgang på substrat på grunn av fysisk utilgjengelighet. Dersom dette er tilfellet kan muligens forsøket vise metning ved lavere substratkonsentrasjon enn det som er reelt.

Som tidligere nevnt bindes kitintråder sammen ved hydrogenbindinger. Løselige dimerer som stammer fra nedbrytningen av substrat kan dermed reassosieres til kitintrådene. Ved risting på 800 rpm vil det være større sannsynlighet for at dimerene ikke reassosierer ettersom dimerene kan bli spredt ut over et større område. Ved mer forsiktig blanding er det større sannsynlighet for at dimerene legger seg oppå eller i nærheten av substratet og legger forholdene mer til rette for reassosiering. Dersom det blir målt et lavere antall dimerer i en prøve enn det som egentlig er dannet kan hastigheten som bestemmes være lavere enn det som er reelt. Følgelig vil en beregnet k_{cat} -verdi også blir feilaktig.

Hva som beskriver virkeligheten i størst grad av de to forsøkene er bare noe man kan spekulere i. Risting ved 800 rpm legger sannsynligvis forholdene mer til rette for degradering av substrat, men blanding ved jevne mellomrom gjenspeiler kanskje virkeligheten mer enn risting ved 800 rpm.

5.2 Aktiveringsparametre

Aktiveringsparametre ble bestemt for ChiA, ChiB og ChiC samt ChiA med CBP21 og i et tilfelle også ChiB med CBP21. Enzymatisk nedbrytelse av kitin ble gjort på 180 μm og 3 μm β -kitin ved pH 6,1 og på 3 μm ved pH 8,0. Felles for aktiveringsparametrene er en positiv verdi for ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger og $-T\Delta S^\ddagger$, det vil si en negativ verdi for ΔS^\ddagger . Dette betyr at alle reaksjonene har brudd på flere bindinger enn det dannes og at det er større grad av orden enn ved startreaksjon, i transition state (Mathews et al. 2000). For lettere å sammenligne verdier for aktiveringsparametrene presenteres verdier for ΔH^\ddagger og $-T\Delta S^\ddagger$ for ChiA, ChiB og ChiC og CBP21 i tabell 5.2-5.5. I tabell 5.5 er standardavvik lagt til eller trukket fra for å vise at verdiene ikke er signifikant forskjellig fra hverandre.

5.2.1 Forandring i Gibbs frie energi - ΔG^\ddagger

For hvert forsøk med de ulike kitinasene er ΔG^\ddagger omtrentlig de samme (17,6-18,6). Forsøkene som ble gjort med ChiA og ChiB med CBP21 som hjelpeenzym viser en litt lavere verdi for ΔG^\ddagger . En lavere verdi for ΔG^\ddagger tilsier at reaksjonen ikke er like energetisk krevende som for ChiA eller ChiB uten CBP21. Det tyder på at CBP21 har en gunstig effekt på nedbrytningen av krystallinsk kitin, noe som tidligere studier også har vist (Vaaje-Kolstad et al. 2010).

5.2.2 Aktiveringsparametre for ChiA og ChiB

ChiA og ChiB har, som tidligere nevnt, mange likhetstrekk. De er begge eksoaktive prosessive enzymer som degraderer kitin fra motsatte sider. På bakgrunn av dette kan man anta at aktiveringsparameterene for binding mellom enzym og substrat vil være lik for de to. Resultatene har derimot vist litt forskjeller mellom de to enzymene. Dette vil bli diskutert i kapittel 5.2.2.1 og 5.2.2.2.

Tabell 5.2 Oversikt over verdier for ΔH^\ddagger og $-T\Delta S^\ddagger$ for ChiA for de ulike forsøkene

ChiA	ΔH^\ddagger	$-T\Delta S^\ddagger$
180 μm β -kitin pH 6,1	$12,8 \pm 1,3$	$4,7 \pm 1,3$
3 μm β -kitin pH 6,1	$15,2 \pm 1,0$	$2,5 \pm 1,0$
3 μm β -kitin pH 8,0	$10,4 \pm 0,5$	$7,6 \pm 0,5$

Tabell 5.3 Oversikt over verdier for ΔH^\ddagger og $-T\Delta S^\ddagger$ for ChiB for de ulike forsøkene

ChiB	ΔH^\ddagger	$-T\Delta S^\ddagger$
180 μm β -kitin pH 6,1	$11,4 \pm 0,2$	$7,1 \pm 0,2$
3 μm β -kitin pH 6,1	$7,8 \pm 1,0$	$9,9 \pm 1,0$
3 μm β -kitin pH 8,0	$12,5 \pm 0,6$	$5,4 \pm 0,6$

Tabell 5.4 Oversikt over verdier for ΔH^\ddagger og $-T\Delta S^\ddagger$ for de ulike forsøkene som ble utført med CBP21 som hjelpeenzym og de samme forsøkene uten CBP21

Forsøk	ΔH^\ddagger	$-T\Delta S^\ddagger$
180 μm β -kitin pH 6,1 ChiA med CBP21	$7,0 \pm 1,5$	$9,6 \pm 1,5$
180 μm β -kitin pH 6,1 ChiA	$12,8 \pm 1,3$	$4,7 \pm 1,3$
3 μm β -kitin pH 6,1 ChiA med CBP21	$11,4 \pm 2,5$	$5,4 \pm 2,5$
3 μm β -kitin pH 6,1 ChiA	$15,2 \pm 1,0$	$2,5 \pm 1,0$
3 μm β -kitin pH 8,0 ChiA med CBP21	$7,6 \pm 1,2$	$9,2 \pm 1,2$
3 μm β -kitin pH 8,0 ChiA	$10,4 \pm 0,5$	$7,6 \pm 0,5$
3 μm β -kitin pH 8,0 ChiB med CBP21	$17,0 \pm 0,6$	$-0,5 \pm 0,6$
3 μm β -kitin pH 8,0 ChiB	$12,5 \pm 0,6$	$5,4 \pm 0,6$

5.2.2.1 Aktiveringsparametre 180 μm β -kitin pH 6,1

Ved 180 μm β -kitin som substrat har ChiA og ChiB like aktiveringsparametre for både ΔH^\ddagger og $-T\Delta S^\ddagger$. For det entalpiske bidraget er verdien for ChiA og ChiB henholdsvis 11,5 og 11,6. For $-T\Delta S^\ddagger$ er verdiene 6,0 for ChiA og 6,9 for ChiB. Verdiene er ikke signifikant forskjellige fra hverandre. Ettersom binding til kitin er det hastighetsbestemmende trinn i enzymkatalysen, tyder dette på at ved hydrolyse av 180 μm β -kitin ved pH 6,1 binder ChiA og ChiB like sterkt til substratet samt at det å finne en tilgjengelig polymertråd er like energikrevende for de to.

5.2.2.2 Aktiveringsparametre 3 μm β -kitin pH 6,1

Dersom man studerer aktiveringsparameterene når 3 μm β -kitin ble benyttet som substrat ser man større forskjeller mellom ChiA og ChiB. Verdien for ΔG^\ddagger er, som tidligere nevnt, like for ChiA og ChiB. Verdiene for entalpi – og entropiforandringene er ulike, henholdsvis $15,2 \pm 1,0$ (ChiA) og $7,8 \pm 1,0$ (ChiB) for ΔH^\ddagger og $2,5 \pm 1,0$ og $9,9 \pm 1,0$ for $-T\Delta S^\ddagger$. Dette tyder på at binding til 3 μm β -kitin er mer entalpisk drevet enn entropisk for ChiA og omvendt for ChiB. I tillegg er det verdiene for ChiB som forandres ved forandring i substrat, verdiene for ChiA er lik ved både 180 og 3 μm β -kitin ved pH 6,1. Dette tyder på at forskjeller i substrat gir større utslag for ChiB enn ChiA. Fra 180 μm β -kitin som substrat til 3 μm for ChiB går entalpien litt ned og entropien litt opp. Forandringene kan tyde på at binding til 3 μm β -kitin er svakere enn for 180 μm β -kitin og at det er litt mer entropisk krevende å få tilgang på kitinkjeden. En årsak til dette kan være modifiseringen kitinet går gjennom ved dannelsen av 3 μm . I denne prosessen blir ofte større kitinpartikler knust for å danne mindre partikler. På denne måten kan den opprinnelige strukturen ødelegges slik at affiniteten mellom kitin og enzym påvirkes.

5.2.3 Aktiveringsparametre for ChiC

ChiC er et endoaktivt enzym som kan binde seg på tilfeldige steder langs kitinkjeden. I tillegg er enzymet ikke-prosessivt og forblir dermed ikke bundet til substrat under påfølgende hydrolyser. Ikke-prosessiv hydrolyse anses å være mer ugunstig en prosessiv hydrolyse ved

nedbrytning av uløselige substrater. Som tidligere nevnt er verdien for ΔG^\ddagger omtrentlig lik for ChiA, ChiB og ChiC og er også lik for ChiC ved de ulike forsøkene som ble utført.

Nedbrytning av kitin ved ulik størrelse og ved ulik pH viser liten forskjell i aktiveringsparametrene for ChiC. I tabell 5.3 vises verdiene for ΔH^\ddagger og $T\Delta S^\ddagger$. Verdiene viser ingen signifikant forskjell fra hverandre innen hver parameter. Dette tyder på at tilgjengeligheten til substrat og pH-styrke har liten påvirkning på nedbrytningen. Dette kan stemme overens med endoaktiviteten til ChiC og enzymets evne til å feste seg til substrat på tilfeldige steder. Denne egenskapen kan muligens gjøre det lettere for ChiC å tilpasse seg i forhold til substrat og ulike ytre påvirkning.

Tabell 5.5 Oversikt over verdier for ΔH^\ddagger og $-T\Delta S^\ddagger$ for ChiC for de ulike forsøkene som ble utført. Standardavvik er trukket fra eller lagt til for å demonstrere at verdiene ikke er signifikant forskjellig innenfor eksperimentelle feil

ChiC	ΔH^\ddagger	$-T\Delta S^\ddagger$
180 μm β -kitin pH 6,1	7,2	11,4
3 μm β -kitin pH 6,1	7,1	10,7
3 μm β -kitin pH 8,0	7,1	11,1

5.2.4 Hastighetskonstanten k_{cat}

k_{cat} er hastighetskonstanten for nedbrytning av enzym-substratkomplekset og beskriver hvor mange ganger hvert enzymmolekyl katalyserer reaksjonen per sekund. k_{cat} er dermed en mål på hastighet på nedbrytelsen og benyttes til karakterisering av enzymer.

For 180 μm pH 6,1 er k_{cat} størst for ChiA med et verdi som er omtrent tre ganger så stor enn verdien for ChiB og ChiC. Dette stemmer overens med at ChiA har en høyere spesifikk aktivitet mot kitin enn de to resterende kitinasene (se kapittel 4.4). ChiA med CBP21 har en verdi for k_{cat} som er omtrent 5 ganger så stor som for ChiA alene. Dette er forenelig med at

CBP21 generelt gjør substratet mer tilgjengelig for hydrolyse ettersom den lager mer frie ender på substratet.

For hydrolyse av 3 μm kitin holder verdien for k_{cat} seg stabil for ChiA og ChiA med CBP21. For ChiB og ChiC går k_{cat} -verdien opp. Oppgang i verdien for k_{cat} kan tyde på at substratet er mer tilgjengelig, noe som kan være forenelig med at 3 μm kitin er generelt lettere å bryte ned i forhold til 180 μm . For hydrolyse av 3 μm kitin ved pH 8,0 går k_{cat} -verdien litt ned for ChiA, ChiB og ChiC i forhold til hydrolyse av 3 μm kitin ved pH 6,1. ChiA med CBP21 er lik som ved pH 6,1. ChiB med CBP21 har en k_{cat} som er åtte ganger så stor som for ChiB alene. Dette viser som tidligere forsøk at CBP21 gjør substratet mer tilgjengelig for hydrolyse.

5.3 pH-avhengighet

Aktiveringsparametrene forandrer seg fra pH 6,1 til pH 8,0 på 3 μm kitin for ChiA og ChiB. For ChiA går ΔH^\ddagger ned og $-T\Delta S^\ddagger$ litt opp. Dette kan tyde på at ChiA bindes svakere til substrat ved høyere pH og at det blir vanskeligere for enzymet å få tilgang på substratet. For ChiB går ΔH^\ddagger opp og $-T\Delta S^\ddagger$ litt ned, altså omvendt vei i forhold til ChiA. Ettersom både ChiA, ChiB og ChiC har et bredt pH-optimum er det litt overraskende at en forandring i to pH-enheter skal ha så stor effekt på parameterene. Likevel ser man at metningsplott for 180 μm kitin ved pH 8,0 ikke viser metning under 70 mg/mL. Dette er 3,5 ganger så høy konsentrasjon av substrat enn metningspunktet ved pH 6,1. At pH har en effekt på den enzymatiske nedbrytningen av kitin i disse forsøkene er tydelig, men akkurat hvordan er vanskelig å si. På bakgrunn av pK_a -verdi kan et residu være protonert ved en pH-verdi og deprotonert ved en annen. Protonering/deprotonering kan gi forskjeller i binding til substrat ved ulik pH (Synstad et al. 2004). Dette er blant annet vist for allosamidin (Cederkvist et al. 2007).

5.4 Oppsummering

På bakgrunn av aktiveringsparametre ser det ut til at ChiA og ChiB påvirkes av typen substrat som brytes ned og av pH. Det ser ut til at de blir påvirket ulikt ettersom verdiene for ΔH^\ddagger - $T\Delta S^\ddagger$ forandrer seg i motsatt retning for de to kitinasene. I motsetning til ChiA og ChiB påvirkes ChiC lite av forskjeller i substrat og pH. Verdier for k_{cat} viser at kitin brytes raskere ned ved pH 6,1 enn pH 8,0 og ved tilstedeværelsen av CBP21. Det er vanskelig å se at bruk av eyringanalyse kan være et godt mål for endoaktivitet basert på resultater som er fremskaffet under dette arbeidet. Til det er observerte forskjeller for spesielt ChiA og ChiB for varierende med hensyn på pH og substrat. Dette viser viktigheten av hva slags substrat man benytter og at man kjenner dette er viktig før en trekker dyptrekkende konklusjoner.

6. Videre arbeid

Denne studien har blitt opphav til noen interessante trender og til litt forvirring. Ettersom aktiveringsparametrene for ChiA mot 180 μm β -kitin har vist seg å være forskjellig fra tidligere publiserte resultater vil det være av interesse å finne ut hva disse forskjellen skyldes. Det vil være nødvendig å utføre forsøkene på ny, med like betingelser for å avdekke om utførelsen av metode har noen påvirkning på resultatet eller om en systematisk feil er årsaken.

Ettersom typen substrat har vist seg å påvirke aktiveringsparametrene for ChiA og ChiB vil videre studier på dette være gunstig. Mange studier blir utført på ulik substrat og dersom resultatet avhenger mye av substratet vil det være fordelaktig å standardisere dette ved framtidige studier. Ved ulik pH viser både resultatene fra substratmetningsanalysen og aktiveringsparameterne ulikheter. Dette er litt motstridene med at ChiA, ChiB og ChiC har brede pH-optimum. På bakgrunn av dette vil flere forsøk med en bredere pH-skala enn kun pH 6,1 og 8,0 muligens kunne gi mer informasjon om hvordan reaksjonen påvirkes av pH.

Ettersom aktiveringsparametrene for ChiC forblir uforandret ved ulik pH og ulikt substrat vil det være interessant å se på hvordan ChiC påvirkes av CBP21. I tillegg kunne det være av interesse å utføre flere nedbrytningsforsøk med flere pH-verdier for å se om det har noen påvirkning.

7. Referanser

- Aachmann, F. L., Sørli, M., Skjåk-Bræk, G., Eijsink, V. G. H. & Vaaje-Kolstad, G. (2012). NMR structure of a lytic polysaccharide monooxygenase provides insight into copper binding, protein dynamics, and substrate interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 (46): 18779-18784.
- Aam, B. B., Heggset, E. B., Norberg, A. L., Sørli, M., Vårum, K. M. & Eijsink, V. G. H. (2010). Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine. *Marine Drugs*, 8: 1482-1517.
- Bernatek, E. R. & Uggerud, E. (2013). *Karbohydrater*: Store norske leksikon. Tilgjengelig fra: <http://snl.no/karbohydrater> (lest 10.04.2013).
- Brurberg, M. B., Synstad, B., Klemsdal, S. S., Van Aalten, D. M., Sundheim, L. & Eijsink, V. G. H. (2000). Chitinases from *Serratia marcescens* *Recent Research Developments in Microbiology*.
- Cederkvist, F. H., Saua, S. F., Karlsen, V., Sakuda, S., Eijsink, V. G. H. & Sørli, M. (2007). Thermodynamic Analysis of Allosamidin Binding to a Family 18 Chitinase. *Biochemistry*, 46 (43): 12347-12354.
- Cederkvist, F. H., Parmer, M. P., Vårum, K. M., Eijsink, V. G. H. & Sørli, M. (2008). Inhibition of a Family 18 Chitinase by Chitooligosaccharides. *Carbohydr.Polym.*, 74: 41-49.
- Chang, R. (2005). *Physical chemistry for the Biosciences*: University Science Books.
- Davies, G. & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3 (9): 853-9.
- Davies, G. J., Wilson, K. S. & Henrissat, B. (1997). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem. J.*, 321 (2): 557-559.
- Dutta, P. K., Dutta, J. & Tripathi, V. S. (2004). Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Sientific & Industrial Research*, 63 (January): 20-31.
- Eijsink, V. G. H., Vaaje-Kolstad, G., Vårum, K. M. & Horn, S. J. (2008). Towards new enzymes for biofuels: lessons from chitinase research. *Trends Biotechnol.*, 26 (5): 228-235.
- Eijsink, V. G. H., Vaaje-Kolstad, G., Vårum, K. M. & Horn, S. J. (2008). Towards new enzymes for biofuels: lessons from chitinase research. *Trends Biotechnol.*, 26 (5): 228-35.

- ExpTec. (2003). *Commonly used bacterial E.coli culture media in microbiology or molecular biology*. Tilgjengelig fra: <http://www.exptec.com/Reagents/Common Media.htm> (lest 23.03.2013).
- Fukamizo, T. (2000). Chitinolytic Enzymes Catalysis, Substrate Binding, and their Application. *Current Protein and Peptide Science*, 1: 105-124.
- Gupta, B., Arora, A., Saxena, S. & Alam, M. S. (2009). Preparation of chitosan–polyethylene glycol coated cotton membranes for wound dressings: preparation and characterization. *Polymers for advanced technologies*, 20: 58-65.
- Hart, J. D., Hadad, M. C., Craine, E. L. & Hart, H. (2012). *Organic Chemistry, A brief course*: Brooks/Cole, Cengage Learning.
- Henrissat, B. (1991). A Classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino-Acid-Sequence Similarities. *Biochem. J.*, 280: 309-316.
- Horn, S. J., Sikorski, P., Cederkvist, J. B., Vaaje-Kolstad, G., Sørlie, M., Synstad, B., Vriend, G., Vårum, K. M. & Eijsink, V. G. H. (2006a). Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A*, 103 (48): 18089-18094.
- Horn, S. J., Sørbotten, A., Synstad, B., Sikorski, P., Sørlie, M., Vårum, K. M. & Eijsink, V. G. H. (2006b). Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. *FEBS J.*, 273 (3): 491-503.
- Hult, E. L., Katouno, F., Uchiyama, T., Watanabe, T. & Sugiyama, J. (2005). Molecular directionality in crystalline beta-chitin: hydrolysis by chitinases A and B from *Serratia marcescens* 2170. *Biochem. J.*, 388 (Pt 3): 851-856.
- Invitrogen*. (2013). Quant-iT™ Technology: Life Technologies Tilgjengelig fra: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Product-Brand/Quant-iT.html?icid=fr-quant-1> (lest 08.04.2013).
- Kumar, M. N. V. R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Elsevier*, 46: 2.
- Lesk, M. A. (2010). *Introduction to Protein Science* Oxford University Press.
- Mathews, C. K., van Holde, K. E. & Ahern, K. G. (2000). *Biochemistry, Third Edition*: Addison Wesley Longman.
- Miller, I., Crawford, J. & Gianazza, E. (2006). Protein stains for proteomic applications: Which, when, why? *Proteomics* (6): 5385-5408.
- Miller, J. M. (2005). *Chromatography Concepts & Contrasts*. 2.utgave utg. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

- Millipore. (2013). *Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units*. Tilgjengelig fra: <http://www.millipore.com/catalogue/module/c7715> (lest 06.05.2013).
- Payne, C. M., Baban, J., Synstad, B., Backe, P. H., Arvai, A. S., Dalhus, B., Bjørås, M., Eijsink, V. G. H., Sørli, M., Beckham, G. T., et al. (2012). Hallmarks of processivity in glycoside hydrolases from computational and crystallographic studies of the *Serratia marcescens* chitinases. *Submitted Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*
- 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 Å resolution. *Structure.*, 2 (12): 1169-1180.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.*, 31 (7): 603-632.
- Rye, C. S. & Withers, S. G. (2000). Glycosidase mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4 (5): 573-580.
- Sigma-Aldrich. (2013a). *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*. Tilgjengelig fra: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/i6758?lang=en®ion=NO> (lest 06.05.2013).
- Sigma-Aldrich. (2013b). *Phenylmethanesulfonyl fluoride*. Tilgjengelig fra: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p7626?lang=en®ion=NO> (lest 02.04.2013).
- Sikorski, P., Sørbotten, A., Horn, S. J., Eijsink, V. G. H. & Vårum, K. M. (2006). *Serratia marcescens* chitinases with tunnel-shaped substrate-binding grooves show endo activity and different degrees of processivity during enzymatic hydrolysis of chitosan. *Biochemistry*, 45 (31): 9566-9574.
- Sinnott, M. L. (1990). Catalytic Mechanisms of Enzymatic Glycosyl Transfer. *Chem. Rev.*, 90 (7): 1171-1202.
- 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. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66 (5): 1075-1083.
- Synowiecki, J. & Al-Khateeb, N. A. (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Crit. Rev. Food Sci.*, 43 (2): 145-171.
- 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. *Eur. J. Biochem.*, 271 (2): 253-262.

- Sørli, M., Zakariassen, H., Norberg, A. L. & Eijsink, V. G. H. (2012). Processivity and substrate-binding in family 18 chitinases. *Biocatal.Biotransfor.*, 30 (3): 1-13.
- Tews, I., Terwisscha van Scheltinga, A. C., Perrakis, A., Wilson, K. S. & Dijkstra, B. W. (1997). Substrate-assisted catalysis unifies two families of chitinolytic enzymes. *J. Am. Chem. Soc.*, 119 (34): 7954-7959.
- Tortora, J. G., Funke, R. B. & Case, L. C. (2007). *Microbiology, an introduction*. San Francisco: Pearson Education, Inc.
- Vaaje-Kolstad, G., Houston, D. R., Riemen, A. H. K., Eijsink, V. G. H. & van Aalten, D. M. F. (2005). Crystal structure and binding properties of the *Serratia marcescens* chitin-binding protein CBP21. *J. Biol. Chem.*, 280 (12): 11313-11319.
- Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Horn, S. J., Liu, Z., Zhai, H., Sørli, M. & Eijsink, V. G. H. (2010). An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides. *Science*, 330 (6001): 219-222.
- Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., Sørli, M. & Eijsink, V. G. H. (2013). The Chitinolytic machinery of *Serratia marcescens* - a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *FEBS Journal*: 1-22.
- 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. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 97 (11): 5842-5847.
- 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. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 98 (16): 8979-8984.
- Withers, S. G. (2001). Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydr. Polym.*, 44 (4): 325-337.
- Zakariassen, H., Eijsink, V. G. H. & Sørli, M. (2010). Signatures of activation parameters reveal substrate-dependent rate determining steps in polysaccharide turnover by a family 18 chitinase. *Carbohydr.Polym.*, 81 (1): 14-20.

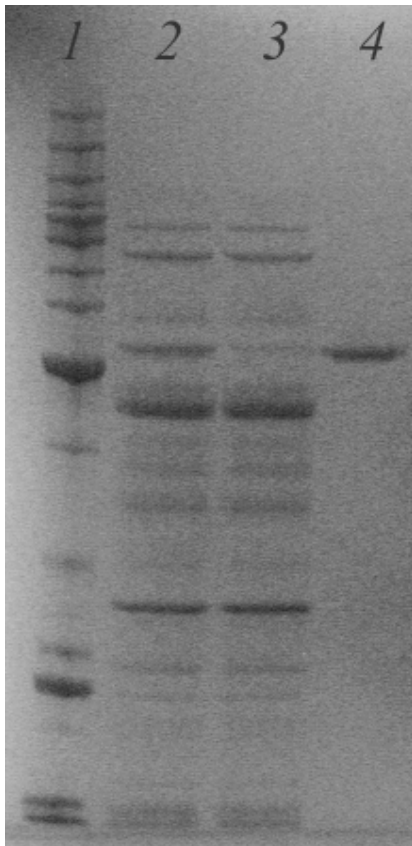
8. Vedlegg

8.1 Vedlegg 1 - SDS-Gel

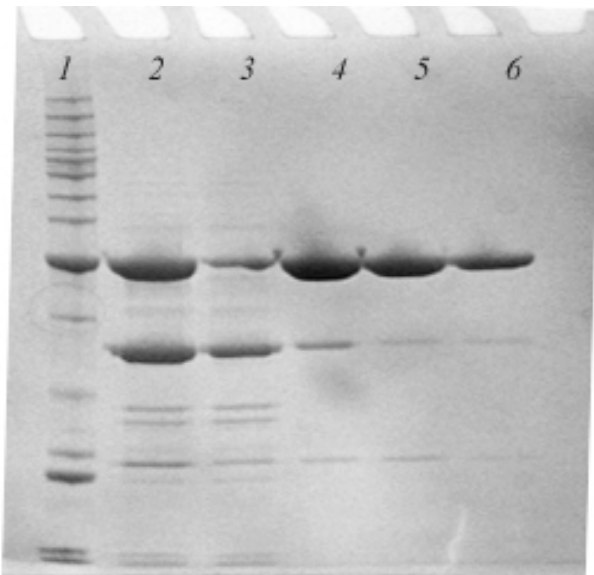
Under presenteres gelbilder fra rensset ChiA, ChiB, ChiC og CBP21.



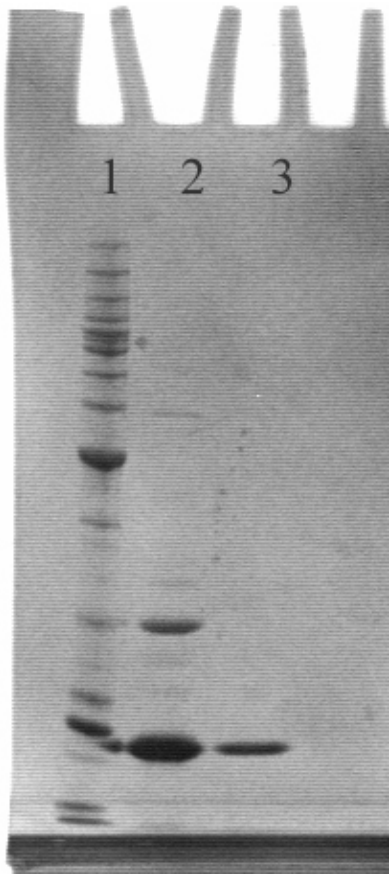
Figur 8.1 Gelbilde etter rensing av Chia. Brønn 1 inneholder stige, brønn 2 inneholder eluat fra voiden og brønn 3 inneholder rensset ChiA.



Figur 8.2 Gelbilde etter rensset ChiB. Brønn 1 inneholder stige, brønn 2 inneholder periplasmatisk ekstrakt før rens, brønn 3 inneholder eluat fra voiden og rensset ChiB er i brønn 4.



Figur 8.3 Gelbilde etter rensset ChiC. Brønn 1 inneholder stige, brønn 2 inneholder periplasmatisk ekstrakt før rens, brønn 3 inneholder eluat fra voiden og brønn 4-6 inneholder rensset ChiC.



Figur 8.4 Gelbilde etter rens av CBP21. Brønn 1 er stige, brønn 2 er eluat fra voidtoppen og brønn 3 er renset CBP21.