



## **Forord**

Denne masteroppgaven ble utført ved Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM) ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) i perioden januar 2013 - mai 2014. Studiet har vært del av et større forskningsprosjekt ved Bioorganisk forskningsgruppe i samarbeid med Protein Engineering and Proteomics (PEP) gruppen.

Først og fremst vil jeg takke min hovedveileder Morten Sørli for god veiledning, oppfølging og oppmuntring gjennom masterløpet. I tillegg vil jeg rette en stor takk til mine medveiledere Anne Grethe Hamre og Kristine B. Eide for uvurderlig hjelp og veiledning. Videre vil jeg takke medstudenter for å ha bidratt til mye hygge og latter på og utenfor laben. Jeg vil også gi en ekstra stor takk til medstudent Daniel Schaupp for hjelp med dyrking og rensing av proteiner. Til slutt vil jeg takke familie, venner og kjæreste for støtte og oppmuntring.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Ås, mai 2014

Matilde Mengkrog Holen



# Innholdsfortegnelse

<b>Forord</b> .....	<b>I</b>
<b>Innholdsfortegnelse</b> .....	<b>III</b>
<b>Sammendrag</b> .....	<b>VII</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>IX</b>
<b>Forkortelser</b> .....	<b>XI</b>
<b>1. Introduksjon</b> .....	<b>1</b>
1.1 Karbohydrater.....	1
1.2 Kitin og kitosan .....	2
1.2.1 Strukturen til kitin.....	2
1.2.2 Anvendelser av kitin og kitosan .....	3
1.3 Glykosylhydrolaser .....	4
1.3.1 Struktur.....	4
1.3.2 Mekanisme .....	6
1.3.2.1 Inverterende mekanisme.....	6
1.3.2.2 Bevarende mekanisme.....	7
1.3.3 Prosessivitet.....	8
1.4 Kitinaser .....	9
1.4.1 Substrat-assistert mekanisme.....	9
1.4.2 Kitinaser fra <i>Serratia marcescens</i> .....	10
1.4.2.1 ChiA og ChiB .....	11
1.4.2.2 ChiC.....	13
1.4.3 Prosessivitet og direksjonalitet .....	14
1.5 Termodynamiske parametere ved protein-ligand interaksjoner .....	16
1.5.1 Likevektskonstanten ( $K_a$ ) og Gibbs fri bindingsenergi ( $\Delta G_r^\circ$ ).....	16
1.5.2 Bindingsentalpi ( $\Delta H_r^\circ$ ) .....	17
1.5.3 Bindingsentropi ( $\Delta S_r^\circ$ ) .....	18

1.5.4	Endring i varmekapasitet ( $\Delta C_p$ ).....	18
1.5.5	Isoterm titreringskalorimetri (ITC).....	19
1.6	Mål med oppgaven .....	22
<b>2.</b>	<b>Materialer.....</b>	<b>23</b>
2.1	Laboratorieutstyr .....	23
2.2	Programvare til dataanalyse .....	25
2.3	Kjemikalier.....	26
2.4	Proteiner, enzymer og substrater .....	28
2.5	Medier .....	29
2.5.1	Selvlagde medier .....	29
2.5.2	Ferdige medier.....	29
2.6	Bakteriestammer og vektorer .....	30
2.7	Kit.....	30
2.8	Buffere og løsninger .....	31
<b>3.</b>	<b>Metoder .....</b>	<b>33</b>
3.1	Design av mutant.....	33
3.1.1	Design av primere.....	33
3.1.2	Oppdyrking av bakteriestamme.....	34
3.1.3	Isolering av plasmid fra cellekultur.....	34
3.1.4	Måling av DNA-konsentrasjon med NanoDrop.....	35
3.1.5	Seterettet mutagenese .....	36
3.1.6	Polymerase kjedereaksjon (PCR) og DpnI behandling .....	38
3.1.7	Utfelling av plasmid .....	39
3.1.8	Transformering av plasmid inn i One Shot® TOP10 superkompetente celler.....	39
3.1.9	Oppdyrking av transformanter .....	40
3.1.10	Isolering av plasmid til sekvensering .....	40
3.1.11	Tillaging av sekvenseringsreaksjoner.....	40
3.1.12	Transformering av plasmid inn i One Shot® BL21 star (DE3) celler.....	41
3.1.13	Oppdyrking av transformanter .....	42

3.1.14	Tillaging av frysekultur .....	42
3.2	Tillaging av histidin (his)-taggede kitinaser .....	43
3.2.1	Transformering av pET-16b inn i One Shot® TOP10 superkompetente celler .....	43
3.2.2	Restriksjonskutting av pET-16b med XhoI og NdeI .....	44
3.2.3	Analyse av DNA ved hjelp av agarose-gelelektroforese .....	44
3.2.4	Oppamplifisering av DNA med kuttsetter for NdeI og XhoI .....	46
3.2.5	Analyse av DNA ved hjelp av agarose-gelelektroforese .....	47
3.2.6	Isolering av kitinase- og pET-16b DNA fra agarosegel .....	48
3.2.7	Ligering av pET-16b med ønsket DNA .....	49
3.2.8	Transformering av ligeringsprodukt inn i One Shot® TOP10 superkompetente celler	50
3.2.9	Kontroll av transformanter med Taq DNA polymerase .....	50
3.2.10	Tillaging av sekvenseringsreaksjoner.....	52
3.2.11	Transformering av his-tagget plasmid inn i One Shot® BL21 star (DE3) celler .....	52
3.2.12	Tillaging av frysekultur .....	52
3.3	Uttrykking av his-taggede kitinaser.....	53
3.3.1	Overekspresjon av his-taggede kitinaser .....	53
3.3.2	Uttrykking av his-taggede kitinaser med Rosetta™ 2(DE3) kompetente celler.....	54
3.3.3	Tillaging av periplasmatiske ekstrakt.....	54
3.3.4	Tillaging av cytoplasmatiske ekstrakt .....	55
3.4	Rensing av his-taggede kitinaser .....	56
3.4.1	Rensing av his-tagget kitinase med nikkelkolonne .....	56
3.4.2	Hydrofob interaksjonskromatografi (HIC) .....	57
3.4.3	Natriumdodecylsulfat polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE).....	58
3.4.4	Spesifikk enzymaktivitet .....	59
3.4.5	Oppkonsentrering og bytting av buffer .....	60
3.4.6	Bestemmelse av proteinkonsentrasjon med Bradford-metoden .....	61
3.4.7	Isoterm titreringskalorimetri (ITC).....	62
<b>4.</b>	<b>Resultater .....</b>	<b>63</b>
4.1	Seterrettet mutagenese .....	63

4.2	Residuanalyse .....	64
4.3	His-tagging .....	65
4.3.1	Restriksjonskutting av pET-16b med NdeI og XhoI .....	65
4.3.2	Oppamplifisering av DNA med kuttsetter for NdeI og XhoI .....	66
4.3.3	Kontroll av transformanter med Taq DNA polymerase .....	67
4.4	Optimalisering av proteinekspressjonen .....	68
4.5	Rensing av his-taggede kitinaser .....	70
4.5.1	Rensing av his-taggede kitinaser med nikkelkolonne .....	70
4.5.2	Separasjon av his-tagget ChiC-E141Q med HIC .....	73
4.5.3	Bestemmelse av proteinkonsentrasjon med Bradford-metoden .....	74
4.6	Binding av (GlcNAc) <sub>6</sub> til ChiA og ChiC .....	74
4.6.1	Binding av (GlcNAc) <sub>6</sub> til ChiA .....	75
4.6.2	Binding av (GlcNAc) <sub>6</sub> til ChiC .....	76
4.6.3	Parameterisering av den entropiske termen .....	76
4.6.4	Binding av (GlcNAc) <sub>6</sub> til ChiC2 .....	78
4.6.5	Aromaters påvirkning på bindingen av (GlcNAc) <sub>6</sub> til ChiA .....	79
4.6.5.1	Binding av (GlcNAc) <sub>6</sub> til ChiA-W167A .....	80
4.6.5.2	Binding av (GlcNAc) <sub>6</sub> til ChiA-W275A .....	80
4.6.5.3	Binding av (GlcNAc) <sub>6</sub> til ChiA-F396A .....	80
<b>5.</b>	<b>Diskusjon .....</b>	<b>83</b>
5.1	Termodynamiske signaturer for binding av (GlcNAc) <sub>6</sub> til ChiA, ChiB og ChiC .....	83
5.1.1	Termodynamiske signaturer for binding til (GlcNAc) <sub>6</sub> og allosamidin .....	84
5.2	Aromaters påvirkning på bindingen av (GlcNAc) <sub>6</sub> til ChiA .....	89
5.3	Oppsummering .....	90
<b>6.</b>	<b>Videre arbeid .....</b>	<b>91</b>
<b>7.</b>	<b>Referanser .....</b>	<b>93</b>
<b>8.</b>	<b>Vedlegg .....</b>	<b>99</b>
8.1	ITC-profiler for ChiA og ChiC for bestemmelse av $\Delta C_{p,T}$ .....	99

## Sammendrag

Denne oppgaven er skrevet som en del av et større forskningsprosjekt der det overordnede målet er å tilegne seg kunnskap om enzymer som katalyserer hydrolyse av den uløselige polymeren kitin. Kitin er en lineær  $\beta$ -1,4-bundet polymer av N-acetyl-D-glukosamin og er den nest vanligste biopolymeren i naturen, etter cellulose. Det kitinolytiske maskineriet til den gram-negative jordbakterien *Serratia marcescens* består av tre kitinaser: kitinase A (ChiA), kitinase B (ChiB) og kitinase C (ChiC). ChiA og ChiB er begge prosessive eksoenzymer som katalyserer hydrolyse av kitin fra henholdsvis reduserende- og ikke-reduserende ende. ChiC er et ikke-prosessivt endoaktivt enzym.

I denne oppgaven har de termodynamiske signaturene for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til inaktive mutanter av ChiA og ChiC blitt bestemt ved hjelp av isoterm titreringskalorimetri (ITC) og sammenlignet med tilsvarende signaturer for ChiB. Ved 30 °C og pH 6,0 er bindingsfrienergiendringen tilnærmet lik for alle kitinasene. Bindingsreaksjonen er entalpisk drevet i ChiC ( $\Delta H^\circ_r = -7,8 \pm 0,2$  kcal/mol,  $-T\Delta S^\circ_r = -1,9 \pm 0,2$  kcal/mol), entropisk drevet i ChiB ( $\Delta H^\circ_r = -0,1 \pm 0,3$  kcal/mol,  $-T\Delta S^\circ_r = -9,2 \pm 0,3$  kcal/mol), og drevet med omtrent like store bidrag entalpisk og entropisk i ChiA ( $\Delta H^\circ_r = -4,5 \pm 0,2$  kcal/mol,  $-T\Delta S^\circ_r = -4,2 \pm 0,2$  kcal/mol). Endring i solvatiseringsentropien er mest gunstig for ChiA ( $-T\Delta S^\circ_{\text{solv}} = -17,5 \pm 1,0$  kcal/mol), mens den er lik for ChiB og ChiC ( $-T\Delta S^\circ_{\text{solv}} = -11,5$  kcal/mol). Ved sammenligning av binding til (GlcNAc)<sub>6</sub> og allosamidin viser resultatene at ChiA blir mest desolvatisert i positive sub seter, at ChiC blir mest desolvatisert i negative sub seter, mens det er en relativt lik fordeling for ChiB. Videre er endring i konformasjonsentropien ugunstig for ChiA og ChiC ( $-T\Delta S^\circ_{\text{conf}} = 10,9 \pm 1,0$  kcal/mol for ChiA og  $7,2 \pm 1,0$  kcal/mol for ChiC), mens den er nøytral for ChiB ( $-T\Delta S^\circ_{\text{conf}} = -0,1 \pm 0,6$  kcal/mol). Binding til (GlcNAc)<sub>6</sub> fører generelt til en mer ugunstig endring i konformasjonsentropien sammenlignet med binding til allosamidin. Dette er mest sannsynlig et resultat av redusert fleksibilitet hos både protein og ligand ved kompleksdannelse.

Videre har bindingen av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiA-W167A, ChiA-W275A og ChiA-F396A blitt studert med ITC ved 30 °C og pH 6,0. Resultatene viser at det residuet som er viktigst for prosessivitet, Trp<sup>167</sup>, også er det residuet som binder sterkest til substratet ( $K_d = 134 \pm 0,03$



$\mu\text{M}$ ,  $\Delta G_r^\circ = -5,4 \pm 0,1 \text{ kcal/mol}$  for ChiA-W167A). I motsetning bidrar residu i produkt  
dissosiasjonssubster, Trp<sup>275</sup> og Phe<sup>396</sup>, i mindre grad til bindingen av substratet ( $K_d = 2,1 \pm$   
 $0,3 \mu\text{M}$ ,  $\Delta G_r^\circ = -7,9 \pm 0,1 \text{ kcal/mol}$  for ChiA-W275A og  $K_d = 1,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ,  $\Delta G_r^\circ = -8,2 \pm$   
 $0,1 \text{ kcal/mol}$  for ChiA-F396A).

## Abstract

This thesis is written as part of a larger research project where the main goal is to acquire knowledge of enzymes that catalyze the hydrolysis of the insoluble polymer chitin. Chitin is a linear  $\beta$ -1,4-linked polymer of N-acetyl-D-glucosamine and is the second most common biopolymer in nature after cellulose. The chitinolytic machinery of the gram-negative soil bacterium *Serratia marcescens* consists of three chitinases: chitinase A (ChiA), chitinase B (ChiB) and chitinase C (ChiC). ChiA and ChiB are both processive exo-enzymes that catalyze the hydrolysis of chitin from the reducing and non-reducing end, respectively. ChiC is a non-processive endo-active enzyme.

In this thesis, the thermodynamic signatures for the binding of (GlcNAc)<sub>6</sub> to inactive mutants of ChiA and ChiC has been determined using isothermal titration calorimetry (ITC) and compared with the corresponding values for ChiB. At 30 °C and pH 6.0 the change in binding free energy is approximately the same for all three chitinases. The binding reaction is enthalpy-driven in ChiC ( $\Delta H^\circ_r = -7.8 \pm 0.2$  kcal/mol,  $-T\Delta S^\circ_r = -1.9 \pm 0.2$  kcal/mol), entropy-driven in ChiB ( $\Delta H^\circ_r = -0.1 \pm 0.3$  kcal/mol,  $-T\Delta S^\circ_r = -9.2 \pm 0.3$  kcal/mol), and equally driven by enthalpy and entropy in ChiA ( $\Delta H^\circ_r = -4.5 \pm 0.2$  kcal/mol,  $-T\Delta S^\circ_r = -4.2 \pm 0.2$  kcal/mol). ChiA has the most favorable change in solvation entropy ( $-T\Delta S^\circ_{\text{solv}} = -17.5 \pm 1.0$  kcal/mol), while ChiB and ChiC have identical values ( $-T\Delta S^\circ_{\text{solv}} = -11.5$  kcal/mol). When comparing the binding of (GlcNAc)<sub>6</sub> and allosamidin, the results show that ChiA becomes most desolvated in positive subsites, that ChiC becomes most desolvated in negative subsites, while ChiB has a relatively equal distribution. Furthermore, the change in conformational entropy is unfavorable for ChiA and ChiC ( $-T\Delta S^\circ_{\text{conf}} = 10.9 \pm 1.0$  kcal/mol for ChiA and  $7.2 \pm 1.0$  kcal/mol for ChiC), while it is neutral for ChiB ( $-T\Delta S^\circ_{\text{conf}} = -0.1 \pm 0.6$  kcal/mol). Binding to (GlcNAc)<sub>6</sub> generally lead to a more unfavorable change in conformational entropy compared with binding to allosamidin. This is most likely the result of reduced flexibility in both the protein and ligand upon complex formation.

Moreover, the binding of (GlcNAc)<sub>6</sub> to ChiA-W167A, ChiA-W275A and ChiA-F396A has been studied with ITC at 30 °C and pH 6.0. The results show that the residue most important for processivity, Trp<sup>167</sup>, is also the residue that binds more strongly to the substrate ( $K_d = 134$

$\pm 0.03 \mu\text{M}$ ,  $\Delta G_r^\circ = -5.4 \pm 0.1 \text{ kcal/mol}$  for ChiA-W167A). In contrast, the residues in the product dissociation subsites, Trp<sup>275</sup> and Phe<sup>396</sup>, contribute in a lesser extent to the binding of the substrate ( $K_d = 2.1 \pm 0.3 \mu\text{M}$ ,  $\Delta G_r^\circ = -7.9 \pm 0.1 \text{ kcal/mol}$  for ChiA-W275A and  $K_d = 1.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ,  $\Delta G_r^\circ = -8.2 \pm 0.1 \text{ kcal/mol}$  for ChiA-F396A).

## Forkortelser

<b>(GlcNAc)<sub>6</sub></b>	<sup>I</sup> N, <sup>II</sup> N, <sup>III</sup> N, <sup>IV</sup> N, <sup>V</sup> N, <sup>VI</sup> N -Heksaacetylkitohexaose
<b>µg</b>	Mikrogram
<b>µL</b>	Mikroliter
<b>µM</b>	Mikromolar
<b>4-MU</b>	4-metylbelliferyl
<b>4-MU-(GlcNAc)<sub>2</sub></b>	4-metylbelliferyl-β-D-N,N`-diacetylkitobiose
<b>AA</b>	Auxiliary activities
<b>Ala (A)</b>	Alanin
<b>bp</b>	Basepar
<b>BSA</b>	Bovin Serum Albumine
<b>CBM</b>	Karbohydrat bindingsmodul
<b>ChiA</b>	Kitinase A fra <i>Serratia marcescens</i>
<b>ChiB</b>	Kitinase B fra <i>Serratia marcescens</i>
<b>ChiC</b>	Kitinase C fra <i>Serratia marcescens</i>
<b>Da</b>	Dalton
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Sterilt vann av Milli-Q kvalitet
<b>DNA</b>	Deoksyribonukleinsyre
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>G</b>	Gram
<b>Gln (Q)</b>	Glutamin
<b>Glu (E)</b>	Glutamat
<b>HIC</b>	Hydrofob interaksjonskromatografi
<b>His</b>	Histidin
<b>HPLC</b>	Væskekromatografi
<b>IMAC</b>	Immobilisert metallaffinitetskromatografi
<b>IPTG</b>	Isopropyl-1-tio-β-D-tiogalaktopyranosid
<b>ITC</b>	Isoterm titreringskalorimetri
<b>K</b>	Kelvin
<b>K<sub>a</sub></b>	Assosiasjonskonstanten
<b>k<sub>a</sub></b>	Assosiasjonsraten
<b>K<sub>b</sub></b>	Kilobaser
<b>K<sub>d</sub></b>	Dissosiasjonskonstanten
<b>k<sub>d</sub></b>	Dissosiasjonsraten
<b>KOS</b>	Kitooligosakkarider
<b>L</b>	Liter
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>LPMO</b>	Lytisk polysakkarid monooxygenase
<b>M</b>	Molar
<b>mg</b>	Milligram
<b>mL</b>	Milliliter
<b>mM</b>	Millimolar
<b>MOPS</b>	3-(N-morfolin) propansvovelsyre
<b>MS</b>	Massespektrometri
<b>MW</b>	Molekylvekt
<b>NI-NTA</b>	Nikkel-nitrilotrieddiksyre

<b>nm</b>	Nanometer
<b>OD</b>	Optisk tetthet
<b>PCR</b>	Polymerase kjedereaksjon
<b>Phe (F)</b>	Fenylalanin
<b>PMSF</b>	Fenylmetylsulfonylfluorid
<b>R</b>	Den generelle gasskonstanten, 1,987 cal/K mol
<b>RNA</b>	Ribonukleinsyre
<b>Rpm</b>	Antall omdreiningar per minutt
<b>SDS-PAGE</b>	Natirumdodecylsulfat polyakrylamid gelelektroforese
<b>TB</b>	Terrific Broth
<b>Thr (T)</b>	Treonin
<b>Trp (W)</b>	Tryptofan
<b>WT</b>	Villtype
<b>Å</b>	Ångstrøm
<b><math>\Delta C_p</math></b>	Endring i varmekapasitet
<b><math>\Delta G</math></b>	Endring i Gibbs fri energi
<b><math>\Delta H</math></b>	Endring i entalpi
<b><math>\Delta S</math></b>	Endring i entropi

## 1. Introduksjon

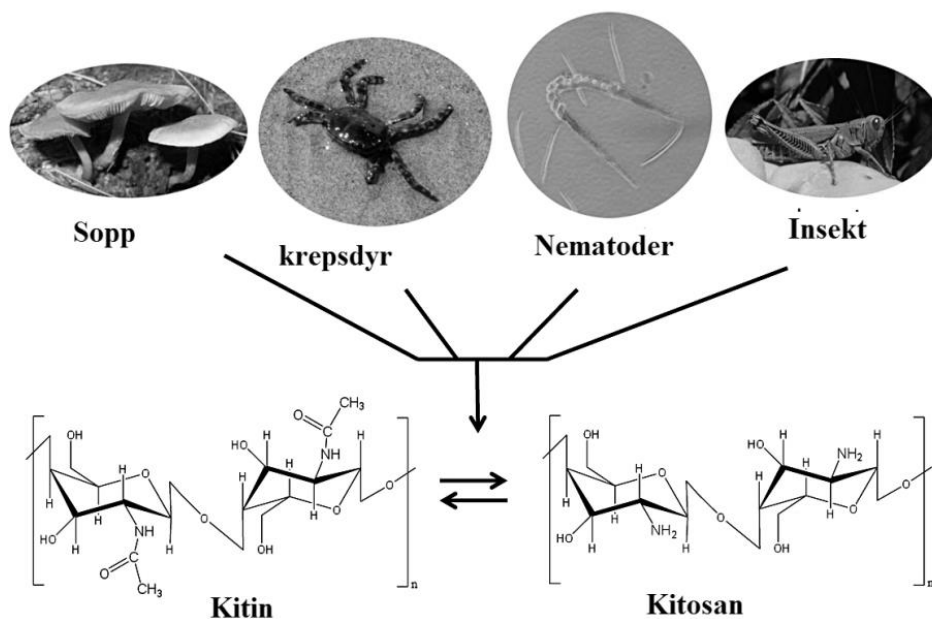
### 1.1 Karbohydrater

Karbohydrater er organisk-kjemiske forbindelser. Mange karbohydrater har den generelle formelen  $C_nH_{2n}O_n$ , mens andre også inneholder grunnstoff som nitrogen, fosfor eller svovel. De fungerer som energikilder og som strukturelle enheter i oppbyggingen av organismer. Karbohydrater er delt inn i fire grupper: monosakkarider, disakkarider, oligosakkarider og polysakkarider. Monosakkarider er den enkleste formen for sukker og kan ikke hydrolyseres til mindre enheter. Disse er som regel ringformede med fire, fem eller seks karbonatomer og ett oksygenatom. Disakkarider består av to monosakkarider, mens oligosakkarider består av mellom to og ti monosakkarideneheter der enhetene er satt sammen med en glykosidbinding. Polysakkarider består av flere enn 10 monosakkarideneheter og har en tredimensjonal struktur. Den tredimensjonale strukturen er bestemt av hvilke monosakkarider polysakkaridet er bygget opp av, kjedelengde, egenskapene til glykosidbindingen og graden av forgrening (Kennedy 1988). Det finnes to ulike hovedklasser av polysakkarider: homopolysakkarider og heteropolysakkarider.

Homopolysakkarider består av kun en type monosakkarideneheter, mens heteropolysakkarider består av ulike typer monosakkarideneheter. Stivelse og glykogen er begge homopolysakkarider og fungerer som energilagere av monosakkaridet de er bygget opp av. Andre polysakkarider, som kitin og cellulose, er strukturelle polysakkarider. Cellulosemolekylet er lineært og består av flere tusen D-glukoseenheter med ( $\beta$ -1,4) binding og er en viktig komponent i oppbyggingen av celleveggen hos planter (Kennedy 1998). Kitin er et lineært homopolysakkarid, i likhet med cellulose, og er bygget opp av flere N-acetylglukosamineneheter med ( $\beta$ -1,4) binding. Kitin er den viktigste komponenten i eksoskjelettet til mange leddyr, som insekter og skalldyr, og finnes også i celleveggen til alger, sopp og gjær (Nelson & Cox 2008a).

## 1.2 Kitin og kitosan

Kitin er den polymeren med høyest forekomst i naturen etter cellulose. Som nevnt tidligere er kitin en lineær  $\beta$ -1,4-bundet polymer av N-acetyl-D-glukosamin (GlcNAc). Kitosan, et viktig derivat av kitin, er vannløselig og består av de-N-acetylerert kitin som er deacetylerert i ulike grader. Sukkerenhetene i både kitin- og kitosankjeder er rotert  $180^\circ$  relativt til hverandre (Horn et al. 2006b). Dette fører til at den strukturelle og funksjonelle enheten i disse polymerene er et disakkarid. Opphav og struktur av kitin og kitosan er presentert i figur 1.2.1. Både kitin og kitosan, samt deres modifiserte derivater, har et bredt bruksområde innen blant annet medisin, jordbruk og matindustri. Interessen rundt kitin, kitosan og deres derivater har i det siste økt grunnet tilstedeværelsen av reaktive funksjonelle grupper, evne til fullstendig biodegradering, geldannelse, deres antifungale og antitumorale aktivitet, samt lav toksisitet (Tharanathan & Kittur 2003).

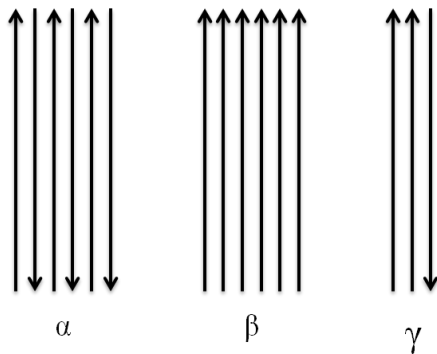


Figur 1.2.1. En skisse av kilder til kitin og strukturen til kitin og kitosan (Bueter et al. 2013).

### 1.2.1 Strukturen til kitin

Tre ulike krystalliske strukturer av kitin er funnet,  $\alpha$ ,  $\beta$  og  $\gamma$ , avhengig av hvilket råmateriale kitinet kommer fra. Forskjellen i strukturen til  $\alpha$ - og  $\beta$ -kitin er at kjedene er arrangert vekselvis antiparallelt i  $\alpha$ -kitin, mens alle kjedene er arrangert parallelt i  $\beta$ -kitin. I  $\gamma$ -kitin går

to kjeder i en retning, men den tredje går i motsatt retning (Jang et al. 2004), se figur 1.2.2. Senere analyser har vist at  $\gamma$ -kitin mest sannsynlig er en variant av  $\alpha$ -familien (Rinaudo 2006). Kitin er parallelt bundet sammen med hydrogenbindinger. De sterke inter- og intramolekylære hydrogenbindingene i  $\alpha$ -kitin gjør dette til den mest rigide kitinstrukturen. Relativt svake intermolekylære hydrogenbindinger i  $\beta$ -kitin gjør den mer reaktiv i ulike modifikasjonsreaksjoner og mer løselig i ulike løsemidler.



Figur 1.2.2. En skisse av  $\alpha$ ,  $\beta$  og  $\gamma$  strukturene til kitin (Schaupp 2014).

### 1.2.2 Anvendelser av kitin og kitosan

Kitin og kitosan har som nevnt et bredt bruksområde og produseres i stor skala på verdensbasis. Det er i hovedsak skall fra krepsdyr og soppvekster som er kildene til industriell fremstilling av kitin (Synowiecki & Al-Khateeb 2003). Innen medisin har særlig kitooligosakkarider (KOS), oligomerer fremstilt fra kitin eller kitosan ved syrehydrolyse, spilt en viktig rolle. Disse har vist seg å ha en antitumoral effekt der de blant annet stimulerer cytotoxisk aktivitet og dermed bidrar til ødeleggelsen av kreftceller (Bae Keun & Moon-Moo 2010). Innen jordbruk har kitin og kitosan vist seg å inhibere vekst og utvikling hos plantepatogener. Disse polymerene kan derfor brukes for å styrke planters immunforsvar (Wan et al. 2008). Kitin og kitosan har flere mulige applikasjoner innen matindustrien. Kitosan kan blant annet brukes til å lage spiselig biofilm og dermed forlenge holdbarheten til mat. Kitosan er bedre egnet enn cellulose- og proteinderivater fordi biofilmen blir sterkere, får bedre vannpermeabilitet og har en barriere for  $O_2$ . Kitosanfilmen reduserer også modning av maten fordi den hindrer  $CO_2$ - og etylen-utvikling, i tillegg til dens antifungale aktivitet (Enrique et al. 2003).



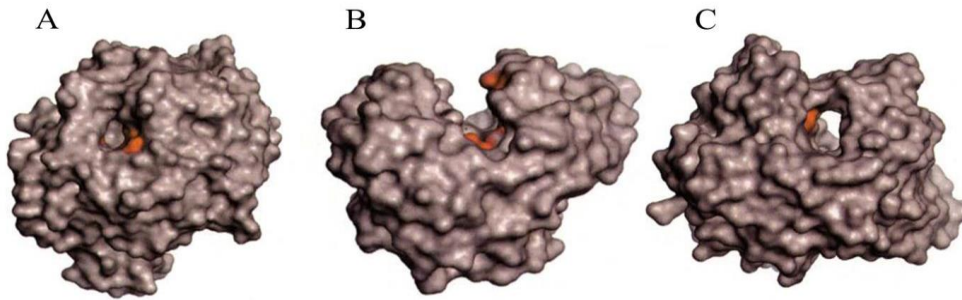
### 1.3 Glykosylhydrolaser

Glykosylhydrolaser er en gruppe enzymer som katalyserer hydrolysen av O-, S- eller N-glykosidbindinger. Denne egenskapen er viktig blant mange levende organismer ettersom de bruker poly- og oligosakkarider til flere ulike biologiske funksjoner, som for eksempel energiopptak, prosessering av ulike proteiner og degradering i lysosomer (Davies & Henrissat 1995). Karbohydrater har en enorm variasjon i stereokjemi. Dette har resultert i flere ulike glykosylhydrolaser som varierer i blant annet reaksjonen de katalyserer og substratspesifisiteten. Ettersom det finnes så mange forskjellige glykosylhydrolaser har de blitt delt inn i familier basert på aminosyresekvensen i databasen Carbohydrate-Active enZymes (CAZy) (Lombard et al. 2014).

Interessen rundt glykosylhydrolaser har i det siste økt grunnet større fokus på bioprospektering og biomassekonvertering. Med økt fokus rundt miljø er det ønskelig å produsere bioenergi fra fornybare og uspiselige kilder. Med utvikling av ny bioteknologi kan glykosylhydrolaser katalysere degradering av uløselige biopolymerer til fermenterbare sukker for bioenergi og andre kjemiske produkter av interesse (Li et al. 2009).

#### 1.3.1 Struktur

Strukturen til glykosylhydrolaser kan bestå av flere domener hvor det alltid er et katalytisk domene. I tillegg kan det være flere ikke-katalytiske domener. Hos noen er det ikke-katalytiske domenet med i substratbinding, men de fleste har ukjent funksjon (Davies & Henrissat 1995). Per i dag er det funnet over 100 ulike familier av glykosylhydrolaser (CAZy 2014). Topologien av aktivt sete er delt inn i tre ulike klasser uavhengig av mekanisme. De tre forskjellige topologiene er: (i) lomme eller krater (ii) kløft og (iii) tunnel, og er vist i figur 1.3.1. Glykosylhydrolaser kan ha endo- eller eksoaktivitet og topologien på det aktive setet påvirker som regel denne egenskapen. Glykosylhydrolaser med eksoaktivitet katalyserer hydrolyse av substratet ved reduserende eller ikke-reduserende ende (oftest den ikke-reduserende), mens de med endoaktivitet katalyserer tilfeldig hydrolyse langs substratet. Tunnelstrukturen er mest observert hos glykosylhydrolaser med eksoaktivitet, mens mer åpne strukturer er funnet hos glykosylhydrolaser med endoaktivitet.



Figur 1.3.1. Tre ulike typer aktive seter funnet i glykosylhydrolaser. De katalytiske residuene er merket med rødt. A) lomme- eller kraterstruktur, B) kløftstruktur og C) tunnelstruktur (Davies & Henrissat 1995).

i) Lomme- eller kraterstruktur

Denne typen struktur virker best for gjenkjennelse av sakkarider med flere tilgjengelige ikke-reduserende ender på overflaten. Strukturen egner seg derfor ikke på fibrøse substrater, som for eksempel cellulose, grunnet færre tilgjengelige ender. Eksempler på enzymer med denne strukturen er monosakkaridaser og eksopolysakkaridaser (Davies & Henrissat 1995).

ii) Kløftstruktur

Glykosylhydrolaser med kløftstruktur kan binde tilfeldig til mange ulike sukkerenheter i polymere substrater. Denne strukturen er vanlig hos polysakkaridaser med endoaktivitet, som for eksempel lysozymer og endocellulaser (Davies & Henrissat 1995).

iii) Tunnelstruktur

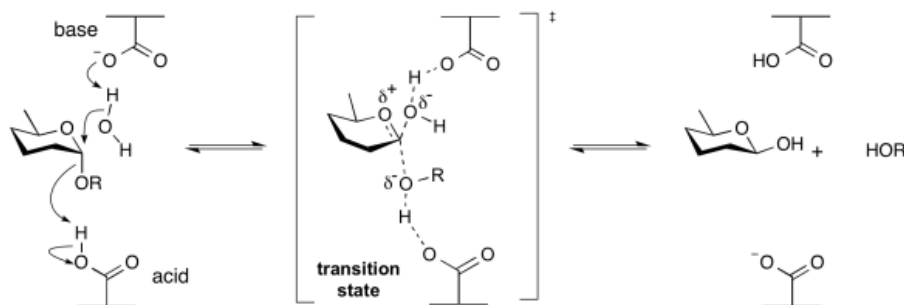
Tunnelstrukturen stammer fra kløftstrukturen, men har utviklet proteinspiraler som dekker overflaten av kløften (Davies & Henrissat 1995). Glykosylhydrolaser med tunnelstruktur har eksoaktivitet og virker slik at polysakkaridkjeden blir tredd gjennom det aktive setet, enten fra reduserende eller ikke-reduserende ende. Enzymer med en slik topologi har evnen til å holde seg fastbundet til substratet samtidig som den frigjør produktet. Dette danner grunnlaget for prosessivitet – en viktig egenskap hos enzymer som kan degradere svært krystallinske substrater. Et eksempel på glykosylhydrolaser med en slik topologi er cellobiohydrolaser (Rouvinen et al. 1990).

## 1.3.2 Mekanisme

Glykosylhydrolaser er kategorisert inn i to hovedklasser når det kommer til mekanisme; inverterende og bevarende, avhengig av endringen i den anomeriske oksygenkonfigurasjonen under reaksjonen (Koshland 1953). I senere tid er flere varianter av disse mekanismene funnet (Rajan et al. 2004).

### 1.3.2.1 Inverterende mekanisme

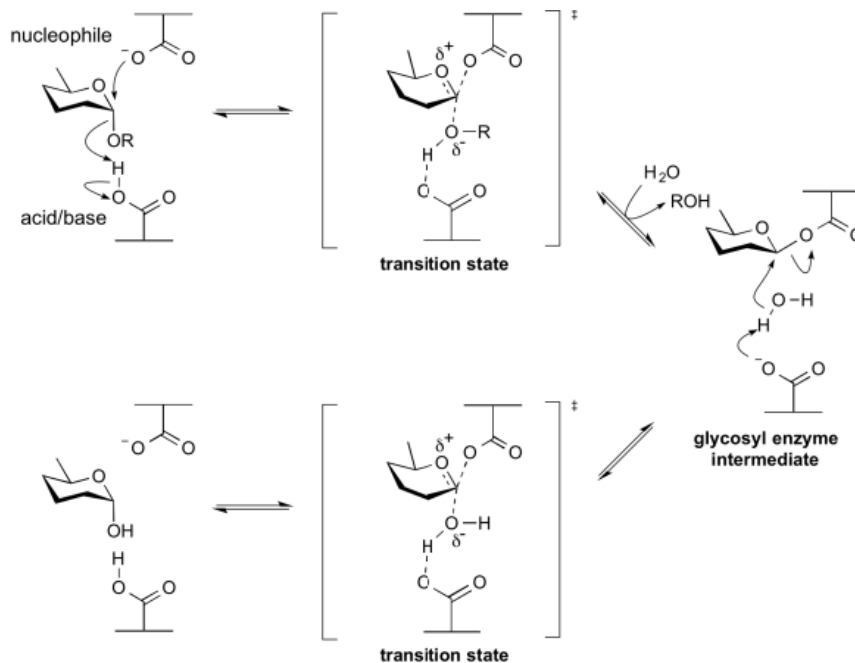
En typisk inverterende glykosylhydrolase avhenger av to aminosyresidekjeder der den ene fungerer som en syre og den andre som en base og som befinner seg 6-11 Å fra hverandre (McCarter & Withers 1994). Den katalytiske syren donerer et proton til oksygenet i glykosidbindingen, mens den katalytiske basen fjerner et proton fra et nærliggende vannmolekyl. Dette øker nukleofiliteten til vannmolekylet slik at det kan angripe det anomeriske karbonatomet og dermed hydrolysere glykosidbindingen (Vuong & Wilson 2010). Resultatet av dette er en inversjon av den anomeriske konfigurasjonen. En slik reaksjon for en  $\alpha$ -glykosidase er vist i figur 1.3.2.



Figur 1.3.2. Inverterende mekanisme for en  $\alpha$ -glykosidase (Withers & Spencer 2013).

### 1.3.2.2 Bevarende mekanisme

Glykosylhydrolaser med bevarende mekanisme har en aminosyre som først fungerer som en syre og deretter som en base i to steg. Det kreves i tillegg en nukleofil som er plassert omtrent 5,5 Å fra syre/base katalysatoren (Withers & Spencer 2013). Både syre/base residuet og nukleofilen er som regel karboksylsidedekjeder. I første trinn blir glykosidoksygenet protonert av den katalytiske syren samtidig som det nukleofile residuet angriper det anomeriske karbonatomet og danner et kovalent substrat-enzym intermediat. I neste trinn virker den deprotonerte katalytiske syre/basen som en generell base og aktiverer et vannmolekyl som gjør et nukleofilt angrep på substrat-enzym intermediet, og dermed fullfører hydrolyse. Resultatet blir en bevaring av den anomere konfigurasjonen (Vuong & Wilson 2010). En slik reaksjon for en  $\alpha$ -glykosidase er vist i figur 1.3.3.



Figur 1.3.3. Bevarende mekanisme for en  $\alpha$ -glykosidase (Withers & Spencer 2013).

### 1.3.3 *Prosessivitet*

Flere glykosylhydrolaser har vist seg å ha en prosessiv virkningsmekanisme, det vil si å kunne holde seg bundet til substratet mellom påfølgende hydrolytiske kutt (Davies & Henrissat 1995). Prosessive enzymer kan tre enkeltkjeder av polymeren gjennom det aktive setet og bevege seg med eksoaktivitet mot midten av substratet samtidig som produkt spaltes av (Teeri 1997). Denne egenskapen kan se ut til å forenkle nedbrytningen av uløselige krystallinske polysakkarider ettersom enzymet slipper den energetiske ugunstige prosessen med å måtte få tilgang til en enkeltkjede av polymeren for hver hydrolyse (Sørli et al. 2012).

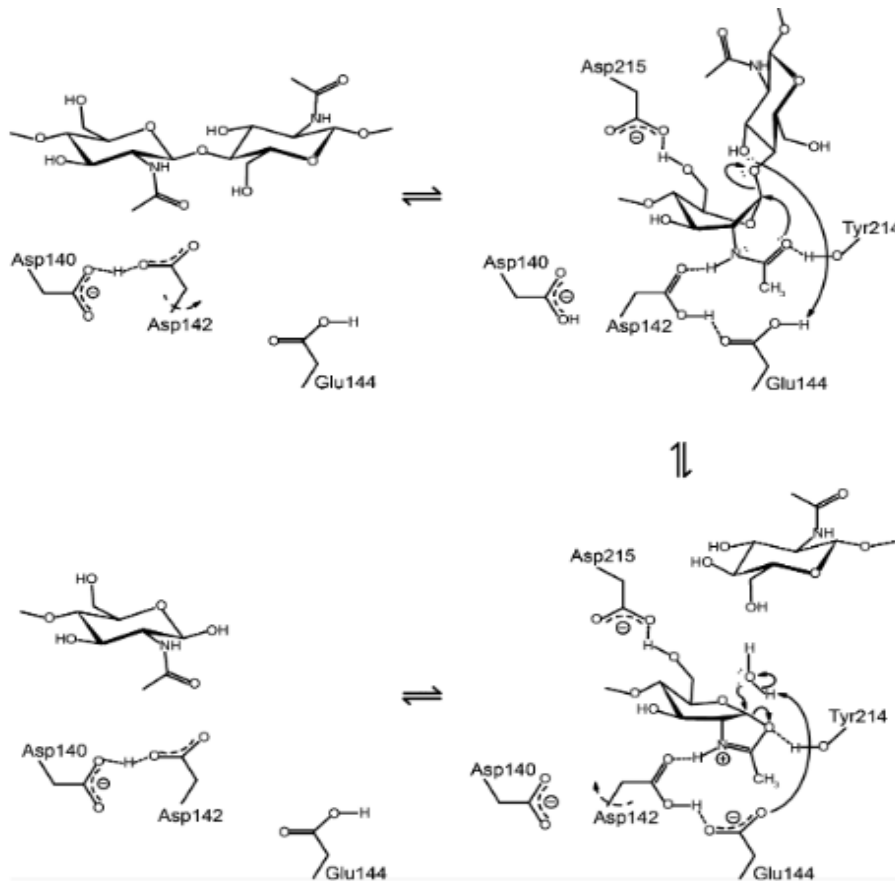
En dyp, tunnel-lignende topologi på det aktive setet er som nevnt felles for flere prosessive enzymer. Det ser ut til at loopstrukturen som danner taket på tunnel-topologien spiller en viktig rolle for den prosessive virkemåten. Viktigheten av loopstrukturen er blant annet bekreftet av von Ossowski et al. (2003), som fjernet en del av loopen på det prosessive enzymet *TrCel7A* og dermed gjorde enzymet mindre prosessivt. Et annet fellestrekk for mange prosessive glykosylhydrolaser er tilstedeværelsen av aromatiske sidekjeder i det aktive setet. Aromatiske sidekjeder binder til begge sider av sukkerringen i polymeren gjennom hydrofobe interaksjoner («hydrofobic stacking»). Hydrofobe interaksjoner over en stor overflate gjør det mindre energikrevende for enzymet å bevege seg langs substratet sammenlignet med mer spesifikke interaksjoner, som for eksempel hydrogenbindinger (Sørli et al. 2012).

## 1.4 Kitinaser

Kitinaser er glykosylhydrolaser som katalyserer hydrolysen av  $\beta$ -1,4-glykosidbindinger i kitin. Størrelsen på kitinaser varierer fra 20 kDa til rundt 90 kDa og finnes i mange ulike organismer; bakterier, planter, sopp og mennesker for å nevne noen (Hamid et al. 2013). Forskere har funnet kitinaser hos mennesker som virker på immunsystemet mot parasitter der de bryter ned kitin i blant annet cellevegg og cyster (Fusetti et al. 2002). Kitinaser kan bryte ned kitin direkte til mindre oligomerer med mange nyttige bruksområder, som beskrevet i avsnitt 1.2.2. Fem ulike klasser av kitinaser er foreslått basert på aminosyresekvensen, og disse er fordelt over familie 18 og 19 glykosylhydrolaser. Kitinaser i de to familiene har ulik aminosyresekvens, 3D-struktur og mekanisme, og har derfor mest sannsynlig utviklet seg fra to ulike forfedre (Hamid et al. 2013). Som nevnt tidligere følger glykosylhydrolaser ofte én av to hovedmekanismer. Kitinaser i familie 19 ser ut til å følge den inverterende mekanismen, mens familie 18 kitinaser følger en substrat-assistert mekanisme der konfigurasjonen på det anomeriske karbonatomet blir bevart (Fukamizo 2000).

### 1.4.1 Substrat-assistert mekanisme

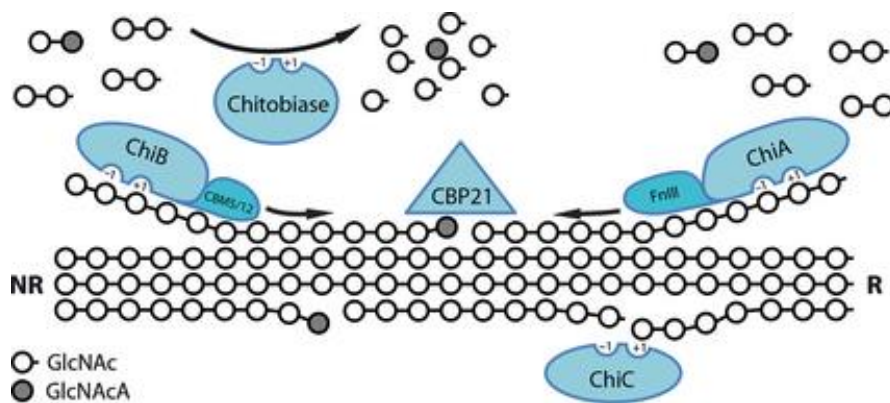
Substrat-assistert mekanisme skiller seg fra den klassiske bevarende mekanismen beskrevet i avsnitt 1.3.2.2 ved at den benytter N-acetylgruppen på substratet som nukleofil og ikke en karboksylsidekjede. van Aalten et al. (2001) har studert familie 18 kitinase B (ChiB) fra *Serratia marcescens* og bekrefter tidligere teorier rundt substrat-assistert mekanisme hos familie 18 kitinaser. Reaksjonen ser ut til å starte med at sukkerringen i -1 subsetet endrer form til båtformasjon ved substratbinding og optimaliserer nukleofilt angrep fra N-acetyloksygenet. Nukleofilt angrep, med assistanse fra en karboksylgruppe (Asp), fører til dannelse av et oxazoliniumionintermediat. Den katalytiske syren, Glu<sup>144</sup> i ChiB (Glu<sup>315</sup> i ChiA), virker som en generell syre/base katalysator ved først å protonere oksygenet på glykosidbindingen og deretter deprotonere et nukleofilt vannmolekyl slik at hydrolysen av oxazoliniumionintermediatet kan skje. Substrat-assistert mekanisme i ChiB er vist i figur 1.4.1. Det er flere konserverte residuer i det katalytiske setet som har viktige roller under en substrat-assistert mekanisme. De katalytiske residuene Asp<sup>140</sup>, Asp<sup>142</sup> og Glu<sup>144</sup> vist i figur 1.4.1 er en del av et høyt konservert DXXDXDXE motiv i familie 18 kitinaser (Synstad et al. 2004).



Figur 1.4.1. Substrat-assistert mekanisme for ChiB fra *Serratia marcescens*. Figuren viser dannelsen av oxazoliniumionintermediatet, som videre blir hydrolysert av et innkommende vannmolekyl vist nederst til høyre (Vaaje-Kolstad et al. 2013).

### 1.4.2 Kitinaser fra *Serratia marcescens*

Det kitinolytiske maskineriet til *Serratia marcescens* er en av de mest studerte enzymssystemene som degraderer uløselige polysakkarider. *S. marcescens* er en gram-negativ jordbakterie fra familien Enterobacteriaceae med et kitinolytisk maskineri bestående av tre kitinaser, ChiA, B og C, et kitinbindende enzym, CBP21, og en kitobiase (Vaaje-Kolstad et al. 2013). ChiA, B og C er kitinaser tilhørende familie 18 glykosylhydrolaser. ChiA og ChiB er begge eksoaktive og prosessive, mens ChiC er endoaktiv og ikke-prosessiv. CBP21 tilhører auxiliary activities (AA) familie 10 og klassifiseres som en lytisk polysakkarid monooksygenase (LPMO) (Vaaje-Kolstad et al. 2005). Dette enzymet binder til kitin og øker tilgjengeligheten av substratet for de andre enzymene ved å introdusere brudd i kitinkjeden. Videre omdanner kitobiasen oligomere produkter til monomerer. Det kitinolytiske maskineriet til *S. marcescens* er skissert i figur 1.4.2.



Figur 1.4.2. En skjematisk presentasjon av det kitinolytiske maskineriet til *S. marcescens*. Kitinasene ChiA og ChiB katalyserer hydrolysen av kitin prosessivt fra hver sin ende, mens ChiC har endoaktivitet og katalyserer tilfeldige kutt langs substratet. CBP katalyserer kutt på de mest krystallinske områdene av substratet og øker dermed tilgjengeligheten for kitinasene. Kitobiasen konverterer mindre oligomerer til monomerer (Vaaje-Kolstad et al. 2013).

Familie 18 kitinaser har et katalytisk domene med en konservert  $(\beta/\alpha)_8$  TIM-tønnestruktur. Dette er en nøye studert proteinkjedefold og finnes i mange enzymer. Tønnestrukturen er dannet av åtte loop-heliks-enheter som er lenket sammen.  $\beta$ -trådene ligger på innsiden og danner tønnestrukturen, mens  $\alpha$ -heliksene ligger pakket rundt utsiden (Silverman et al. 2001). I tillegg til det katalytiske domenet har *S. marcescens* kitinasene et eller flere mindre domener som er tenkt til å bidra til å binde substratet (Perrakis et al. 1994). Tønnestrukturen til ChiA og ChiB inneholder blant annet et  $\alpha+\beta$ -domene mellom den syvende og åttende  $\beta$ -tråden. Dette domenet danner en vegg som utgjør den substratbindende kløften.

#### 1.4.2.1 ChiA og ChiB

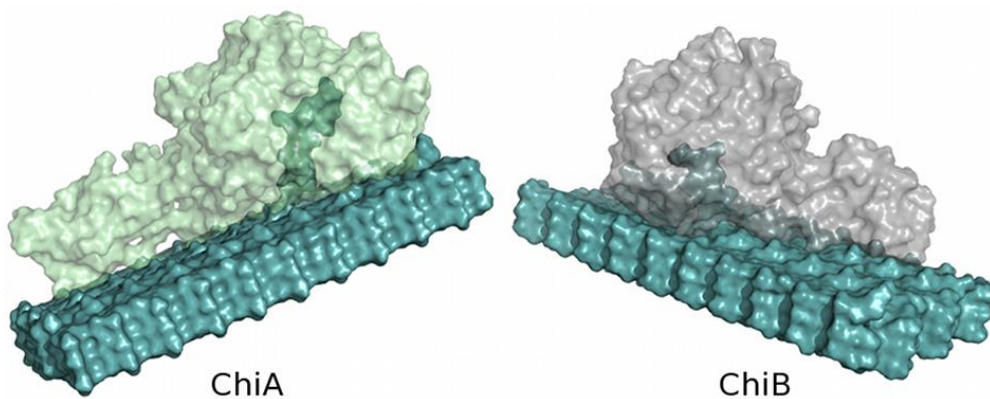
Både ChiA og ChiB har en dyp substratbindende kløft som er forlenget av aromatiske residuer sittende på de kitinbindende domenene, men det er flere ting som skiller ChiA og ChiB fra hverandre. ChiA har en lengde på 540 residuer og har en molekylvekt på 58,5 kDa, mens ChiB er 498 residuer lang og har en kalkulert masse på 55,4 kDa (Brurberg et al. 2000). ChiA opprettholder over 80 % av maksimal aktivitet mellom pH 4-11, mens ChiB virker best ved lavere pH-verdi innen samme område (pH 4-10). Optimal temperatur for aktiviteten av begge enzymene er ved 60 °C (Suzuki et al. 2002).



## 1. Introduksjon

---

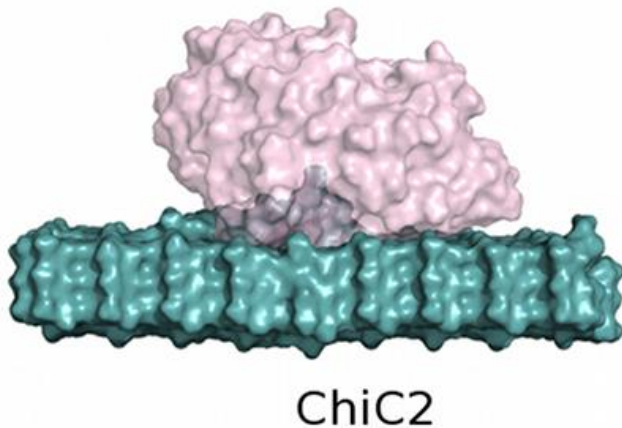
Den substratbindende kløften til ChiA skiller seg fra ChiB ved at den mangler loopen som utgjør «taket» i tunnelen til ChiB. I ChiA består den substratbindende kløften av seks veldefinerte subseter som strekker seg fra -4 til +2 og kløften er åpen fra begge ender (Brurberg et al. 2000). Oppdagelsen av denne åpne strukturen har ført til antagelser om at ChiA kan ha noe endoaktivitet, og senere studier av Norberg et al. (2011) har vist at et tiltenkt subsete i posisjon +3 kan være delaktig i å promotere endoaktivitet hos den ellers eksoaktive kitinasen. ChiB består av et katalytisk domene, en linker og et lite C-terminalt bindingsdomene (van Aalten et al. 2000). Den substratbindende kløften består av seks veldefinerte subseter som strekker seg fra -3 til +3. Med en loop som dekker «taket» på kløften får ChiB en «tunnel»-lignende struktur, noe som er karakteristisk for prosessive eksoenzymmer (van Aalten et al. 2001). Strukturelle data og enzymatiske reaksjoner har vist at ChiB katalyserer hydrolyse av kitin fra ikke-reduserende ende med produktbindende seter ved subsete -2 og -1. I motsetning viser liknende eksperimenter at ChiA katalyserer hydrolyse av kitin fra reduserende ende der aromater ved subsete +1 og +2 binder til disakkaridproduktet (Baban et al. 2010; Horn et al. 2006c; Hult et al. 2005; Zakariassen et al. 2009). En modell av ChiA og ChiB er vist i figur 1.4.3.



Figur 1.4.3. En modell av strukturene til ChiA og ChiB der de virker eksoaktivt på substratet fra hver sin ende (Payne et al. 2012).

### 1.4.2.2 ChiC

Det katalytiske domenet til ChiC mangler  $\alpha+\beta$  domenet i TIM-tønnestrukturen og har derfor en mer åpen substratbindende kløft sammenlignet med ChiA og ChiB. I tillegg mangler ChiC aromatiske sidekjeder som er essensielle for prosessivitet, og har et fleksibelt katalytisk senter med den katalytiske syren Glu<sup>141</sup> (Payne et al. 2012). Dette gjør at enzymet kan binde på tilfeldige steder langs kitinkjeden og dermed virke endoaktivt. Komplette krystallstruktur til ChiC er enda ikke kjent, men kitinasen består av et katalytisk domene samt to C-terminale kitinbindende domener (Horn et al. 2006c). Substratbindingskløften har seks sub seter som strekker seg fra -2 til +4. To ulike former av ChiC er funnet i kulturer av *S. marcescens*: ChiC1 og ChiC2. ChiC1 er proteinet i sin helhet, mens ChiC2 er et proteolytisk produkt av ChiC1 som kun består av det katalytiske domenet (Horn et al. 2006b). ChiC2 er representert i figur 1.4.4. Det proteolytiske produktet er 325 residuer lang og har en molekylvekt på rundt 35 kDa (Okay et al. 2008). ChiC1 har en lengde på 479 residuer og en molekylvekt på 51,6 kDa (Brurberg et al. 2000). ChiC1 har vist optimal aktivitet ved 65 og 70 °C og har et optimalt pH-område som ChiB (Suzuki et al. 2002).

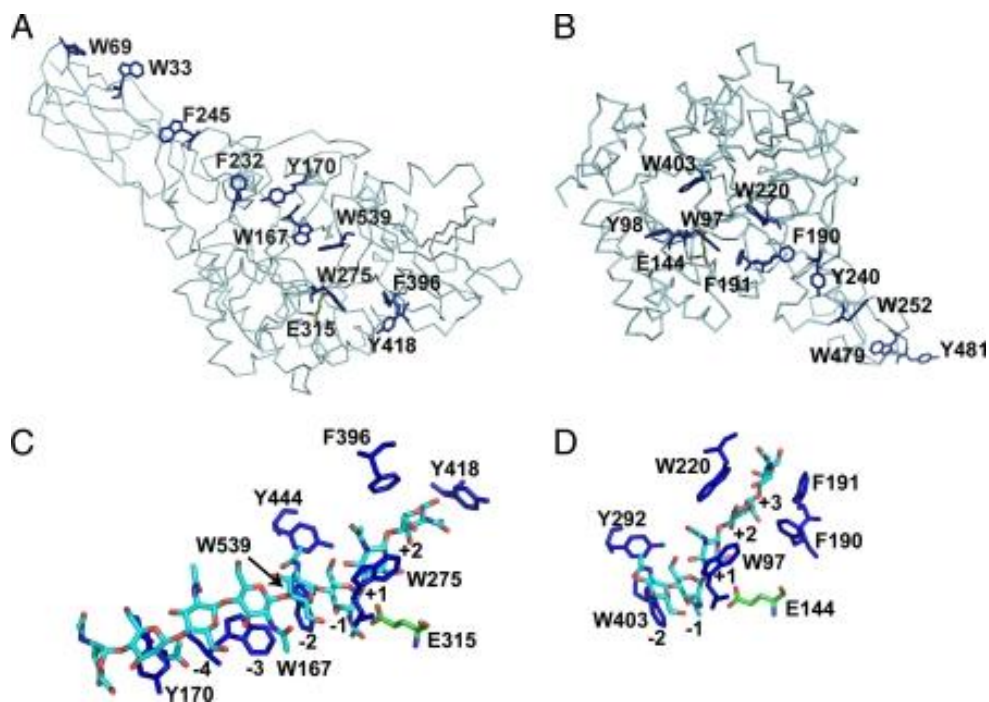


Figur 1.4.4. En modell av enzymet ChiC2, en kitinase som virker endoaktivt på substratet (Payne et al. 2012).

### 1.4.3 *Prosessivitet og direksjonalitet*

Ettersom både ChiA og ChiB har en dyp substratbindingskløft fylt med aromatiske residuer som strekker seg inn mot det katalytiske domene er det tenkt at disse er prosessive, eksoaktive enzymer. Eksperimenter gjort av Hult et al. (2005) har vist at ChiA og ChiB arbeider synergisk ved å katalysere hydrolyse av kitinkjeder fra hver sin ende, noe som samsvarer med strukturen til de to kitinasene med bindings seter på motsatt side av hverandre. Prosessivitet og direksjonalitet er ikke enkelt å måle direkte. Prosessivitet kan indirekte måles med dimer/trimer ratioen produsert når enzymet blir tilført substrat (GlcNAc). Ettersom hver sukkerenhet i kitin er rotert 180° i forhold til hverandre og produktiv binding avhenger av en N-acetylgruppe i -1 subsetet, vil skyving av kitinkjeden gjennom det aktive setet til prosessive eksoaktive enzymer resultere i produksjon av disakkarider. Trimerer kan kun produseres av en eksokitinase i det første hydrolytiske steget (Horn et al. 2006b). Dimer/trimer ratioen har blitt bestemt til å være 7,3 for ChiA, 12,6 for ChiB og 4,1 for ChiC (Horn et al. 2006c). Dette stemmer overens med teorien om at ChiA og ChiB er prosessive, mens ChiC er ikke-prosessiv. En annen måte å måle prosessivitet for familie 18 kitinaser er å bruke kitosan som substrat. Ettersom kitosan er et deacetylerert produkt av kitin kan binding til kitinasen ende med en ikke-produktiv binding. Prosessive enzymer som ChiA og ChiB vil holde seg løst assosiert med enzymet og forflytte seg til en N-acetylgruppe befinner seg i -1 subsetet. Resultatet av dette er produksjon av partallsprodukter, med unntak av det første produktet. Hos ChiC derimot, vil en ikke-produktiv binding føre til fullstendig frigjøring av substrat etterfulgt av binding helt til den får en produktiv binding. Resultatet av dette er en tilfeldig distribusjon av partalls- og oddetallsprodukter (Horn et al. 2006b).

Aromatiske sidekjeder nær det katalytiske senteret ser ut til å være viktige for graden av prosessivitet og direksjonalitet. Hos ChiB resulterte en mutasjon av Trp<sup>97</sup> og Trp<sup>220</sup> til alanin i henholdsvis subsete +1 og +2 i en kraftig reduksjon i prosessiviteten (Horn et al. 2006a). Mutasjon i tilsvarende residuer hos ChiA (Trp<sup>275</sup> og Phe<sup>396</sup>) reduserte prosessiviteten i mindre grad, mens en mutasjon i Trp<sup>167</sup> til alanin i subsete -3 resulterte i en kraftig reduksjon i prosessivitet tilsvarende Trp<sup>97</sup> hos ChiB (Zakariassen et al. 2009). Som nevnt tidligere binder ChiA til substratet etter en prosessiv hydrolyse i - subseter, mens det samme er tilfelle for ChiB i + subseter. Dette tyder på at det er subsetene som binder til substratet, og ikke de som binder produktet, som bestemmer grad av prosessivitet. Plassering av aromatiske sidekjeder og enzym-substrat interaksjoner i ChiA og ChiB er vist i figur 1.4.5.



Figur 1.4.5. Plassering av aromatiske sidekjeder og enzym-substrat interaksjoner i ChiA og B fra *S. marcescens* (Zakariassen et al. 2009). Figuren viser  $\alpha$ -karbonkjeden til henholdsvis ChiA (A) og ChiB (B) med aromatiske sidekjeder langs substratbindende kløft samt kitinbindende domene. C og D viser ChiA-E315Q (C) bundet til  $(\text{GlcNAc})_8$  og ChiB-E144Q bundet til  $(\text{GlcNAc})_5$  (D). Aromatiske sidekjeder er farget mørkeblå, mens GlcNAc oligomerer er farget lyseblå. Den katalytiske syren er merket med grønt (Glu<sup>315</sup> i ChiA og Glu<sup>144</sup> i ChiB).

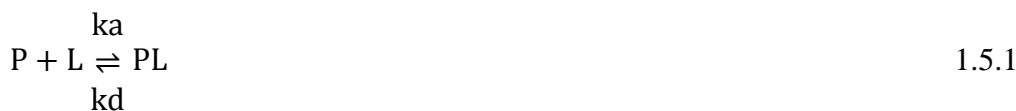
Videre viser eksperiment gjort av Zakariassen et al. (2009) at de ikke-prosessive mutantene er mindre effektive mot krystallinsk kitin, men at de har en høyere aktivitet mot kitosan. Dette tyder på at det er substratbinding som er hastighetsbegrensende når kitin hydrolyseres, mens det er produktfrigjøringen som er det hastighetsbegrensende steget når kitosan hydrolyseres. Denne hypotesen ble videre forsterket av et oppfølgingsstudium gjort av Zakariassen et al. (2010).

### 1.5 Termodynamiske parametere ved protein-ligand interaksjoner

Biologiske prosesser avhenger av molekylære organiseringer og gjenkjennelsesprosesser. Forståelsen av kreftene som driver disse prosessene krever en detaljert beskrivelse av bindingstermodynamikken, samt sammenhengen mellom termodynamiske parametere og strukturene til protein og ligand. Termodynamiske parametere inkluderer likevektskonstanten ( $K_a$ ), endringen i Gibbs frie energi ( $\Delta G$ ), endringen i entalpi ( $\Delta H$ ), endringen i entropi ( $\Delta S$ ), samt endringen i varmekapasitet ( $\Delta C_p$ ) (Perozzo et al. 2004). En måte for enkelt å bestemme termodynamiske parametere knyttet til binding av en ligand til et protein er å benytte isoterm titreringskalorimetri (ITC). ITC måler varmeutvekslingen når en ligand blir titrert i en løsning som inneholder et protein, og dermed kan grad av binding bestemmes (Freiburger et al. 2011). Nedenfor er ulike termodynamiske parametere og ITC forklart nærmere.

#### 1.5.1 Likevektskonstanten ( $K_a$ ) og Gibbs fri bindingsenergi ( $\Delta G_r^\circ$ )

Generelt kan en reversibel binding mellom et protein (P) og en ligand (L) beskrives med et enkelt likevektsuttrykk vist i ligning 1.5.1:



Hvor  $k_a$  og  $k_d$  er hastighetskonstantene for henholdsvis assosiasjon og dissosiasjon til bindingen. Reaksjonen er karakterisert av en likevektskonstant,  $K_a$ , som forklares med ligning 1.5.2:

$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{k_a}{k_d} \quad 1.5.2$$

$K_a$  er et mål på hvor høy affinitet liganden har til proteinet. Målenheten til  $K_a$  er  $M^{-1}$ ; desto høyere verdien til  $K_a$  er, desto høyere affinitet har liganden for proteinet (Nelson & Cox 2008b). Sammenhengen  $\frac{1}{K_a} = K_d$  gir dissosiasjonskonstanten  $K_d$ .

Endring i Gibbs fri energi ( $\Delta G$ ) er et nyttig mål i energibetraktninger i biologiske systemer ettersom det sier noe om stabiliteten til systemet. Dersom et protein-ligand kompleks befinner seg på et lavere energinivå enn i fri tilstand vil en spontan kompleksdannelse skje. Den frie energiendringen for en reaksjon ved standard betingelser (konstant trykk og temperatur) som følge av en binding mellom protein og ligand kan relateres til likevektskonstanten  $K_a$  gjennom ligning 1.5.3:

$$\Delta G_r^\circ = -RT \ln K_a \quad 1.5.3$$

Hvor  $R$  er den generelle gasskonstanten (1,987 cal/K mol) og  $T$  er temperaturen i grader Kelvin (Nelson & Cox 2008b). Gibbs fri energiendring er drevet av to faktorer som bestemmer om en reaksjon vil skje. Dette er endringen i bindingsenergien mellom protein og ligand og endringen i grad av uorden i systemet. Endring i standard fri energi for en reaksjon kan derfor defineres gjennom ligning 1.5.4:

$$\Delta G_r^\circ = \Delta H_r^\circ - T\Delta S_r^\circ \quad 1.5.4$$

Hvor  $\Delta H_r^\circ$  (kapittel 1.5.2) er endringen i entalpien for en reaksjon ved standard betingelser, mens  $\Delta S_r^\circ$  (kapittel 1.5.3) er endringen i entropien for en reaksjon ved standard betingelser (Rarey 2009). Som følge av en entalpi-entropi kompensasjon ofte observert i ligand-protein interaksjoner blir endringer i standard Gibbs frienergiendringer ofte tilnærmet lik 0, selv om liganden blir modifisert til å binde sterkere til et protein. Dette er fordi endringer i entalpien ofte fører til delvis eller fullstendig lik endring i entropien (Chodera & Mobley 2013). Betydningen av endringen i entalpi og entropi er derfor viktige for å få økt forståelse om bindingen mellom protein og ligand.

### 1.5.2 Bindingsentalpi ( $\Delta H_r^\circ$ )

Endring i bindingsentalpien ved ligand-protein interaksjoner representerer endringer i energi som følge av spesifikke, ikke-kovalente bindinger. Dette involverer dannelsen eller brudd på flere individuelle bindinger. Eksempler på dette er tap av hydrogenbindinger, elektrostatiske krefter eller van der Waals interaksjoner mellom protein og løsemiddel. Det kan også være

dannelsen av protein-ligand bindinger og reorganisering av det intramolekulære nettverket, samt reorganisering av løsemiddelnettverket (Connelly et al. 1993).

### 1.5.3 Bindingsentropi ( $\Delta S_r^\circ$ )

Endring i bindingsentropien er ofte relatert til dynamikken og fleksibiliteten til et system og blir som regel oversatt til endring i grad av uorden i systemet. Det er i hovedsak tre faktorer som påvirker endring bindingsentropien. Den største effekten er ofte løsemiddeleffekten ( $\Delta S_{\text{solv}}^\circ$ ); når proteinet ligger i ubundet tilstand vil løsemiddelet være bundet og strukturert rundt de hydrofobe overflatene til proteinet som fører til en nedgang i entropien. Ved interaksjon til ligand derimot, vil løsemiddel frigjøres og entropien vil derfor øke. En positiv entropiendring ved binding vil følgelig gi en sterk indikasjon på at et vannmolekyl er frigjort fra kompleksets overflate (Jelesarov & Bosshard 1999). En annen viktig effekt som virker på den totale bindingsentropien er endring i konformasjonen ved binding ( $\Delta S_{\text{conf}}^\circ$ ). En negativ endring i entropi kan observeres når en ligand binder til et protein grunnet redusert fleksibilitet (rotasjon- og vibrasjonsfrihetsgrader) hos både protein og ligand (Frederick et al. 2007). Videre vil det alltid være et tap av translasjonsentropi ved å bringe to spesies sammen til ett kompleks ( $\Delta S_{\text{mix}}^\circ$ ). En negativ endring i bindingsentropien trenger derfor ikke bety at hydreringen rundt protein-ligand komplekset forblir uendret eller økes ved binding. En positiv endring i bindingsentropien gir derimot en sterk indikasjon på at et vannmolekyl er frigjort fra komplekset.

### 1.5.4 Endring i varmekapasitet ( $\Delta C_p$ )

Endring i varmekapasiteten har flere ulike definisjoner, men blir vanligvis definert som temperaturavhengigheten til  $\Delta H$  (ligning 1.5.5) og  $\Delta S$  (ligning 1.5.6):

$$\Delta C_p = \frac{\partial \Delta H}{\partial T} \quad 1.5.5$$

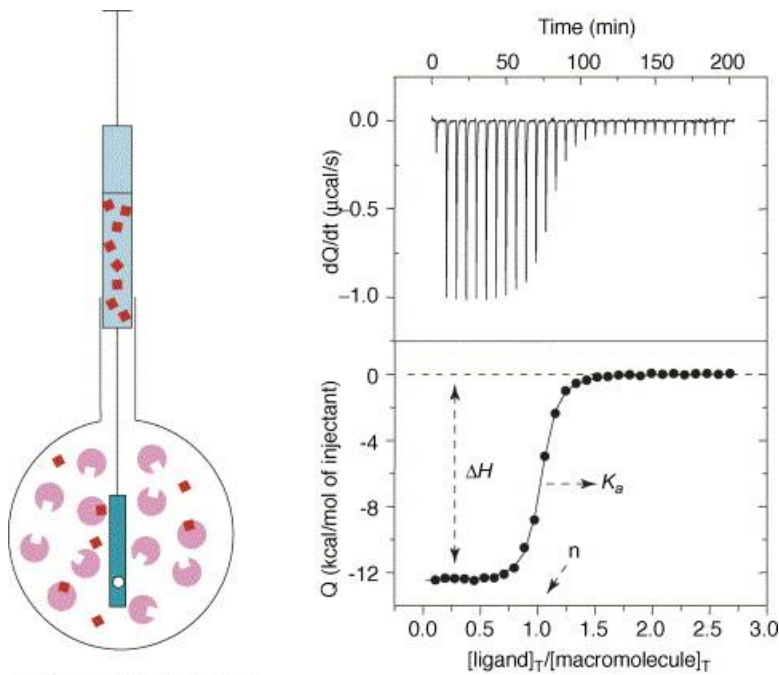
$$\Delta C_p = \frac{\partial \Delta S}{\partial \ln T} \quad 1.5.6$$

Hvor basisen til endring i varmekapasiteten er foreslått å være relatert til endringer i solvatiseringen av liganden og proteinet ved binding (Prabhu & Sharp 2005). Det er for eksempel blitt observert at tegnet til  $\Delta C_p$  er ulik for polar (+) og upolar (-) solvatisering, i motsetning til  $\Delta H$  og  $\Delta S$  som begge er negative for hydrering av både polare og upolare grupper. Hydrofobe interaksjoner, tidlig studert av Kauzmann (1959), er tenkt å være viktige for stabiliteten til flere proteinstrukturer og protein-ligand komplekser. Hydrofobe interaksjoner er mest sannsynlig resultatet av to prosesser: (1) frastøting av upolare grupper fra vann og (2) pakkingen av disse upolare gruppene inn mot senteret av proteinet eller proteinkomplekset (Connelly & Thomson 1992). Som et resultat av dette vil assosiasjonen mellom hydrofobe grupper i vann føre til en negativ endring i varmekapasitet ved konstant trykk (Syme et al. 2007). Den hydrofobe effekten er fremdeles debattert, men en vanlig tolkning av dette fenomenet går ut på at hydrofobe overflater induserer en "tangential" orientering av O-H bindinger i hydreringslaget nærmest overflaten ("first hydration shell"), og at dette ordnede vannet blir frigjort fra overflaten ved assosiasjon (Madan & Sharp 1999).

#### *1.5.5 Isoterm titreringskalorimetri (ITC)*

ITC er en av de mest direkte metodene for å måle endringen i varme når et kompleks dannes ved en konstant temperatur. Et titreringseksperiment blir utført ved å titrere flere injeksjoner med små volum av ligand inn i en proteinløsning. Etersom proteinet blir mer og mer mettet med ligand vil varmeutvekslingen avta og til slutt er det kun varme fra fortykning av liganden som observeres. Dette gir en titreringskurve av varme absorbert eller frigjort per mol ligand injisert. Ut i fra et enkelt ITC-forsøk kan både  $K_a$ ,  $\Delta H_r^\circ$  og støkiometrien  $n$  ved interaksjon bestemmes ut i fra titreringskurven, som vist i figur 1.5.1. Ut i fra  $K_a$  og  $\Delta H_r^\circ$  kan reaksjonens  $\Delta S_r^\circ$  og  $\Delta G_r^\circ$  beregnes. ITC kan også gi informasjon om solvatiseringseffekter ved binding. Dersom endring i varmeutveksling ved dannelse av protein-ligand komplekset måles ved ulike temperaturer kan  $\Delta C_p$  bestemmes. Som et resultat av dette, dersom den strukturelle komposisjonen til proteinet og liganden er kjent, kan ITC brukes til å identifisere de viktigste komponentene som bidrar til interaksjonen mellom protein og ligand (Freire 2004).





*Drug Discovery Today: Technologies*

Figur 1.5.1. Til venstre vises reaksjonscellen ved et ITC-forsøk med ligand (rød) og protein (rosa). Til høyre er ITC-profiler fra et typisk ITC-forsøk vist. Øverst til høyre er et termogram som viser varmemendringene underveis i forsøket. Nederst til høyre er en isotherm hvor parameterne  $\Delta H$ ,  $K_a$  og  $n$  kan bestemmes (Freire 2004).

Et ITC instrument består av to identiske celler, en prøvecelle og en referansecelle, som er laget av et svært effektivt varmeledende materiale. Cellene er dekket med en adiabatisk kappe som ofte blir avkjølt av et varmebad (Pierce et al. 1999). Sensitive termokretser detekterer temperaturforskjeller mellom de to cellene og mellom cellene og kappen slik at lik temperatur kan holdes konstant mellom alle komponentene. Ved et ITC-forsøk befinner proteinløsningen seg i prøvecellen, mens referansecellen inneholder buffer eller vann. Før injiseringen av ligand i prøvecellen blir referansecellen tilført en konstant strøm som aktiverer et varmeapparat som sitter på prøvecellen. Dette representerer baselinjen. Ved injisering av ligand vil det som blir direkte observert være mengden energi ( $\mu\text{cal}\cdot\text{sekunder}^{-1}$ ) som kreves for å opprettholde lik temperatur mellom prøvecellen og referansecellen.

Som nevnt tidligere blir resultatet av et ITC-forsøk en bindingsisoterm. Wiseman et al. (1989) observerte at formen på en bindingsisoterm endres med parameteren  $c$  som er produktet av assosiasjonskonstanten ( $K_a$ ) og proteinkonsentrasjonen ( $[M]_T$ ):

$$c = nK_a[M]_T$$

1.5.7

Hvor  $n$  er antall bindings seter per protein (Turnbull & Daranas 2003).  $c$  benyttes for å beskrive det praktiske vinduet til instrumentet som gir en nøyaktig bestemmelse av  $K_a$ , og bør ligge mellom 10-1000 (Wiseman et al. 1989). En lav  $c$ -verdi korresponderer til svak binding mellom protein og ligand, mens en høy  $c$ -verdi korresponderer til sterk binding. Dersom  $K_a$  er liten ( $<10^4 \text{ M}^{-1}$ ) vil bindingsisotermen bli flat og dermed gi upålitelige verdier av både  $\Delta H$  og  $K_a$ . En høyere  $c$ -verdi kan oppnås ved å øke konsentrasjonen til proteinløsningen og slik få en høyere grad av metning i de første injeksjonene. Dersom  $K_a$  er for stor ( $>10^9 \text{ M}^{-1}$ ) vil det bli for få data i ekvivalensregionen (hvor mengde fritt og bundet protein er i likevekt) slik at estimatet for  $K_a$  blir usikkert. For å få en mindre  $c$ -verdi må proteinløsningen i prøvecellen fortynnes. Turnbull og Daranas (2003) har vist det er mulig å studere lavaffinitetssystemer hvor  $c$ -verdien er mindre enn 10. Dette krever imidlertid at følgende kriterier er oppfylt: 1) en tilstrekkelig del av bindingsisotermen må brukes under forsøket; det vil si at proteinet må oppnå en høy metningsgrad ved for eksempel å bruke en høy konsentrasjon på ligand, 2) bindingsstøkiometrien må være kjent, 3) konsentrasjonen av ligand og protein må være nøyaktige, og 4) det må være høy nok signal-til-støy-ratio i dataene.

### 1.6 Mål med oppgaven

Det kitinolytiske maskineriet til *Serratia marcescens* består av kitinasene ChiA, ChiB og ChiC. ChiA og ChiB er prosessive eksoenzymmer, mens ChiC er et ikke-prosessivt endoenzym. I denne oppgaven har de termodynamiske signaturene for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til inaktive mutanter av ChiA og ChiC blitt bestemt ved hjelp av isoterm titreringskalorimetri (ITC) og sammenlignet med tilsvarende signaturer for ChiB. Dette ble gjort for å se om de termodynamiske signaturene kan knyttes opp mot deres unike egenskaper.

Det foreligger en hypotese om at det er en korrelasjon mellom bindingsfrienergi og prosessivitet. Det vil si at dersom et residu er viktig for prosessivitet så vil det mest sannsynlig også binde sterkt til substratet. Aromatiske residuer i det aktive setet hvor substratet forblir bundet under prosessiv hydrolyse har tidligere vist seg å være viktige for grad av prosessivitet. Derimot har lignende residuer i produktbindende seter vist seg å være mindre viktige for prosessivitet (Zakariassen et al. 2009). I denne oppgaven har derfor bidraget av tre ulike aromatiske residuer i ChiA (Trp<sup>167</sup>, Trp<sup>275</sup> og Phe<sup>396</sup>) til bindingsfrienergiendring blitt kvantifisert ved substratbinding til (GlcNAc)<sub>6</sub> med ITC.

For å kunne gjøre bindingsstudier med ITC måtte tre forutsetninger være oppfylt: 1) Inaktive kitinaser med mutert katalytisk syre, 2) muterte aromatiske residuer og 3) his(histidin)-taggede kitinaser for enkelt å kunne isolere store mengder med protein.

## 2. Materialer

### 2.1 Laboratorieutstyr

Laboratorieutstyr	Spesifikasjon	Leverandør
Autoklavteip	13 mm	VWR
Automatpipetter	Finnpipetter	Thermo Scientific
Avtrekkskap	Mc6	Waldner
Blåkorkflasker	1000 mL 500 mL 250 mL 100 mL 50 mL	VWR
Blåkorkrør	Cellstar® tubes 15 mL 50 mL	Greiner Bio-One
Bordrister	PS-3D	Grant-bio
Bordsentrifuge	Sigma 1-14	LABEX
Cryorør	2 mL	Starsted
Dyrkningkolber	2 L	BD Falcon
Elektroforeseutstyr	Gelkjøringskammer Gelspenningskilde Gelkniv UV-visualiseringskilde	Bio-Rad Bio-Rad PowerPac Basic Swann-Morton Benchtop UV Transilluminator UVP
Eppendorfrør	1,5 mL 2,0 mL	Axygen
Filter	Steritopp 0,22 µm	Millipore
Fluorometer	DyNA Quant 300	Hoefler
Fryser (-20 °C)		Bosch
Fryser (-80 °C)	Ultra-Low freezer	SANYO

## 2. Materialer

GATC Bokser		GATC Biotech AG
Gelfotoutstyr	Gel Doc EZ Imager	Bio-Rad
Glassutstyr		Schott-Duran
Inkubator		Termaks
Isbitmaskin	KF145	PORKKA
ITC-kalorimeter	VP-ITC Microcalorimeter	MicroCal
Kjøleskap		Gram
Kyvette	1 x 1 cm	VWR
LP-kromatografisystem	BioLogic LP System BioFrac Fraction Collector Kolonne Stempel	Bio-Rad
Magnetrører		VWR
Merketape	13 mm	VWR
Mikrobølgeovn	D142	Whirlpool
Mikrovekt	Sartorius CP-2P	VWR
Nanodrop	ND-1000	Saveen Werner
Oppkonsentreringsrør	Ultra-15 Ultra-30 Macrosep-10K Macrosep-30K	Millipore  Pall Corporation
Parafilm	10 cm og 5 cm bredde	VWR
PCR-maskin	PCR Doppio	VWR
PCR-rør	0,2 mL	VWR
Petriskåler	9 cm	Heger
pH-meter	SN400	Sentron
Pipettespisser	"Next Generation Tip Refill"	VWR
Risteinkubator	Multitron Standard Multitron Eco	Infors
Sentrifuge	Avanti™ J-25 SORVALL® RC 6 Sentrifuge- 5430 R	Beckman ONEMED Eppendorf
Sentrifugerotor	JA-10	Beckman

	SLA 3000	ONEMED
	5430/5430 R	Eppendorf
Sentrifugerør	500 mL	Nalgene
	30 mL	
Sonikator	Vibra Cell VCX500	Sonics
Spektrofotometer	AG Biophotometer	Eppendorf
Sprøytefilter	0,20 µm	Sarstedt
Sprøyter	1 mL	BD plastipak
	10 mL	
	50 mL	
Sterilskap	Av-100	TelStar
Vannbad	Eco Temp TW12	Julabo
Vekt	LC621P	Sartorius Basic
Whirlmikser	Vortex-Genie 2	Scientific Industries

## 2.2 Programvare til dataanalyse

Bruksområde	Programvare	Leverandør
ITC	ORIGIN 7.0	MicroCal
LP-kromatografisystem	LP Data View	Bio-Rad
Måle DNA-konsentrasjonen	NanoDrop 1000 (Versjon ND-100)	Thermo Scientific
Se og lagre bilder av geler	ImageLab	Bio-Rad
Sekvensering	CLC DNA Workbench 6	CLCbio
Visualisere DNA-kloning	pDraw32	Acaclone

## 2. Materialer

### 2.3 Kjemikalier

Kjemikalie	Leverandør
3-(N-morfolin) propansvovelsyre (MOPS) SDS buffer (20x)	Invitrogen
4- metylumbelliferon C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich
Aceton CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich
Agar, Bacto-agar	Merck
Agarose	Lonza
Ammoniumsulfat (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
Ampicillin C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	Sigma-Aldrich
Bacto™ Gjærekstrakt	BD
Bacto™ Trypton	BD
Bio-Rad Protein Assay Fargereagens	Bio-Rad
Coomassie® Brilliant Blue R-250	Bio-Rad
Destillert vann, dH <sub>2</sub> O (Milli-Q kvalitet)	
Dibasisk kaliumfosfat K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
Dibasisk Natriumhydrogenfosfat NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
DNA Loading Buffer	Invitrogen
Eddiksyre CH <sub>3</sub> COOH	Sigma-Aldrich
Etanol C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	VWR
Etanolamin C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO	Sigma-Aldrich
Etylenediaminetetraeddiksyre (EDTA) C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	Sigma-Aldrich
Fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF) C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> FO <sub>2</sub> S	Sigma-Aldrich
GelRed nukleinsyrer (10 000x)	Biotium
Glyserol C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	Merck
Hydrogenklorid HCl	Sigma-Aldrich
Imidazol C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich
Isopropanol C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	Merk
Isopropyl-1-tio-β-D-tiogalaktopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich
Kaliumdihydrogenfosfat KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich

---

Kaliumhydroksid KOH	Merk
Kloamfenikol C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Sigma-Aldrich
Magnesiumklorid MgCl <sub>2</sub>	VWR
Metanol CH <sub>3</sub> OH	Sigma-Aldrich
Monobasisk Natriumhydrogenfosfat NaHPO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
Natriumfosfat Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
Natriumhydroksid NaOH	VWR
Natriumkarbonat Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich
Natriumklorid NaCl	Sigma-Aldrich
NEBuffer2	New England BioLabs
NI-NTA Superflow	Qiagen
NuPAGE® 10 % Bis-Tris Gel 1,0mm x 10 brønner	Invitrogen
NuPAGE® Prøvebuffer (4x)	Invitrogen
NuPAGE® Reduserende agent (10x)	Invitrogen
Sepharose 6 Fast Flow	GE healthcare Life Sciences
Sitronsyre C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	VWR
Sukrose C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	VWR
Trizma base C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich

---



## 2. Materialer

### 2.4 Proteiner, enzymer og substrater

Protein/Enzym/Substrat	Spesifikasjoner	Leverandør
1 kb DNA ladder		New England BioLabs
4-methylumbelliferyl-D-N,N'- Diacetylkitobiose		Sigma-Aldrich
BenchMark protein ladder		Invitrogen
Bovin Serum Albumin (BSA) 100 x, 10 mg/mL		New England BioLabs
DNase I		Sigma-Aldrich
dNTP miks (10 mM)		Life Technologies
Generuler 1kb DNA ladder		Thermo Scientific
Heksaacetylkitohexaose		Megazyme
His-taggede kitinaser	His <sub>10</sub> -ChiA-WT	Selvlaget
	His <sub>10</sub> -ChiA-E315Q	Selvlaget
	His <sub>10</sub> -ChiA-E315Q/W275A	Selvlaget
	His <sub>10</sub> -ChiA-E315Q/W167A	Selvlaget
	His <sub>10</sub> -ChiA-E315Q/F396A	Daniel Schaupp
	His <sub>10</sub> -ChiC-WT	Selvlaget
	His <sub>10</sub> -ChiC-E141Q	Selvlaget
Lysozym		Sigma-Aldrich
NdeI		New England Biolabs
Q5 High-Fidelity DNA polymerase		New England BioLabs
Taq DNA 2x Polymerase MasterMix Red		Ampliqon
XhoI		New England Biolabs

## 2.5 Medier

### 2.5.1 Selvlagde medier

Medium	Innhold
LB-medium med agar	Trypton 10 g Gjærekstrakt 5 g NaCl 10 g Agar 15 g Løses i dH <sub>2</sub> O til et sluttvolum på 1 L Ampicillin tilsettes til en konsentrasjon på 100 µg/mL
LB-medium uten agar	Trypton 10 g Gjærekstrakt 5 g NaCl 10 g Løses i dH <sub>2</sub> O til et sluttvolum på 1 L
TB-medium	Trypton 12 g Gjærekstrakt 24 g Glycerol (85 %) 4 mL Løses i dH <sub>2</sub> O til et sluttvolum på 900 mL 100 mL filtrert saltløsning (0,17 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> og 0,72 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) tilsettes mediet til slutt

### 2.5.2 Ferdige medier

Medium	Innhold
SOC – medium	2 % Tryptone 0,5 % Gjærekstrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> 20 mM Glukose

### 2.6 Bakteriestammer og vektorer

Stamme	Spesifikasjon	Bruk	Leverandør
<i>Escheria coli (E. coli)</i>	Top10 superkompetente celler	Høy transformasjonseffektivitet	Invitrogen
<i>Escheria coli (E. coli)</i>	One Shot® BL21 Star (DE3)	Ekspresjon	Invitrogen
<i>Escheria coli (E. coli)</i>	Rosetta™ 2 (DE3) kompetente celler	Ekspresjon	Novagen
pET-16b DNA	His <sub>10</sub> -vektor	His-tagging	Novagen

### 2.7 Kit

Kit	Innhold	Leverandør
E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit I	Oppsamlingsrør (2 mL) Løsning I/RNase Løsning II (NaOH) Løsning III (Guanidin-HCl, Eddiksyre) HiBind™ DNA minikolonne Ekvilibreringsbuffer (NaOH) HB buffer (Guanidin-HCl, isopropanol) DNA vaskebuffer Elueringsbuffer	Omega BIO-TEK
In-Fusion HD Cloning Kit	5X In-Fusion HD Enzyme Premix Linearisert pUC19 kontrollvektor (50 ng/μl) 2 kb Kontrollinsert (40 ng/μl)	Clontech

---

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit	Oppsamlingsrør (2 mL) NT1 buffer NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kolonne NT3 buffer NE buffer (5 mM Tris-HCl pH 8,5)	Macherey-Nagel
Pellet paint® Co-Precipitant kit	0,3 M natriumacetat pH 5,2 Pellet paint® Co-Precipitant	Novagen
QuikChange II Site Directed Mutagenesis Kit	10x reaksjonsbuffer DpnI restriksjonsenzym dNTP miks PfuUltra HF DNA polymerase pWhitescript 4.5-kb kontrollplasmid (5 ng/ µl) Oligonukleotid kontrollprimer 1 Oligonukleotid kontrollprimer 2	Stratagene

## 2.8 Buffere og løsninger

Buffer/Løsning	Innhold
0,1 M Kaliumfosfatbuffer pH 6,0	13,2 mL 1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 86,8 mL 1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Fortynnes med dH <sub>2</sub> O til et totalvolum på 1L
1 M Tris-HCl pH 8,0	121 g Trizma base oppløst i dH <sub>2</sub> O Tilsetter konsentrert HCl til pH 8,0 Fortynnes til et totalvolum på 1 L med dH <sub>2</sub> O
50x TAE-buffer	242 g Trizma base 57,1 mL eddiksyre 100 mL 0,5M EDTA pH 8,0 Fortynnes til et totalvolum på 1 L med dH <sub>2</sub> O
Avfargingsløsning SDS-Page	100 mL Etanol 75 mL 100 % Eddiksyre 825 mL dH <sub>2</sub> O

## 2. Materialer

---

Bindingsbuffer NI-NTA	20 mM Tris-HCl pH 8,0 5 mM Imidazol 0,5 M NaCl
Citrat-fosfat (Mellvain) buffer pH 5,2	23,3 mL 0,1 M Sitronsyre 26,7 mL 0,2 M Natriumfosfat Fortynn til 100 mL med dH <sub>2</sub> O
Elueringsbuffer NI-NTA	20 mM Tris-HCl pH 8,0 250 mM Imidazol 0,5 M NaCl
Elueringsbuffer-HIC	20 mM Tris-HCl pH 8,0 4 % Isopropanol
Fargeløsning SDS-Page	0,50 g Comassie Brilliant Blue R250 200 mL Etanol 50 mL 100 % Eddiksyre 250 mL dH <sub>2</sub> O
Mobilfase-HIC	20 mM Tris-HCl pH 8,0 0,5 M Ammoniumsulfat
Spheroplastbuffer	100 mL 1 M Tris-HCl pH 8,0 171 g Sukrose 1 mL 0,5 M EDTA pH 8,0 2 mL PMFS Fortynnes til et totalvolum på 1 L med dH <sub>2</sub> O
Vaskebuffer NI-NTA	20 mM Tris-HCl pH 8,0 20 mM Imidazol 0,5 M NaCl

---

### 3. Metoder

#### 3.1 Design av mutant

For å gjøre bindingsstudier med ligand og enzym med ITC, må den katalytiske syren til enzymet muteres slik at det blir inaktivt. Den katalytiske syren til ChiA og ChiC ble endret fra glutamat (E) til glutamin (Q) slik at mutantene ble som følger: ChiA-E315Q og ChiC-E141Q. Den inaktive mutanten til ChiA var allerede laget, mens ChiC-E141Q måtte lages.

##### 3.1.1 Design av primere

To primere kreves for å danne en ønsket mutant; en forward og en revers primer. Primerene må være komplementære og ha riktig mutasjonssekvens. Design av primere ble gjort med QuickChange Primer Design Program, en programvare tilgjengelig på Agilent Technologies sine nettsider (Agilent Technologies 2013b). Primerene ble bestilt fra Life Technologies. Design og bestilling av primere ble utført av stipendiat Anne Grethe Hamre. Optimal bruk av en oligonukleotid som primer avhenger av flere faktorer som: 1) assosiasjon- og dissosiasjonskinetikken til primer-templat duplekset ved annealing- og ekstensjonstemperaturen, 2) stabiliteten til duplekset med ønsket «mismatch» mutasjon, samt 3) polymerasens evne til å gjenkjenne et «mismatched» dupleks og forlenge seg fra dette. Sekvensen til primere som brukes under PCR (polymerase kjedereaksjon) amplifikasjon kan ha stor innvirkning på reaksjonens spesifisitet og sensitivitet. Det er derfor noen retningslinjer som bør følges når primere designes. Lengden på primerene bør være mellom 18 og 30 baser, smeltetemperaturen ( $T_m$ ) mellom 52-58 °C og GC-innholdet mellom 45-60 %. Det er viktig å ta i betraktning at GC-innhold, hybridisering (annealing)- og smeltetemperatur avhenger av hverandre (Abd-Elsalam 2003). Primerene som ble benyttet for å lage ChiC-E141Q er vist i tabell 3.1.1.

Tabell 3.1.1. Primere som ble benyttet til seterettet mutagenese av ChiC-E141Q.

Mutant	DNA-templat	Primer	Sekvens (5'-3')
ChiC-E141Q	ChiC villtype	Forward	CTGGATATCGATCTGCAGCAGGCGGCGATCGGC
		Reverse	GCCGATCGCCGCCTGCTGCAGATCGATATCCAG

#### 3.1.2 Oppdyrking av bakteriestamme

I forkant av seterettet mutagenese var det nødvendig å dyrke opp *E. coli* celler med ChiC villtype (WT) plasmid. Plasmidet ble senere brukt som templat for muteringen beskrevet i avsnitt 3.1.5.

#### Materialer:

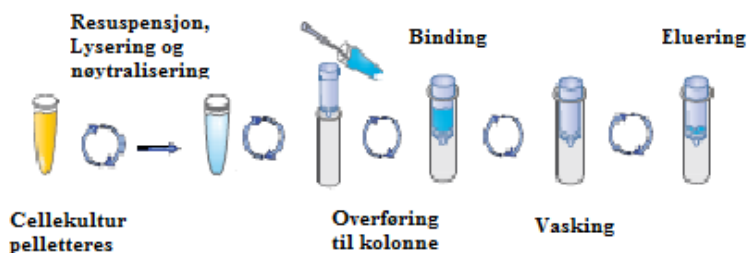
- LB-medium
- Ampicillin (50 mg/mL)
- Frysekultur med bestemt bakteriestamme

#### Metode:

5 mL LB-medium tilsatt 5 µL ampicillin (50 mg/mL) ble inokulert med celler fra bestemt frysekultur. Bakteriekulturen ble dyrket ved 37 °C og 220 rpm over natt (~16 timer).

#### 3.1.3 Isolering av plasmid fra cellekultur

Isolering av plasmid fra cellekultur ble gjort ved hjelp av E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I. Ved bruk av dette kitet skjer først en alkalisk lysing av cellene. DNA blir så bundet til en HiBind® DNA kolonnematriks. Kolonnen blir deretter vasket og til slutt elueres DNA med en buffer med lavt saltinnhold (VWR 2012). De ulike trinnene er vist i figur 3.1.1



Figur 3.1.1. Isolering av plasmid med E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I (VWR 2012).

Materialer:

- Cellekultur av bestemt bakteriestamme
- E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I

Metode:

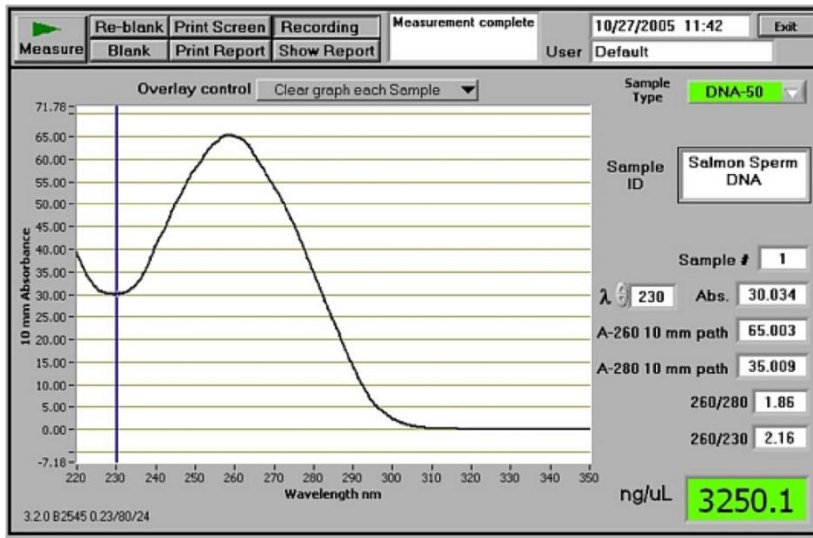
Cellekulturen ble overført til et eppendorfrør og høstet ved sentrifugering i ett minutt ved 10 000 x g. Videre ble cellepelleten resuspendert i 250 µL løsning I (tilsatt RNase A). Det ble så tilsatt 250 µL løsning II og løsningen ble blandet forsiktig til det ble dannet et klart lysat. Deretter ble 350 µL løsning III tilsatt og løsningen raskt blandet slik at en hvit utfelling ble dannet. Denne løsningen ble sentrifugert i 10 minutter ved 13 000 x g og deretter overført til en HiBind® DNA mini kolonne plassert i et oppsamlingsrør. Kolonnen var tidligere ekvilibrert med 100 µL ekvilibreringsbuffer og sentrifugert i ett minutt ved 13 000 x g. For å vaske kolonnen ble først 500 µL HB buffer og deretter 700 µL DNA vaskebuffer (fortynnet i etanol) tilsatt. Mellom hvert rensessteg ble kolonnen sentrifugert i ett minutt ved 13 000 x g. For å tørke kolonnematriksen etter vask ble den sentrifugert i to minutter ved 13 000 x g. Til slutt ble kolonnen plassert i et nytt eppendorfrør og tilsatt 30 µL elueringsbuffer. Plasmidet ble eluert ved å sentrifugere kolonnen i ett minutt ved 13 000 x g. Isolert plasmid ble oppbevart ved -20 °C.

**3.1.4 Måling av DNA-konsentrasjon med NanoDrop**

Etter isolering av plasmid er det ønskelig å vite konsentrasjonen på plasmidet før videre bruk. Konsentrasjonen ble målt med et Thermo Scientific NanoDrop ND-1000 spektrofotometer. Dette spektrofotometeret måler DNA-konsentrasjoner fra 2-3700 ng/µL uten fortykning, ved en bølgelengde på 260 nm (Thermo Fisher Scientific Inc 2008). Programvaren ND-1000 måler prøvens konsentrasjon og gir en kurve som indikerer prøvens renhet. Et rent plasmid får et spekter likt det i figur 3.1.2. Dersom prøven er uren vil spekteret avvike fra dette.



### 3. Metoder



Figur 3.1.2. Et eksempel på en måling av DNA-konsentrasjon med NanoDrop 1000. Kurven indikerer at plasmidet i prøven er ren. DNA-konsentrasjonen er vist nederst til høyre (Brigham Young University 2014).

#### Materialer:

- Thermo Scientific NanoDrop ND-1000 spektrofotometer
- Renset plasmid
- Elueringsbuffer (fra E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit I)
- dH<sub>2</sub>O

#### Metode:

Vasking og nullstilling av spektrofotometeret ble gjort med 2 µL dH<sub>2</sub>O. For kalibrering ble 2 µL elueringsbuffer benyttet. Til slutt ble DNA-konsentrasjonen målt ved å applisere 2 µL plasmid.

#### **3.1.5 Seterettet mutagenese**

Seterettet mutagenese er en metode for å lage spesifikke punktmutasjoner i DNA. En spesifikk punktmutasjon kan resultere i en endring i mRNA sekvensen til et protein produsert av cellen og dermed også aminosyresekvensen. Seterettet mutagenese ble utført ved å bruke Stratagene's QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit. Ved hjelp av temperaturøkning blir DNA først denaturert slik at dobbelheliksen blir til to enkelttråder. Primere med ønsket mutasjon binder seg til templatet og forlenges av PfuUltra (HF) DNA polymerase fra kitet (Agilent Technologies 2013a). Seterettet mutagenese ble utført med PCR (se avsnitt 3.1.6).

Materialer:

- QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit
- Primere (jfr. tabell 3.1.1)
- dsDNA templat: Renset plasmid av ChiC villtype

Metode:

Prøvereaksjonen vist i tabell 3.1.2 og kontrollreaksjonen vist i tabell 3.1.3 ble laget i PCR-rør stående på kuldeblokk.

Tabell 3.1.2. Prøvereaksjon ved seterettet mutagenese.

<b>Komponent</b>	<b>Mengde (µL)</b>
10 x reaksjonsbuffer	5
ChiC villtype dsDNA templat (75-100 ng/µL)	1
ChiC-E141Q primer forward	1,25
ChiC-E141Q primer reverse	1,25
dNTP miks	1
ddH <sub>2</sub> O	40,5
<i>PfuUltra</i> HF DNA polymerase	1
Totalt	51

Tabell 3.1.3. Kontrollreaksjon ved seterettet mutagenese.

<b>Komponent</b>	<b>Mengde (µL)</b>
10 x reaksjonsbuffer	5
pWhitescript 4,5 kb kontrollplasmid	2
Kontrollprimer 1 (forward)	1,25
Kontrollprimer 2 (reverse)	1,25
dNTP miks	1
ddH <sub>2</sub> O	39,5
<i>PfuUltra</i> HF DNA polymerase	1
Totalt	51

#### 3.1.6 Polymerase kjedereaksjon (PCR) og DpnI behandling

PCR er en metode som amplifiserer en bestemt DNA-sekvens. Reaksjonen baserer seg på termiske sykluser hvor temperaturen i syklusen økes og senkes for å splitte dobbelttråden til to enkelttråder og for enzymatisk replikasjon av DNA-tråden. En PCR-reaksjon kan deles inn i tre trinn: 1) Denaturering av DNA ved høy temperatur, 2) hybridisering der temperaturen senkes slik at primerene kan feste seg til DNA-trådene, og 3) forlengelse av DNA-trådene ved at polymerasen syntetiserer nytt DNA. Syklusen gjentas for å oppnå ønsket mengde DNA. Etter endt PCR blir DpnI (endoduklease) tilsatt PCR-produktet for å bryte ned metylert foreldre-DNA samt hemimetylert DNA (villtype DNA med fraksjoner av PCR-produkt) (Agilent Technologies 2013a).

#### Materialer:

- PCR-reaksjoner fra avsnitt 3.1.5
- DpnI

#### Metode:

Reaksjonssyklusene som ble benyttet er vist i tabell 3.1.4.

Tabell 3.1.4. Oversikt over PCR-program brukt ved seterettet mutagenese av ChiC.

Reaksjonstrinn	Temperatur (°C)	Tid	Antall sykluser
<b>Oppvarming</b>	110		1
<b>Initiell denaturering</b>	95	30 sekunder	1
<b>Denaturering</b>	95	30 sekunder	18
<b>Hybridisering</b>	55	1 minutt	
<b>Forlengelse</b>	68	5,5 minutter*	
<b>Nedkjøling</b>	10		1

\* 5,5 minutter for å gjøre ekstensjonstiden til rundt 1 minutt per kilobase.

Etter endt PCR ble 1 µL DpnI tilsatt PCR-produktet. DpnI-reaksjonene ble inkubert i 1 time ved 37 °C.

### 3.1.7 Utfelling av plasmid

Før transformering inn i One Shot® TOP10 superkompetente *E. coli* celler ble plasmidet rensset og oppkonsentrert ved hjelp av Pellet Paint® Co-Precipitant Kit fra Novagen. Ved bruk av kitet felles plasmidet ut i form av en rosa pellet. Dette gjør det enkelt å fjerne primere og annet uønsket materiale før transformering (Emd Millipore 2014).

#### Materialer:

- DpnI behandlede reaksjoner (jfr. avsnitt 3.1.6)
- Pellet Paint® Co-Precipitant
- Etanol
- Natriumacetat (3 M)
- dH<sub>2</sub>O

#### Metode:

De DpnI behandlede reaksjonene ble overført til eppendorfrør. 2 µL Pellet Paint® Co-Precipitant og 0,1 volum natriumacetat ble tilsatt før løsningen ble blandet forsiktig. Videre ble 2 volum 96 % etanol tilsatt. Løsningen ble blandet og inkubert i romtemperatur i 2 minutter. For å felle ut DNA ble løsningen sentrifugert ved 16 000 x g i 5 minutter. Etter sentrifugering ble supernatanten fjernet og pelleten rensset ved å tilsette flere volum 70 % etanol med påfølgende sentrifugering. Supernatanten ble på nytt fjernet og pelleten ble rensset ved å tilsette 96 % etanol før siste sentrifugeringstrinn ble utført. Etter fjerning av supernatant ble plasmidet inkubert i romtemperatur inntil all etanol var fordampet. Pelleten ble til slutt resuspendert i 5 µL dH<sub>2</sub>O.

### 3.1.8 Transformering av plasmid inn i One Shot® TOP10 superkompetente celler

Rensset og oppkonsentrert plasmid ble transformert inn i One Shot® TOP10 superkompetente *E. coli* celler. Plasmidet ble transformert inn i disse cellene fordi de er godt egnet til å ta opp fremmed DNA, samtidig som de har en høy transformasjonseffektivitet (1 x 10<sup>9</sup> cfu/µg plasmid DNA) med en stabil reproduksjon av plasmidet (Life Technologies 2014). TOP10 vektoren har et gen som koder for resistens mot ampicillin og cellekulturen ble derfor

### 3. Metoder

---

dyrket på LB-agarplater inneholdende ampicillin slik at uønsket vekst av andre bakterier ble hindret.

#### Materialer:

- One Shot® TOP10 superkompetente *E. coli* celler
- Renset og oppkonsentrert plasmid
- SOC-medium
- To LB-agarplater (100 µg/mL ampicillin)
- Ampicillin (50 mg/mL)

#### Metode:

Et rør med One Shot® TOP10 superkompetente *E. coli* celler ble tint forsiktig på is før 5 µL (5-10 ng/µL) plasmid ble tilsatt til cellene og blandet forsiktig. Cellene ble inkubert i 30 minutter på is. Videre ble reaksjonene varmebehandlet ved 42 °C i 30 sekunder. Reaksjonen ble plassert på is i 2 minutter før 250 µL forvarmet (42 °C) SOC-medium ble tilsatt. Reaksjonene ble deretter inkubert i 1 time ved 37 °C og 220 rpm. Etter endt inkubasjon ble 100 µL cellekultur platet ut på hver sin LB-agarplate inneholdende 100 µg/mL ampicillin. Platene ble inkubert ved 37 °C over natt.

#### **3.1.9 Oppdyrking av transformanter**

Oppdyrking av transformanter fra LB-agarplatene ble utført som beskrevet i avsnitt 3.1.2.

#### **3.1.10 Isolering av plasmid til sekvensering**

Isolering av plasmid med mutert DNA ble utført som beskrevet i avsnitt 3.1.3. Videre ble DNA-konsentrasjon bestemt med NanoDrop som beskrevet i avsnitt 3.1.4.

#### **3.1.11 Tillaging av sekvenseringsreaksjoner**

For å bekrefte riktig mutasjon i villtypeplasmidet ble mutert plasmid sendt til GATC Biotech i Constance, Tyskland for sekvensering. Ved DNA-sekvensering blir nukleotidsekvensen til

DNAet funnet. Ved å sammenligne nukleotidsekvensen med villtypesekvensen kan riktig mutasjon bekreftes eller avkreftes. Sammenligning av nukleotidsekvenser ble gjort med programvaren *CLC DNA Workbench*. Primere brukt til sekvensering av ChiC-E141Q er presentert i tabell 3.1.5.

Tabell 3.1.5. Primere brukt til sekvensering av ChiC-E141Q.

Primer	Sekvens (5'-3')
Seq_371_fw	TTATTCGCCTGGTGGAAGTC
Seq_574_rev	AATCCAGATAGGTGCCGTTG
Seq_848_rev	GCGTTATACACCGCCTGTTT
Seq_639_fw	CGGTATTTGGGTGGATGAAC

#### Materialer:

- Isolert plasmid med en konsentrasjon på 80-100 ng/μL
- Sekvenseringsprimere (tabell 3.1.5)
- (Elueringsbuffer fra E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit I)

#### Metode:

5 μL av hver primer ble tilsatt 5 μL plasmid med en konsentrasjon på 80-100 ng/μL i hvert sitt eppendorfrør, til sammen 4 sekvenseringsreaksjoner. Prøvene ble merket og sendt til GATC Biotech for sekvensering.

#### **3.1.12 Transformering av plasmid inn i One Shot® BL21 star (DE3) celler**

For å få økt uttrykking av ønsket protein ble ChiC-E141Q plasmid transformert inn i One Shot® BL21 star (DE3) *E. coli* celler. Disse cellene har et T7-promoter ekspresjonssystem; et system som produserer mer protein enn andre ekspresjonssystemer. Disse cellene mangler to proteaser (*lon* og *ompT*) som vanligvis finnes i *E. coli* og som degraderer «unormale» og ekstracellulære proteiner (Biomol 2004). Fordelen med å fjerne disse proteasene er at cellene mest sannsynlig ikke degraderer ønsket protein. Cellekulturen ble dyrket på LB-agarplater inneholdende ampicillin slik at uønsket vekst av andre bakterier ble hindret.

### 3. Metoder

---

#### Materialer:

- One Shot® BL21 star (DE3) *E. coli* celler
- Aktuelt plasmid (ChiC-E141Q)
- SOC-medium
- LB-agarplater (100 µg/mL ampicillin)
- Ampicillin (50 µg/mL)

#### Metode:

Et rør med One Shot® BL21 star (DE3) *E. coli* celler ble tint forsiktig på is før 10 ng plasmid ble tilsatt cellene og blandet forsiktig. Resten av prosedyren er lik den beskrevet for transformering inn i One Shot® TOP10 *E. coli* celler i avsnitt 3.1.8.

#### ***3.1.13 Oppdyrking av transformanter***

Oppdyrking av transformanter fra LB-agarplatene ble utført som beskrevet i avsnitt 3.1.2.

#### ***3.1.14 Tillaging av frysekultur***

Det ble laget frysekultur av cellekulturene fra avsnitt 3.1.13 for oppbevaring ved -80 °C.

#### Materialer

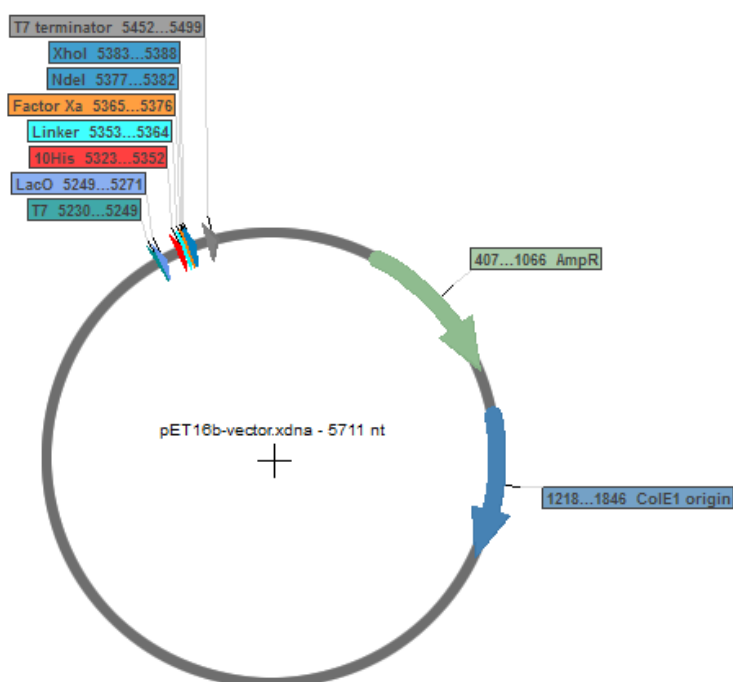
- Cellekultur
- 87 % glycerol

#### Metode

En frysekultur bestående av 1050 µL cellekultur og 450 µL 87 % glycerol ble laget i et cryorør. Frysekulturen ble oppbevart ved -80 °C.

### 3.2 Tillaging av histidin (his)-taggede kitinaser

For å optimalisere rensing av inaktive kitinase-mutanter ble det påført en polyhistidintag på enden av proteinet. En polyhistidintag kan variere i størrelse, men det ble i denne oppgaven brukt en vektor med 10 histidinresiduer. Fordelen med å sette på en slik tag er at proteinet kan renses i et enkelt steg med affinitetskromatografi. Ønsket DNA ble satt inn i vektoren pET-16b som inneholder en N-terminal his-tag sekvens, se figur 3.2.1 for vektorkart. His-taggen vil da sitte på proteinet ved uttrykking.



Figur 3.2.1. Vektorkart for pET-16b (laget med programvaren SerialCloner 2.0).

#### 3.2.1 Transformering av pET-16b inn i One Shot® TOP10 superkompetente celler

pET-16b vektoren ble transformert inn i TOP10 superkompetente *E. coli* celler. Vektoren ble mottatt som tørrstoff (10 ng) og ble fortynnet med 10  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O. 4  $\mu$ L av løsningen med vektor ble tilsatt et rør med One Shot® TOP10 superkompetente *E. coli* celler. Ellers ble transformeringen utført som beskrevet i avsnitt 3.1.8. Videre ble oppdyrking av transformanter, isolering av plasmid og tillaging av frysekultur utført som beskrevet i henholdsvis avsnitt 3.1.2, 3.1.3 og 3.1.14.



#### 3.2.2 Restriksjonskutting av pET-16b med XhoI og NdeI

pET-16b ble kuttet med restriksjonsenzymene XhoI og NdeI for senere å kunne ligeres sammen med DNAet til aktuell kitinase. BSA (Bovin serum albumin) ble tilsatt for å hindre at enzymene festet seg til rør- og pipetteoverflater (New England BioLabs 2013a), mens NEBuffer 2 ble tilsatt for å sikre optimal aktivitet av restriksjonsenzymene (New England BioLabs 2013b).

##### Materialer:

- pET-16b plasmid
- XhoI
- NdeI
- BSA
- NEBuffer2

##### Metode:

En kuttereaksjon ble laget i et eppendorfrør som beskrevet i tabell 3.2.1.

Tabell 3.2.1. Kuttereaksjon for restriksjonskutting av pET-16b plasmid.

<b>Komponent</b>	<b>Mengde (µL)</b>
XhoI	2
NdeI	2
BSA	0,5
NEBuffer2	5
pET-16b plasmid	40,5

Kuttereaksjonen ble inkubert i 2 timer ved 37 °C.

#### 3.2.3 Analyse av DNA ved hjelp av agarose-gelelektroforese

Kuttereaksjonene ble analysert med agarose-gelelektroforese. Agarose-gelelektroforese er en metode for å separere DNA fragmenter. Det benyttes en agarosegel som tilføres strøm. Hver side av gelen kommer i kontakt med positiv anode lengst fra brønnene i gelen og negativ

anode nærmest. Etersom fosfatgruppene i DNA er negativt ladet vil DNA-fragmentene vandre mot den positive anoden. Dersom DNA fragmentene er av ulik størrelse vil fragmentene med lavest motstand (færrest antall basepar) vandre raskest gjennom gelen, mens de med større motstand (flere antall basepar) vil vandre saktere. Om et analysert DNA-fragment har ønsket størrelse kan sjekkes ved å sette på en DNA størrelsesmarkør. For å observere DNA-fragmenter og størrelsesmarkøren på agarosegelen må det tilsettes et fargestoff, for eksempel GelRed, som gjør at DNA-fragmentene i gelen kan visualiseres under UV-lys. Loadingbuffer må tilsettes DNA-fragmentene slik at de blir tyngre enn bufferen og synker ned i brønnen ved applisering.

#### Materialer:

- Kuttet pET-16b plasmid
- 1 x TAE-buffer
- Agarose
- GelRed
- Loadingbuffer
- DNA størrelsesmarkør

#### Metode:

Det ble benyttet en 1 % agarosegel bestående av 50 mL 1 x TAE-buffer og 0,5 g agarose. TAE-buffer og agarose ble blandet i en erlenmeyerkolbe og alle partikler ble oppløst ved å varme opp løsningen i en mikrobølgeovn. Videre ble 1 µL GelRed tilsatt før løsningen ble helt over i en støpeform og en kam med med åtte brønner ble satt i. Da gelen hadde størknet ble kammen tatt ut og gelen med støpekar ble satt i elektroforesekaret. Elektroforesekaret ble fylt med 1 x TAE-buffer og DNA størrelsesmarkøren ble tilsatt den første brønnen (mengden avhenger av type markør). 10 µL loadingbuffer ble tilsatt kuttereaksjonene før de ble applisert til hver sin brønn. Agarosegelen ble påsatt 90 V til DNA-fragmentene hadde vandret gjennom gelen. DNA-fragmentene ble visualisert med UV-lys og bånd med riktig størrelse (5711 basepar for pET-16b vektoren) ble kuttet ut av gelen, overført til forhåndsveide eppendorfrør og oppbevart ved -20 °C.

#### 3.2.4 Oppamplifisering av DNA med kutteseter for *NdeI* og *XhoI*

Plasmidet til kitinasene som skulle his-tagges måtte ha et kuttesete for henholdsvis *NdeI* og *XhoI* på motsatt ende av hverandre for å kunne limes inn pET-16b vektoren. Ettersom his-taggen skulle bli plassert på N-terminal ende av proteinet måtte starten av DNA-sekvensen (5'-enden) ha et kuttesete for *NdeI* og (3'-enden) et kuttesete for *XhoI*. Produksjon av kutteseter ble utført med PCR, aktuelle primere og Q5 High-Fidelity DNA polymerase. Aktuelle primere ble designet av stipendiat Anne Grethe Hamre. Det er viktig at 5'-enden til primeren har 15 homologe baser med enden til DNAet som skal klones. 3'-enden av primeren må være spesifikk til målgenet og bør være 18-25 baser lang med et GC-innhold på mellom 40 og 60 %. Den bør ha en  $T_m$  mellom 58-65 °C og ikke inneholde rekker med identiske nukleotider (Clontech 2014). Primerene som ble benyttet for de ulike kitinasene er vist i tabell 3.2.2.

Tabell 3.2.2. Primere benyttet til oppamplifisering av DNA med kutteseter for *NdeI* og *XhoI*.

<b>Kitinase</b>	<b>DNA-templat</b>	<b>Primer</b>	<b>Sekvens (5'-3')</b>
ChiA-WT, -E315Q, -E315Q/W167A, -E315Q/W275A	ChiA villtype	Forward	TCGAAGGTCATATGGCCGCGCCGGGC
		Reverse	CAGCCGGATCCTCGAGTTATTCGCCGGCGC
ChiC-WT, -E141Q	ChiC villtype	Forward	TCGAAGGTCATATGAGCACAAATAACACTATTAATGC
		Reverse	AGCCGGATCCTCTTAGGCGATGAGCTGCCA

#### Materialer:

- Aktuelt kitinase plasmid
- Primere (20 pmol/μL)
- dNTP mix (10 mM)
- Q5 High-Fidelity DNA polymerase
- 5X Q5 reaksjonsbuffer
- dH<sub>2</sub>O

#### Metode:

Prøvereaksjonen vist i tabell 3.2.3 ble laget i PCR-rør stående på kuldeblokk.

Tabell 3.2.3. PCR-reaksjon for oppamplifisering av DNA med kuttesete for XhoI og NdeI.

Komponent	Mengde ( $\mu\text{L}$ )
5X Q5 reaksjonsbuffer	10
Kitinase plasmid	1
Primer forward	2,5
Primer reverse	2,5
10 mM dNTP mix	1
dH <sub>2</sub> O	32,5
Q5 High-Fidelity DNA polymerase	0,5
Totalt	50

PCR-programmet som ble benyttet er vist i tabell 3.2.4.

Tabell 3.2.4. PCR-program brukt under oppamplifisering av kitinase-DNA med kutteseter for NdeI og XhoI.

Reaksjonstrinn	Temperatur ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tid	Antall sykluser
<b>Oppvarming</b>	110		1
<b>Initiell denaturering</b>	98	30 sekunder	1
<b>Denaturering</b>	98	5 sekunder	30
<b>Hybridisering</b>	55	30 sekunder	
<b>Forlengelse</b>	72	30 sekunder	
<b>Endelig forlengelse</b>	72	2 minutter	1
<b>Nedkjøling</b>	10		1

### 3.2.5 Analyse av DNA ved hjelp av agarose-gelelektroforese

Etter endt PCR-reaksjon ble reaksjonene analysert med agarose-gelelektroforese som beskrevet i avsnitt 3.2.3. Riktig DNA-fragment (cirka 1500 basepar) ble kuttet ut av gelen, overført til forhåndsveide eppendorfrør og oppbevart ved  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.2.6 *Isolering av kitinase- og pET-16b DNA fra agarosegel*

Før ligering av kitinase med pET-16b vektoren ble oppamplifisert kitinase-DNA og restriksjonskuttet pET-16b fra agarosegel rensset med et NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel 2014). Agarosegelen med DNA blir løst i en bindingsbuffer under oppvarming. Videre blir DNA bundet til en NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kolonne grunnet tilstedeværelsen av et chaotropisk salt som ødelegger den ordnede strukturen av vannmolekyler som dekker DNA. Kontaminanter blir deretter vasket vekk med en vaskebuffer inneholdende etanol, før eluering av DNA utføres ved å bruke en noe alkalisk elueringsbuffer med lav saltkonsentrasjon.

#### Materialer:

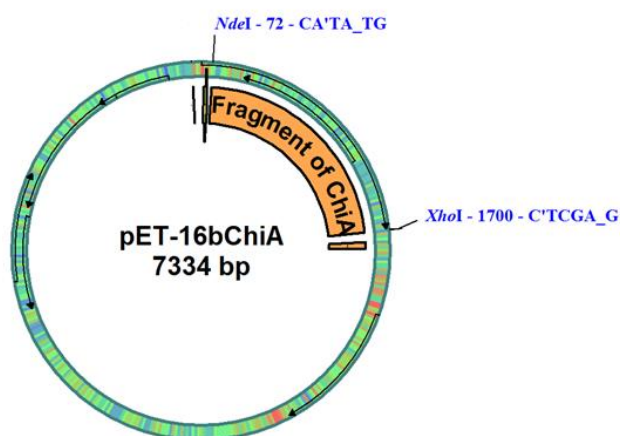
- Gelbiter inneholdende henholdsvis restriksjonskuttet pET-16b og kitinase-DNA
- NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit

#### Metode:

Vekten på gelbiten ble bestemt og 200 µL Buffer NTI per 100 mg agarosegel (1 %) ble tilsatt eppendorfrøret. Dette ble inkubert ved 50 °C i 5-10 minutter. Løsningen ble blandet med vortex hvert andre minutt til gelbiten var fullstendig oppløst. En NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kolonne ble plassert i et oppsamlingsrør før 700 µL prøve ble tilsatt. Dette ble sentrifugert ved 11 000 x g i 30 sekunder. Steget ble gjentatt dersom det var mer oppløst prøve igjen. 700 µL Buffer NT3 ble tilsatt kolonnen og sentrifugert ved 11 000 x g i 30 sekunder. Dette ble repetert én gang. Kolonnen ble deretter sentrifugert ved 11 000 x g i 1 minutt for å fjerne all Buffer NT3. Kolonnen ble videre plassert i et eppendorfrør før 15 µL oppvarmet (72 °C) Buffer NE ble tilsatt kolonnen. Dette ble inkubert i romtemperatur i 1 minutt og deretter sentrifugert ved 11 000 x g i 1 minutt. DNA-konsentrasjonen ble målt som beskrevet i avsnitt 3.1.4 og DNA ble oppbevart ved -20 °C.

### 3.2.7 Ligering av pET-16b med ønsket DNA

For å ligere pET-16b med ønsket kitinase-DNA ble et In-Fusion® HD Cloning Kit benyttet. Dette kitet er designet for rask og direksjonal kloning av ett eller flere fragmenter av DNA inn i en vektor ved hjelp av et In-Fusion Enzym. Dette enzymet gjenkjenner et 15 basepar overlapp ved endene på insertet (PCR-generert sekvens) og den lineariserte vektoren (Clontech 2014). I figur 3.2.2 kan pET-16b vektor med ChiA-DNA observeres.



Figur 3.2.2. pET-16b vektor med ChiA-DNA (laget med programvaren pDRAW32).

#### Materialer:

- In-Fusion® HD Cloning Kit
- Renset lineær pET-16b vektor kuttet med NdeI og XhoI
- Renset kitinase-DNA med kuttsetter for NdeI og XhoI

#### Metode:

En kloningsreaksjon, en negativ kontrollreaksjon og en positiv kontrollreaksjon ble laget i hvert sitt eppendorfør som vist i tabell 3.2.5. In-Fusion® Molar Ratio Kalkulator ble brukt for å regne ut mengde insert og vektor som skulle tilsettes kloningsreaksjonen basert på antall basepar kitinase-DNAet og pET-16b vektoren hadde.

### 3. Metoder

Tabell 3.2.5. Klonings- og kontrollreaksjoner laget med In-Fusion® HD Cloning Kit.

<b>Komponent</b>	<b>Kloningsreaksjon</b>	<b>Negativ kontrollreaksjon</b>	<b>Positiv kontrollreaksjon</b>
Insert (kitinase-DNA)	84,2 ng	-	2 µL av 2 kb kontrollinsert
Kuttet pET-16b vektor	150 ng	1 µL	1 µL av pUC19 kontrollvektor
5X In-Fusion HD Enzyme Premix	2 µL	2 µL	2 µL
dH <sub>2</sub> O	til 10 µL	til 10 µL	til 10 µL

Reaksjonene ble inkubert 15 minutter ved 50 °C før de ble plassert på is.

#### ***3.2.8 Transformering av ligeringsprodukt inn i One Shot® TOP10 superkompetente celler***

2 µL av ligeringsproduktet ble tilsatt et rør med One Shot® TOP10 superkompetente *E. coli* celler. Ellers ble transformeringen utført som beskrevet i avsnitt 3.1.8.

#### ***3.2.9 Kontroll av transformanter med Taq DNA polymerase***

For å undersøke om transformantene inneholdt kitinase-DNA av riktig størrelse før de ble sendt til sekvensering ble de kontrollert med Taq DNA polymerase 2x MasterMix Red. Denne blandingen inneholder Taq DNA polymerase, reaksjonsbuffer, dNTP og loadingbuffer, og er derfor enkel å bruke. Ved å tilsette ønsket DNA templat og aktuelle primere (forward og reverse) vil Taq DNA polymerasen, med PCR, oppamplifisere det ønskede DNAet. Et bånd rundt 1500 basepar på agarosegelen indikerer at transformantene består av ønsket kitinase-DNA.

#### Materialer:

- LB-agarplater med transformanter
- Primere til aktuell kitinase (jfr. tabell 3.2.2)

- Taq DNA polymerase 2x MasterMix Red
- dH<sub>2</sub>O
- Ampicillin (50 mg/ml)

Metode:

En tannpirker med celler fra en koloni på en LB-agarplate ble strøket inntil veggen i et PCR-rør. Tannpirkeren ble videre overført til 5 mL LB-medium inneholdende 5 µL ampicillin (50 mg/mL), som beskrevet i avsnitt 3.1.2. Dette ble gjort for flere kolonier. Videre ble det laget en reaksjonsblanding i PCR-rørene som vist i tabell 3.2.6. Reaksjonsblandingene ble holdt på kuldeblokk.

Tabell 3.2.6. PCR-reaksjon for kontroll av transformanter med Taq DNA polymerase.

Komponent	Mengde (µL)
Taq DNA Polymerase 2x MasterMix Red	25
Primer forward	1
Primer reverse	1
dH <sub>2</sub> O	23
<b>Totalt</b>	<b>50</b>

PCR-programmet som ble benyttet er vist i tabell 3.2.7.

Tabell 3.2.7. PCR-program brukt til oppamplifisering av DNA med Taq DNA polymerase.

Reaksjonstrinn	Temperatur (°C)	Tid	Antall sykluser
<b>Oppvarming</b>	110		1
<b>Initiell denaturering</b>	94	30 sekunder	1
<b>Denaturering</b>	94	45 sekunder	35
<b>Hybridisering</b>	55	30 sekunder	
<b>Forlengelse</b>	72	1 minutt	
<b>Endelig forlengelse</b>	72	10 minutter	1
<b>Nedkjøling</b>	10		1



PCR-produktene ble analysert med agarose-gelelektroforese som beskrevet i avsnitt 3.2.3. Det ble ikke tilsatt loadingbuffer da Taq DNA polymerase 2x MasterMix Red inneholdt det fra før. DNA i gelen ble ikke tatt vare på, men cellekultur fra kolonier med riktig PCR-produkt ble brukt videre i avsnitt 3.2.10.

#### **3.2.10 Tillaging av sekvenseringsreaksjoner**

Isolering av plasmid, måling av konsentrasjon og tillaging av sekvenseringsreaksjoner ble utført som beskrevet i henholdsvis avsnitt 3.1.3, 3.1.4 og 3.1.11. Primere brukt til sekvensering av his-tagget ChiA kan observeres i tabell 3.2.8. De samme sekvenseringsprimerene beskrevet i tabell 3.1.5 ble brukt for his-tagget ChiC-WT og ChiC-E141Q.

Tabell 3.2.8. Primere brukt til sekvensering av his-tagget ChiA-villtype og mutanter.

<b>Primer</b>	<b>Sekvens (5'-3')</b>
Seq_1574_rev	AAGCCACCTTGTCGATCTTG
Seq_1378_fw	CGTGGATATCGACTGGGAGT
Seq_770_rev	GCACAATGCCACCTGCATTTGATAACGG
Seq_779_fw	CCGTTATCAAATGCAGGTGGCATTGTGC
T7	TAATACGACTCACTATAGGG

#### **3.2.11 Transformering av his-tagget plasmid inn i One Shot ®BL21 star (DE3) celler**

His-tagget plasmid ble videre transformert inn i One Shot ®BL21 star (DE3) *E. coli* celler. Transformeringen ble utført som beskrevet i avsnitt 3.1.12.

#### **3.2.12 Tillaging av frysekultur**

Transformeringen inn i One Shot ®BL21 star (DE3) *E. coli* cellene ble kontrollert med Taq DNA polymerase (se avsnitt 3.2.9). Det ble laget frysekultur av transformanter med

tilsynelatende riktig DNA-størrelse. Frysekulturene ble laget som beskrevet i avsnitt 3.1.14 og oppbevart ved -80 °C.

### 3.3 Uttrykking av his-taggede kitinaser

pET-16b vektoren som kitinase-genene ble klonet inn i inneholder en *T7lac* promoter. I tillegg har pET-16b vektoren en promoter og sekvens som koder for en *lac* repressor. Denne *lac* repressoren binder seg til en *lac* operatorsekvens nedstrøms for promoteren og hindrer T7 RNA polymerase i å binde seg til *T7lac* promotoren i pET-16b og *E. coli* RNA polymerase i å binde seg til *lacUV5* promotoren i BL21 star (DE3) cellene (Novagen 2012). T7 RNA polymerase kommer opprinnelig fra bakteriofagen T7, og denne polymerasen kan kontrollere transkripsjon av nesten alt DNA i cellene da termineringssignal er sjeldne. Dersom IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-tiogalaktopyranosid) tilsettes vil *T7lac* og *lacUV5* promoterene induseres ettersom repressoren får en konformasjonsendring som gjør at den ikke kan binde seg til operatorsekvensen (Andersen 1998). Først blir T7 RNA polymerase produsert fra *lacUV5* promoteren, som deretter kan binde seg til *T7lac* promoteren og dermed produsere ønsket kitinase-protein. Tilsetting av IPTG bør skje når cellene er midt i lag-fasen fordi bakteriene ved dette tidspunktet forbereder seg til eksponentiell vekst. For å undersøke når cellene er i denne fasen kan absorbansen måles ved en bølgelengde på 600 nanometer ( $OD_{600}$ ). Dette gir en indikasjon på celletettheten i mediet. Optimal indusering skjer ved en  $OD_{600}$  som ligger mellom 0,4 og 1,0.

#### 3.3.1 Overekspresjon av his-taggede kitinaser

For å uttrykke ønsket kitinase ble de ulike bakteriestammene dyrket i LB-medium tilsatt ampicillin.

#### Materialer:

- LB-medium
- Ampicillin (50 mg/mL)
- Frysekultur med bestemt bakteriestamme
- 1 M IPTG

#### Metode:

En forkultur med his-tagget kitinase ble laget ved å inokulere 50 mL LB-medium inneholdende 50 µL ampicillin (50 mg/mL) med ønsket frysekultur. Forkulturen ble inkubert ved 37 °C og 220 rpm over natt (~16 timer). Forkulturen ble deretter inokulert i 500 mL LB-medium inneholdende 500 µL ampicillin slik at OD<sub>600</sub> ble 0,1. Dette ble inkubert i en risteinkubator ved 200 rpm i 37 °C til OD<sub>600</sub> nådde 0,8 – 1,0. Cellene ble avkjølt og induisert med 500 µL 1 M IPTG før de videre ble inkubert ved 30 °C og 200 rpm i 4 timer for ChiC-kitinaser og 20 °C over natt for ChiA-kitinaser.

#### **3.3.2 Uttrykking av his-taggede kitinaser med Rosetta™ 2(DE3) kompetente celler**

Rosetta celler er BL21 derivater som er designet for å øke uttrykkingen av proteiner som inneholder kodon sjeldent brukt av *E. coli*. Disse cellene inneholder tRNA for 7 sjeldne kodon (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA) i et kloramfenikolresistent plasmid (Merck Millipore 2014).

Kodonet CCC ble funnet i sekvensen til ChiA og de nyeste his-taggede ChiA mutantene (ChiA-E315Q/W275A og ChiA-E315Q/F396A) ble derfor videre transformert inn i disse cellene. Transformeringsprosessen ble utført som beskrevet i avsnitt 3.1.8, men utstryking av cellekultur ble gjort på agarplater inneholdende 100 µg/mL kloramfenikol i tillegg til 100 µg/mL ampicillin. Oppdyrking av kolonier ble utført som beskrevet i avsnitt 3.1.2, men med TB-medium istedenfor LB-medium. Det ble også tilsatt 5 µL kloramfenikol (50 mg/mL) til cellekulturen. Overekspressjon av kitinasene i disse cellene ble utført som beskrevet i avsnitt 3.3.1, men med TB-medium istedenfor LB-medium tilsatt lik mengde kloramfenikol som ampicillin.

#### **3.3.3 Tillaging av periplasmatiske ekstrakt**

*E. coli* celler er gram-negative og har mellom peptidoglykanlaget og ytre cellevegg et område kalt periplasma. ChiA bærer et N-signal peptid og blir transportert til periplasma via et sec-avhengig protein (Brurberg et al. 2000). ChiB og ChiC mangler dette signalpeptidet, men ser ut til å «lekke» til periplasmat av ukjente grunner. Ved å tilsette en buffer med høy sukkerkonsentrasjon til cellene, slik som spheroplastbuffer, vil cellene ta opp sukkeret.

Frigjøring av periplasmatisk ekstrakt skjer når cellene blir utsatt for iskaldt vann og magnesiumklorid. Da vil cellene få et osmotisk sjokk. Fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF) kan tilsettes for å hemme eventuelle proteaser i løsningen.

#### Materialer:

- Fersk, iskald spheroplastbuffer
- Sterilt, iskaldt H<sub>2</sub>O
- 1 M MgCl<sub>2</sub>
- 50 mM PMSF (dersom ekstraktet ble lagret før rensing)

#### Metode:

Etter endt inkubering ble cellene høstet ved å sentrifugere cellekulturen i 500 mL sentrifugerør med en SLA-3000 rotor ved 8000 rpm og 4 °C i 10 minutter. Cellepelleten ble resuspendert i 25 mL iskald, fersk spheroplastbuffer og satt på is i 5 minutter. Videre ble suspensjonen sentrifugert på ny ved 8000 rpm og 4 °C i 10 minutter. Supernatanten ble dekantert, og pelleten ble inkubert i romtemperatur i 10 minutter. Pelleten ble så resuspendert i 15 mL iskaldt, sterilt vann og deretter satt på is i 45 sekunder før 1,5 mL 1 M MgCl<sub>2</sub> ble tilsatt. Suspensjonen ble så sentrifugert en siste gang ved 8000 rpm og 4 °C i 10 minutter. Supernatanten (periplasmatisk ekstrakt) ble filtrert gjennom et 0,22 µm filter og 2 µL PMSF (50 mM) per mL supernatant ble tilsatt dersom det skulle lagres. Det periplasmatiske ekstraktet ble lagret ved 4 °C frem til rensing.

#### **3.3.4 Tillaging av cytoplasmatisk ekstrakt**

Tillaging av cytoplasmatisk ekstrakt ble utført etter tillaging av periplasmatisk ekstrakt for å sikre et høyt utbytte av den his-taggede kitinasen. Som nevnt tidligere inneholder ikke ChiB og ChiC et signalpeptid og vil derfor ikke transporteres til periplasma. Selv om det er observert «lekkning» av disse kitinasene i periplasma, vil det mest sannsynlig være noe igjen i den cytoplasmatiske fraksjonen. Lyzosym og sonikering brukes for å ødelegge cellemembranen, mens DNase brukes for å degradere DNAet som frigjøres.

#### Materialer:

- Cellepelletter fra avsnitt 3.3.3
- 20 mM Tris-HCl pH 8,0
- Lysozym (1 mg oppløst i 100  $\mu$ L 20 mM Tris-HCl pH 8,0)
- DNase I
- 50 mM PMSF (dersom ekstraktet ble lagret før rensing)

#### Metode:

Hver cellepellet ble resuspendert i 10 mL 20 mM Tris-HCl pH 8,0. 100  $\mu$ L lysozym-løsning (0,01 mg/ $\mu$ L) og 1  $\mu$ L DNase ble tilsatt per pellet. Løsningene ble inkubert i romtemperatur i 20 minutter. Videre ble løsningene satt på is og sonikert i 12 minutter hver (5 sekunder på/av) med en Vibra cell™-sonikator fra Sonics. Amplituden ble satt til 30 %. Etter sonikeringen ble løsningene sentrifugert i 30 minutter ved 8000 rpm og 4 °C. Supernatanten (cytoplasmatisk ekstrakt) ble filtrert gjennom et 0,22  $\mu$ m filter og 2  $\mu$ L PMSF (50 mM) per mL supernatant ble tilsatt dersom det skulle lagres. Det cytoplasmatiske ekstraktet ble lagret ved 4 °C frem til rensing.

### **3.4 Rensing av his-taggede kitinaser**

Rensing av his-taggede kitinaser kan utføres ved hjelp av immobilisert metallaffinitets-kromatografi (IMAC). Denne typen kromatografi baserer seg på interaksjonen mellom et transisjonsmetallion som er immobilisert på en matriks og en spesifikk aminosyresidekjede på proteinet. Histidin er den aminosyren som binder sterkest til en nikkkelkolonne. Peptider med histidinresiduer kan elueres fra kolonnematriksen ved enten å endre pH eller å øke imidazolkonsentrasjonen på kolonnebufferen (Bornhorst & Falke 2011).

#### ***3.4.1 Rensing av his-tagget kitinase med nikkkelkolonne***

De his-taggede kitinasene ble rensert med en kolonne laget av Ni-NTA agarose. Ni-NTA består av nitroleddiksyre (NTA) - en chelaterende agent, og et nikkkelion. Nikkelionet har seks bindingssteder; fire er okkupert av NTA og to er ledige for binding med en histidintag. For å hindre at uønskede proteiner binder til kolonnen tilsettes både bindingsbufferen og vaskebufferen noe imidazol. Imidazol har høyere affinitet til nikkkel-bindingssetene enn

histidin. For å eluere ut his-taggede kitinaser benyttes en elueringsbuffer med høy imidazolkonsentrasjon.

#### Materialer:

- Proteinekstrakt (periplasmatisk og cytoplasmisk ekstrakt) med his-tagget kitinase
- Ni-NTA Superflow kolonnemateriale
- Bindingsbuffer NI-NTA
- Vaskebuffer NI-NTA
- Elueringsbuffer NI-NTA
- 0,5 M NaOH
- 20 % etanol

#### Metode:

Kolonnen ble pakket med 2 mL Ni-NTA Superflow kolonnemateriale. Bindingsbufferen ble påsatt kolonnen med en hastighet lik 1 mL/min til baselinjen var stabil. Proteinekstrakt ble påsatt kolonnen samme hastighet. Etter at alt protein var påsatt ble kolonnen vasket med vaskebufferen til baselinjen var stabil. Det his-taggede proteinet ble eluert ved å tilsette elueringsbuffer og fraksjoner av proteinet ble samlet opp. Da baselinjen igjen var stabil ble kolonnen vasket med 5 volum av henholdsvis 0,5 M NaOH og 20 % etanol.

#### **3.4.2 Hydrofob interaksjonskromatografi (HIC)**

For å separere his-tagget ChiC1-E141Q og ChiC2-E141Q fra hverandre ble HIC benyttet. Separasjon med HIC er basert på den reversible interaksjonen mellom et protein og den hydrofobe liganden bundet til kromatografimatriksen. Buffere med høyt saltinnhold eksponerer hydrofobe regioner på proteinet og øker dermed hydrofobe interaksjoner mellom protein og ligand. Eluering av proteinet skjer ved å senke saltkonsentrasjonen gradvis (GE Healthcare 2014).

#### Materialer:

- Proteinfraksjoner med his-tagget ChiC-E141Q
- Phenyl Sepharose 6 fast flow kolonnemateriale
- 2,5 M Ammoniumsulfat
- 1 M Tris-HCl pH 8,0
- Mobilfase-HIC
- Elueringsbuffer-HIC
- 1 M NaOH
- dH<sub>2</sub>O
- 20 % Etanol

#### Metode:

Kolonnen ble pakket med Phenyl Sepharose 6 fast flow kolonnemateriale. Mobilfase-HIC ble påsatt kolonnen med en hastighet lik 3,0 mL/min til baselinjen var stabil. Proteinfraksjonen ble justert til 0,5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> og 20 mM Tris-HCl pH 8,0 før det ble påsatt kolonnen med en hastighet på 1,5 mL/min. Etter at alt protein var påsatt ble kolonnen vasket med mobilfase-HIC til baselinjen var stabil med en hastighet på 3,0 mL/min. En gradienteluering ble utført ved å øke konsentrasjonen av elueringsbuffer-HIC fra 0 – 100 % på 75 minutter med en hastighet på 3,0 mL/min. Proteinfraksjoner ble samlet opp underveis i gradientelueringen. Etter gradientelueringen ble 100 mL elueringsbuffer-HIC påsatt. Til slutt ble kolonnen regenerert med 100 mL NaOH, 100 mL dH<sub>2</sub>O og 100 mL 20 % Etanol.

#### **3.4.3 Natriumdodecylsulfat polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE)**

SDS-PAGE er en metode som brukes for å undersøke størrelsen på proteiner i en løsning, samt renheten på løsningen. Før proteinene skal undersøkes må de behandles med SDS (natriumdodecylsulfat), DTT (ditiotreitoll) og varme (Caprette 1996). SDS ødelegger den tredimensjonale strukturen til proteinet ved å tilføre negative ladninger til aminosyrene på proteinet, mens DTT er en sterk reduktant som tilføres for å redusere disulfidbindingene i proteinet. Varmebehandlingen øker hastigheten på denatureringen. Etter behandling blir proteinene i løsningen separert i et elektrisk felt. På grunn av proteinets negative ladning vil proteinet vandre mot den positive polen i enden av polyakrylamidgelen. Porer i gelen fører til

at større proteiner vandrer saktere enn mindre proteiner. En proteinmarkør gjør det mulig å identifisere proteinene ved hjelp av størrelse. Coomassie brilliant blue er et fargestoff som brukes til å visualisere de separerte proteinene på gelen. Fargestoffet er tenkt å reagere med proteinene ved van der Waals interaksjoner og gjennom elektrostatiske bindinger med aminosyrene til proteinene i et surt miljø (Panfoli et al. 2012).

#### Materialer:

- Proteinfraksjon(er)
- dH<sub>2</sub>O
- NuPAGE® 10 % Bis-Tris Gel 1,0 mm x 10 brønner
- NuPAGE® reduserende agent (10x)
- NuPAGE® LDS prøvebuffer (4x)
- Proteinmarkør: BenchMark Protein Ladder
- MOPS SDS buffer (1x)
- SDS-fargeløsning
- SDS-avfargingsløsning

#### Metode:

En blanding med 5 µL prøvebuffer, 2 µL reduserende agent, 3 µL dH<sub>2</sub>O og 10 µL proteinfraksjon ble laget. Dette ble inkubert ved 70 °C i 10 minutter. En ferdigstøpt polyakrylamidgel ble plassert i et gelelektroforese-kammer og kammeret ble fylt med 1x MOPS SDS buffer. 7 µL proteinmarkør og 20 µL denaturert proteinfraksjon ble applisert til henholdsvis hver sin brønn. Gelen ble påført en spenning på 200 V i 50 minutter. Deretter ble gelen farget med SDS-fargeløsning og videre avfarget med SDS-avfargingsløsning. For at farging og avfarging skulle gå raskest mulig ble gelen med løsning varmet opp i mikrobølgeovn i 2 minutter, før inkubering på et ristebrett i 10 minutter.

#### **3.4.4 Spesifikk enzymaktivitet**

4-metyllumbelliferyl- $\beta$ -D-N-N'-diacetylkitobiose (4-MU (GlcNAc)<sub>2</sub>) er et kunstig substrat bestående av to sukkerenheter ((GlcNAc)<sub>2</sub>) bundet til en fluoriserende gruppe 4-Metyllumbelliferyl). Ved tilsetning av en aktiv kitinase skjer en hydrolyse der den



### 3. Metoder

---

fluoriserende gruppen spaltes av. Den frie fluoriserende gruppen absorberer lys ved en gitt bølgelengde og avgir fluorescens som kan detekteres av et fluorometer. Målt fluorescens kan brukes til å beregne spesifikk enzymaktivitet. Den spesifikke enzymaktiviteten kan beregnes med formel 3.4.1:

$$\frac{V_{\text{kyvette}} \text{ (l)} \times \text{gjennomsnittlig fluorescens (nm)}}{10 \times \text{reaksjonstid (min)} \times (V_{\text{enzym}} \text{ (mL)} \times \text{enzymkonsentrasjon } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right))} \quad 3.4.1$$

Hvor  $V_{\text{kyvette}}$  er total mengde løsning i kyvetten ved måling og  $V_{\text{enzym}}$  er total mengde enzymløsning i kyvetten ved måling.

#### Materialer:

- Løsning med aktivt enzym
- 100 x BSA
- Citrat-fosfat buffer pH 5,2
- 1 mg/mL 4-MU (GlcNAc)<sub>2</sub>
- 0,2 M Natriumkarbonat
- 1,0 μM 4-metylumbelliferon

#### Metode:

En arbeidsløsning bestående av 4,95 mL citrat-fosfat buffer og 50 μL BSA ble laget. 87 μL arbeidsløsning ble blandet med 8 μL 4-MU (GlcNAc)<sub>2</sub> i hvert sitt reagensrør. Det ble laget tre paralleller per proteinløsning i tillegg til en blankprøve. Reagensrørene ble plassert på et ristebrett i vannbad ved 37 °C og 5 μL proteinløsning ble tilsatt hver parallell. Til blankprøven ble det tilsatt 5 μL arbeidsløsning. Reaksjonene ble stoppet etter 10 minutter ved å tilsette 1,9 mL 0,2 M natriumkarbonat. Et fluorometer ble kalibrert med 0,2 M natriumkarbonat og 1,0 μM 4-metylumbelliferon før fluorescensen til prøvene ble målt.

#### **3.4.5 Oppkonsentrering og bytting av buffer**

Macrosep® Advance sentrifugerør består av en Omega™ (modifisert polyetersulfon) bindingsmembran som minimiserer tap av protein grunnet ikke-spesifikk binding (Pall Corporation 2013), og ble benyttet til oppkonsentrering av proteinløsningene. Sentrifugerøret

har et filter som kan variere i porestørrelse, for eksempel 10K eller 30K. Forbindelser med lavere molekylvekt enn porestørrelsen vil slippe gjennom filteret, mens større molekyler vil bli værende igjen. Macrosep® Advance sentrifugerør ble også benyttet til å bytte buffer til videre analyse.

#### Materialer:

- Ren proteinfraksjon
- Macrosep® Advance sentrifugerør
- 20 mM kaliumfosfatbuffer pH 6,0

#### Metode:

Ren proteinfraksjon ble overført til et Macrosep® Advance sentrifugerør og sentrifugert ved 4 °C og 4200 rpm til det var igjen rundt 1,5 mL løsning. Røret ble deretter etterfylt med 20 mM kaliumfosfatbuffer pH 6,0 og sentrifugert ved samme betingelser som tidligere. Dette steget ble gjentatt fire ganger før proteinløsningen over filteret ble lagret i et cryorør ved 4 °C.

#### ***3.4.6 Bestemmelse av proteinkonsentrasjon med Bradford-metoden***

Bradford-metoden går ut på at det skjer et skifte i absorbansmaksimumet til en sur fargeløsning (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent) fra 465 nm til 595 nm når den fester seg til proteinet (Schwelberger 2012). Absorbansen måles ved 595nm med et spektrofotometer, og mengde protein i løsningen bestemmes ut i fra en standardkurve.

#### Materialer:

- Ren proteinløsning
- Fargeløsning: Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent
- 20 mM kaliumfosfatbuffer pH 6,0

#### Metode:

Proteinløsning ble fortynnet i 20 mM kaliumfosfatbuffer pH 6,0 til et totalvolum på 800 µL. Tre paralleller ble laget, i tillegg til en blankprøve med 800 µL 20 mM kaliumfosfatbuffer pH 6,0. Videre ble 200 µL fargeløsning tilsatt hver prøve. Dette ble inkubert ved romtemperatur i

5 minutter. Spektrofotometeret ble nullstilt med blankprøven før konsentrasjonen til de tre parallellene ble målt.

#### 3.4.7 *Isoterm titreringskalorimetri (ITC)*

ITC ble brukt for å bestemme termodynamiske parametere for kitinase-ligand interaksjoner. Forsøkene ble utført med et VP-ITC kalorimeter fra MicroCal. Dette instrumentet er beskrevet nærmere av Wiseman et al. (1989).

#### Materialer:

- Ren proteinløsning
- 20 mM kaliumfosfatbuffer pH 6,0
- Ligand: (GlcNAc)<sub>6</sub>
- 0,1 M NaOH
- dH<sub>2</sub>O

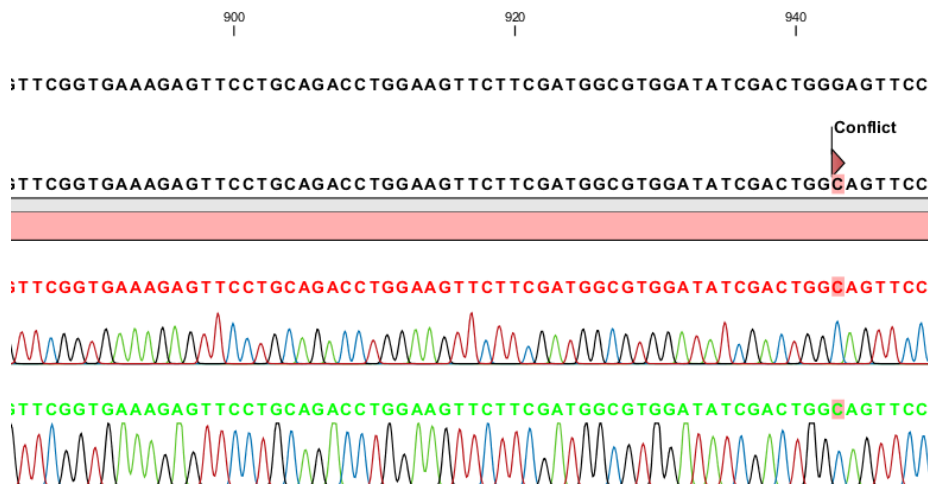
#### Metode:

Før hvert ITC-forsøk ble prøvecellen vasket med 0,1 M NaOH og dH<sub>2</sub>O. Proteinløsning med ønsket kitinase ble fortynnet til en konsentrasjon på 15 µM med 20 mM kaliumfosfatbuffer pH 6,0, og avgasset i 20 minutter. Videre ble 1,8 mL proteinløsning injisert i prøvecellen (rommer 1,41 mL). Et overskudd av proteinløsning i prøvecellen hindret dannelsen av luftbobler i systemet. 500 µM (i tillegg 3 mM for ChiA-E315Q/W167A) (GlcNAc)<sub>6</sub> ble tilført prøvecellen med 4-6 µL injeksjoner gjennom en roterende injeksjonssprøyte (260 rpm). 40-60 injeksjoner med ligand ble tilført prøvecellen for å sikre at proteinet ble mettet. Forsøksseriene for ChiA-E315Q og ChiC-E141Q bestod av 2-3 paralleller ved 20, 25, 30 og 37 °C, mens forsøksseriene for ChiA-E315Q/W167A, ChiA-E315Q/W275A og ChiA-E315Q/F396A bestod av 2-3 paralleller ved 30 °C (ChiA-E315Q/W167A ble i tillegg undersøkt med ITC ved 40 og 5 °C). Dataene ble behandlet med dataprogrammet ORIGIN 7.0 (MicroCal). Data fra første injeksjon (2 µL) ble fjernet. Denne verdien er ofte unøyaktig grunnet blanding mellom protein- og ligandløsningen. Ellers ble standard 1:1 bindingsmodell brukt for å tilpasse dataene.

## 4. Resultater

### 4.1 Seterrettet mutagenese

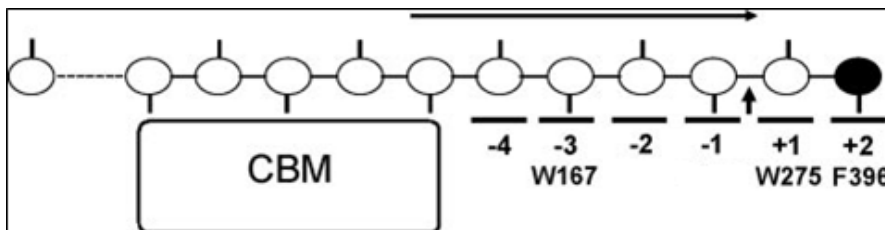
ChiA og ChiC måtte være inaktive for å kunne analysere bindingen til (GlcNAc)<sub>6</sub> med ITC. Den katalytiske syren til ChiA (Glu<sup>315</sup>) og ChiC (Glu<sup>141</sup>) ble derfor mutert til glutamin (Q). ChiA-E315Q var allerede laget av Nicole Reppert, mens ChiC-E141Q måtte tillages. Tillagingen av ChiC-E141Q er beskrevet i delkapittel 3.1. For å bekrefte riktig mutasjon ble det muterte plasmidet sendt til GATC Biotech i Constance, Tyskland for sekvensering, som beskrevet i avsnitt 3.1.11. Resultatet av sekvenseringen ble presentert og analysert med programvaren *CLC DNA Workbench*. Med denne programvaren ble aminosyresekvensen til villtypen sammenlignet med sekvensene til det muterte plasmidet. Etersom det muterte plasmidet ble sendt med fire ulike primere ble resultatet av sekvenseringen fire ulike sekvenser. I figur 4.1.1 er sekvensen til ChiA villtype sammenlignet med sekvensen til ChiA-E315Q.



Figur 4.1.1. Aminosyresekvensen til ChiA villtype sammenlignet med sekvensen til ChiA-E315Q. Residuet merket med "conflict" indikerer at glutamat (E) er blitt mutert til glutamin (Q). Øverst i figuren er villtypesekvensen, mens sekvensen under er konsensussekvensen. Konsensussekvensen er en sammenstilling av sekvensene laget fra de fire ulike primerene.

## 4.2 Residuanalyse

Karakteristisk for prosessive kitinaser er aromatiske residuer som strekker seg fra det kitinbindende domene til det aktive setet. De aromatiske residuene hjelper kitinasen i å binde og skyve substratet gjennom det aktive setet via hydrofobe interaksjoner samtidig som produkt frigjøres (Zakariassen et al. 2009). ChiA har flere aromatiske residuer som strekker seg fra negative subseter (-4) til positive subseter (+2). Trp<sup>167</sup> (W167) er en aromat som befinner seg i subsete -3. Denne aromaten har vist seg å være viktig i bindingen til det polymere substratet da hydrofobe interaksjoner med substratet assisterer gjenkjennelse og posisjonering av N-acetylgruppen før -1 subsetet. Trp<sup>167</sup> virker også viktig for å holde proteinet assosiert med substratet og er med på å skyve substratet gjennom det aktive setet (Norberg et al. 2011). Etter hydrolyse av glykosidbindingen må det dimeriske produktet fjernes. Aromatene Trp<sup>275</sup> (W275) og Phe<sup>396</sup> (F396) sitter på henholdsvis subsete +1 og +2 og binder til produktet før det fjernes. En studie gjort av Zakariassen et al. (2009) viste at en mutasjon av Trp<sup>167</sup> til alanin (A) førte til en sterk reduksjon i prosessivitet, mens effekten av samme mutasjonen av Trp<sup>275</sup> og Phe<sup>396</sup> var betydelig mindre. En skisse av subsetene og tilhørende aromater bundet til en kitinkjede er presentert i figur 4.2.1.



Figur 4.2.1. Skisse av ChiA bundet til en kitinkjede. Det katalytiske setet til kitinasen går over seks subseter (-4 til +2). CBM er en karbohydratbindende modul som er tenkt å bidra i bindingen av kitin. Sukkeret på den reduserende enden er farget svart. Aminosyrene Trp<sup>167</sup>, Trp<sup>275</sup> og Phe<sup>396</sup> interagerer med substratet og er plassert på hvert sitt subsete. Hydrolyse av glykosidbindingen skjer mellom subsete +1 og -1. Pilen viser hvilken vei kitinkjeden glir gjennom det aktive setet (Zakariassen et al. 2009).

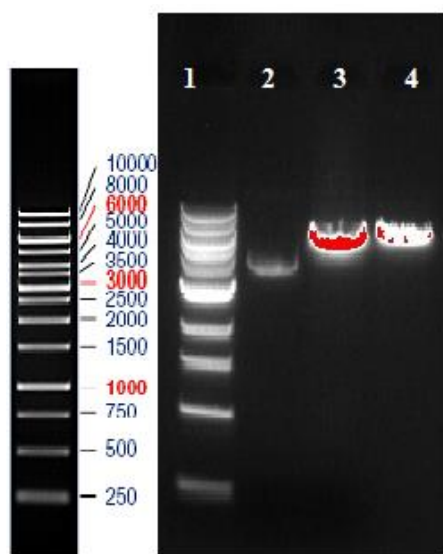
I denne oppgaven ble bindingen av dobbeltmutantene ChiA-E315Q/W167A, ChiA-E315Q/W275A og ChiA-E315Q/F396A til (GlcNAc)<sub>6</sub> studert med ITC. Dobbeltmutantene var allerede laget av masterstudent Daniel Schaupp, men de ble his-tagget i denne oppgaven (med unntak av ChiA-E315Q/F396A som ble laget fra his-tagget ChiA-E315Q av Daniel Schaupp).

### 4.3 His-tagging

Tillaging av his-taggede kitinaser ble gjort for å kunne isolere store mengder protein med et enkelt rensesteg. Dette er viktig ettersom bindingsstudier med ITC krever store mengder rent protein.

#### 4.3.1 Restriksjonskutting av pET-16b med *NdeI* og *XhoI*

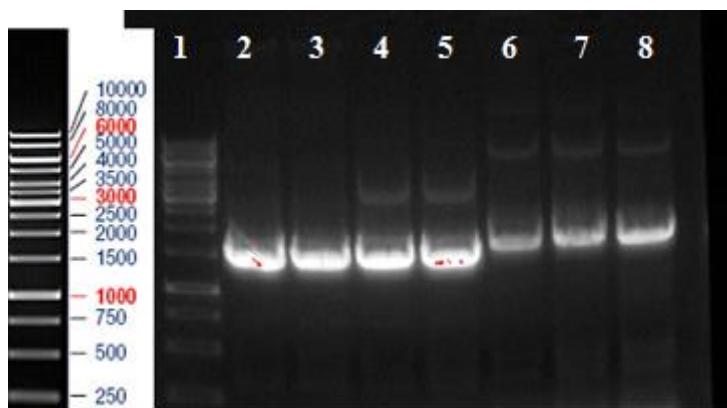
pET-16b vektoren ble kuttet for senere å kunne klonе vektoren med ønsket kitinase-DNA. Resultatet av restriksjonskuttingen av pET-16b vektoren med restriksjonsenzymene *NdeI* og *XhoI* ble analysert ved hjelp av gelelektroforese, som beskrevet i avsnitt 3.2.3. Figur 4.3.1 viser et gelbilde med kuttet pET-16b etter gelelektroforese. pET-16b vektoren har en størrelse på 5711 basepar. Et bånd på gelen rundt 6000 basepar bekrefter dermed at dette er DNA med riktig størrelse.



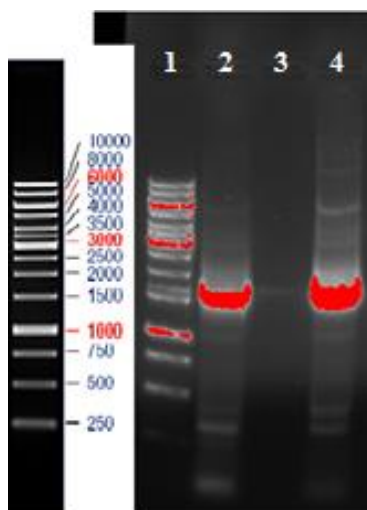
Figur 4.3.1. Agarosegel av pET-16b vektor etter restriksjonskutting med *NdeI* og *XhoI*. Størrelsen til den kuttete vektoren er 5711 basepar. I første brønn fra venstre kan størrelsesmarkøren observeres. Helt til venstre er de angitte størrelsene (i bp) i størrelsesmarkøren vist. I andre brønn kan et sirkulært plasmid av pET-16b vektoren observeres, mens i tredje og fjerde brønn kan kuttet pET-16b vektor observeres.

### 4.3.2 Oppamplifisering av DNA med kutteseter for *NdeI* og *XhoI*

For å kunne klone den restriksjonskuttete pET-16b vektoren sammen med ønsket kitinase måtte kitinasen ha kutteseter for *NdeI* og *XhoI*. Resultatet av PCR-reaksjonen i avsnitt 3.2.4 ble analysert ved hjelp av gelelektroforese, som beskrevet i avsnitt 3.2.3. Figur 4.3.2 og 4.3.3 viser gelbilder med kitinase-fragmenter etter gelelektroforese. ChiA har en DNA-størrelse på 1623 basepar, mens ChiC er 1423 basepar stor. Et bånd på gelen rundt 1500 basepar bekrefter dermed at dette er et DNA-fragment av riktig størrelse.



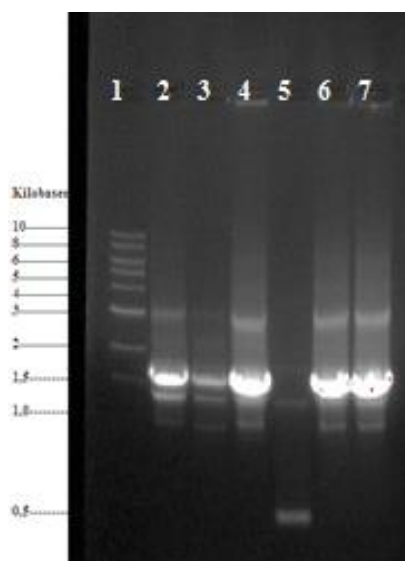
Figur 4.3.2. Agarosegel av ChiC-WT (brønn 2 og 3), ChiC-E141Q (brønn 4 og 5), ChiA-E315Q (brønn 6 og 7) og ChiA-WT (brønn 8) etter PCR. Gelen viser store fragment på rundt 1500 basepar. I første brønn fra venstre kan størrelsesmarkøren observeres. Helt til venstre er de angitte størrelsene (i bp) i størrelsesmarkøren vist.



Figur 4.3.3. Agarosegel av ChiA-E315Q/W167A (brønn 2) og ChiA-E315Q/W275A (brønn 4) etter PCR. Gelen viser store fragment på rundt 1500 basepar. I første brønn fra venstre kan størrelsesmarkøren observeres. Helt til venstre er de angitte størrelsene (i bp) i størrelsesmarkøren vist.

### 4.3.3 Kontroll av transformanter med Taq DNA polymerase

Etter kloning av pET-16b med kitinase-DNA ble transformantene tilsatt Taq DNA polymerase og aktuelle primere for PCR, se avsnitt 3.2.9, og analysert med gelelektroforese, se avsnitt 3.2.3. Dette ble utført for å sjekke om transformantene inneholdt DNA-fragment med tilsvarende størrelse som kitinase-DNAet før de ble sendt til sekvensering. Figur 4.3.4 viser et gelbilde etter utført PCR-reaksjon med Taq DNA polymerase. DNA-fragmenter på rundt 1500 basepar indikerer at et fragment med samme størrelse som ChiA-WT befinner seg i transformanten.



Figur 4.3.4. Kontroll av his-tagget ChiA-WT med Taq DNA polymerase. DNA-fragment på rundt 1500 basepar indikerer at DNA med samme størrelse som ChiA-WT befinner seg i transformanten.



#### 4.4 Optimalisering av proteinekspressjonen

De aktive his-taggede kitinasene ChiA-WT og ChiC-WT ble dyrket og rensset for å kontrollere at ønsket protein ble uttrykt. Rensset protein som viste et bånd med riktig størrelse på SDS-PAGE gelen kunne undersøkes ved å måle aktiviteten. ChiA-WT ble først dyrket og rensset som beskrevet i Norberg et al. (2010b). Dette ga verken rent eller aktivt protein og følgelig måtte proteinekspressjonen optimaliseres. Dyrking ved ulike temperaturer (30, 25 og 20 °C, etter indusering) over natt, samt ulike IPTG konsentrasjoner (0,2, 0,4 og 1 mM) ble forsøkt. Det eneste resultatet der ChiA-WT ble signifikant uttrykt var da cellene ble dyrket på 20 °C over natt og indusert med en IPTG konsentrasjon på 1 mM ved OD<sub>600</sub> = 0,8-0,9. I tabell 4.4.1 kan den spesifikke aktiviteten for ChiA-WT og ChiC-WT dyrket ved disse betingelsene observeres. Aktiviteten ble målt fluorimetrisk som beskrevet i avsnitt 3.4.4 og den spesifikke enzymaktiviteten ble regnet ut i fra ligning 3.4.1. De oppkonsentrerte proteinløsningene ble fortynnet slik at de falt innenfor det lineære området til fluorometeret (0-5000 nm).

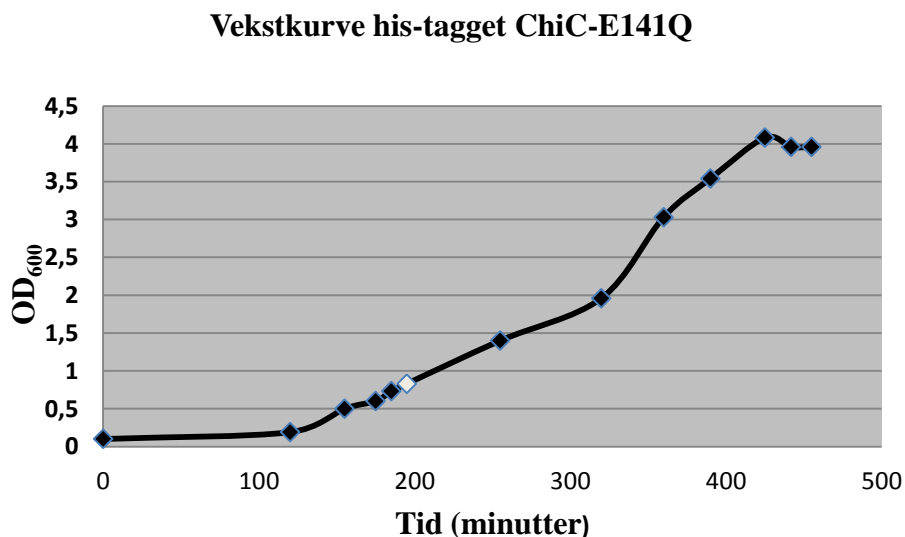
Tabell 4.4.1. Fluorescens og spesifikk aktivitet av ChiA-WT og ChiC-WT indusert med 1 mM IPTG og dyrket ved 20 °C over natt.

Enzym	Gjennomsnittlig fluorescens (nm) (fortynning)	Spesifikk aktivitet (nm/min/mg)
ChiA-WT	450 (1:100)	1800
ChiC-WT	415 (1:100)	415

ChiA-WT viste en lavere spesifikk aktivitet (1800 nm/min/mg) enn tidligere observert av Wold (2013) (30276 nm/min/mg). ChiC-WT derimot, viste en relativt lik spesifikk aktivitet (415 nm/min/mg sammenlignet med 356 nm/min/mg). Det ble senere i masterløpet oppdaget av postdoktor Patricia Wildberger at sekvensen til ChiA-WT inneholder det uvanlige kodonet CCC. De nyeste ChiA dobbeltmutantene ble derfor transformert inn i Rosetta™ 2 (DE3) celler, som beskrevet i avsnitt 3.3.2. Det ble forsøkt å dyrke opp ChiA- og ChiC-mutantene ved samme betingelser (20 °C over natt, 1 mM IPTG) som villtypene i tabell 4.4.1. Dette ga bedre uttrykk enn for villtypene, og det ble derfor ikke prøvd å optimalisere uttrykket av villtypene videre.

Det ble senere observert at ChiC-E141Q ble uttrykt i større grad når cellene ble dyrket ved 30 °C i 4 timer etter indusering (1 mM IPTG) sammenlignet med 20 °C over natt. For å finne

stasjonærfasen til cellene ved dyrking på 30 °C ble celletettheten ( $OD_{600}$ ) målt hver time etter indusering. Cellene ble høstet da veksten flatet ut. I figur 4.4.1 kan den resulterende vekstkurven observeres.



Figur 4.4.1. Vekstkurve for celler med ChiC-E141Q.  $OD_{600}$  ved indusering med 1 mM IPTG er markert med et hvitt punkt. Før indusering ble cellene dyrket ved 37 °C. Etter indusering ble cellene dyrket ved 30 °C. Cellene ble høstet etter 4,5 time.

I tabell 4.4.2 kan proteinutbyttet av ChiC-E141Q etter dyrking ved henholdsvis 20 °C over natt og 30 °C i 4 timer etter indusering observeres.

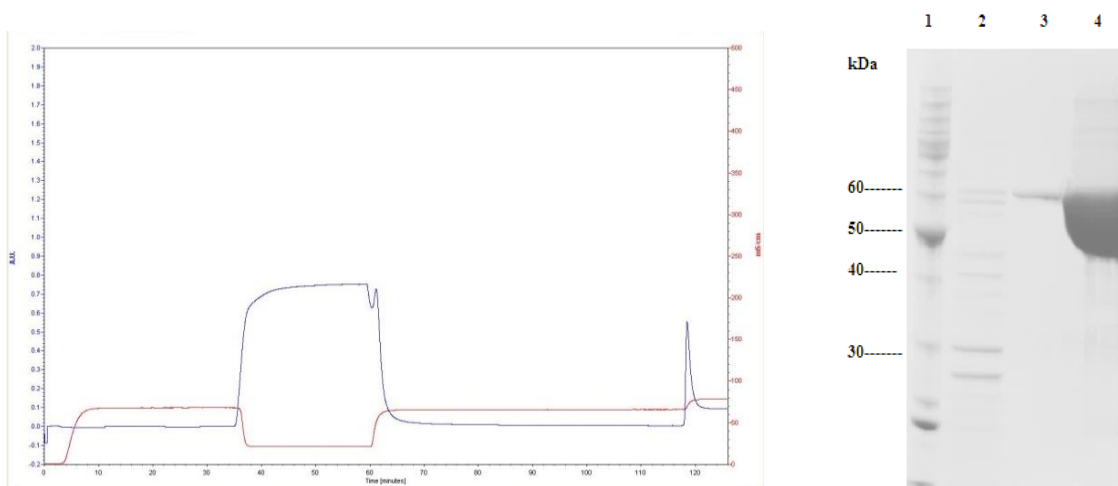
Tabell 4.4.2. Proteinutbytte av ChiC-E141Q etter dyrking ved 20 °C over natt etter indusering ( $PUTB_{20}$ ) sammenlignet med dyrking ved 30 °C i 4 timer etter indusering ( $PUTB_{30}$ ).

Mutant ChiC	$PUTB_{20}$ (mg)	$PUTB_{30}$ (mg)	Mengde vekstmedium (L)
E141Q	3,3	8,5	3

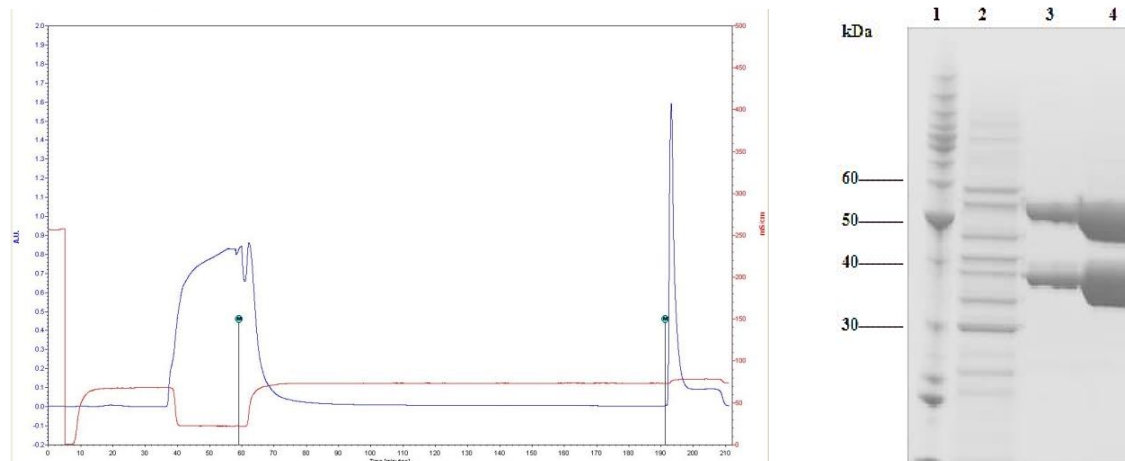
### 4.5 Rensing av his-taggede kitinaser

#### 4.5.1 Rensing av his-taggede kitinaser med nikkelkolonne

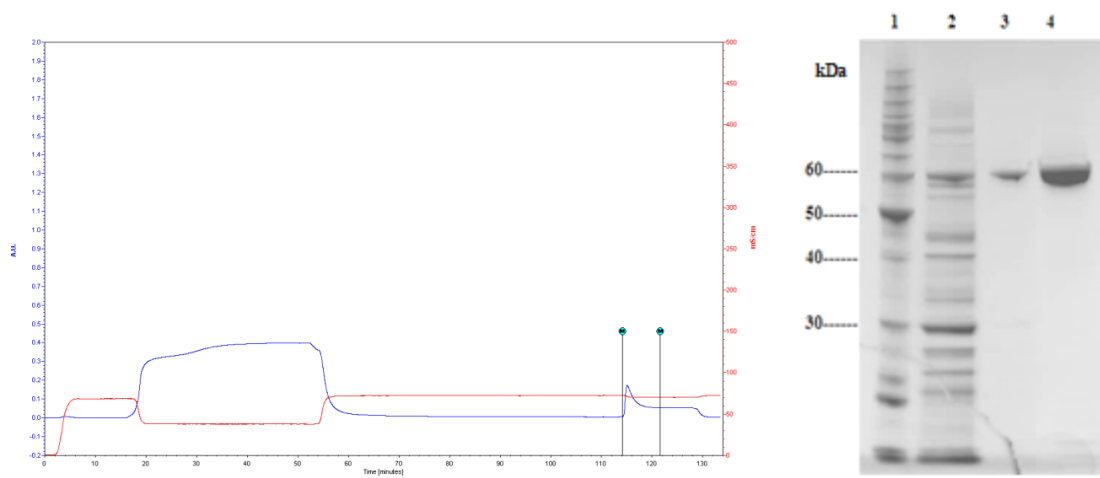
De his-taggede mutantene ble isolert ved å rense periplasmatisk og cytoplasmatisk ekstrakt med en nikkelkolonne, som beskrevet i avsnitt 3.4.1. Figur 4.5.1-4.5.5 viser kromatogrammene for rensingen av de ulike mutantene sammen med tilhørende SDS-PAGE gel. I kromatogrammet kalles den første toppen for void-toppen og inneholder alle proteiner i det påsatte ekstraktet som ikke er his-tagget og som dermed ikke fester seg til kolonnen. Den andre toppen er elueringstoppen som inneholder his-tagget kitinase. Som tidligere nevnt har ChiA en molekylvekt på 58,5 kDa, ChiC1 en molekylvekt på 51,6 kDa og ChiC2 en molekylvekt på rundt 35 kDa. Bånd på gelen ved disse størrelsene indikerer ønsket protein.



Figur 4.5.1. Kromatogram (til venstre) og utsnitt av en SDS-PAGE gel (til høyre) for rensing av his-tagget ChiA-E315Q med nikkelkolonne. I kromatogrammet er den første toppen void-toppen, mens den andre er elueringstoppen. På SDS-PAGE gelen er brønn 1 påsatt størrelsesmarkøren, brønn 2 fraksjon fra void-toppen, brønn 3 fraksjon fra elueringstoppen og brønn 4 fraksjon fra oppkonsentrert protein. Et bånd på rundt 59 kDa indikerer ChiA protein.

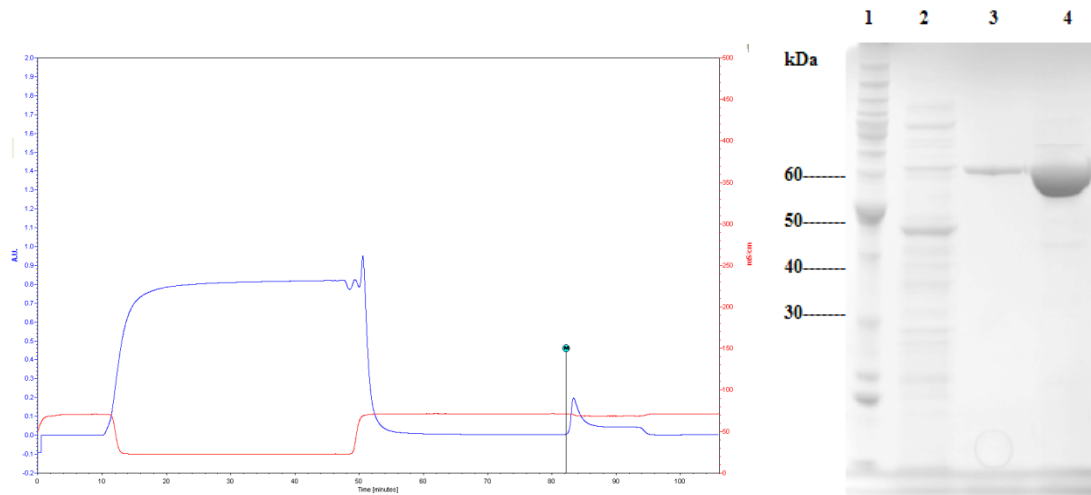


Figur 4.5.2. Kromatogram (til venstre) og utsnitt av en SDS-PAGE gel (til høyre) for rensing av his-tagget ChiC-E141Q med nikkelkolonne. I kromatogrammet er den første toppen void-toppen, mens den andre er elueringstoppen. På SDS-PAGE gelen er brønn 1 påsatt størrelsesmarkøren, brønn 2 fraksjon fra void-toppen, brønn 3 fraksjon fra elueringstoppen og brønn 4 fraksjon fra oppkonsentrert protein. Båndet på rundt 52 kDa indikerer ChiC1 protein, mens båndet på rundt 35 kDa indikerer ChiC2 protein.

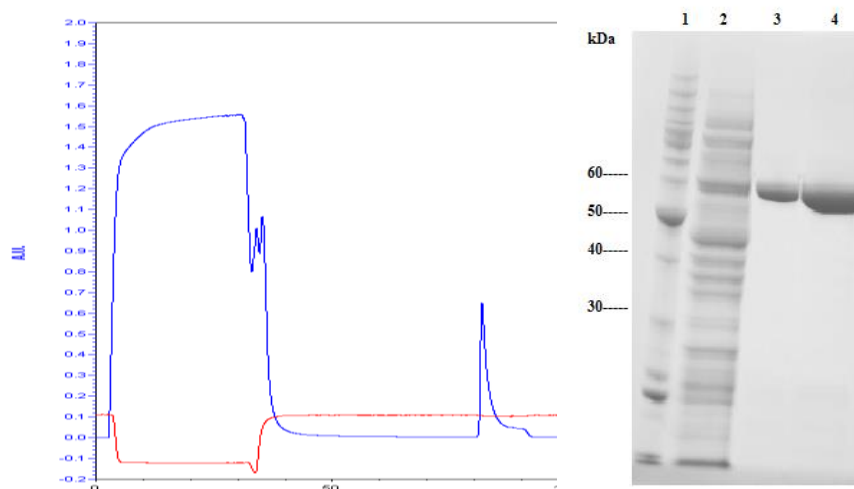


Figur 4.5.3. Kromatogram (til venstre) og utsnitt av en SDS-PAGE gel (til høyre) for rensing av his-tagget ChiA-E315Q/W167A med nikkelkolonne. I kromatogrammet er den første toppen void-toppen, mens den andre er elueringstoppen. På SDS-PAGE gelen er brønn 1 påsatt størrelsesmarkøren, brønn 2 fraksjon fra void-toppen, brønn 3 fraksjon fra elueringstoppen og brønn 4 fraksjon fra oppkonsentrert protein. Et bånd på rundt 59 kDa indikerer ChiA protein.

## 4. Resultater



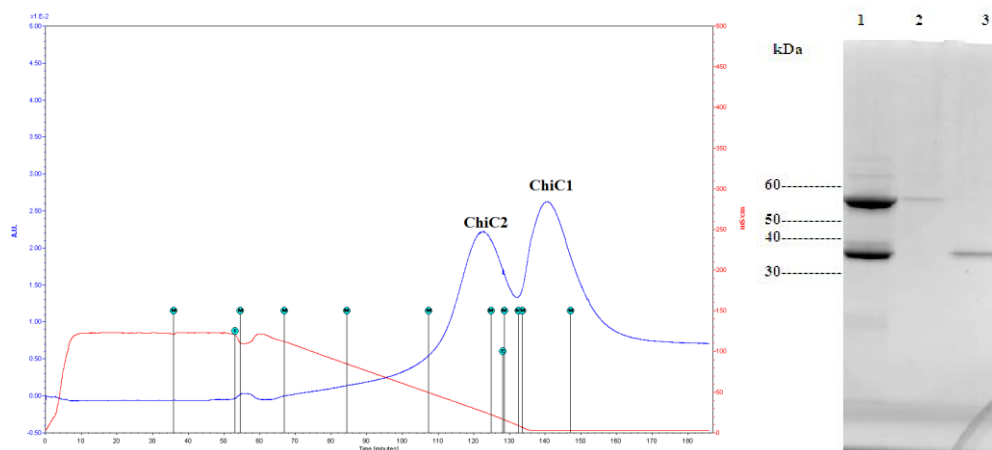
Figur 4.5.4. Kromatogram (til venstre) og utsnitt av en SDS-PAGE gel (til høyre) for rensing av his-tagget ChiA-E315Q/W275A med nikkelkolonne. I kromatogrammet er den første toppen void-toppen, mens den andre er elueringstoppen. På SDS-PAGE gelen er brønn 1 påsatt størrelsesmarkøren, brønn 2 fraksjon fra void-toppen, brønn 3 fraksjon fra elueringstoppen og brønn 4 fraksjon fra oppkonsentrert protein. Et bånd på rundt 59 kDa indikerer ChiA protein.



Figur 4.5.5. Utsnitt av kromatogram (til venstre) og utsnitt av en SDS-PAGE gel (til høyre) for rensing av his-tagget ChiA-E315Q/F396A med nikkelkolonne. I kromatogrammet er den første toppen void-toppen, mens den andre er elueringstoppen. På SDS-PAGE gelen er brønn 1 påsatt størrelsesmarkøren, brønn 2 fraksjon fra void-toppen, brønn 3 fraksjon fra elueringstoppen og brønn 4 fraksjon fra oppkonsentrert protein. Et bånd på rundt 59 kDa indikerer ChiA protein.

### 4.5.2 Separasjon av his-tagget ChiC-E141Q med HIC

ChiC-E141Q ble renset med HIC, som beskrevet i avsnitt 3.4.2, for å isolere det proteolytiske produktet ChiC2-E141Q fra ChiC-E141Q. Figur 4.5.6 viser kromatogrammet fra rensingen med HIC samt et bilde av SDS-PAGE gelen som bekrefter separasjonen.



Figur 4.5.6. Kromatogram (til venstre) og SDS-PAGE gel (til høyre) for separasjon av ChiC1-E141Q og ChiC2-E141Q med HIC. I kromatogrammet kan to topper observeres. Den første toppen er ChiC2-E141Q, mens den andre er ChiC1-E141Q. På SDS-PAGE gelen kan proteinekstraktet med ChiC-E141Q som ble påført kolonnen observeres i brønn 1. Brønn 2 og 3 viser ren fraksjon av henholdsvis ChiC1-E141Q og ChiC2-E141Q.

ChiC2-E141Q ble videre oppkonsentrert og brukt som kontroll til bindingsstudiene. ChiC1-E141Q ble ikke brukt videre grunnet lavt utbytte og mangel på tid.

### 4.5.3 Bestemmelse av proteinkonsentrasjon med Bradford-metoden

Proteinkonsentrasjonen ble bestemt ved hjelp av Bradford-metoden som beskrevet i avsnitt 3.4.6. Tabell 4.5.1 viser en oversikt over høyest oppnådde konsentrasjoner (mg/mL) av his-tagget ChiA og ChiC villtype med tilhørende mutanter.

Tabell 4.5.1. Oversikt over høyest oppnådde proteinkonsentrasjoner (mg/mL) av his-tagget ChiA og ChiC villtype med tilhørende mutanter i BL21 (DE3) eller Rosetta™ 2 (DE3) celler.

His-tagget kitinase	Proteinkonsentrasjon (mg/mL)	Mengde proteinløsning (mL)	Mengde vekstmedium (L)
ChiA-WT	0,1	1,1	3
ChiA-E315Q	2,6	1,3	3
ChiA-E315Q/W167A	3,8	0,7	3
ChiA-E315Q/W275A*	1,1	3,1	3
ChiA-E315Q/F396A*	1,6	1,5	3
ChiC-WT	0,4	1,5	3
ChiC-E141Q	1,7	5,0	3

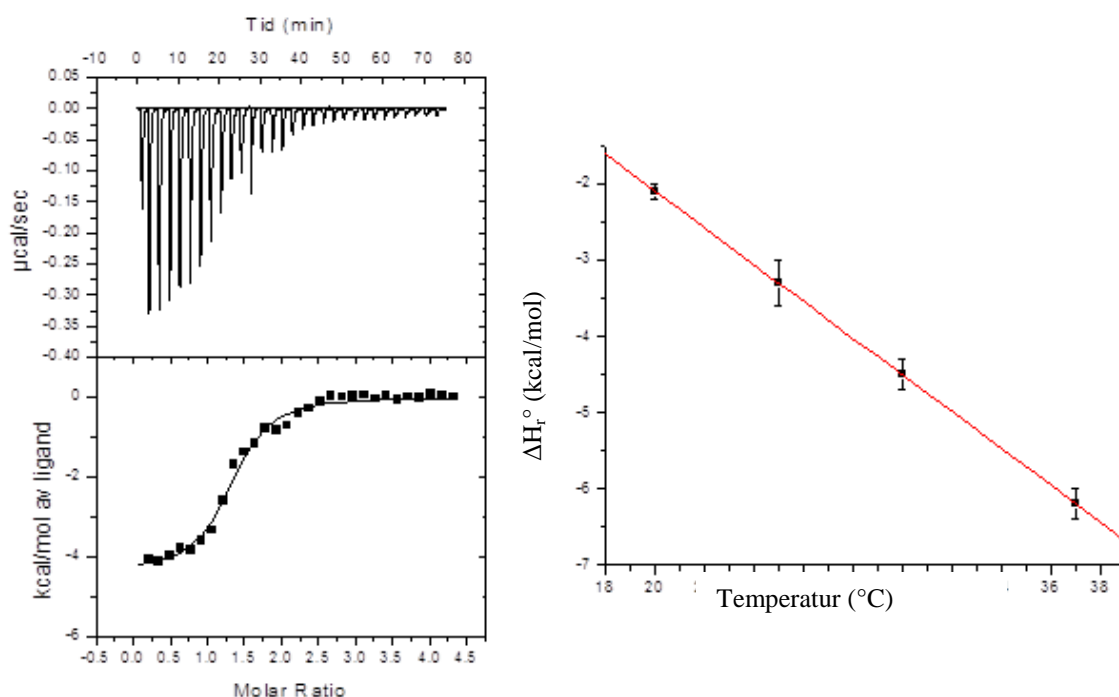
\* Rosetta™ 2 (DE3) celler.

### 4.6 Binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiA og ChiC

Bindingen av (GlcNAc)<sub>6</sub> til «villtypene» ChiA-E315Q og ChiC-E141Q (heretter kalt ChiA og ChiC), samt mutanter (W167A, W275A og F396A) av ChiA ble studert med ITC. Forsøkene ble utført ved pH 6,0 (20 mM kaliumfosfatbuffer) over ulike temperaturer (20-37 °C) for de inaktive «villtypene» og ved 30 °C for mutantene. De termodynamiske parameterne  $K_a$  og  $\Delta H_r^\circ$  ble gitt direkte fra ITC forsøkene, mens  $K_d$ ,  $\Delta G_r^\circ$  og  $\Delta S_r^\circ$  ble beregnet ved hjelp av ligningene 1.5.2, 1.5.3 og 1.5.4. Endringen i varmekapasiteten,  $\Delta C_{p,r}$ , ble beregnet ved hjelp av ligning 1.5.5. Alle ITC-profilene for bindingen av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiA og ChiC ved 20-37 °C er presentert i vedlegg 8.1. For å bestemme  $-T\Delta S_{\text{solv}}^\circ$ ,  $-T\Delta S_{\text{conf}}^\circ$  og  $-T\Delta S_{\text{mix}}^\circ$  for bindingen av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiA og ChiC måtte entropiuttrykket parameteriseres.

#### 4.6.1 Binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiA

Et ITC termogram, isoterm og temperaturavhengigheten for bindingen av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiA er vist i figur 4.6.1. Termodynamiske parametere for bindingen av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiA er vist i tabell 4.6.1. Ved 30 °C binder ChiA til (GlcNAc)<sub>6</sub> med  $K_d = 0,56 \pm 0,03 \mu\text{M}$  og  $\Delta G_r^\circ = -8,7 \pm 0,1 \text{ kcal/mol}$ . Reaksjonen har en  $\Delta H_r^\circ$  på  $-4,5 \pm 0,2 \text{ kcal/mol}$  samt en  $\Delta S_r^\circ$  lik  $13,9 \pm 0,6 \text{ cal/K mol}$  ( $-T\Delta S_r^\circ = -4,2 \pm 0,2 \text{ kcal/mol}$ ).  $\Delta C_{p,r}$ , bestemt av ligning 1.5.5, ble beregnet til å være  $-241 \pm 12 \text{ cal/K mol}$ .

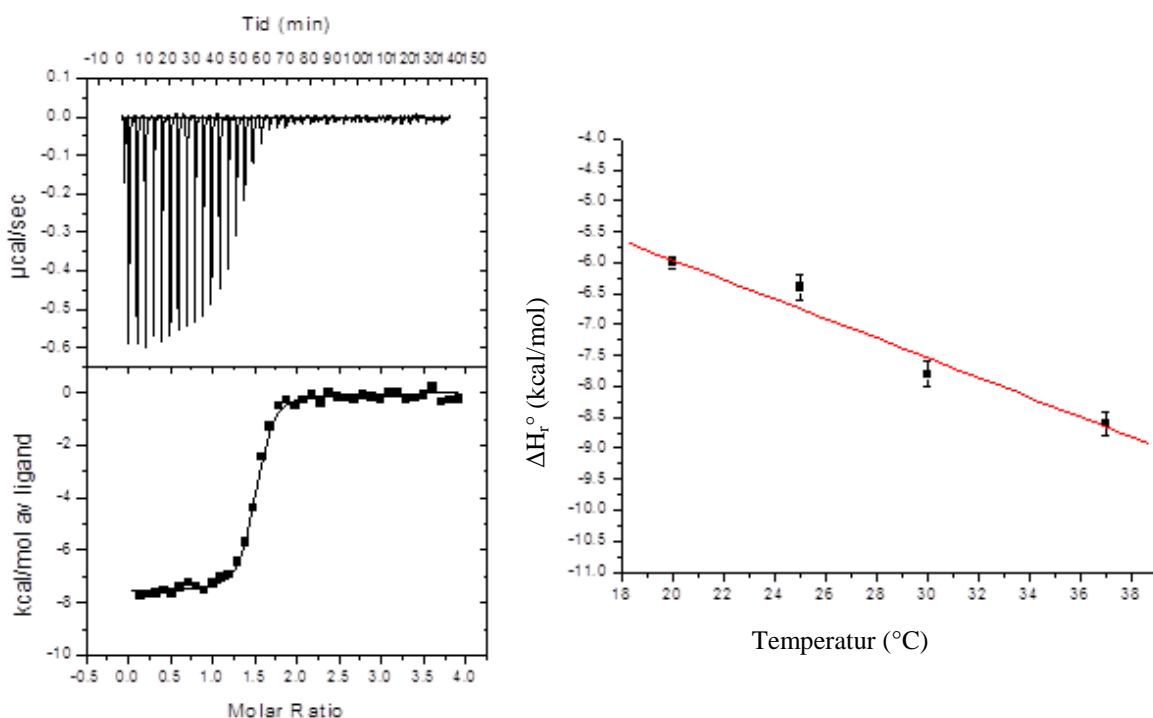


Figur 4.6.1. Til venstre: Termogram (øverst) og bindingsisoterm (nederst) for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiA ved pH 6,0 og  $t = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Til Høyre: Temperaturavhengigheten for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiA ved pH 6,0. En graf med  $\Delta H_r^\circ$  versus temperatur gir endringen i varmekapasitet ( $\Delta C_{p,r}$ ) som stigningstall.



### 4.6.2 Binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiC

Et ITC termogram, isoterm og temperaturavhengigheten for bindingen av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiC er vist i figur 4.6.2. Termodynamiske parametere for bindingen av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiC er vist i tabell 4.6.1. Ved 30 °C binder ChiC til (GlcNAc)<sub>6</sub> med  $K_d = 0,10 \pm 0,02 \mu\text{M}$  og  $\Delta G_r^\circ = -9,7 \pm 0,1 \text{ kcal/mol}$ . Reaksjonen har en  $\Delta H_r^\circ$  på  $-7,8 \pm 0,2 \text{ kcal/mol}$  samt en  $\Delta S_r^\circ$  lik  $6,3 \pm 0,6 \text{ cal/K mol}$  ( $-T\Delta S_r^\circ = -1,9 \pm 0,2 \text{ kcal/mol}$ ).  $\Delta C_{p,r}$ , bestemt av ligning 1.5.5, ble beregnet til å være  $-158 \pm 12 \text{ cal/K mol}$ .



Figur 4.6.2. Til venstre: Termogram (øverst) og bindingsisoterm (nederst) for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiC ved pH 6,0 og  $t = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Til Høyre: Temperaturavhengigheten for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiC ved pH 6,0. En graf med  $\Delta H_r^\circ$  versus temperatur gir endringen i varmekapasitet ( $\Delta C_{p,r}$ ) som stigningstall.

### 4.6.3 Parameterisering av den entropiske termen

Endringen i entropien kan som nevnt tidligere sees på som summen av tre ledd (Baker & Murphy 1997):

$$\Delta S_r^\circ = \Delta S_{\text{solv}}^\circ + \Delta S_{\text{conf}}^\circ + \Delta S_{\text{mix}}^\circ \quad 4.6.1$$

$\Delta S_{\text{solv}}^{\circ}$  er endringen i entropi når et vannmolekyl frigjøres ved binding mellom protein og ligand.  $\Delta S_{\text{conf}}^{\circ}$  representerer endringen i entropi som følge av strukturforandringer og endring i rotasjonsfrihet i protein og ligand ved binding.  $\Delta S_{\text{mix}}^{\circ}$  representerer tap av translasjons- og rotasjonsfrihet når et kompleks dannes fra to molekyler som er frie i løsning. Det er dokumentert at solvatiseringsentropien er tilnærmet lik null for proteiner ved  $T = 385 \text{ K}$  (Baldwin 1986; Murphy et al. 1990; Murphy 1994).  $\Delta C_{p,r}^{\circ}$  til bindingsreaksjonen ved  $t = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  kan derfor relateres til  $\Delta S_{\text{solv}}^{\circ}$  gjennom ligning 4.6.2:

$$\Delta S_{\text{solv}}^{\circ} = \Delta C_{p,r}^{\circ} \ln \left( \frac{303 \text{ K}}{385 \text{ K}} \right) \quad 4.6.2$$

Videre er  $\Delta S_{\text{mix}}^{\circ}$  estimert til å være  $-8 \text{ cal/K mol}$  gjennom ligning 4.6.3 (Baker & Murphy 1997):

$$\Delta S_{\text{mix}}^{\circ} = R \ln \left( \frac{1}{55,5} \right) \quad 4.6.3$$

Dette tillater til slutt en beregning av  $\Delta S_{\text{conf}}^{\circ}$  gjennom ligning 4.6.1.

Ved å bruke ligning 4.6.2 ble  $\Delta S_{\text{solv}}^{\circ}$  for ChiA beregnet til å være  $57,8 \pm 3,3 \text{ cal/K mol}$  ( $-T\Delta S_{\text{solv}}^{\circ} = -17,5 \pm 1,0 \text{ kcal/mol}$ ), mens  $\Delta S_{\text{conf}}^{\circ}$  ble beregnet til å være  $-36,0 \pm 3,3 \text{ cal/K mol}$  ( $-T\Delta S_{\text{conf}}^{\circ} = 10,9 \pm 1,0 \text{ kcal/mol}$ ) gjennom ligning 4.6.1. For ChiC ble  $\Delta S_{\text{solv}}^{\circ}$  beregnet til å være  $38,0 \pm 3,3 \text{ cal/K mol}$  ( $-T\Delta S_{\text{solv}}^{\circ} = -11,5 \pm 1,0 \text{ kcal/mol}$ ), mens  $\Delta S_{\text{conf}}^{\circ}$  ble beregnet til å være  $-23,8 \pm 3,3 \text{ cal/K mol}$  ( $-T\Delta S_{\text{conf}}^{\circ} = 7,2 \pm 1,0 \text{ kcal/mol}$ ).

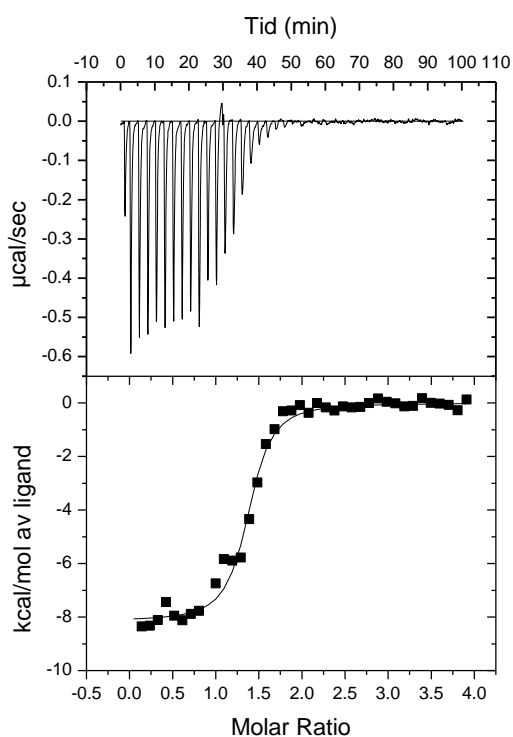
Tabell 4.6.1 Termodynamiske parametere for binding av  $(\text{GlcNAc})_6$  til ChiA og ChiC tilhørende *S. marcescens* ved  $t = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  og  $\text{pH} = 6,0$ .

Enzym	$K_d^a$	$\Delta G_r^{\circ b}$	$\Delta H_r^{\circ b}$	$-T\Delta S_r^{\circ b}$	$-T\Delta S_{\text{solv}}^{\circ b}$	$-T\Delta S_{\text{conf}}^{\circ b}$	$-T\Delta S_{\text{mix}}^{\circ b}$	$\Delta C_{p,r}^{\circ c,d}$
ChiA	$0,56 \pm 0,03$	$-8,7 \pm 0,1$	$-4,5 \pm 0,2$	$-4,2 \pm 0,2$	$-17,5 \pm 1,0$	$10,9 \pm 1,0$	2,4	$-241 \pm 12$
ChiC	$0,10 \pm 0,02$	$-9,7 \pm 0,1$	$-7,8 \pm 0,2$	$-1,9 \pm 0,2$	$-11,5 \pm 1,0$	$7,2 \pm 1,0$	2,4	$-158 \pm 12$

<sup>a</sup>  $\mu\text{M}$ , <sup>b</sup>  $\text{kcal/mol}$ , <sup>c</sup>  $\text{cal/K mol}$ ,  $\Delta S_{\text{solv}}^{\circ} = \Delta C_p \ln(T_{303 \text{ K}}/T_{385 \text{ K}})$  ut i fra ligningen  $\Delta S_r^{\circ} = \Delta S_{\text{solv}}^{\circ} + \Delta S_{\text{mix}}^{\circ} + \Delta S_{\text{conf}}^{\circ}$  hvor  $\Delta S_{\text{mix}}^{\circ} = R \ln(1/55,5) = -8 \text{ cal/K mol}$ , <sup>d</sup> hentet fra temperaturavhengigheten til  $\Delta H_r^{\circ}$ .

#### 4.6.4 Binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiC2

Resultatene for ChiC i avsnitt 4.6.3 kommer fra en blanding av ChiC1 og ChiC2 ettersom utbyttet ved separasjonen av de to produktene med HIC ble relativt lave. Det ble utført ett ITC-forsøk med 15  $\mu\text{M}$  ChiC2 som en kontroll på resultatene beskrevet i avsnittet over. Kontrollen ble utført ved 30 °C og pH 6,0 (20 mM kaliumfosfatbuffer). Figur 4.6.3 viser termogrammet og bindingsisotermen for forsøket.



Figur 4.6.3. Termogram (øverst) og bindingsisotermen (nederst) for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiC2 ved pH 6,0 og  $t = 30$  °C.

Ved denne temperaturen binder ChiC2 til (GlcNAc)<sub>6</sub> med  $K_d = 0,22 \mu\text{M} \pm 0,04 \mu\text{M}$  og  $\Delta G_r^\circ = -9,2 \pm 0,1$  kcal/mol. Reaksjonen har en  $\Delta H_r^\circ$  på  $-8,2 \pm 0,2$  kcal/mol samt en  $\Delta S_r^\circ$  lik  $3,3 \pm 0,3$  cal/K mol ( $-T\Delta S_r^\circ = -1,0 \pm 0,1$  kcal/mol). I tabell 4.6.2 er de termodynamiske parameterne til ChiC2 sammenlignet med ChiC.

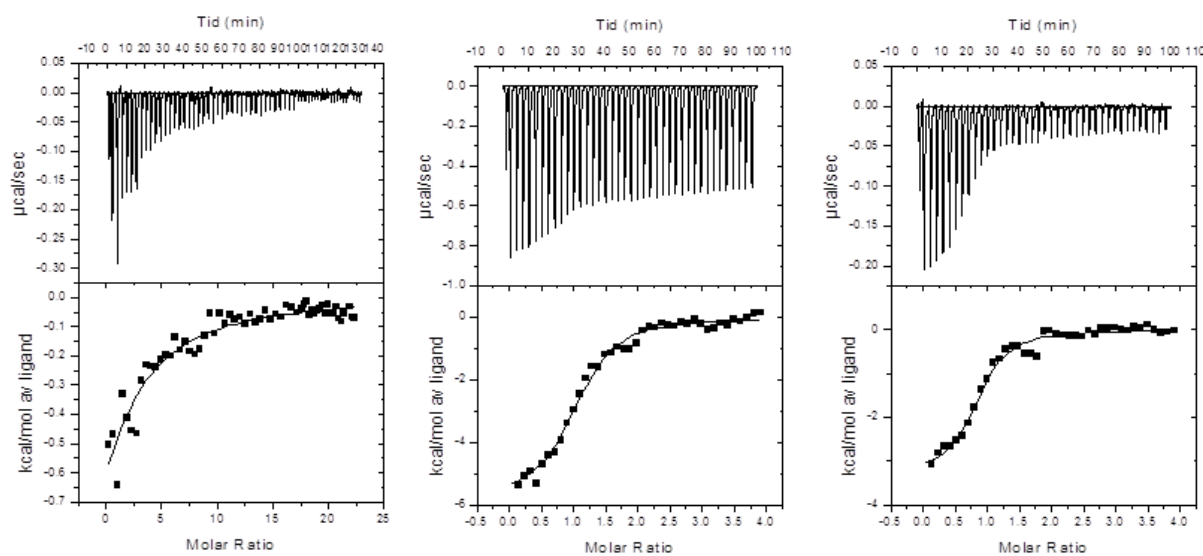
Tabell 4.6.2. Termodynamiske parametere for bindingen av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiC2 og ChiC ved t = 30 °C og pH = 6,0.

Enzym	K <sub>d</sub> <sup>a</sup>	ΔG <sub>r</sub> <sup>ob</sup>	ΔH <sub>r</sub> <sup>ob</sup>	-TΔS <sub>r</sub> <sup>ob</sup>
ChiC	0,10 ± 0,02	-9,7 ± 0,1	-7,8 ± 0,2	-1,9 ± 0,2
ChiC2	0,22 ± 0,04	-9,2 ± 0,1	-8,2 ± 0,2	-1,0 ± 0,1

<sup>a</sup> μM, <sup>b</sup> kcal/mol.

#### 4.6.5 Aromaters påvirkning på bindingen av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiA

For å undersøke aromaters påvirkning på bindingen av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiA ble mutantene ChiA-W167A, ChiA-W275A og ChiA-F396A studert med ITC ved 30 °C og pH 6,0 (20 mM kaliumfosfatbuffer). I figur 4.6.4 kan termogrammene og isotermene til de ulike mutantene observeres.



Figur 4.6.4. Fra venstre: Termogram (øverst) og bindingsisoterm (nederst) for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til henholdsvis ChiA-W167A, ChiA-W275A og ChiA-F396A.

De samlede termodynamiske parameterne for bindingen av (GlcNAc)<sub>6</sub> til de ulike mutantene er presentert i tabell 4.6.3.

#### 4.6.5.1 Binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiA-W167A

En 20 μM proteinløsning av ChiA-W167A ble overtitrert med en høy (3 mM) konsentrasjon av (GlcNAc)<sub>6</sub>. Dette sikret en tilfredsstillende c-verdi (se avsnitt 1.5.5 om c-verdi for lavaffinitetsstudier). Det var kun protein tilgjengelig for en parallell. Ved 30 °C binder ChiA-W167A til (GlcNAc)<sub>6</sub> med  $K_d = 134 \pm 13 \mu\text{M}$  og  $\Delta G_r^\circ = -5,4 \pm 0,1 \text{ kcal/mol}$ . Reaksjonen har en  $\Delta H_r^\circ$  på  $-4,5 \pm 0,3 \text{ kcal/mol}$ , samt en  $\Delta S_r^\circ$  lik  $3,0 \pm 0,6 \text{ cal/K mol}$  ( $-T\Delta S_r^\circ = -0,9 \pm 0,2 \text{ kcal/mol}$ ). Som kontroll ble bindingen av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiA-W167A studert ved ulike temperaturer (40, 30 og 5 °C) under samme betingelser som for ChiA. Alle tilpasninger av teoretiske data til eksperimentelle viste at beregnet  $K_a$ -verdi ga en c-verdi langt under 10 og en overtitrering måtte utføres som beskrevet av Turnbull og Daranas (2003).

#### 4.6.5.2 Binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiA-W275A

Ved 30 °C binder ChiA-W275A til (GlcNAc)<sub>6</sub> med  $K_d = 2,1 \pm 0,3 \mu\text{M}$  og  $\Delta G_r^\circ = -7,9 \pm 0,1 \text{ kcal/mol}$ . Reaksjonen har en  $\Delta H_r^\circ$  på  $-6,7 \pm 0,7 \text{ kcal/mol}$ , samt en  $\Delta S_r^\circ$  lik  $4,0 \pm 2,0 \text{ cal/K mol}$  ( $-T\Delta S_r^\circ = -1,2 \pm 0,6 \text{ kcal/mol}$ ).

#### 4.6.5.3 Binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiA-F396A

Ved 30 °C binder ChiA-F396A til (GlcNAc)<sub>6</sub> med  $K_d = 1,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$  og  $\Delta G_r^\circ = -8,2 \pm 0,1 \text{ kcal/mol}$ . Reaksjonen har en  $\Delta H_r^\circ$  på  $-3,3 \pm 0,0 \text{ kcal/mol}$ , samt en  $\Delta S_r^\circ$  lik  $16,2 \pm 0,3 \text{ cal/K mol}$  ( $-T\Delta S_r^\circ = -4,9 \pm 0,1 \text{ kcal/mol}$ ).

Tabell 4.6.3. Termodynamiske parametere for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiA, ChiA-W167A, ChiA-W275A og ChiA-F396A ved  $t = 30 \text{ }^\circ\text{C}$  og  $\text{pH} = 6,0$ .

Enzym	$K_d^a$	$\Delta G_r^{\circ b}$	$\Delta H_r^{\circ b}$	$-T\Delta S_r^{\circ b}$
ChiA	$0,56 \pm 0,03$	$-8,7 \pm 0,1$	$-4,5 \pm 0,2$	$-4,2 \pm 0,2$
ChiA-W167A	$134 \pm 13$	$-5,4 \pm 0,1$	$-4,5 \pm 0,3$	$-0,9 \pm 0,2$
ChiA-W275A	$2,1 \pm 0,3$	$-7,9 \pm 0,1$	$-6,7 \pm 0,7$	$-1,2 \pm 0,6$
ChiA-F396A	$1,2 \pm 0,1$	$-8,2 \pm 0,1$	$-3,3 \pm 0,0$	$-4,9 \pm 0,1$

<sup>a</sup> μM, <sup>b</sup> kcal/mol.

## 5. Diskusjon

I denne oppgaven ble det utført bindingsstudier med (GlcNAc)<sub>6</sub> til familie 18 kitinasene ChiA og ChiC i *Serratia marcescens*. Målet med disse bindingsstudiene er å se om termodynamiske signaturer ved substratbinding til *S. marcescens* kitinasene kan relateres til deres unike egenskaper, og å ta opp hypotesen om at prosessivitet er direkte relatert til bindingsfrienergiendring.

### 5.1 Termodynamiske signaturer for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiA, ChiB og ChiC

Det er med resultatene i denne oppgaven mulig å sammenligne de termodynamiske signaturene for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiA, ChiB og ChiC. Signaturene for ChiA og ChiC ble funnet i denne oppgaven, mens de for ChiB tidligere ble funnet av Norberg et al. (2010a). De ulike parameterne til kitinasene er vist i tabell 5.1.1.

Tabell 5.1.1. Termodynamiske parametere for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiA, ChiC og ChiB tilhørende *S. marcescens* ved t = 30 °C og pH = 6,0.

Enzym	K <sub>d</sub> <sup>a</sup>	ΔG <sub>r</sub> <sup>ob</sup>	ΔH <sub>r</sub> <sup>ob</sup>	-TΔS <sub>r</sub> <sup>ob</sup>	-TΔS <sub>solv</sub> <sup>ob</sup>	-TΔS <sub>conf</sub> <sup>ob</sup>	-TΔS <sub>mix</sub> <sup>ob</sup>	ΔC <sub>p,r</sub> <sup>oc,d</sup>
ChiA	0,56 ± 0,03	-8,7 ± 0,1	-4,5 ± 0,2	-4,2 ± 0,2	-17,5 ± 1,0	10,9 ± 1,0	2,4	-241 ± 12
ChiC	0,10 ± 0,02	-9,3 ± 0,1	-7,8 ± 0,2	-1,9 ± 0,2	-11,5 ± 1,0	7,2 ± 1,0	2,4	-158 ± 12
ChiB*	0,20 ± 0,03	-9,7 ± 0,1	-0,1 ± 0,3	-9,2 ± 0,3	-11,5 ± 0,5	-0,1 ± 0,6	2,4	-158 ± 5

<sup>a</sup> μM, <sup>b</sup> kcal/mol, <sup>c</sup> cal/K mol,  $\Delta S_{\text{solv}}^{\circ} = \Delta C_p \ln(T_{303 \text{ K}}/T_{385 \text{ K}})$  ut i fra ligningen  $\Delta S_r^{\circ} = \Delta S_{\text{solv}}^{\circ} + \Delta S_{\text{mix}}^{\circ} + \Delta S_{\text{conf}}^{\circ}$  hvor  $\Delta S_{\text{mix}}^{\circ} = R \ln(1/55,5) = -8 \text{ cal/K mol}$ , <sup>d</sup> hentet fra temperaturavhengigheten til  $\Delta H_r^{\circ}$ .

\* tall hentet fra Norberg et al. (2010a).

Ettersom (GlcNAc)<sub>6</sub> var lik for alle kitinasene vil observerte forskjeller i tabell 5.1.1 være et resultat av variasjon i kitinasene i forhold til hverandre. Ved 30 °C og pH 6,0 er disosiasjonskonstanten relativt lik for alle kitinasene; de binder til (GlcNAc)<sub>6</sub>, med en frienergiendring på ~9,2 kcal/mol, med ChiA som svakest bindende. Bindingsreaksjonen er entalpisk drevet i ChiC, mens den er entropisk drevet i ChiB. I ChiA er bidraget omtrent likt både entalpisk og entropisk. Når det kommer til endring i solvatiseringsentropien er den større

og mer gunstig for ChiA enn de andre. I motsetning er endring i konformasjonsentropien ugunstig for ChiA og ChiC, mens den er tilnærmet «nøytral» for ChiB.

### *5.1.1 Termodynamiske signaturer for binding til (GlcNAc)<sub>6</sub> og allosamidin*

ChiA, ChiB og ChiC har som nevnt tidligere ulike roller i degraderingen av kitin. Som følge av dette har den katalytiske syren til hver kitinase ulike roller og egenskaper forbundet med om subsetene deltar i substratbinding eller produktdissosiasjon etter endt hydrolyse, med en prosessiv eller ikke-prosessiv virkemåte (Baban et al. 2010; Horn et al. 2006c; Zakariassen et al. 2009; Zakariassen et al. 2010). Det er derfor interessant å studere de positive og negative subsetenes bidrag i ligandbinding. (GlcNAc)<sub>6</sub> binder i både positive og negative subseter for alle familie 18 kitinaser. I ChiA binder dette substratet hovedsakelig fra subsete -4 til +2, men det er også observert binding fra subsete -3 til +3 og -2 til +4 (Norberg et al. 2011). I ChiC binder (GlcNAc)<sub>6</sub> hovedsakelig fra subsete -2 til +4, men også i mindre grad fra -3 til +3. ChiB binder substratet fra subsete -2 til +4, men kan óg binde fra -3 til +3. Allosamidin er et pseudotrisakkarid som kun binder til negative subseter (-3 til -1) hos familie 18 kitinaser. Allosamizolin gruppen på allosamidin ligner oxazoliniumionintermediatet som blir dannet i subsete -1 under hydrolysen av kitin og er med på å posisjonere allosamidin fra -3 til -1 (van Aalten et al. 2001). Tidligere har binding av allosamidin til ChiA, ChiB og ChiC blitt studert av Baban et al. (2010). Ved å sammenligne de termodynamiske signaturene for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub>, allosamidin, samt (GlcNAc)<sub>6</sub> minus allosamidin vil vi få bidraget til henholdsvis aktivt sete, negative subseter og positive subseter. Selv om dette er en forenkling kan en slik fremgangsmåte gi en nyttig pekepinn på kitinasenes ulike roller. Termodynamiske parametere for bindingen av allosamidin til ChiA, ChiB og ChiC er presentert i tabell 5.1.2.

Tabell 5.1.2. Termodynamiske parametere for binding av allosamidin til ChiA, ChiC og ChiB tilhørende *S. marcescens* ved  $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$  og  $\text{pH} = 6,0$  (Baban et al. 2010; Cederkvist et al. 2007).

Enzym	$K_d^a$	$\Delta G_r^{ob}$	$\Delta H_r^{ob}$	$-T\Delta S_r^{ob}$	$-T\Delta S_{solv}^{ob}$	$-T\Delta S_{conf}^{ob}$	$-T\Delta S_{mix}^{ob}$	$\Delta C_{p,r}^{oc,d}$
ChiA	$0,17 \pm 0,06$	$-9,4 \pm 0,2$	$-6,2 \pm 0,2$	$-3,2 \pm 0,3$	$-4,5 \pm 1,3$	$-1,1 \pm 1,3$	2,4	$-61 \pm 13$
ChiC	$2,0 \pm 0,2$	$-7,9 \pm 0,1$	$-0,6 \pm 0,1$	$-7,3 \pm 0,1$	$-8,7 \pm 1,3$	$-1,0 \pm 1,3$	2,4	$-120 \pm 15$
ChiB	$0,16 \pm 0,04$	$-9,4 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,2$	$-13,2 \pm 0,2$	$-4,5 \pm 0,5$	$-11,1 \pm 0,6$	2,4	$-63 \pm 4$

<sup>a</sup>  $\mu\text{M}$ , <sup>b</sup> kcal/mol, <sup>c</sup> cal/K mol,  $\Delta S_{solv}^{\circ} = \Delta C_p \ln(T_{303\text{ K}}/T_{385\text{ K}})$  ut i fra ligningen  $\Delta S_r^{\circ} = \Delta S_{solv}^{\circ} + \Delta S_{mix}^{\circ} + \Delta S_{conf}^{\circ}$  hvor  $\Delta S_{mix}^{\circ} = R \ln(1/55,5) = -8\text{ cal/K mol}$ , <sup>d</sup> hentet fra temperaturavhengigheten til  $\Delta H_r^{\circ}$ .

I arbeidet til Baban et al. (2010) ble gunstig endring i solvatiseringsentropien ved binding av ChiC til allosamidin korrelert med endoaktivitet. Ettersom ChiC har en mer overflateeksponert substratbindende kløft enn de to andre kitinasene, ble det antatt at bindingskløften er mer solvatisert når proteinet ligger fritt i løsning og dermed frigjør flere vannmolekyler ved binding til substrat.

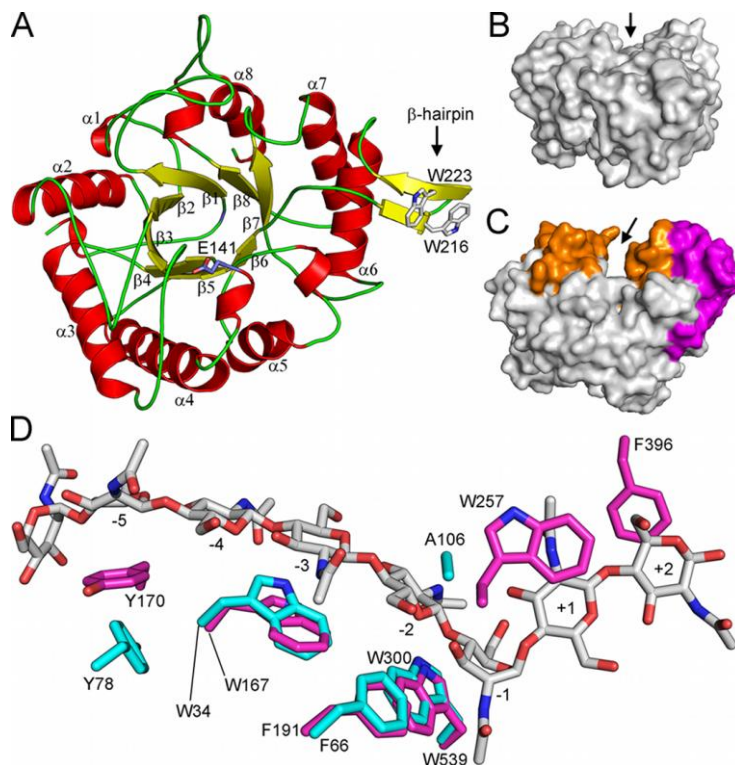
Om desolvatisering av proteinet og ligand ved binding er gunstig eller ikke avhenger av sterke interaksjoner mellom proteinet og liganden som kan kompensere for tap av eventuelle gunstige interaksjoner mellom vannmolekyler og proteinet/liganden. Det er observert at selv om entropien øker ved frigjøring av et vannmolekyl til løsning, kan det entalpisk være mer fordelaktig å ha vannmolekylet bundet ettersom det stabiliserer bindingen mellom proteinet og liganden (Li & Lazaridis 2005). Amadasi et al. (2006) har kartlagt bindingsenergier ved vann-protein og vann-ligand interaksjoner ved å analysere strukturelle data for sett av proteiner med og uten ligand. Ved hjelp av et HINT (hydropatic interactions) kraftfelt ble bindingsenergien for et bundet vannmolekyl i andre hydreringslag rundt proteinet kalkulert til å være  $-0,04\text{ kcal/mol}$ , for et vannmolekyl i første hydreringslag  $-0,38\text{ kcal/mol}$ , for et vannmolekyl i aktive sete  $-0,45\text{ kcal/mol}$ , for et vannmolekyl i hulrom  $-0,55\text{ kcal/mol}$  og for et «begravet» vannmolekyl  $-0,56\text{ kcal/mol}$ . Bindingsenergien for et vannmolekyl som kobler proteinet og liganden ble kalkulert til å være så mye som  $-1,13\text{ kcal/mol}$  og er derfor særlig gunstig.

I andre tilfeller er det observert at frigjøring av ordnede vannmolekyler kan føre til en større bindingsaffinitet mellom protein og ligand. Dette er blant annet vist for en syklisk urea HIV-1 protease inhibitor som var designet for å frigjøre et bundet vannmolekyl observert i



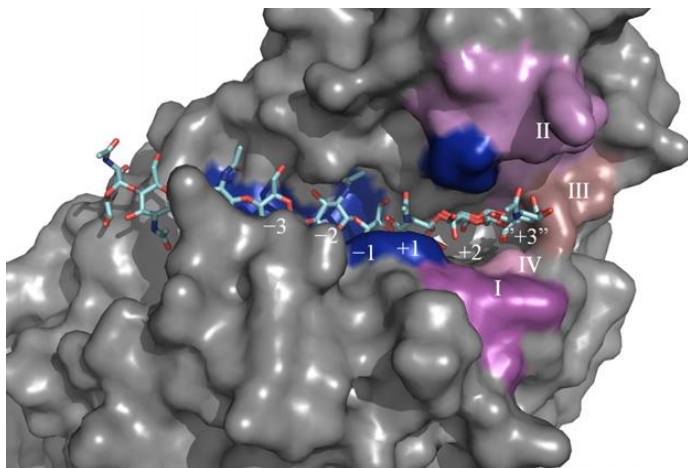
krystallstrukturen til HIV-1. Frigjøringen av vannmolekylet førte til en sterkere binding (Lam et al. 1994). Det er også vist at frigjøring av ett vannmolekyl ved binding av en mutant av bakteriofagen HK620TSP-E372Q til et heksasakkarid kan være en del av forklaringen på en 1000-talls senkning i dissosiasjonskonstanten for mutanten i forhold til villtype (Broeker et al. 2013). Om desolvatisering er gunstig eller ugunstig for en bindingsreaksjon avhenger følgelig av strukturen til proteinet og liganden, samt strukturen på protein-ligand komplekset.

Dersom bindingsstudiene på allosamidin og (GlcNAc)<sub>6</sub> sees under ett antyder dataene at ChiC blir mest desolvatisert i negative sub seter ( $-T\Delta S_{\text{solv}}^{\circ}(\text{GlcNAc})_6$ :  $-11,5 \pm 1,0$  kcal/mol,  $-T\Delta S_{\text{solv}}^{\circ}$  allosamidin:  $-8,7 \pm 1,3$  kcal/mol), at ChiA blir mest desolvatisert i positive sub seter ( $-T\Delta S_{\text{solv}}^{\circ}(\text{GlcNAc})_6$ :  $-17,5 \pm 1,0$  kcal/mol,  $-T\Delta S_{\text{solv}}^{\circ}$  allosamidin:  $-4,5 \pm 1,3$  kcal/mol), og at ChiB blir desolvatisert i omtrent like stor grad både i positive og negative sub seter ( $-T\Delta S_{\text{solv}}^{\circ}(\text{GlcNAc})_6$ :  $-11,5 \pm 0,5$  kcal/mol,  $-T\Delta S_{\text{solv}}^{\circ}$  allosamidin:  $-4,5 \pm 0,5$  kcal/mol). En mulig årsak til desolvatisering i negative sub seter framfor positive hos ChiC kan være et resultat av at ChiC2 kun har aromater tilsvarende ChiA i negative sub seter, se figur 5.1.1D. Det er tidligere observert at det gir en lavere energetisk «straff» å fjerne vannmolekyler fra en overflateregion med aromater og hydrofobe aminosyrer, sammenlignet med mer polare aminosyrer (Fiorucci & Zacharias 2010).



Figur 5.1.1. Struktur av ChiC2. A viser  $(\beta/\alpha)_8$  TIM-tønnestrukturen til ChiC2 med den katalytiske syren Glu<sup>141</sup> plassert mellom den 4  $\beta$ - og  $\alpha$ -heliksen. B og C viser en sammenligning av ChiC2 (B) og ChiA (C) med insersjoner i den substratbindende kløften farget oransje og  $\alpha + \beta$  subdomene farget magenta. Pilene viser hvor bindingskløften er. D viser aromaterne som ligger langs den substratbindende kløften til ChiA (magentafarget) og ChiC2 (cyanofarget). Substratet (GlcNAc)<sub>8</sub> er representert med gråfarge og sub seter som er assosiert til de ulike sukkerenhetene er indikert (Payne et al. 2012).

For ChiA er det i denne oppgaven vist at subsete -3 (Trp<sup>167</sup>) binder sterkt til substratet (se tabell 4.6.3). Derimot er det tidligere vist ved væskechromatografiske (HPLC) målinger at binding av (GlcNAc)<sub>5</sub> skjer likt fordelt fra -2 til +3 og -3 til +2 (Horn et al. 2006c). Dette indikerer en like sterk binding i +3 som i -3. Denne subsetepreferansen har i tillegg blitt studert med massespektrometri (MS) der resultatene viste at 3 av 4 (GlcNAc)<sub>5</sub> binder fra -2 til +3 (Hamre et al. Upubliserte data), hvilket indikerer en sterk substrataffinitet til subsete +3. I figur 5.1.2 er krystallstrukturen av det aktive setet til ChiA i et kompleks med (GlcNAc)<sub>8</sub> presentert. Krystallstrukturen viser at ChiA er mer åpen mot løsemiddel i subsete +3 enn -3 (Norberg et al. 2011). Dette kan muligens forklare hvorfor ChiA blir mer desolvatisert i positive sub seter ved binding til (GlcNAc)<sub>6</sub>.



Figur 5.1.2. Krystallstruktur av det aktive setet til ChiA i kompleks med et  $(\text{GlcNAc})_8$  molekyl. Fire aromatiske aminosyrer som virker på liganden og som er lokalisert nærme det katalytiske senteret er farget blått. Disse er: Trp<sup>167</sup> (subsete -3), Trp<sup>539</sup> (subsete -1/-2), Trp<sup>275</sup> (subsete +1) og Phe<sup>396</sup> (Subsete +2). Det er fire regioner i ChiA som potensielt kan virke med GlcNAc enheten som er bundet til det tiltenkte +3 subsetet og disse er farget magenta (I), fiolett (II og III) og rosa (IV) (Norberg et al. 2011).

Som nevnt tidligere er det viktig å ta i betraktning at dette er en forenkling ettersom gunstig endring i solvatiseringsentropi for eksempel også kan skyldes frigjøring av mer “ordnede” vannmolekyler, og er derfor nødvendigvis ikke et mål på antall vannmolekyler frigjort fra proteinets overflate. For å kunne trekke noen endelige konklusjoner er det derfor nødvendig å sammenligne krystallstrukturen til ChiA, ChiB og ChiC med krystallstrukturen for hver enkelt kitinase- $(\text{GlcNAc})_6$  kompleks og se om strukturene kan forklare noen av trendene i de termodynamiske signaturene. Dette har ikke vært mulig i denne oppgaven da det per dags dato ikke foreligger krystallstrukturer for ChiA, ChiB og ChiC mot  $(\text{GlcNAc})_6$ .

Sammenligningen av ChiA, ChiC og ChiB mot binding til allosamidin og  $(\text{GlcNAc})_6$  viser at endring i konformasjonsentropien blir mindre gunstig ved binding av  $(\text{GlcNAc})_6$ . For ChiA er  $-T\Delta S_{\text{conf}}^{\circ}(\text{GlcNAc})_6 = 10,9 \pm 1,0$  kcal/mol, mens  $-T\Delta S_{\text{conf}}^{\circ}\text{allosamidin} = -1,1 \pm 1,3$  kcal/mol. Liknende for ChiC er  $-T\Delta S_{\text{conf}}^{\circ}(\text{GlcNAc})_6 = 7,2 \pm 1,0$  kcal/mol og  $-T\Delta S_{\text{conf}}^{\circ}\text{allosamidin} = -1,0 \pm 1,3$  kcal/mol. For ChiB er  $-T\Delta S_{\text{conf}}^{\circ}(\text{GlcNAc})_6 = -0,1 \pm 0,6$  kcal/mol, mens  $-T\Delta S_{\text{conf}}^{\circ}\text{allosamidin} = -11,1 \pm 0,6$  kcal/mol. En negativ endring i konformasjonsentropi ved binding til  $(\text{GlcNAc})_6$  kan forklares med at lange ligander som  $(\text{GlcNAc})_6$  er mer fleksible enn korte. Ved binding vil derfor tapet av konformasjonsentropien være større. Videre vil  $(\text{GlcNAc})_6$  mest sannsynlig «låse» mer av proteinet grunnet flere interaksjonskontakter mot  $(\text{GlcNAc})_6$  enn mot allosamidin. Både ChiA og ChiB har looper med relativt høy B-faktor som sitter ved det

substratbindende setet. Tap av fleksibilitet i disse loopene ved binding til (GlcNAc)<sub>6</sub> kan føre til tap av konformasjonsentropi (Norberg et al. 2010a).

Noe av bidraget kan også komme av at -1 sukkeret i GlcNAc må undergå en transformasjon av konformasjonen ved hydrolyse og dermed tape konformasjonsentropi. Bidraget av denne entropien er ikke kjent for GlcNAc-enheter i KOS. Derimot har tidligere studier gjort av Haverkamp et al. (2007) på kontribusjonen av entalpi og entropi til transformasjon av stol-båt konformasjonen på glukose i dextran vist at kontribusjonen av entropi utgjør mindre enn 3 cal/K mol. Transformasjonen er derfor mest sannsynlig ikke det største bidraget til en ugunstig endring i konformasjonsentropi.

## 5.2 Aromaters påvirkning på bindingen av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiA

Det foreligger en hypotese om at det er en korrelasjon mellom bindingsstyrke og prosessivitet. Dette fordi prosessive enzymer er avhengige av å holde seg bundet til substratet mellom påfølgende hydrolytiske kutt. Bindingsstudiene for (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiA-W167A med ITC ga en veldig høy dissosiasjonskonstant ( $K_d = 134 \pm 0,03 \mu\text{M}$ ,  $\Delta G_r^\circ = -5,4 \pm 0,1 \text{ kcal/mol}$ ) sammenlignet med "villtype" ChiA ( $K_d = 0,56 \pm 0,03 \mu\text{M}$ ,  $\Delta G_r^\circ = -8,7 \pm 0,1 \text{ kcal/mol}$ ), se tabell 4.6.3. Dette resultatet styrker den ovennevnte hypotesen da det ser ut til at residuet som binder sterkest til (GlcNAc)<sub>6</sub>, Trp<sup>167</sup>, også er det residuet som tilsynelatende er viktigst for prosessivitet i ChiA (Zakariassen et al. 2009). Videre kan det observeres at residu i produkt dissosiasjonssubseter; Trp<sup>275</sup> og Phe<sup>396</sup>, som har vist seg å være mindre viktige for prosessivitet, bidrar i mindre grad til bindingen av substratet ( $K_d = 2,1 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ,  $\Delta G_r^\circ = -7,9 \pm 0,1 \text{ kcal/mol}$  for ChiA-W275A og  $K_d = 1,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ,  $\Delta G_r^\circ = -8,2 \pm 0,1 \text{ kcal/mol}$  for ChiA-F396A). Resultatene viser at det er en sannsynlig korrelasjon mellom bindingsstyrke og grad av prosessivitet.

### 5.3 Oppsummering

Resultatene fra denne oppgaven viser at selv om bindingsfrienergiendringene til de tre aktive kitinasene i *S. marcescens* er relativt like, så er det distinkte variasjoner i de termodynamiske signaturene for substratbinding. Ved sammenligning av binding til (GlcNAc)<sub>6</sub> og allosamidin indikerer resultatene at ChiA blir mest desolvatisert i positive sub seter, at ChiC blir mest desolvatisert i negative sub seter, mens det er en relativt lik fordeling for ChiB. Det skjer en ugunstig endring i konformasjonsentropien ved binding til (GlcNAc)<sub>6</sub> sammenlignet med binding til allosamidin for alle kitinasene. Dette skyldes mest sannsynlig redusert fleksibilitet hos både ligand og protein ved kompleksdannelse.

Tidligere studier av ChiA mutantene W167A, W275A og F396A har vist at Trp<sup>167</sup> i substratbindende sete er det viktigste residuet for prosessivitet, mens Trp<sup>275</sup> og Phe<sup>396</sup> i produkt dissosiasjonssub seter i mindre grad bidrar til prosessivitet. I denne oppgaven viser resultatene at det er en korrelasjon mellom bindingsstyrke og prosessivitet. Det residuet som er viktigst for prosessivitet er også det residuet som binder sterkest til substratet. I motsetning bidrar residu i produkt dissosiasjonssub seter i mindre grad til bindingen av substratet.

## 6. Videre arbeid

Det er igangsatt videre arbeid med å produsere to andre ligander (kitotriose tiazolin og kitotriose lakton) som eksklusivt binder i negative subsepter for ChiA, ChiB og ChiC. Det er av interesse å undersøke om bindingsstudier til disse ligandene for familie 18 kitinaser samsvarer med resultatene for allosamidin og dermed støtter opp under konklusjonene trukket i denne oppgaven. Videre er det av interesse å identifisere sterkt bindende residuer i subsete +3 hos ChiA for å se om bindingsstyrke og endring i solvatiseringsentropi endres når disse residuene muteres. Det ville også vært interessant å se nærmere på hvordan vannmolekyler rundt kitinase og ligand oppfører seg ved kompleksdannelse. Dette for å se hvilke vannmolekyler som er energetisk gunstig og ugunstig å fjerne ved binding til ligand. Dette kunne ikke utføres i denne oppgaven da det, som tidligere nevnt, ikke er funnet krystallstruktur for ChiA, ChiB og ChiC mot (GlcNAc)<sub>6</sub>.

Ettersom det i denne oppgaven ble utført bindingsstudier på en blanding av ChiC1 og ChiC2, med unntak av ett kontrollforsøk med ChiC2, er det hensiktsmessig å gjøre samme forsøk med henholdsvis ChiC1 og ChiC2 for å se om resultatene blir de samme. Dette krever et høyere utbytte av ChiC og følgelig må proteinekspressjonen optimaliseres.



## 7. Referanser

- Abd-Elsalam, K. A. (2003). Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *Afr J Biotechnol*, 2 (5): 91-95.
- Agilent Technologies. (2013a). *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit* Tilgjengelig fra: <http://www.chem.agilent.com/library/usermanuals/Public/200523.pdf> (lest 04.02.2014).
- Agilent Technologies. (2013b). *QuikChange Primer Design*. Tilgjengelig fra: [http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp?&\\_requestid=74082](http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp?&_requestid=74082) (lest 04.02.2014).
- Amadasi, A., Spyraakis, F., Cozzini, P., Abraham, D. J., Kellogg, G. E. & Mozzarelli, A. (2006). Mapping the energetics of water-protein and water-ligand interactions with the "natural" HINT forcefield: predictive tools for characterizing the roles of water in biomolecules. *J Mol Biol*, 358 (1): 289-309.
- Andersen, K. B. (1998). *Beregning av proteinkonsentrasjon*. Tilgjengelig fra: <http://folk.uio.no/oddsg/metodebok/Protein.html#top> (lest 04.02.2014).
- Baban, J., Fjeld, S., Sakuda, S., Eijsink, V. G. & Sorlie, M. (2010). The roles of three *Serratia marcescens* chitinases in chitin conversion are reflected in different thermodynamic signatures of allosamidin binding. *J Phys Chem B*, 114 (18): 6144-9.
- Bae Keun, P. & Moon-Moo, K. (2010). Applications of Chitin and Its Derivatives in Biological Medicine. *Int J Mol Sci*, 11 (12).
- Baker, B. M. & Murphy, K. P. (1997). Dissecting the energetics of a protein-protein interaction: the binding of ovomucoid third domain to elastase. *J Mol Biol*, 268 (2): 557-69.
- Baldwin, R. L. (1986). Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83 (21): 8069-8072.
- Biomol. (2004). *Ampliqon III BL21 Competent cells*. Tilgjengelig fra: [http://www.biomol.de/dateien/infos\\_nr353.pdf](http://www.biomol.de/dateien/infos_nr353.pdf).
- Bornhorst, B. J. & Falke, J. J. (2011). Reprint of: Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Protein Expr Purif*.
- Brigham Young University. (2014). Tilgjengelig fra: <http://ricfacility.byu.edu/Equipment/Spectrophotometer.aspx> (lest 09.03.2014).
- Broeker, N. K., Gohlke, U., Muller, J. J., Uetrecht, C., Heinemann, U., Seckler, R. & Barbirz, S. (2013). Single amino acid exchange in bacteriophage HK620 tailspike protein results in thousand-fold increase of its oligosaccharide affinity. *Glycobiology*, 23 (1): 59-68.
- Brurberg, M. B., Synstad, B., Klemsdal S. L., van Aalten, D. M. F. & Sundheim, L., Eijsink, V. G.H. (2000). *Chitinases from Serratia marcescens*. Institute, T. N. C. R. (red.). Recent Research Developments in Microbiology.
- Bueter, C., L., Specht, C., A. & Levitz, S., M. (2013). *Innate Sensing of Chitin and Chitosan*. I: Heitman, J. (red.). PLOS collections. Tilgjengelig fra: <http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1003080> (lest 06.04.2014).
- Caprette, D. R. (1996). *Preparing Protein Samples for Electrophoresis*. Rice University. Tilgjengelig fra: <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/sds-page/denature.html> (lest 10.03.2014).



- CAZy. (2014). *Glycoside Hydrolase family classification*: AFMB - CNRS - Université d'Aix-Marseille. Tilgjengelig fra: <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html> (lest 16.02.2014).
- Cederkvist, F. H., Saua, S. F., Karlsen, V., Sakuda, S., Eijsink, V. G. & Sorlie, M. (2007). Thermodynamic analysis of allosamidin binding to a family 18 chitinase. *Biochemistry*, 46 (43): 12347-54.
- Chodera, J. D. & Mobley, D. L. (2013). Entropy-enthalpy compensation: role and ramifications in biomolecular ligand recognition and design. *Annu Rev Biophys*, 42: 121-42.
- Clontech. (2014). *In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual*: Clontech Laboratories, Inc. A Takara Bio Company. 15 s.
- Connelly, P. R. & Thomson, J. A. (1992). Heat capacity changes and hydrophobic interactions in the binding of FK506 and rapamycin to the FK506 binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (11): 4781-5.
- Connelly, P. R., Thomson, J. A., Fitzgibbon, M. J. & Bruzzese, F. J. (1993). Probing hydration contributions to the thermodynamics of ligand binding by proteins. Enthalpy and heat capacity changes of tacrolimus and rapamycin binding to FK506 binding protein in D2O and H2O. *Biochemistry*, 32 (21): 5583-90.
- Davies, G. & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3 (9): 853-859.
- Emd Millipore. (2014). *Pellet Paint Co-Precipitant* Tilgjengelig fra: [http://www.emdmillipore.com/is-bin/INTERSHOP.enfinity/WFS/Merck-US-Site/en\\_CA/-/USD/ViewPDF-Print.pdf?RenderPageType=ProductDetail&CatalogCategoryID=AJKb.s1O9eQAAAEjHRx9.zLX&ProductUUID=XQub.s1OpKkAAAEiRohRV1.U&PortalCatalogUUID=ywGb.s1LayMAAAEWzdUfVhTl](http://www.emdmillipore.com/is-bin/INTERSHOP.enfinity/WFS/Merck-US-Site/en_CA/-/USD/ViewPDF-Print.pdf?RenderPageType=ProductDetail&CatalogCategoryID=AJKb.s1O9eQAAAEjHRx9.zLX&ProductUUID=XQub.s1OpKkAAAEiRohRV1.U&PortalCatalogUUID=ywGb.s1LayMAAAEWzdUfVhTl).
- Enrique, A., María Susana, R., Viviana, R. & Liliana, A. (2003). Present and Future Role of Chitin and Chitosan in Food. *Macromol Biosci*, 3 (10): 521-530.
- Fiorucci, S. & Zacharias, M. (2010). Prediction of protein-protein interaction sites using electrostatic desolvation profiles. *Biophys J*, 98 (9): 1921-30.
- Frederick, K. K., Marlow, M. S., Valentine, K. G. & Wand, A. J. (2007). Conformational entropy in molecular recognition by proteins. *Nature*, 448 (7151): 325-329.
- Freiburger, L. A., Mittermaier, A. K. & Auclair, K. (2011). Collecting variable-concentration isothermal titration calorimetry datasets in order to determine binding mechanisms. *J Vis Exp* (50).
- Freire, E. (2004). Isothermal titration calorimetry: controlling binding forces in lead optimization. *Drug Discov Today Technol*, 1 (3): 295-299.
- Fukamizo, T. (2000). Chitinolytic enzymes: catalysis, substrate binding, and their application. *Curr Protein Pept Sci*, 1 (1): 105-24.
- Fusetti, F., von Moeller, H., Houston, D., Rozeboom, H. J., Dijkstra, B. W., Boot, R. G., Aerts, J. M. & van Aalten, D. M. (2002). Structure of human chitotriosidase. Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. *J Biol Chem*, 277 (28): 25537-44.
- GE Healthcare. (2014). *Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC)*. Tilgjengelig fra: <http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/nb/GELifeSciences-NO/products/hydrophobic-interaction-chromatography-hic/> (lest 11.03.2014).
- Hamid, R., Khan, M. A., Ahmad, M., Ahmad, M. M., Abdin, M. Z., Musarrat, J. & Javed, S. (2013). Chitinases: An update. *J Pharm Bioallied Sci*, 5 (1): 21-9.

- Haverkamp, R. G., Marshall, A. T. & Williams, M. A. (2007). Entropic and enthalpic contributions to the chair-boat conformational transformation in dextran under single molecule stretching. *J Phys Chem B*, 111 (48): 13653-7.
- Horn, S. J., Sikorski, P., Cederkvist, J. B., Vaaje-Kolstad, G., Sorlie, M., Synstad, B., Vriend, G., Varum, K. M. & Eijsink, V. G. (2006a). Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (48): 18089-94.
- Horn, S. J., Sorbotten, A., Synstad, B., Sikorski, P., Sorlie, M., Varum, K. M. & Eijsink, V. G. (2006b). Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. *FEBS J*, 273 (3): 491-503.
- Horn, S. J., Sørli, M., Vaaje-Kolstad, G., Norberg, A. L., Synstad, B., Vårum, K. M. & Eijsink, V. G. H. (2006c). Comparative studies of chitinases A, B and C from *Serratia marcescens*. *Biocatal Biotransform*, 24 (1-2): 39-53.
- 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): 851-6.
- Jang, M.-K., Kong, B.-G., Jeong, Y.-I., Lee, C. H. & Nah, J.-W. (2004). Physicochemical characterization of  $\alpha$ -chitin,  $\beta$ -chitin, and  $\gamma$ -chitin separated from natural resources. *J Polym Sci Polym Chem*, 42 (14): 3423-3432.
- Jelesarov, I. & Bosshard, H. R. (1999). Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J Mol Recognit*, 12 (1): 3-18.
- Kauzmann, W. (1959). Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv Protein Chem*, 14: 1-63.
- Kennedy, M. F. (1988). *Carbohydrate Chemistry*. New York: Oxford University Press. 678;3-4 s.
- Kennedy, M. F. (1998). *Carbohydrate Chemistry*. New York: Oxford University Press. 678;33-34 s.
- Koshland, D. E. (1953). Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biol Rev*, 28 (4): 416-436.
- Lam, P. Y., Jadhav, P. K., Eyermann, C. J., Hodge, C. N., Ru, Y., Bacheler, L. T., Meek, J. L., Otto, M. J., Rayner, M. M., Wong, Y. N., et al. (1994). Rational design of potent, bioavailable, nonpeptide cyclic ureas as HIV protease inhibitors. *Science*, 263 (5145): 380-4.
- Li, L. L., McCorkle, S. R., Monchy, S., Taghavi, S. & van der Lelie, D. (2009). Bioprospecting metagenomes: glycosyl hydrolases for converting biomass. *Biotechnol Biofuels*, 2: 10.
- Li, Z. & Lazaridis, T. (2005). The effect of water displacement on binding thermodynamics: concanavalin A. *J Phys Chem B*, 109 (1): 662-70.
- Life Technologies. (2014). *One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli*. Tilgjengelig fra: <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/C404006> (lest 04.02.2014).
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M. & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res*, 42 (1): D490-5.
- Macherey-Nagel. (2014). *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up*. Tilgjengelig fra: <http://www.mn-net.com/tabid/1452/default.aspx> (lest 04.02.2014).
- Madan, B. & Sharp, K. (1999). Changes in water structure induced by a hydrophobic solute probed by simulation of the water hydrogen bond angle and radial distribution functions. *Biophys Chem*, 78 (1-2): 33-41.

- McCarter, J. D. & Withers, S. G. (1994). Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr Opin Struct Biol*, 4 (6): 885-92.
- Merck Millipore. (2014). *71397 Rosetta™ 2(DE3) Competent Cells*. Tilgjengelig fra: [http://www.merckmillipore.com/norway/life-science-research/rosetta-2de3-competent-cells/EMD\\_BIO-71397/p\\_uuid?ReferrerProductID=EMD\\_BIO-71402](http://www.merckmillipore.com/norway/life-science-research/rosetta-2de3-competent-cells/EMD_BIO-71397/p_uuid?ReferrerProductID=EMD_BIO-71402) (lest 11.03.2014).
- Murphy, K. P., Privalov, P. L. & Gill, S. J. (1990). Common features of protein unfolding and dissolution of hydrophobic compounds. *Science*, 247 (4942): 559-61.
- Murphy, K. P. (1994). Hydration and convergence temperatures: on the use and interpretation of correlation plots. *Biophys Chem*, 51 (2-3): 311-326.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2008a). *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5th utg. New York, NY 10010: W. H. Freeman. 1158; 247 s.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2008b). *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5th utg. New York, NY 10010: W. H. Freeman. 1158; 491-493 s.
- New England BioLabs. (2013a). *BSA*. Tilgjengelig fra: <https://www.neb.com/products/b9001-bsa> (lest 04.02.2014).
- New England BioLabs. (2013b). *NEBuffer2*. Tilgjengelig fra: <https://www.neb.com/products/b7002-nebuffer-2> (lest 04.02.2014).
- Norberg, A. L., Eijsink, V. G. H. & Sørli, M. (2010a). Dissecting factors that contribute to ligand-binding energetics for family 18 chitinases. *Thermochim Acta*, 511 (1-2): 189-193.
- Norberg, A. L., Karlsen, V., Hoell, I. A., Bakke, I., Eijsink, V. G. & Sorlie, M. (2010b). Determination of substrate binding energies in individual subsites of a family 18 chitinase. *FEBS Lett*, 584 (22): 4581-5.
- Norberg, A. L., Dybvik, A. I., Zakariassen, H., Mormann, M., Peter-Katalinic, J., Eijsink, V. G. & Sorlie, M. (2011). Substrate positioning in chitinase A, a processive chito-biohydrolase from *Serratia marcescens*. *FEBS Lett*, 585 (14): 2339-44.
- Novagen. (2012). *pET System Manual*. Tilgjengelig fra: [http://labs.fhcrc.org/hahn/Methods/biochem\\_meth/pet.pdf](http://labs.fhcrc.org/hahn/Methods/biochem_meth/pet.pdf).
- Okay, S., Tefon, B. E., Ozkan, M. & Ozcengiz, G. (2008). Expression of chitinase A (chiA) gene from a local isolate of *Serratia marcescens* in Coleoptera-specific *Bacillus thuringiensis*. *J Appl Microbiol*, 104 (1): 161-70.
- Pall Corporation. (2013). *Macrosep® Advance Centrifugal Devices*. Tilgjengelig fra: <http://www.pall.com/main/laboratory/product.page?id=53353>.
- Panfoli, I., Calzia, D., Santucci, L., Ravera, S., Bruschi, M. & Candiano, G. (2012). A blue dive: from 'blue fingers' to 'blue silver'. A comparative overview of staining methods for in-gel proteomics. *Expert Rev Proteomics*, 9 (6): 627-34.
- Payne, C. M., Baban, J., Horn, S. J., Backe, P. H., Arvai, A. S., Dalhus, B., Bjoras, M., Eijsink, V. G., Sorlie, M., Beckham, G. T., et al. (2012). Hallmarks of processivity in glycoside hydrolases from crystallographic and computational studies of the *Serratia marcescens* chitinases. *J Biol Chem*, 287 (43): 36322-30.
- Perozzo, R., Folkers, G. & Scapozza, L. (2004). Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. *J Recept Signal Transduct Res*, 24 (1-2): 1-52.
- 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): 1169-80.
- Pierce, M. M., Raman, C. S. & Nall, B. T. (1999). Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods*, 19 (2): 213-21.

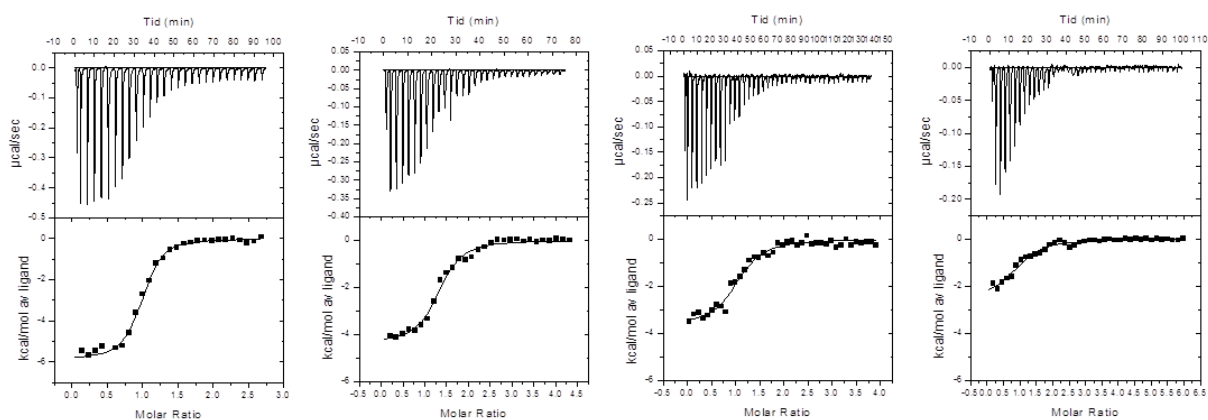
- Prabhu, N. V. & Sharp, K. A. (2005). Heat capacity in proteins. *Annu Rev Phys Chem*, 56: 521-48.
- Rajan, S. S., Yang, X., Collart, F., Yip, V. L., Withers, S. G., Varrot, A., Thompson, J., Davies, G. J. & Anderson, W. F. (2004). Novel catalytic mechanism of glycoside hydrolysis based on the structure of an NAD<sup>+</sup>/Mn<sup>2+</sup>-dependent phospho-alpha-glucosidase from *Bacillus subtilis*. *Structure*, 12 (9): 1619-29.
- Rarey, M. (2009). Molecular Design. Concepts and Applications. By Gisbert Schneider and Karl-Heinz Baringhaus. *Angew Chem Int Edit*, 48 (10): 1718-1719.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci*, 31 (7): 603-632.
- Rouvinen, J., Bergfors, T., Teeri, T., Knowles, J. K. & Jones, T. A. (1990). Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science*, 249 (4967): 380-6.
- Schaupp, D. (2014). *Direksjonaliteten på prosessive enzymer som virker på krystallinske polysakkarider gjenspeiles i de kinetiske signaturer av oligomer degradering*. Ås: Norges miljø- og biovitenskapelige universitet, IKBM.
- Schwelberger, H. (2012). *Bio-Rad Protein Assay (Bradford)*. Tilgjengelig fra: <https://www.i-med.ac.at/hmtd/genmeth/proteinmethods/docs/proteinbradford.pdf> (lest 04.02.2014).
- Silverman, J. A., Balakrishnan, R. & Harbury, P. B. (2001). Reverse engineering the (beta/alpha)<sub>8</sub> barrel fold. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (6): 3092-7.
- 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): 1075-83.
- Syme, N. R., Dennis, C., Phillips, S. E. & Homans, S. W. (2007). Origin of heat capacity changes in a "nonclassical" hydrophobic interaction. *Chembiochem*, 8 (13): 1509-11.
- Synowiecki, J. & Al-Khateeb, N. A. (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 43 (2): 145-71.
- Synstad, B., Gaseidnes, S., Van Aalten, D. M., Vriend, G., Nielsen, J. E. & Eijsink, V. G. (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): 253-62.
- Sørli, M., Zakariassen, H., Norberg, A. L. & Eijsink, V. G. H. (2012). Processivity and substrate-binding in family 18 chitinases. *Biocatal Biotransform*, 30 (3): 353-365.
- Teeri, T. T. (1997). Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends Biotechnol*, 15 (5): 160-167.
- Tharanathan, R. N. & Kittur, F. S. (2003). Chitin--the undisputed biomolecule of great potential. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 43 (1): 61-87.
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2008). *NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual* Tilgjengelig fra: <http://www.nanodrop.com/library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf> (lest 04.02.2014).
- Turnbull, W. B. & Daranas, A. H. (2003). On the value of c: can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? *J Am Chem Soc*, 125 (48): 14859-66.
- Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., van Aalten, D. M., Synstad, B. & Eijsink, V. G. (2005). The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. *J Biol Chem*, 280 (31): 28492-7.
- Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., Sørli, M. & Eijsink, V. G. (2013). The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens*--a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *FEBS J*, 280 (13): 3028-49.

- van Aalten, D. M., Synstad, B., Brurberg, M. B., Hough, E., Riise, B. W., Eijsink, V. G. & Wierenga, R. K. (2000). Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1.9-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (11): 5842-7.
- van Aalten, D. M., Komander, D., Synstad, B., Gaseidnes, S., Peter, M. G. & Eijsink, V. G. (2001). Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (16): 8979-84.
- von Ossowski, I., Stahlberg, J., Koivula, A., Piens, K., Becker, D., Boer, H., Harle, R., Harris, M., Divne, C., Mahdi, S., et al. (2003). Engineering the exo-loop of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase, Cel7A. A comparison with *Phanerochaete chrysosporium* Cel7D. *J Mol Biol*, 333 (4): 817-29.
- Vuong, T. V. & Wilson, D. B. (2010). Glycoside hydrolases: catalytic base/nucleophile diversity. *Biotechnol Bioeng*, 107 (2): 195-205.
- VWR. (2012). *E.Z.N.A.® Plasmid Mini Extraction Kits*. Tilgjengelig fra: [https://us.vwr.com/store/catalog/product.jsp?product\\_id=9569295](https://us.vwr.com/store/catalog/product.jsp?product_id=9569295) (lest 04.02.2014).
- Wan, J., Zhang, X. C. & Stacey, G. (2008). Chitin signaling and plant disease resistance. *Plant Signal Behav*, 3 (10): 831-3.
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F. & Lin, L. N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem*, 179 (1): 131-7.
- Withers, S. & Spencer, W. (2013). *Glycoside Hydrolases*: CAZypedia. Tilgjengelig fra: [http://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside\\_hydrolase#bibkey\\_Koshland1953](http://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_hydrolase#bibkey_Koshland1953) (lest 15.02.2014).
- Wold, H. H. (2013). *Aktiveringsparametere for det kitinolytiske maskineriet til Serratia marcescens*. Ås: Norges miljø- og biovitenskapelige universitet, IKBM.
- Zakariassen, H., Aam, B. B., Horn, S. J., Varum, K. M., Sorlie, M. & Eijsink, V. G. (2009). Aromatic residues in the catalytic center of chitinase A from *Serratia marcescens* affect processivity, enzyme activity, and biomass converting efficiency. *J Biol Chem*, 284 (16): 10610-7.
- 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.

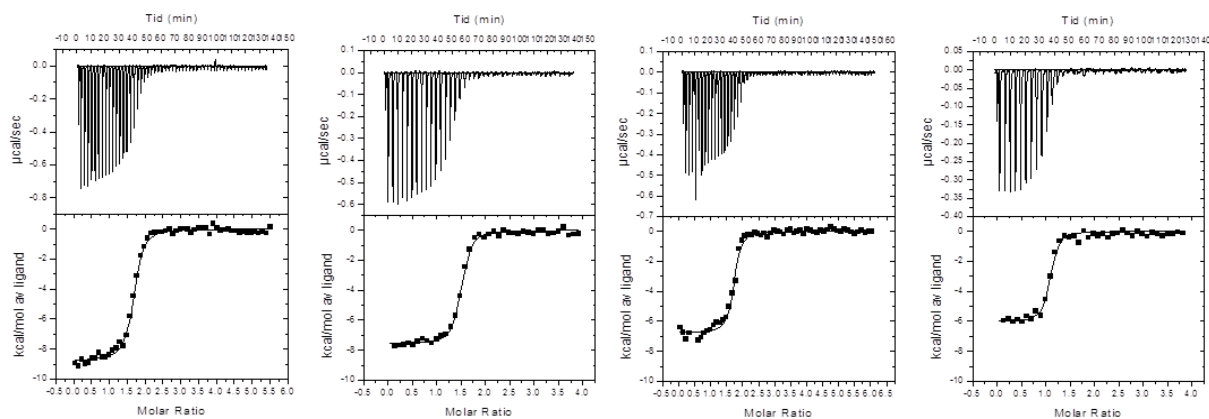
## 8. Vedlegg

### 8.1 ITC-profiler for ChiA og ChiC for bestemmelse av $\Delta C_{p,r}$

I figur 8.1.1 og 8.1.2 kan ITC-profilene for binding av  $(\text{GlcNAc})_6$  ved pH 6,0 og temperatur 37-20 °C til henholdsvis ChiA og ChiC observeres.



Figur 8.1.1. ITC-profiler for binding av  $(\text{GlcNAc})_6$  ved pH 6,0 og temperatur 37-20 °C (Fra venstre: 37, 30, 25, og 20 °C) til ChiA.



Figur 8.1.2. ITC-profiler for binding av  $(\text{GlcNAc})_6$  ved pH 6,0 og temperatur 37-20 °C (Fra venstre: 37, 30, 25, og 20 °C) til ChiC.

## 8. Vedlegg

---

I tabell 8.1.1 og 8.1.2 kan  $K_a$  og  $\Delta H^\circ_r$  for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> ved pH 6,0 og temperatur 20-37 °C til henholdsvis ChiA og ChiC observeres.

Tabell 8.1.1. Temperaturavhengighet for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiA.

Temperatur (°C)	$K_a$ (M <sup>-1</sup> )	$\Delta H^\circ_r$ (kcal/mol)
20	$(3,6 \pm 0,2) \times 10^5$	$-2,1 \pm 0,1$
25	$(9,5 \pm 0,5) \times 10^5$	$-3,4 \pm 0,3$
30	$(1,8 \pm 0,0) \times 10^6$	$-4,6 \pm 0,2$
37	$(3,0 \pm 0,4) \times 10^6$	$-6,2 \pm 0,2$

Tabell 8.1.2. Temperaturavhengighet for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiC.

Temperatur (°C)	$K_a$ (M <sup>-1</sup> )	$\Delta H^\circ_r$ (kcal/mol)
20	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^7$	$-6,0 \pm 0,0$
25	$(1,2 \pm 0,2) \times 10^7$	$-6,6 \pm 0,2$
30	$(9,9 \pm 0,1) \times 10^6$	$-7,8 \pm 0,2$
37	$(6,3 \pm 0,2) \times 10^6$	$-8,6 \pm 0,2$



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
67 23 00 00  
[www.nmbu.no](http://www.nmbu.no)