



Forord

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

Først og fremst vil jeg takke min hovedveileder professor Morten Sørlie for god støtte, kunnskap og veiledning. I tillegg vil jeg takke mine medveiledere Anne Grethe Hamre og Patrica Wildberger for all deres hjelp, verdifull kunnskap og gode råd på laben.

Jeg vil også takke Daniel Schaupp, Matilde Holen og Silje Benedicte Lorentzen for fantastisk hjelp og oppmuntring på labben. Uten dere ville ikke dette ha blitt ett så kjekt og minneverdig år. Til slutt vil jeg takke venner og familie som har støttet meg gjennom hele prosessen.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Ås, 16.06.14

Linn Berge Vormedal

Innhold

Sammendrag	V
Abstract	VI
Forkortelser	VII
1. Introduksjon	1
1.1 Karbohydrater	1
1.1.2 Kitin	1
1.1.2.1 Kitin struktur	1
1.1.3 Kitosan	3
1.1.4 Anvendelser av kitin og kitosan	3
1.2 Kitooligosakkarider	4
1.3 Glykosyl hydrolaser	5
1.3.1 Klassifisering	5
1.3.2 Struktur	5
1.3.3 Mekanisme	6
1.3.3.1 Inverterende mekanisme	7
1.3.3.2 Bevarende mekanisme	8
1.4 Familie 18 kitinaser	8
1.4.1 Kitinaser fra <i>Serratia marcescens</i>	9
1.4.1.1 Struktur av kitinaser fra <i>S. marcescens</i>	10
1.4.1.1.1 ChiA	11
1.4.1.1.2 ChiB	12
1.4.1.1.3 Substrat-assistert katalyse mekanisme	12
1.5 Transglykosylering	14
1.5.1 Transglykosylering i familie 18 kitinaser	14
1.6 Seterettet mutagenese	14
1.7 Mål med oppgaven	16
2. Materialer	17
2.1 Laboratorieutstyr	17
2.2 Kjemikalier	19
2.3 Bakteriestammer og plasmid	20
2.4 Gelelektroforese markører og buffere	20
2.5 Enzymer og buffere i PCR reaksjoner	20
2.6 Kit	21
2.7 Medier	22
2.8 Selvlagde løsninger	22
2.9 Selvlagde buffere	24
2.10 Programvare	24
3. Metoder	25
3.1 Tillaging av ny mutant	25
3.1.1 Primer design	25
3.1.2 Oppdyrking av bakteriestamme	26

3.1.3 Isolering av plasmid.....	26
3.1.4 Måling av DNA konsentrasjon med NanoDrop	27
3.1.5 Seterettet mutagenese	29
3.1.6 Oppkonsentrering av plasmid med Pellet Paint [®] Co- Precipitant Kit.....	30
3.1.7 Transformering av plasmid inn i One Shot [®] TOP10 superkompetente <i>E. coli</i> celler	31
3.1.8 Oppdyrking av transformanter	32
3.1.10 Sekvensering.....	32
3.1.11 Transformering inn i One Shot [®] BL21 Star (DE3) <i>E.coli</i> celler.....	33
3.1.12 Oppdyrking av BL 21 Star (DE3) transformanter	34
3.1.13 Tillaging av frysestock	34
3.2 Produksjon av kitinaser	34
3.2.1 Overekspesjon av kitinaser.....	34
3.2.2 Tillaging av periplasmatisk ekstrakt.....	35
3.2.3 Tillaging av cytoplasmatisk ekstrakt.....	37
3.2.4 Kromatografisk rensing ved bruk av kitinkuler.....	38
3.2.5 Kontroll av proteinets renhet på Sodium Dodecyl Sulfate- Polyakrylamid Gel Elektroforese (SDS-PAGE).....	38
3.2.6 Oppkonsentrering av enzym.....	40
3.2.7 Måling av proteinkonsentrasjon	40
3.2.8 Måling av spesifikk enzymaktivitet.....	41
3.3 Optimalisering av proteinuttrykk	42
3.3.1 Polyhistidine Tag.....	42
3.3.2 Restriksjonskutting i pET-16b med NdeI og XhoI.....	43
3.3.3 Analyse av DNA med agarose-gelelektroforese	44
3.3.4 Oppamplifisering av DNA med kuttsetter for NdeI og XhoI	45
3.3.5 Analyse av DNA etter PCR reaksjon	47
3.3.6 Rensing av kitinase-DNA og pET-16b DNA fra agarosegel	47
3.3.6 Ligering av aktuelt kitinase-DNA med pET-16b	48
3.3.7 Transformering av ligeringsprodukt i TOP10 superkompetente <i>E.coli</i> celler	49
3.3.8 Transformering av kitinaser i <i>E. coli</i> Rosetta 2 TM (DE3)celler	49
3.3.9 Oppdyrking av Rosetta 2 TM (DE3) transformanter.....	50
3.3.10 Overekspesjon av kitinaser i Rosetta 2 TM (DE3) <i>E. coli</i> celler.....	50
3.3.11 Tillaging av periplasmatisk - og cytoplasmatisk ekstrakt	51
3.3.12 Kromatografisk rensing av proteiner med pET-16b vektor med bruk av nikkel – nitrilotrieddiksyre (Ni – NTA) agarose	52
3.4 Transglykosylering	53
3.4.1 Transglykosylerings assay:.....	54
3.4.2 High Performance Liquid Chromotography (HPLC)	56
3.4.3 Databehandling av HPLC resultater med Chromeleon 7	57
3.4.4 Matrix- assisted laser desorption ionization (MALDI) Time of flight (TOF)	57
3.4.5 Databehandling med FlexControl 2.4.....	58
3.5 Hydrolyse av (GlcNAc)₆	58
4. Resultat og diskusjon	60
4.1 Valg av mutanter	60
4.1.1 ChiA F396W	61
4.1.2 ChiA D313N og ChiB D142N	62
4.1.3 ChiB Y214F.....	62
4.1.4.ChiB R294A	62

4.2 Sekvensering av mutanter	62
4.2.1 ChiB D142N.....	63
4.2.2 ChiB D142N/Y214F.....	63
4.2.4 ChiB D142N - Ny mutasjon	63
4.2.5 Chromas.....	64
4.3 Rensing av mutanter på kitinkuler	64
4.4 Rensing av his-taggede kitinaser med Ni-NTA	68
4.5 Proteinkonsentrasjon.....	73
4.5.1 Proteinkonsentrasjon i ChiB wt.....	74
4.5.2 Proteinkonsentrasjon i ChiA wt.....	75
4.5.3. Øvrige mutanter.....	75
4.6 Spesifikk enzymaktivitet.	76
4.6.1 Analyse av spesifikk enzymaktivitet	76
4.7 Tillaging av His₁₀ChiB D142N	77
4.8 Transglykosylerings assay	78
4.8.1 HPLC	78
4.8.2 HPLC analyse.....	80
4.8.2.1 ChiB mutanter.....	80
4.8.2.2 ChiA mutanter.....	80
4.8.3 MALDI-TOF MS	81
4.8.4 MALDI-TOF MS analyse	83
4.9 Hydrolyse av (GlcNAc)₆ med ChiB Y214F	83
4.9.1 Analyse av nedbrytningsreaksjonen (GlcNAc) ₆ med ChiB Y214F.....	84
 5. Videre arbeid	 85
5.1 ChiB R294A og Y214F.....	85
5.2 ChiA D313N/F396W, F396W, W167A og Y390F.....	85
5.3 Nedbrytning av (GlcNAc) ₆ med ChiB Y214F.....	85
5.4 Tillaging av kitooligosakkarider.....	86
 6. Kilder.....	 87
 7. Vedlegg	 92

Sammendrag

Denne masteroppgaven er skrevet som del av et større forskningsprosjekt hvor hovedmålet er å studere og utvikle enzymer som effektivt degraderer kitin og dets vannløselige derivat kitosan, til kitoooligosakkarider med en bestemt lengde og en gitt grad av acetylerede enheter. Dette kan oppnås ved enzymatisk hydrolyse eller ved å bruke transglykosylerende enzymer.

Kitin er et lineært uløselig polysakkarid som består av repeterte N-acetyl-D-glukosaminenheter (GlcNAc eller A) som er rotert 180 grader i forhold til hverandre og er bundet sammen av β 1,4- glykosidbindinger. Kitinaser, glykosyl hydrolaser i familie 18 og 19, katalyserer hydrolyse av kitin og har vist transglykosylerende egenskaper.

I denne oppgaven var hovedmålet å lage og studere ulike seterettede muterte enzymer for å undersøke endringer i transglykosylerings aktiviteten. I tillegg ble det forsøkt å forbedre proteinuttrykket for kitinasene. Mutantene ChiB R294A, ChiB Y214F, ChiA F396W og ChiA D313N/F396W ble benyttet. I tillegg ble mutanten ChiB D142N tillaget ved hjelp av seterettet mutagenese, som et templat for ChiB D142N/R294A og ChiBD142N/Y214F, men grunn av feil i DNA sekvensen til templatet ble ikke disse mutasjonene vellykket.

ChiA og ChiB villtype ble klonet inn i en pET-16b vektor fra en pMay2-10 vektor som gav en ≈ 105 gangers økt proteinmengde for ChiB og en ≈ 3 gangers økt proteinmengde for ChiA i forhold til tidligere protokoller.

Det ble gjennomført et transglykosylerings assay med de ulike mutantene som ble analysert ved hjelp av MALDI-TOF MS og HPLC. Analyse av HPLC resultatene viste at ChiA D313N/F396W har høyest transglykosyleringsaktivitet av tilgjengelige mutanter. ChiA F396W viste også høye verdier, mens ChiB R294A og Y214F viste en noe lavere aktivitet. MALDI-TOF spekterene viste at alt substratet ble nedbrutt til $(\text{GlcNAc})_2$, bortsett fra for ChiA D313N/F396W hvor $(\text{GlcNAc})_3$, $(\text{GlcNAc})_4$ og $(\text{GlcNAc})_6$ ble detektert. For videre forsøk bør tidspunkt for prøveuttak endres. Et nedbrytningsforsøk med $(\text{GlcNAc})_6$ og ChiB Y214F viste at substrat binding i subsetene -2 til +4 og -3 til +3 var i samsvar med ChiB villtype. Dette viser at mutasjonen ikke endrer substratposisjoneringen.

Abstract

This thesis is written as part of a larger research project whose main goal is to study and develop enzymes that efficiently degrade chitin and its water-soluble chitosan derivative, to chitooligosaccharides with a certain length and a given degree of acetylated units.

This can be achieved by enzymatic hydrolysis or transglycosylation.

Chitin is a linear insoluble polysaccharide composed of repeating N-acetyl-D-glucosamine units (GlcNAc or A) which is rotated by 180 degrees relative to each other and are bonded together by β 1,4 - glycosidic bonds. Chitinase, glycosyl hydrolases family 18 and 19 catalyze the hydrolysis of chitin and have shown transglycosylation activity.

In this thesis, the main objective was to create and study various site-directed mutant enzymes, to examine changes in transglycosylation activity. In addition, attempts were made to improve protein expression of chitinase. The mutants ChiB R294A, ChiB Y214F, ChiA F396W and ChiA D313N/F396W were used. In addition, the mutant ChiB D142N was prepared to be used as a template for ChiB D142N/R294A and ChiBD142N/Y214F. Because of errors in the DNA sequence of the template, these two mutations were not successful.

ChiA and ChiB wild type was cloned into a pET-16b vector from a pMay2-10 vector, resulting in a \approx 105-fold increase in protein quantity ChiB and \approx 3-fold increased protein amount of ChiA compared to previous protocols.

It was conducted a transglycosylation assay were the different mutants were analyzed by MALDI-TOF MS and HPLC. Analysis of HPLC results showed that ChiA D313N/F396W had the highest transglycosylation activity of available mutants. ChiA F396W also showed high values, while ChiB R294A and Y214F showed a slightly lower activity. MALDI-TOF spectra showed that all the substrate was hydrolysed to (GlcNAc)₂, except ChiA D313N/F396W where (GlcNAc)₃ (GlcNAc)₄ and (GlcNAc)₆ was detected. For further research time of sampling should be the changed. A hydrolyzing experiment of (GlcNAc)₆ and ChiB Y214F showed that substrate binds to the subsets of -2 to +4 and -3 to 3 similarly as ChiB wild type. This shows that the mutation do not change the substrate positioning.

Forkortelser

Forkortelse	Definisjon
µg	Mikrogram
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
4-MU	4-metylumbelliferyl
4-MU-(GlcNAc) ₂	4-metylumbelliferyl-β-D-N,N`-diacetylchitobiose
Ala (A)	Alanin
Arg (R)	Arginin
Asp (D)	Aspartat
BSA	Bovin Serum Albumine
CBM	Karbohydrat bindende modul
CBP	Kitin bindende protein
ChiA	Kitinase A
ChiB	Kitinase B
ChiC	Kitinase C
DHB	2,5-dihydrobenzoic acid
DMSO	Dimetyl Sulfoxid
dsDNA	Dobbeltrådet DNA
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FA	Molar konsentrasjon av acetylerede enheter (A)/total molar konsentrasjon av monomerenheter
GlcN	D-glukosamin
GlcNAc	N-acetyl-D-glucosamine

HPLC	High Performance Liquid chromatography
Kb	Kilobaser
kDA	KiloDalton
KOS	Kitooligosakkarider
LB	Luria-Bertani
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
mM	Millimolar (millimol/L)
MOPS	3-(N-morfolin) propansvovelsyre
MS	Massespetrometri
MW	Molekylvekt
m/z	Masse/ladning
Ni-NTA	Nikkel – nitrilotrieddiksyre
Phe (F)	Fenylalanin
PMSF	Phenyl-methyl sulfonylfluorid
Rpm	Rotasjoner per minutt
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyakrylamide Gel Elektroforese
TB	Terrific Broth
TIM	Triosefosfat isomerase
TOF	Time-of-flight
Trp (W)	Tryptofan
Tyr (Y)	Tyrosin
WT	Enzymets villtype
Å	Ångstrøm

1. Introduksjon

1.1 Karbohydrater

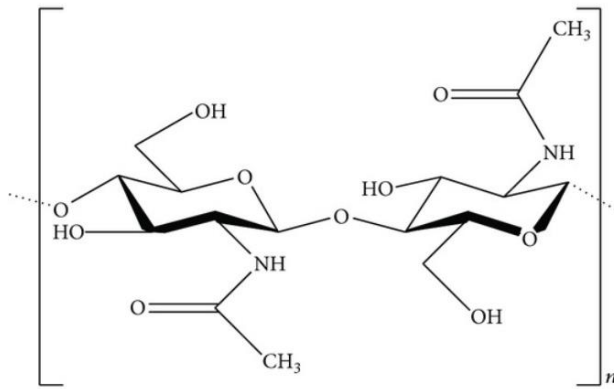
Karbohydrater er en stor og variert gruppe av organiske forbindelser, som inkluderer sukker og stivelse. Karbohydrater utfører en rekke viktige funksjoner i levende systemer, der de blant annet er strukturelle komponenter i ulike cellestrukturer. Karbohydrater er bygget opp av karbon, hydrogen og oksygen atomer med en generell formel $(\text{CH}_2\text{O})_n$ og klassifiseringen av karbohydrater er basert på størrelsen av karbohydratkjeden. Enkle sukkerenheter er kalt monosakkarid, mens komplekse sukkerenheter er kalt polysakkarider. En polysakkaridkjede kan bestå av hundrevis av monosakkarider koblet sammen ved hjelp av dehydrering syntese (Tortora et al. 2009).

1.1.2 Kitin

Kitin er en nøytral, lineær og uløselig polysakkaridkjede som blant annet er et viktig strukturelt element i eksoskjelettet til leddyr, virvelløse dyr og insekter. Innholdet av kitin i eksoskjelettet varierer mellom 2 % og 42 % av den totale kroppsmassen avhengig av arten (Synowiecki & Al-Khateeb 2003). Kitin er også en viktig komponent i sopp og alger der den forsterker celleveggen (Bueter et al. 2013). Etter cellulose er kitin er det vanligste og viktigste polysakkaridet som finnes i naturen. Årlig produksjon i biosfæren anslås å være på mellom 10^{10} og 10^{11} tonn (Gooday 1990). Kitin og dets derivater er bionedbrytbart, har en lav toksisitet og har derfor et stort bruksområde. Det er blant annet mye brukt i landbruk, næringsmiddelindustrien, kjemi og medisin blant annet på grunn av deres gelédannende -, antimikrobielle - og sopphekkende egenskaper (Dutta et al. 2004).

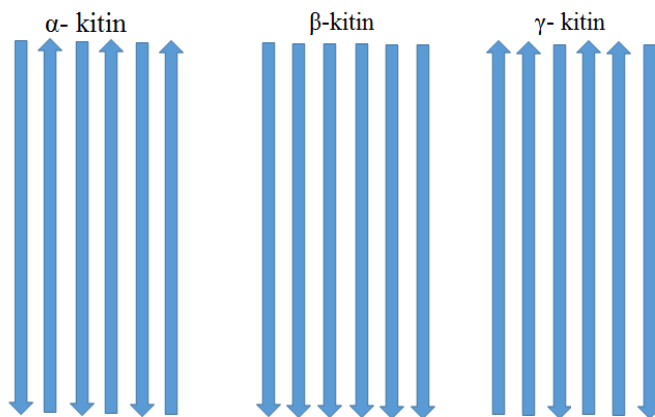
1.1.2.1 Kitin struktur

Biopolymeren består av lange lineære N-acetyl-D-glukosaminenheter (GlcNAc eller A) som er rotert 180 grader i forhold til hverandre og er bundet sammen av β 1,4- glykosidbindinger (se figur 1.1). Lengden av polysakkaridkjedene varierer fra art til art der krabber kan ha opp til 8000 GlcNAc enheter, mens noen typer gjær kun har 100 GlcNAc enheter (Synowiecki & Al-Khateeb 2003).



Figur 1.1: Kitin struktur med to GlcNAc enheter rotert 180 grader i forhold til hverandre bundet med en glykosidbinding (Madhuprakash et al. 2013).

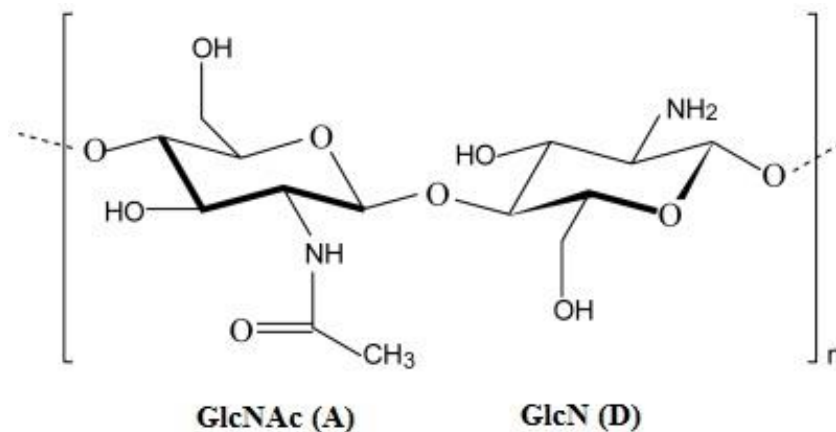
Kitin forekommer i tre ulike krystallinske former bundet sammen med hydrogenbindinger. α -kitin har antiparallele kitinkjeder, β -kitin har parallelle kitinkjeder og γ -kitin har et mønster med to parallelle og en antiparallell kitinkjede som vist i figur 1.2 (Synowiecki & Al-Khateeb 2003). Den parallelle α -kitin kjeden har den sterkeste og mest solide pakkingen på grunn av de sterke intra- og intermolekulære hydrogenbindingene (Pillai et al. 2009). Det finnes mest α -kitin i naturen hvor det blant annet forekommer i de fleste marine dyreartene, soppartene og insektene. Det mer sjeldne β -kitin finnes blant annet i noen blekksprut og alge arter. Det er færre hydrogenbindinger mellom de parallelle kjedene og β -kitin er dermed lettere å bryte ned enn α -kitin. γ -kitin er en omdiskutert struktur der det kan vise seg at det kun er en variant av α -kitin. (Rinaudo 2006).



Figur 1.2: De tre krystallinske formene av kitin; α -kitin med antiparallele kjeder, β -kitin med parallelle kjeder og γ -kitin med både antiparallele og parallelle kjeder.

1.1.3 Kitosan

Kitosan er en heteropolymer bestående av 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose; GlcNAc (A) og 2-amino-2-deoxy-D-glucose; GlcN (D) enheter (se figur 1.3). Kitosan er mindre vanlig i naturen enn kitin, men det finnes i visse sopparter som *Cryptococcus* (Bueter et al. 2013). Kommersielt fremstilles det ved partiell de- N- acetylering av kitin. Deacetyleringen fører til en svekkelse av de intra – og intermolekylære hydrogenbindingene til kitin uten at hydroksylbindingene blir berørt. Kitosan et vannløselig polysakkarid dersom andelen av acetylte enheter (F_A) er under 50 % (Pillai et al. 2009; Sikorski et al. 2005).



Figur 1.3: Struktur av kitosan med en (A) enhet og en (D) enhet (Hamman 2010).

1.1.4 Anvendelser av kitin og kitosan

Den dårlige løseligheten av kitin er en begrensende faktor i for utnyttelsen av dets egenskaper. Men til tross for begrensningene er det muligheter for å anvende kitin og modifisert kitin i blant annet som råmaterial for kunstfiber. Fiberet kan brukes som bandasje der det er sårhelende, eller som operasjonstråd der stingene kan motstå galle, urin og bukspyttkjertel væske (Rinaudo 2006). Fibrene kan også bli brukt til rensing av avløpsvann der det danner chelatkomplekser med metalioner. Kitin kan også brukes som bindingsmiddel i papirfremstillingsprosesser og i næringsmiddelindustrien kan det immobilisere enzymer eksempelvis ved foredling av melk og ved avklaring av fruktjuice. Forskning har også vist at kitin kan aktivere makrofager *in vivo* som kan undertrykke veksten av tumorceller i mus. Kitin har en høy affinitet for proteiner og kan brukes i affinitetskromatografi for separasjon og isolasjon av spesifikke proteiner som lektiner. (Dutta et al. 2004). Kitosan blir brukt i en lang rekke ulike produkter og applikasjoner på grunn av dets kjemiske og fysiske egenskaper. Disse egenskaper endrer seg noe i forhold til grad acetylering fordi dette har en innvirkning på løseligheten (Sikorski et al. 2006).

I landbruket blir kitosan brukt for å stimulere plantevekst, for å bekjempe sopp og for å beskytte planter mot frost. I næringsmiddelindustrien kan kitosan brukes som konserveringsmiddel, fortykningsmiddel og som antibakteriell beskyttelse (Synowiecki & Al-Khateeb 2003). Kitosan er mye brukt innen kosmetikk hvor det blant annet opprettholder hudens fuktighet og reduserer statisk elektrisitet i håret. Kitosan er i seg selv hemostatisk, men noen derivater har også antikoagulerende egenskaper. I odontologien brukes kitosan i tannlegefyllinger på grunn av sine soppdrepende egenskaper (Rinaudo 2006).

1.2 Kitooligosakkarider

Kitooligosakkarider (KOS) er homo- eller heterooligomerer av GlcN og/eller GlcNAc, der kitin eller kitosan er utgangs-materialet. Omdannelsen kan skje kjemisk ved syrehydrolyse eller enzymatisk ved hjelp av glykosylhydrolaser (se avsnitt 1.3) (Aam et al. 2010). KOS har et stort potensiale for flere bruksområder spesielt innen mat, medisin og landbruk (Rinaudo 2006). Det har potensielt mange viktige biologiske aktiviteter som inkluderer antitumor egenskaper, soppdrepende og antibakterielle aktiviteter og immunstyrkende effekter. Det er også indikasjoner på at KOS kan anvendes i genterapi, brukes i medisiner mot astma og malaria og øke beinstyrken i osteoporose. (Aam et al. 2010; Rinaudo 2006; Sikorski et al. 2005). Det bør bemerkes at noen av de biologiske effektene som er rapportert for kitosan faktisk kan skyldes KOS som naturlig forekommer når kitosan brytes ned av hydrolytiske enzymer. Egenskaper til KOS endrer seg noe i forhold til grad acetylering, lengden av kitinkjeden og rekkefølgen av monomerenhetene (A og D). (Aam et al. 2010). Å finne den optimale enzym/substrat kombinasjonen og forutsi utfallet byr på store utfordringer. Det er derfor viktig å utvikle metoder for effektiv enzymatisk omdanning av kitin og kitosan til KOS blandinger med nye eller forbedrede bioaktiviteter. Dette kan oppnås ved hydrolyse av glykosid bindinger eller ved å bruke transglykosylerende enzymer som kan kople mindre KOS bygge blokker til hverandre eller til andre funksjonelle grupper ved hjelp av nye glykosidbindinger (Zakariassen 2011)

1.3 Glykosyl hydrolaser

Enzymer som katalyserer hydrolyse av glykosidbindinger mellom karbohydrater eller mellom et karbohydrat og et annet molekyl kalles glykosyl hydrolaser eller glykosidaser. Karbohydrater har en stor stereokjemisk variasjon og det er over 10^{12} mulige isomerer etter reduksjon av et hexasakkarid. Glykosyl hydrolaser har derfor en stor variasjon i strukturell sammensetning og størrelse (Davies & Henrissat 1995).

1.3.1 Klassifisering

CAZy (Carbohydrate-Active enzymes) er en database med karbohydrat-aktive enzymer som ble introdusert av Bernard Henrissat i 1991 (Henrissat 1991). Databasen inneholder et klassifiseringssystem av de katalytiske domenene på ulike enzymer, deriblant glykosyl hydrolaser. Likheter i aminosyresekvensen deler glykosyl hydrolasene inn i evolusjonære beslektede familier. Bakgrunnen til denne klassifiseringen er at det kan foreligge en sammenheng mellom sekvens, struktur og mekanisme (Davies & Henrissat 1995; Henrissat & Davies 2000).

1.3.2 Struktur

Glykosidhydrolasene består av et katalytisk domene hvor det substratbindende aktive setet befinner seg. I tillegg er det ofte ett eller flere ikke-katalytiske domener. Selv om noen av de ikke-katalytiske domenene er substratbindende har flestparten ukjente funksjoner (Davies & Henrissat 1995). I det katalytiske domenet er subsetene nummerert fra -n til +n, der -n er på den ikke-reduserende enden og +n er på den reduserende enden av substratet. Hydrolysering av glykosidbindingene vil alltid skje mellom -1 og +1, mens de resterende setene vil stabilisere substratbindingen (Davies et al. 1997). Det aktive setet på glykosyl hydrolasene har hovedsakelig tre ulike topologier som er lomme/krater-, kløft- og tunnelstruktur (Davies & Henrissat 1995).

A) Lomme/ krater topologi

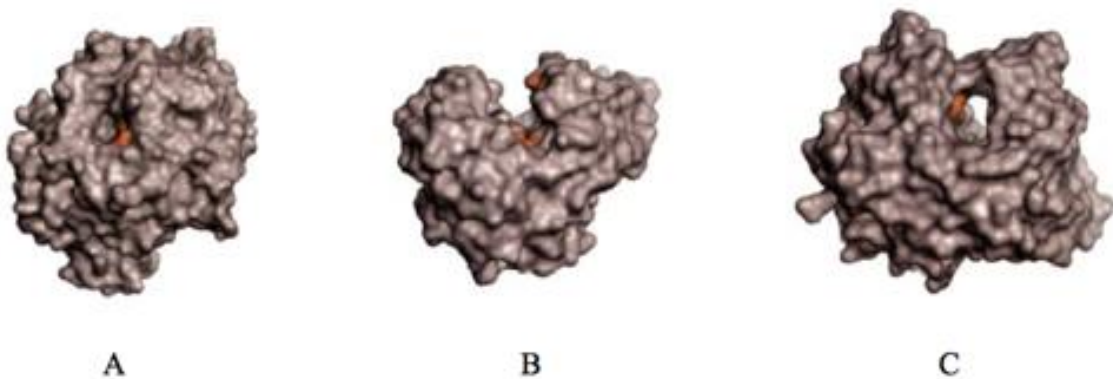
Lomme/krater topologien (se figur 1.4) er ideell for substrater som har flere tilgjengelige reduserende og ikke-reduserende ender på overflaten. Eksempler på enzymer med denne topologien er β -galactosidase, glucoamylase β -amylase og β -glucosidase. (Davies & Henrissat 1995). Lomme topologien gjør at det gjør at bindingen til substratet forekommer i kjedeendene og enzymene viser ekso-aktivitet (Sikorski et al. 2006).

B) Kløft topologi

Kløft topologien (se figur 1.4) har en åpen struktur i det aktive setet som tillater tilfeldig binding av flere sukkerenheter. Strukturen er ofte funnet i enzymer med endo-aktivitet som kitinaser, endocellulaser, α – amylaser og lysozymer (Davies & Henrissat 1995).

C) Tunnel topologi

Tunnel topologien (se figur 1.4) har et tunnelformet aktivt sete som polysakkaridkjeden tres igjennom. Enzymet vil være bundet til substratet under hydrolyse, som kjennetegner prosessive enzymer og/eller enzymer med ekso-aktivitet. Dette omfatter blant annet cellulaser og kitinaser. Topologien oppstår fra kløft topologien når proteinet utvikler seg til lange sløyfer, som dekker en del av kløften (Davies & Henrissat 1995; Sikorski et al. 2006).

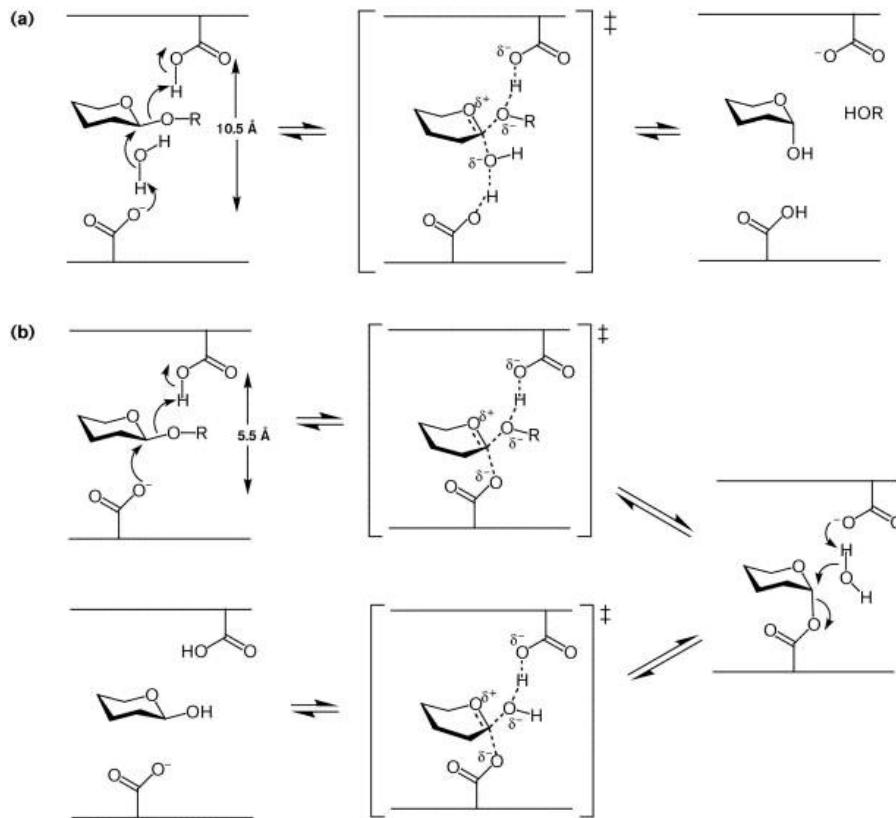


Figur 1.4: Topologien til det aktive setet på glykosylhydrolaser. A) Lomme/krater, B) Kløft, C) Tunnel (Davies & Henrissat 1995).

1.3.3 Mekanisme

Glykosylhydrolaser kan klassifiseres etter hvilken mekanisme som gjennomføres ved hydrolysering. De to ulike mekanismene er en inverterende mekanisme og en bevarende mekanisme basert på det stereokjemiske resultatet av reaksjonen (Davies & Henrissat 1995). De katalytiske reaksjonene forekommer ved hjelp av en nukleofil substitusjon på det anomere karbonet, som fører til en inversjon eller retensjon av konfigurasjonen (Sinnott 1990). I begge tilfellene skjer hydrolysen ved en generell syrekatalyse og krever en protondonor og en base (inverterende mekanisme) eller nukleofil (bevarende mekanisme) (se figur 1.5).

Protondonoren har samme posisjon i begge mekanismene og den kan danne hydrogenbinding med glykosidoksygenet (Davies & Henrissat 1995).



Current Opinion in Chemical Biology

Figur 1.5 Generell mekanisme for glykosylhydrolaser a) inverterende mekanisme og b) bevarende mekanisme (Rye & Withers 2000).

1.3.3.1 Inverterende mekanisme

Den inverterte mekanismen for glykosid hydrolysen blir også referert som «direct replacement mechanism», fordi den utgående gruppens avgang inntreffer samtidig med et nukleofilt angrep av et vannmolekyl (Sinnott 1990) (se figur 1.5 a). To karboksylsyrer er plassert med en relativ lang avstand på $\sim 10,5$ Å i det aktive setet, der den ene virker som en katalytisk base og den andre som en katalytisk syre (Rye & Withers 2000). Den katalytiske syren protonerer oksygenet i glykosidbindingen samtidig som vannet blir aktivert av at den katalytiske basen og utfører et nukleofilt angrep på det anomere karbonet. Dette gir en nøytral utgående gruppe. Reaksjonen krever mer sterisk frihet enn den bevarende mekanismen på grunn av tilstedeværelsen av et vannmolekyl mellom basen og sukkeret (Davies & Henrissat 1995).

1.3.3.2 Bevarende mekanisme

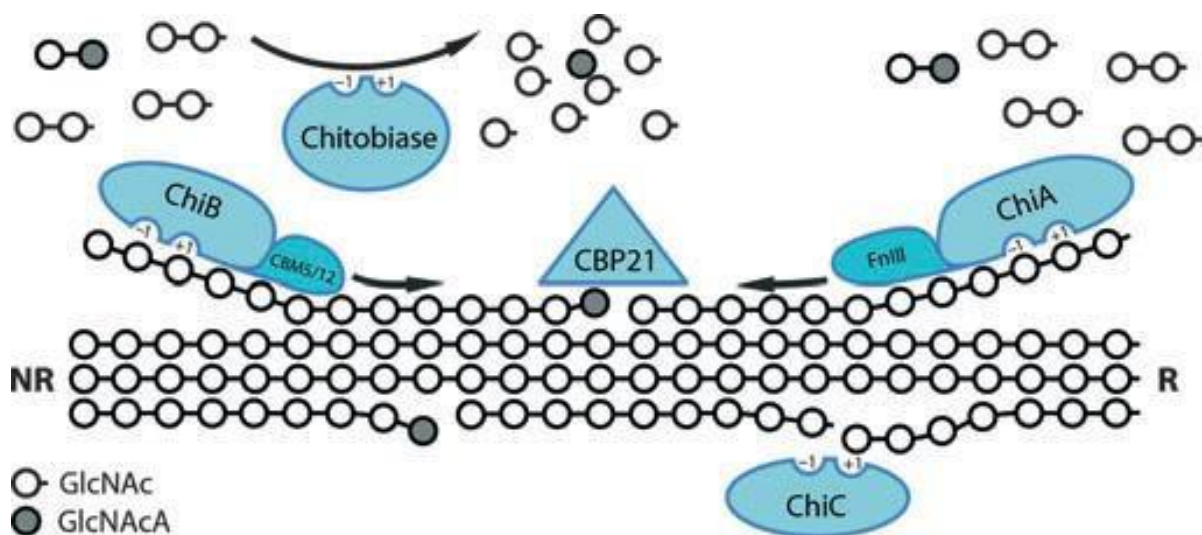
Den bevarende omfatter to trinn og danner et kovalent mellomprodukt, og er ofte referert til en dobbelt utbyttings mekanisme (se figur 1.5 b). De to katalytiske karboksylsyrene er plassert med en relativt kort avstand i forhold til hverandre på $\sim 5,5 \text{ \AA}$ (Rye & Withers 2000). I det første trinnet fungerer den ene karboksylsyren som en katalytisk syre ved at glykosid oksygenet blir protonert, mens den andre karboksylsyren fungerer som en katalytisk base og utfører et nukleofilt angrep på det anomere karbonet. Dette danner et kovalent substrat-enzym intermediat. I det andre trinnet blir det innkommende vannmolekylet deprotonert av den tidligere katalytiske syren som nå fungerer som en katalytisk base og hydroksylionet og angriper det anomere karbonatomet. Karboksylsyren med kovalent binding til substratet spaltes av og den stereokjemiske konfigurasjonen opprettholdes med en OH-gruppe på det anomere karbonet. (Davies & Henrissat 1995; Rye & Withers 2000). Familie 18 kitinaser bruke en spesiell variant av den bevarende mekanismen, som beskrevet i avsnitt 1.4.1.2.

1.4 Familie 18 kitinaser

Det finnes over 130 ulike familier blant glykosyl hydrolasene (AFMB 2014). Kitinaser katalyserer hydrolyse av kitin til kitoooligosakkarider, og tilhører familie 18 og 19 av glykosyl hydrolasene. Begge familiene inneholder eksokitinaser som degraderer kitin fra den reduserende - eller ikke reduserende enden og endokitinaser som katalyserer hydrolyse av tilfeldige glykosidbindinger langs kitin kjeden (Brurberg et al. 2000). De to familiene er ikke homologe, de har ulike katalytiske mekanismer og forskjellige 3D strukturer (Fukamizo 2000). Familie 18 kitinaser inneholder enzymer fra en rekke prokaryote og eukaryote organismer, mens familie 19 kitinaser bare har blitt funnet i høyerestående planter og i den gram-positive bakterien *bacterium Streptomyces*. Organismer som inneholder kitinaser degraderer kitin for å opprettholde en normal livssyklus, der kitoooligosakkarider inngår i funksjoner som morfogenese og celledeling. Mange bakterier og sopp kan også konvertere kitin til forbindelser som brukes som energikilder. Planter produserer kitinaser som en del av forsvarsmekanismen blant annet mot patogene soppvekster. Enzymene er av stor bioteknologisk interesse fordi omgjøringen av kitin til kitininneholdige komponenter har en høy nytteverdi (Brurberg et al. 2000). For uten om hydrolyse av kitin har flere enzymer i familie 18 har vist transglykosylerende aktivitet og har derfor blitt studert i denne oppgaven (Zakariassen et al. 2011).

1.4.1 Kitinaser fra *Serratia marcescens*

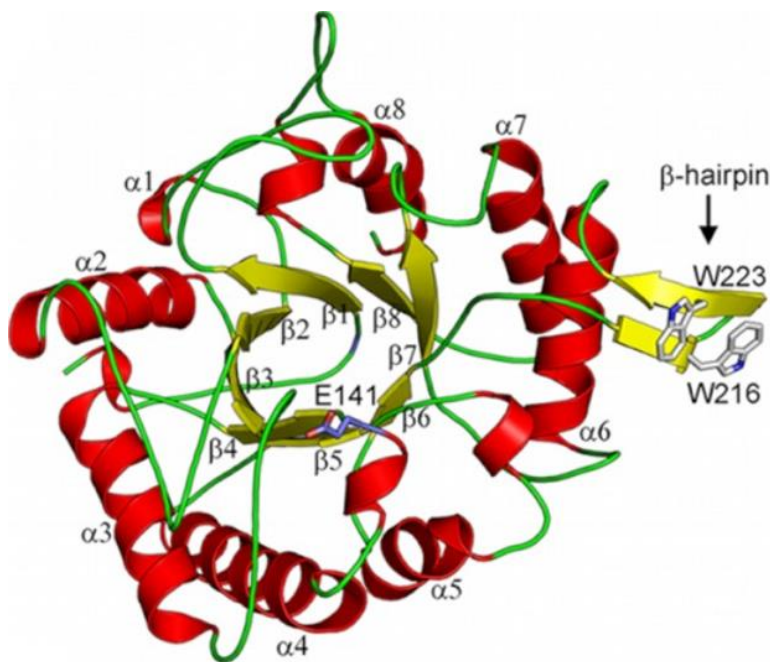
I 1969 konkluderte Jaime Monreal og Elwyn T. Reese i en banebrytende studie med, at *Serratia marcescens* i Enterobacteriaceae var den mest effektive for nedbryting av kitin blant 100 testede mikroorganismer (Monreal & Reese 1969). Den gram negative jordbakterien *S. marcescens* skiller ut en rekke ekstracellulære enzymer, deriblant kitinaser. Studier har konkludert med at *S. marcescens* produserer minst tre familie 18 kitinaser (ChiA, ChiB og ChiC), en familie 20 N- acetylhexosaminidase (kitobiase) og et overflateaktivt lytisk polysakkarid monooxygenase (CBP21) (Vaaje-Kolstad et al. 2013). ChiA og ChiB har vist ekso-aktivitet som hydrolyserer kitin fra henholdsvis den reduserende - og den ikke-reduserende enden. ChiC har vist endo-aktivitet som binder og degraderer tilfeldig på interne områder på substratet. CBP21 er klassifisert som auxiliary activity familie 10 og introduserer brudd i kitinkjeden ved oksidativ spaltning. Kitobiasen omdanner oligomerer produkter fra de andre enzymene til monomerer. Disse fem utgjør deler eller det hele kitinolytiske maskineriet i bakterien (se figur 1.6) (Brurberg et al. 2000; Vaaje-Kolstad et al. 2013). Denne oppgaven vil ha et fokus på ChiA og ChiB fra *S. marcescens*.



Figur 1.6: Skissering av det kitinolytiske maskineriet i *S. marcescens* (Vaaje-Kolstad et al. 2013).

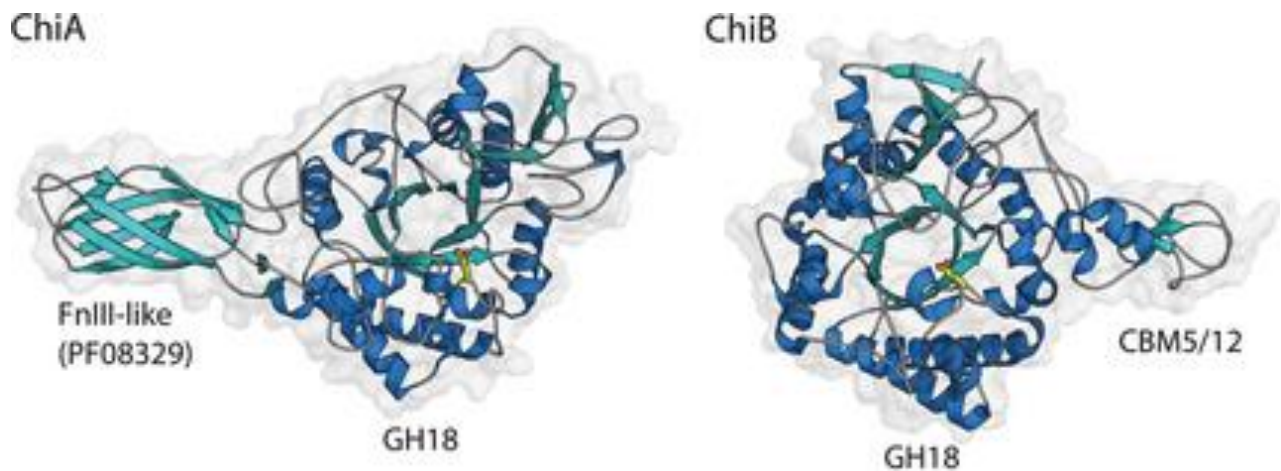
1.4.1.1 Struktur av kitinaser fra *S. marcescens*

Det katalytiske domenet til familie 18 kitinasene ChiA, ChiB og ChiC består av en $(\beta\alpha)_8$ -tønne struktur (TIM-barrel) som består av åtte α -helikser og åtte parallelle β -tråder som vikles rundt i en lukket struktur med en sylindrisk i topologi (se figur 1.7) (Lesk M. Arthur 2010; Vaaje-Kolstad et al. 2013). De viktigste katalytiske residuene er plassert i β -tråd nummer fire som inneholder det karakteristiske DXXDXDXE sekvens motivet som er involvert i den substratassisterte mekanismen. Mellom den syvende og den åttende tråden i TIM-tønne strukturen har ChiA og ChiB et $\alpha + \beta$ -domene som ikke er tilstede i ChiC (Payne et al. 2012; Perrakis et al. 1994; Suzuki et al. 2002; Vaaje-Kolstad et al. 2013; van Aalten et al. 2000). Dette domenet danner en dyp substratbindende kløft hos ChiA og ChiB, mens ChiC har en mer åpen substratbindende kløft. Dette kan være en årsak til at det er foreslått at ChiA og ChiB har ekso-aktivitet og ChiC har endo-aktivitet (Horn et al. 2006a).



Figur 1.7: Oversikt over $(\beta\alpha)_8$ TIM-tønne strukturen for ChiC2. Den katalytiske syren Glu (E) i DXXDXDXE motivet plassert mellom β -strengen 4 og α -helix 4 (vist som «stick» konfirmasjon) (Payne et al. 2012).

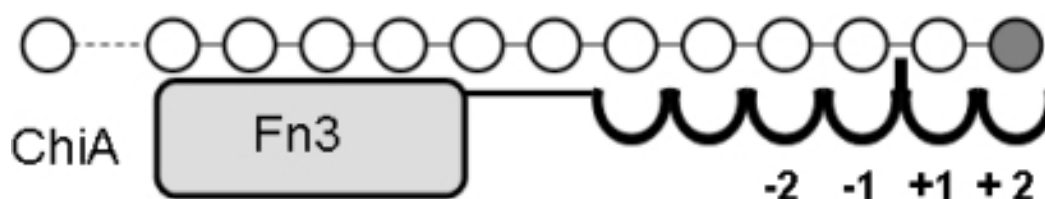
ChiA er N-terminal bundet med modulet fibronektin III (FnIII) og ChiB er bundet til et karbohydrat bindende modul CBM5 eller CBM12 i C-terminal (se figur 1.8). Rollene til disse ekstra modulene er ikke fullstendig avklart, men ulike studier har konkludert med at modulene inneholder aromatiske residuer som bidrar til substrat binding og økt substrat hydrolyse (Vaaje-Kolstad et al. 2013).



Figur 1.8: Krystallstrukturer av ChiA og ChiB med modulene FnIII og CBM5/12. α -helikser er farget mørkeblå og β -trådene har en lysere blåtone. Det katalytiske syren Glu (E) som er en del av det karakteristiske DXXDXDXE sekvensmotivet er vist i gult (Vaaje-Kolstad et al. 2013).

1.4.1.1.1 ChiA

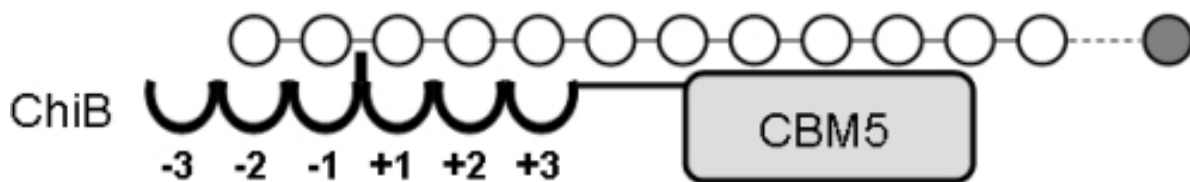
ChiA enzymet fra *S.marcescens* inneholder 540 residuer og har en molekylvekt på 58,5 kDa. Topologien til det aktive setet har en dyp kløft med høye vegger, som er forlenget med en aromatisk overflate på den antatte kitin-bindende modulet FnIII (se figur 1.9). Kløften er åpen på begge sider og kan minne om en tunnel struktur uten tak. I det aktive sete befinner det seg seks substratbindende subseter fra -4 til +2, der + siden korresponderer til den reduserende enden på suktermolekylet (Brurberg et al. 2000). Den åpne strukturen i det aktive setet til ChiA forbindes med enzymer som har en endo-aktivitet. ChiA er ekso-prosessiv fra den reduserende ende mot kitin, mens ved hydrolyse av kitosan med en høy F_A er vist seg å være endo-prosessiv (Hult et al. 2005; Sikorski et al. 2006; Zakariassen et al. 2009). Ved hydrolyse av kitin har ChiA et bredt pH område. Enzymet har en aktivitet høyere enn 80 % i pH området mellom 4 og 11 og aktiviteten til ChiA er høyest ved cirka 60 °C (Suzuki et al. 2002).



Figur 1.9: ChiA fra *S. marcescens* med fibronektin III, bundet til et substrat i subsetene -4 til +2. Hydrolyse kuttet vil forekomme mellom subsete -1 og +1. Den reduserende enden av substratet er markert grå (Horn et al. 2006a).

1.4.1.1.2 ChiB

Det prosessive enzymet ChiB fra *S.marcescens* inneholder 498 residuer og har en beregnet molekylmasse er 55,4 kDa. Det aktive setet i ChiB har en dyp relativt lukket kløft som gir kitinasen en karakteristisk tunnel topologi (Brurberg et al. 2000; van Aalten et al. 2001; van Aalten et al. 2000). Denne strukturen kjennetegner ekso aktive enzymer. Ved hydrolyse av kitosan har ChiB derimot vist seg å være endo-prosessiv (Sikorski et al. 2006). I det aktive setet har ChiB fem veldefinerte subseter som går fra -3 til +2 (Brurberg et al. 2000), men binding til substart er mulig i flere positive subseter (se figur 1.10). Framfor subsetet -3, mellom residuene 14 og 26, befinner det seg en «porch loop» som blokkerer for binding av substrater i subsetet -4. Dette medfører at ChiB hydrolyserer kitin fra den ikke-reduserende enden (van Aalten et al. 2000). I likhet med ChiA har ChiB et bredt pH område ved hydrolyse av kitin. Enzymet har en høy aktivitet i pH området mellom 4 og 11, der aktiviteten er høyest i det lavere pH området. Aktiviteten til ChiB er også høyest ved cirka 60 °C (Suzuki et al. 2002).



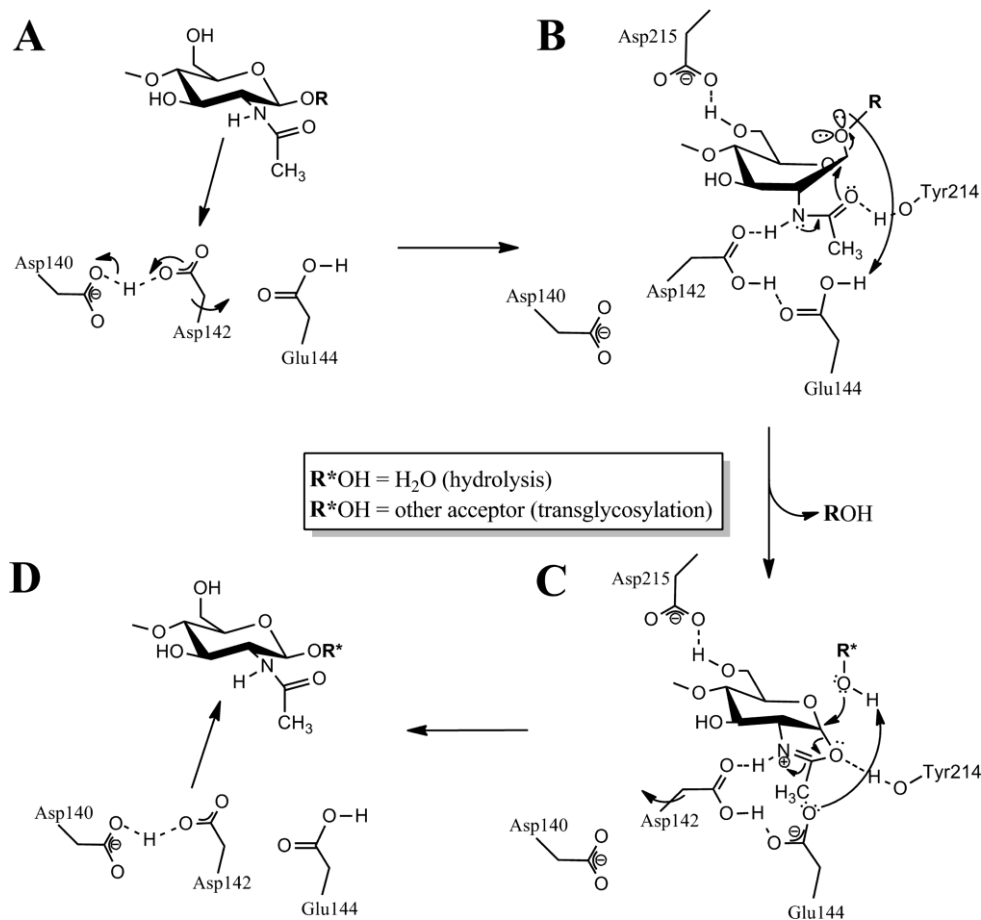
Figur 1.10: ChiB fra *S. marcescens* med CBM5 bundet til et substrat i subsetene -2 til +3. Hydrolyse kuttet vil forkomme mellom subsete -1 og +1. Den reduserende enden av substratet er markert grå (Horn et al. 2006a)

1.4.1.1.3 Substrat-assistert katalyse mekanisme

Noe av de mest detaljerte arbeidet med å oppklare den katalytiske mekanismen av familie 18 kitinaser ble gjort på ChiB fra *S. marcescens*. Hydrolyseringen av kitin skjer mellom subsetene -1 og +1 og gjennomføres ved hjelp av substrat-assistert mekanisme som beholder konfigurasjonen til det anomere karbonet. Som tidligere nevnt inneholder familie 18 kitinaser det høyt konserverte DXXDXDXE sekvens motiv som er essensielt for katalysen. I ChiB er de viktigste residuene i motivet Asp-140, Asp-142 og Glu-144 (DXDXE) (Vaaje-Kolstad et al. 2013; van Aalten et al. 2001). Den tilsvarende katalytiske syren i ChiA er Glu-315 (Brurberg et al. 2000).

1. Introduksjon

Den substratassisterte mekanismen innledes ved substratbinding ved at sukkerringen i -1 subsetet endres fra stol stolkonformasjon til båtkonformasjon. Dette fører til en rotasjon av Asp-142 mot Glu-144 (se figur 1.11 A og B). En hydrogenbinding blir dannet mellom disse residuene samtidig som hydrogenbindingen mellom Asp-142 og Asp-140 brytes. Glu 144 fungerer som en generell syre og protonerer oksygenet i glykosidbindingen ved syrekatalyse. Samtidig skjer et nukleofilt angrep av acetamido-gruppen (C_2H_4NO) i -1 sukker som fører til dannelsen av et oxazoliniumion-intermediat som blir stabilisert av Tyr-214 og Asp142 ved dannelser av hydrogenbindinger (se figur 1.11 B og C). Til slutt fungerer Glu 144 som en generell base og aktiverer et akseptormolekyl som angriper oxazolinium ionet. Dette fører til en rotasjon i Asp-142 som går tilbake til utgangsposisjonen sammen med Asp-140 og det anomere karbonet beholder konformasjonen (se figur 1.11 D). Dersom nukleofilen er vann så vil hydrolyse inntreffe og dersom nukleofilen er et sukker vil det skje en transglykosylerings reaksjon (van Aalten et al. 2001; Zakariassen et al. 2011).



Figur 1.11 Foreslått substrat-assistert mekanisme for ChiB. A) Asp-142 og Asp 140 deler et proton. Asp-142 ligger for langt unna for å danne binding med Glu-144. B) Binding til substratet fører til en konformasjonsendring fra stol til båt. Asp-142 roteres mot Glu-144 og danner en hydrogenbinding. C) Hydrolyse av oxazolinium ion fører til protonering av Glu-144 og rotasjon av Asp142. D) Asp-142 returnerer til sin opprinnelige posisjon og det anomere karbonet beholder konformasjonen . Hydrolysereaksjonen skjer dersom nukleofilen er vann ellers vil en transglykosyleringsreaksjon inntreffe (Zakariassen et al. 2011).

1.5 Transglykosylering

Transglykosylering er en overføring av et sukkerresidu fra en donor til en akseptor med dannelsen av en ny glykosidbinding. Transglykosylering er en kinetisk kontrollert reaksjon og en effektiv transglykosylering krever et enzym med et aktivt sete som ikke favoriserer den korrekte posisjonering av hydrolytisk vannmolekyl og/eller favoriserer binding av innkommende karbohydratmolekyler ved hjelp av sterke interaksjoner i aglykon delområdene (Madhuprakash et al. 2012; Zakariassen 2011).

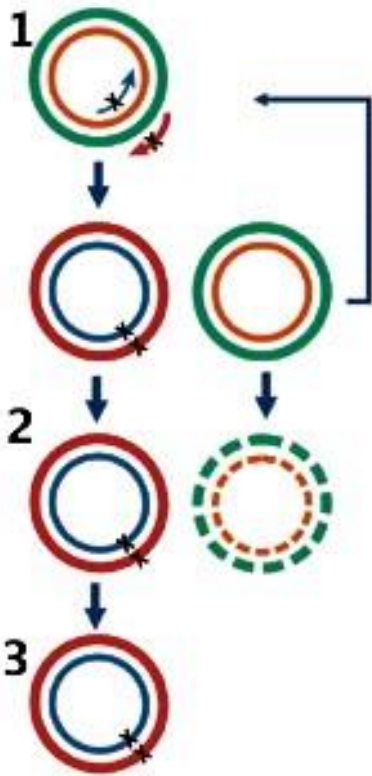
1.5.1 Transglykosylering i familie 18 kitinaser

Flere enzymer i familie 18 glykosid hydrolaser er i stand til å katalysere transglykosylering reaksjoner for å danne nye glykosidbindinger mellom donor -og akseptor sakkarider. Disse er av spesiell interesse på grunn av de potensielle bruksområdene til kitooligosakkaridene som nevnt i avsnitt 1.2. Villtype ChiB ikke gir påvisbare nivåer av transglykosylering produkter, men villtype ChiA viser en mindre aktivitet. Det er mulig å forbedre transglykosylering effekten ved å introdusere spesifikke mutasjoner i ChiA og ChiB som ikke favoriserer korrekt posisjonering av hydrolytisk vannmolekyl og/eller favoriserer binding med innkommende karbohydrat molekyler. Nyere forskning har også vist at akseptor affinitet er viktig, på grunnlag av at transglykosylerings effekten ble redusert da aromatiske residuer i akseptor subsetene ble fjernet. (Vaaje-Kolstad et al. 2013; Zakariassen 2011; Zakariassen et al. 2011). Strukturelle og funksjonelle analyser har vist at små variasjoner i det katalytiske maskineriet kan ha viktige roller for reaksjonen. Dette medfører at det ikke alltid enkelt å forutsi hvordan en mutasjon vil påvirke transglykosylering egenskapene. (Zakariassen et al. 2011).

1.6 Seterettet mutagenese

Mutasjoner er en av årsakene til det store mangfoldet av liv i naturen. En mutasjon er en endring av basesekvensen i DNA. Dersom endringen forekommer i et gen vil dette kunne forårsake endringer i produktet som er kodet av det muterte genet. Utfallet av endringen kan være fordelaktig, nøytral eller ufordelaktig. Mutasjoner kan forekomme naturlig ved spontane mutasjoner i DNA replikasjoner eller ved ytre påvirkninger som et resultat av stråling eller kjemiske mutagener (Tortora et al. 2009).

In vitro seterettet mutagenese er en teknikk for å blant annet karakterisere komplekse sammenhenger mellom proteinstruktur, vektormodifikasjoner og genekspressjon. Dette kan gjennomføres ved punktmutasjoner, insersjoner eller delesjoner av en eller flere aminosyrer (se figur 1.12). Denne prosedyren tar utgangspunktet i supercoilet dobbeltrådet DNA (dsDNA). To komplementære syntetiske oligonukleotid- primere som begge inneholder den ønskede mutasjonen tilsettes, sammen med en DNA polymerase. Primerene forlenges ved bruk av Polymerase chain reaction (PCR) med temperatursykluser optimalisert for DNA polymerasen. Etter syklusene behandles produktet med DpnI endonuklease som bryter ned umutert «foreldre» DNA ved at den gjenkjenner metylerte og hemimetylerte områder på DNAet. Mutert DNA transformeres deretter inn i kompetente celler (Aligent Technologies 2004).



Figur 1.12: De ulike trinnene ved seterettet mutagenese. 1) Dobbelttrådet DNA gjennomgår ulike temperatursykluser sammen med to komplementære muterte primere og en DNA polymerase. 2) Etter temperatursyklusene tilsettes DpnI som bryter ned «foreldre» DNAet. 3) Mutert DNA kan transformeres (Aligent Technologies 2004).

1.7 Mål med oppgaven

Kitooligosakkarider har blant annet vist ulike helsebringende og næringsnyttige effekter (Aam et al. 2010). Dannelse av kitooligosakkarider kan oppnås ved enzymatisk hydrolyse eller transglykosylering av kitin eller kitosan. ChiA og ChiB villtype fra *Serratia marcescens* har vist lave transglykosylerende egenskaper (Zakariassen 2011). Hovedmålet med denne oppgaven har derfor vært å lage og teste ulike seterettete muterte kitinaser, for å undersøke endringer i transglykosylerings aktiviteten. I tillegg ble det ulike forsøk for å forbedre protein uttrykket.

Seterettete mutanter som skulle studeres var ChiB mutantene Y2144 og R294A og ChiA mutantene F396W og D313N/396W. Videre skulle ChiB D142N muteres inn i en pET-16b vektor som et ledd for økt overuttrykk av proteinet. Transglykosyleringsforsøk ble analysert ved hjelp av HPLC og MALDI-TOF og resultatene fra forsøkene ble sammenlignet med ChiA og ChiB villtype.

2. Materialer

2.1 Laborieutstyr

Utstyr	Spesifikasjon	Leverandør
Amiconrør	Ultra- 15, 10kDa Ultracel, 30kDa	Millipore "
Autoklavteip	12 mm	VWR
Aluminiumsfolie		
Automatpipetter	Finnpipette ® F2	Thermo Scientific Thermolabsystems
Avtrekkskap	AV- 100	Telstar
Bordrister	Swip	Edmund Bühler
Bordsentrifuge	Sigma 1- 14	LABEX
Blåkorkflasker	2000mL 1000 mL 500 mL 250 mL 100 mL 50 mL 25 mL	VWR " " " " " "
Blåkorkrør, Cellstar® tubes	Cellstar® tubes 50 mL	Greiner Bio- One "
Cryorør	2 mL	Sarstedt
Dyrkningskolber	2 L 1 L 250 mL	BD Falcon " "
Elektroforeseutstyr: Agarose Gel	Elektroforesekar Spenningskilde Powepac™ basic	Bio-Rad Bio-Rad
Elektroforeseutstyr: SDS- PAGE	Gelkjøringskammer Gelspenningkilde Gel kniv	Invitrogen VWR Nisahu
Eppendorfrør	1,5 mL 2,0 mL	Axygen "
Filter	0,22 µm Steritop 0,22 µm	Millipore "
Fluorometer	DQ 300	AA Hoefer
Fotoutstyr (gel)	Gel Doc™ EZ System Lyskilde Benchtop UV transuliminator	Bio- Rad Kilab AS UVP inc.
Fryser	-80 °C -20 °C	SANYO "
Glassutstyr		Schott- Duran
HPLC	Ultimate 3000 system Autoinjektor Detektor	Dionex " "

2. Materialer

HPLC	UV/VIS detektor Vials og caps	Dionex VWR
HPLC- forkolonne	Carbo- H 4 x 3,0 mm	Phenomenex
HPLC- Kolonne	Rezex RFO- Fast Fruit H+ 7,8 x 100 mm	Phenomenex
Inkubator	Inkubatorskap 37 °C	Thermax
Ismaskin	KF145A, Porkka	Thermax
Econo-Column® Chromatography Columns	98 mL	Bio- Rad
Kyvette	1 x 1 cm	VWR
Magnetrører	Magnetic Stirrer, Standard Unit	VWR
Merketeip	13 mm	VWR
Mikrobølgeovn		Whirlpool
Microplate	96-brønner	Eppendorf
Microvekt	Sartorius CP- 2P	VWR
Målekolbe	2 L	Kelbo
Målesylinder	2 L 1 L 250 mL 100 mL 50 ml 25mL	VWR " " " " "
Nanodrop	ND-1000 Spectrofotometer	Saveen Werner
NuPAGE® 10% Bis-Gel	1,0 mm x 10 well	Invitrogen
Parafilm	10 cm og 5cm bredde	VWR
PCR maskin	Master cycler gradient	VWR
PCR-rør	0,2 mL	VWR
Petrisåler	9 cm	Heger
pH- meter	MicroFET 9270- 010	Sentron
Pipettespisser	Next generation Tip Refil 0,1- 10 µL Next generation Tip Refil 1- 200 µL Next generation Tip Refil 100- 1250 µL	VWR " "
Ristebrett	Sunflower minishaker PS-3D	Grant-Bio
Risteinkubator	Multitron Standard Multitron Eco	Infors "
Sentrifuge	Avanti™ J-25 Sentrifuge- 5430 R	Beckman Eppendorf
Sentrifugerotor	JA- 10 5430/5430 R	Beckman Eppendorf
Sentrifugerør	500 mL 30 mL	Nalgene Nalgene
Skalpell	Stainless steel	Swann-Morton
Sonikator	Sonics vibra cell VCx500	Sonics

2. Materialer

Spektrofotometer	Biophotometer	Eppendorf
Sprøyter	50 mL 10 mL	BD plastipak "
Sprøytefilter	0,20 µm	Sarstedt
Sterilbenk	AV- 100	Telstar
Tannpirkere		Jordan
Thermomikser	Thermomixer confort 1,5 mL	Eppendorf
Vakuumpumpe		Millipore
Vannbad	Eco Temp TW12	Julabo
Vekt	LL621P	Sartorius
Whirlmixer	Vortex- Genie 2	Scientific Industries

2.2 Kjemikalier

Kjemikalie	Leverandør
Agar, Bakto-agar	Merck
Agarose, SeaKem® LE Agarose	Lonza
Ammoniumacetat, CH ₃ COONH ₄	Merck
Ampicillin, C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	Sigma- Aldrich
Bacto™ Tryptone	BD
Bacto™ Yeast Extract	BD
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent	Bio- Rad
Biovine Serum Albumin (BSA), Purified 100x, 10 mg/mL	New England BioLabs. Inc
Coomassie® Brilliant Blue R-250 Farge Reagent, C ₄₅ H ₄₄ N ₃ NaO ₇ S ₂	Bio- Rad
D(+)- saccharose, C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Sigma- Aldrich
Destillert vann, dH ₂ O (Milli- Q kvalitet)	
Dikaliumfosfat K ₂ HPO ₄	Applichem
Eddiksyre, CH ₃ COOH	Sigma- Aldrich
Etanol, C ₂ H ₅ OH	Arcus
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Na ₂ C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈ x2H ₂ O	Sigma- Aldrich
Glyserol, 87 %, C ₃ H ₈ O ₃	Millipore
Hydrogenklorid, HCl	Sigma- Aldrich
Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, (IPTG), C ₉ H ₁₈ O ₅ S	Thermo Scientific
Kaliumdihydrogenfosfat, KH ₂ PO ₄	Applichem
Kloramfenikol, C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅	Sigma
Kitinkuler	Biolabs Inc.
Magnesiumklorid, MgCl ₂	Sigma- Aldrich

2. Materialer

Metanol, CH ₃ OH	Sigma- Aldrich
MOPS SDS Runningbuffer	Merck
Natriumfosfat, NaHPO ₄	Sigma- Aldrich
Natriumhydroksid, NaOH	Merck
Natriumkarbonat NaCO ₃	Sigma- Aldrich
Natriumklorid, NaCl	Sigma- Aldrich
Nikkel – nitrilotrieddiksyre (Ni-NTA) agarose	Qiagen
Phenyl-methyl sulfonylfluorid (PMSF), C ₇ H ₇ FO ₂ S	Sigma
Sitronsyre, C ₆ H ₈ O ₇	WWR
Trizma base, C ₄ H ₁₁ NO ₃	Sigma- Aldrich

2.3 Bakteriestammer og plasmid

Celler	Spesifikasjoner	Leverandør
<i>Escherichia coli</i>	BL 21 Star™ (DE3)	Invitrogen
	One Shot® TOP10 Superkompetente celler	Invitrogen
	Rosetta 2™ (DE3)	Invitrogen

Plasmid	Leverandør
<i>E.coli</i> pMay2- 10	Bruberg, M. B. NMBU
<i>E.coli</i> pET16b	Novagen

2.4 Gelelektroforese markører og buffere

Markør/buffer	Leverandør
1 Kb DNA ladder	New England BioLabs. Inc
BenchMark Protein Ladder	Invitrogen
GelRed™	Biotium
Loadingbuffer (10x) (DNA gel)	New England BioLabs. Inc
NuPAGE® Sample reducing agent (10x)	Invitrogen
NuPAGE® Samplebuffer (4x)	Invitrogen

2.5 Enzymer og buffere i PCR reaksjoner

Enzym/buffer	Leverandør
Nde I	New England BioLabs. Inc
Phusion® HF buffer (5x)	New England BioLabs. Inc
Phusion® polymerase	New England BioLabs. Inc
Xho I	New England BioLabs. Inc

2.6 Kit

Kit	Innhold	Leverandør
E.Z.N.A.® Plasmid Mini kit I	Solution I/RNAase	Omega Bio-TEK
	Solution II (Natriumhydroksid)	
	Solution III (Guanidine HCl Eddiksyre)	
	HiBind™ DNA Mini kolonner	
	Oppsamlingsrør	
	Ekvibrasjonsbuffer (Natriumhydroksid)	
	HB Buffer (Guanidine HCl Isopropanol)	
	DNA Vaskebuffer med etanol	
	Elueringsbuffer	
In-Fusion® HD Cloning Kit	5X In-Fusion HD Enzyme Premix	Clontech Laboratories
	Linearisert pUC19 Control Vector (50 ng/μl),	
	2 kb kontrollinsert (40 ng/μl).	
NucleoSpin® Gel and PCR Clean- up kit	NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kolonne	Macherey-Nagel
	Oppsamlingsrør	
	Buffer NTI	
	Buffer NT3	
	Buffer NE	
QuikChange® Site- Directed Mutagenesis Kit	10x Reaksjonsbuffer	Stratagene
	Dpn I Restriksjons enzym	
	pWhiteScript™ 4.5- kb Kontrollplasmid	
	dNTP mix	
	Pfu Ultra DNA polymerase	
	Oligonukleotid Kontrollprimer #1	
	Oligonukleotid Kontrollprimer #2	
Pellet Paint® Co- Precipitant	Pellet Paint® Co-Precipitant	Novagen
	0,3 M Sodium acetat pH 5,2	

2.7 Medier

Medie	Innhold
Luria-Bertani (LB) medie	10 g Bacto™ Tryptone 5 g Bacto™ Yeast Extract 10 g Natriumklorid, NaCl dH ₂ O til 1 L - Autoklaveres
Luria-Bertani (LB) agar	10 g Bacto™ Tryptone 5 g Bacto™ Yeast Extract 10 g Natriumklorid, NaCl 15 g Bacto Agar dH ₂ O til 1 L - pH justeres til 7 med NaOH og autoklaveres. Ampicillin (115 µg/mL) tilsettes ved 50 °C og agaren støpes i skåler. Oppbevares ved 4 °C
Terrific Broth (TB) medie	12 g Bacto™ Tryptone 24 g Bacto™ Yeast Extract 4 ml Glyserol dH ₂ O til 0,9 L – Autoklaveres
Terrific Broth (TB) saltløsning	18,8 g Kaliumdihydrogenfosfat, KH ₂ PO ₄ 4,4 g Dikaliumfosfat, K ₂ HPO ₄ dH ₂ O til 100 ml – Filtreres Tilsettes i det avkjølte TB mediet
Super Optimal Broth (S.O.C) Medium fra Invitrogen	2% Bacto™ Tryptone 0.5% Bacto™ Yeast Extract 10 mM NaCl 2.5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM glucose Oppbevares ved -20 °C

2.8 Selvlagde løsninger

Løsninger	Innhold
Ammoniumacetat, CH ₃ COONH ₄ , pH 6,1, 1 M	38,54 g Ammoniumacetat dH ₂ O til totalt 0,5 L
Ampicillin Sodium salt, C ₁₆ H ₁₈ N ₃ NaO ₄ S, 115 mg/mL	1150 mg Ampicillin dH ₂ O til totalt 10 mL
Avfargingsløsning SDS-PAGE	75 mL Eddiksyre 100 mL Etanol dH ₂ O til totalt 1 L
Di- acetyl- D- glucosamine [GlcNAc] ₂ , C ₁₆ H ₂₈ N ₂ O ₁₁ , 1 mM	0,4244 g Di-acetyl chitobiose 20 mM Ammoniumacetate pH 6.1 til totalt 1 mL

2. Materialer

Eddiksyre, CH ₃ COOH, 20 mM	1,15 mL Konsentrert eddiksyre dH ₂ O til totalt 1 L
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Na ₂ C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈ x 2H ₂ O, pH 8.0, 0,5 M	46,5 g Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 200 mL dH ₂ O pH justeres med natriumhydroksid dH ₂ O til totalt 250 mL
Etanol, CH ₃ CH ₂ OH, 20 %	200 mL 100 % Etanol dH ₂ O til totalt 1 L
Fargeløsning SDS-PAGE	0,50 g Coomassie Brilliant Blue R250 200 mL EtOH 50 mL 100 % Eddiksyre dH ₂ O til totalt 250 mL
Hexa-N-acetyl-chitohexaose (GlcNAc) ₆ C ₄₈ H ₈₀ N ₆ O ₃₁ , 1 Mm	1,237 mg Hexa-N-acetyl-chitohexaose 20 mM Ammoniumacetate pH 6.1 til totalt 1 mL
Kloramfenikol ,C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅ , 50 mg/mL	500 mg Kloramfenikol Etanol til totalt 10 ml
Magnesiumdiklorid, MgCl ₂ , 1 M	10,5 g Magnesiumdiklorid x 6H ₂ O dH ₂ O til totalt 500 mL
MOPS, C ₇ H ₁₅ NO ₄ S, 1X	100 mL 20 X MOPS dH ₂ O til totalt 2 L
N- acetyl- D- glucosamine [GlcNAc], C ₈ H ₁₅ NO ₆ , 1 mM	0,221 g N- acetyl- D- glucosamine 20 mM Ammoniumacetate pH 6.1 til totalt 1 mL
Natriumfosfat, Na ₂ HPO ₄ , 0,2 M	3,5598 g Natriumfosfat dH ₂ O til totalt 100 mL
Natriumhydroksid, NaOH, 6 M	240 g Natriumhydroksid dH ₂ O til et sluttvolum på 1 L
Sitronsyre , C ₆ H ₈ O ₇ , 0,1 M	2,1014 g Sitronsyre dH ₂ O til totalt 100 mL
Svovelsyre, H ₂ SO ₄ , 20 mM	50 µL Konsentrert svovelsyre dH ₂ O til totalt 50 mL
Tetra- acetyl chitotetraose (GlcNAc) ₄ , C ₃₂ H ₅₄ N ₄ O ₂ ,1 mM	0,83 mg Tetra- acetyl chitotetraose 20 mM Ammoniumacetate pH 6.1 til totalt 1 mL
Tri-N-acetyl-chitotriose (GlcNAc) ₃ C ₂₄ H ₄₁ N ₃ O ₁₆ , 1mM	0,63 mg Tri-N-acetyl-chitotriose 20 mM Ammoniumacetate pH 6.1 til totalt 1 mL
Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM	100 mL 1M Tris- HCl dH ₂ O til totalt 1L

2.9 Selvlagde buffere

Buffer	Innhold
Citrat/fosfat buffer, pH 5.2	23,3 mL 0,1 M Sironsyre 26,7 mL 0,2 M Natriumfosfat dH ₂ O til totalt 100 mL
Natriumkarbonat buffer, 0,2 M	2,12 g Natriumkarbonat dH ₂ O til totalt 100 mL
Spheroplastbuffer	100 mL Tris-HCl 171 g D (+)- Saccharose 1 mL 0,5 M EDTA 2 mL PMSF dH ₂ O til totalt 1 L
TAE buffer 50 x	242 g Trizma base 57,1 ml eddiksyre 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 dH ₂ O til totalt 1 L
Tris- HCl pH 8,0, 1 M	800 mL dH ₂ O 121,1 g Trizma base Justerte pH ved å tilsette ca 42 mL 6 M saltyre dH ₂ O til totalt 1 L

2.10 Programvare

Bruksområde	Programvare	Leverandør
Gelbilde	Image Lab TM	Bio-Rad
HPLC	Chromeleon	Dionex
Kontroll av sekvenseringresultater	Clustal Omega Chromas	EMBL-EBI Technelysium
MALDI	FlexControl 2.4 FlexAnalysis 2.4	Bruker Daltonics "
Proteinrensing	LP Data View	Bio-Rad
Spektrofotometer	Nano Drop 1000	Thermo Scientific

3. Metoder

3.1 Tillaging av ny mutant

På bakgrunn av tidligere forskning på transglykosylerings effekten til kitinaser (Zakariassen et al. 2011) ble det bestemt at mutantene som er oppført i tabell 3.1 skulle bli benyttet i denne oppgaven. I tillegg ble ChiA wt og ChiB wt også benyttet. De fleste mutantene var allerede laget og tilgjengelige som frysestock, men noen mutanter måtte designes. Dette gjaldt ChiB D142N, ChiB D142N/R294A og ChiB D142N/Y214F.

Tabell 3.1 Mutanter som ble benyttet.

Mutant	Vektor	Opphav
ChiA F396W	pMay2-10	Frysestock
ChiA D313N/F396W	pMay2-10	Frysestock
ChiA W167A	pMay2-10	Frysestock
ChiA Y390F	pMay2-10	Frysestock
ChiB Y214F	pMay2-10	Frysestock
ChiB R294A	pMay2-10	Frysestock
ChiB D142	pET-16b	Ny mutasjon
ChiB D142N/R294A	pET-16b	Ny mutasjon
ChiB D142N/Y214F	pET-16b	Ny mutasjon

3.1.1 Primer design

Godt primer design er avgjørende for vellykkede PCR reaksjoner (se avsnitt 3.1.5 for mer detaljer). For å gjennomføre seterettet mutagenese var det nødvendig å ha to primere – en med rett og en med komplementær sekvens. Primerne ble designet ved hjelp av QuikChange® Primer Design (Aligent Technologies 2014) og bestilt fra Life Technologies. For å oppnå en best mulig primer er det viktig at den er mellom 20 og 45 basepar lang, at den nye mutasjonen er plassert midt i primeren, at smelte-temperaturen er på > 78 °C og at GC andelen er minimum 40 %. (Aligent Technologies 2004). Post Doc Patrica Wildberger, Post Doc Anne Line Norberg og avdelingsingeniør Silje Benedicte Lorentzen designet og bestilte henholdsvis primerene for ChiB D142N, R294A og Y214F (se tabell 3.2).

3. Metdoder

Tabell 3.2: Primere og plasmidene som ble brukt ved tillaging av ny mutant der mutasjonene er markert.

Mutant	Plasmid	Primer	Sekvens
ChiB D142N*	ChiB	D142NFwd	TGTGGACATCAACTGGGAGTAC
	wt*	D142NRev	GTACTCCCA GTTGATGTCCACA
ChiB D142N/ R294A	ChiB	R294AFwd	GCCCTTCTATGGCGCCGCCTTCAAGGGC
	D142N*	R294ARew	CGGGA ACTTCCG CCGCGGTATCTTCCCG
ChiB D142N/ Y214F	ChiB	Y214FFwd	ATCAACCTGATGACCTTCGATCTGGCCGGC
	D142N*	Y214FRev	GCCGGCCAGATCGAAGGTCATCAGGTTGAT

*med pET-16b vektor (se avsnitt 3.3.1 til 3.3.8)

3.1.2 Oppdyrking av bakteriestamme

ChiB D142N skulle brukes for å lage dobbelmutantene ChiB D142N/R294A og ChiB D142N/Y214F. Det var derfor nødvendig å dyrke opp celler med dette plasmidet, slik at det kunne bli benyttet som templat i seterettet mutagenese.

Materialer:

- LB-medium
- Ampicillin (50 mg/ml)
- Frysestock med aktuelt templat

Metode:

5 ml LB-medium og 5 µl ampicillin ble tilsatt i dyrkningsrør og inokulert med celler fra bestemt frysestock. Bakteriekulturen ble inkubert ved 37 °C ved 200 rpm over natt (~15 timer).

3.1.3 Isolering av plasmid

Før seterettet mutagenese måtte plasmidet fra den ønskede cellekulturen isoleres. Dette ble gjort ved hjelp av E.Z.NA[®] Plasmid DNA Mini Kit I. Prosedyren er delt inn i tre steg for å isolere DNA. Binding av DNA på kolonnen, utvasking av alle andre forbindelser og eluering av DNA (Omega Bio-tek 2014).

Materialer:

- E.Z.NA[®] Plasmid DNA Mini Kit I
- Cellekultur av ønsket bakteriestamme

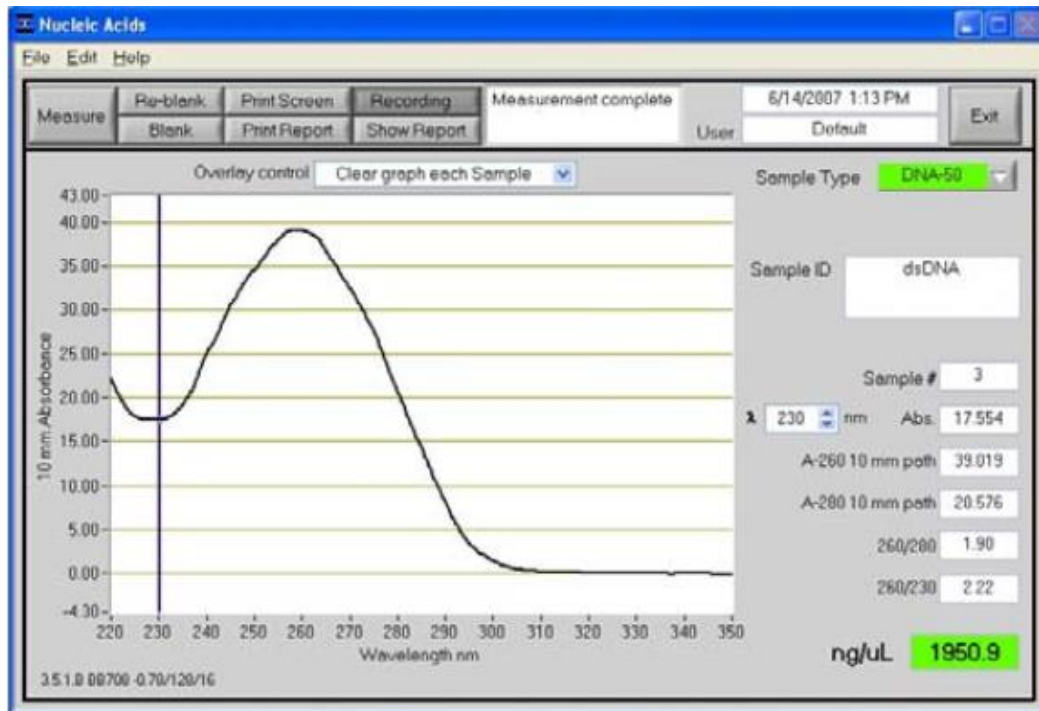
Metode:

Cellekulturen ble overført til eppendorfrør og spunnet ned ved 10 000 x g i 1 minutt. Supernatanten ble helt av, og cellepelleten ble resuspendert i 250 µL Solution 1/RNAase A til det ikke var noen synlige celleklumper igjen. 250 µL Solution II ble tilsatt og løsningen ble forsiktig blandet ved å snu eppendorfrøret opp og ned til det ble dannet et klarere lysat. 350 µL av Solution III ble tilsatt og løsningen ble blandet med en gang slik at en hvit utfelling ble dannet. Løsningen ble spunnet ned ved 13 000 x g i 10 minutter. Den klare supernatanten ble til satt en HiBind DNA Mini kolonne som på forhånd var blitt ekvilibrert med 100 µl ekvilibrasjonsbuffer 500 µL HB buffer ble tilsatt for å vaske kolonnen som videre ble sentrifugert i ved 13 000 x g i 1 minutt. Der etter ble 700 µL DNA Wash Buffer tilsatt, og løsningen ble sentrifugert ved 13 000 x g i 1 minutt. For å få ut all væsken fra kolonnematriksen ble denne sentrifugert i 2 minutter. Den tørre kolonnen ble til slutt satt i et rent eppendorfrør og 30 µL Elueringsbuffer ble tilsatt. Kolonnen ble inkubert i 1 minutt ved romtemperatur før kolonnen ble sentrifugert ved 13 00 x g i 1 minutt. Det rensede plasmidet ble oppbevart ved – 20 °C.

3.1.4 Måling av DNA konsentrasjon med NanoDrop

Konsentrasjonen til det isolerte plasmidet ble målt med NanoDrop 1000. Spektrofotometeret måler DNA konsentrasjonen ved en bølgelengde på 260 nm i et lineært område på 2 – 3700 ng/µL med et standardavvik på ± 2 ng/µL. Dersom plasmidet er rent vil kurven forekomme som i figur 3.1 (Thermo Scientific 2008).

3. Metdoder



Figur 3.1: Spekter av rent plasmid med ND 1000 (Thermo Scientific 2008).

Materialer:

- NanoDrop™ 1000 Spektrofotometer
- Elueringsbuffer (E.Z.NA® Plasmid DNA Mini Kit I Spin Protocol)
- Renset plasmid
- dH₂O

Metode:

Programmet ND 1000 ble åpnet og 2 μl dH₂O ble tilsatt for å vaske og nullstille spektrofotometeret. Instrumentet ble deretter kalibrert med 2 μl Elueringsbuffer buffer. DNA-konsentrasjonen ble videre avlest etter å ha applisert 2 μl plasmid.

3.1.5 Seterettet mutagenese

For å gjøre punktmutasjoner ved hjelp av seterettet mutagenese ble kittet QuikChange Site Directed Mutagenesis Kit brukt (Agilent Technologies 2004). Prosessen for å bytte ut aminosyrene begynner med en Polymerase Chain Reaction. PCR er en metode for å oppamplifisere små mengder av spesifikt genetisk materiale som DNA og virus. Metoden omfatter følgende tre trinn: Denaturering, hybridisering og forlengelse. I det første trinnet denatureres det genetiske materialet ved en høy temperatur, noe som fører til en konvertering av dobbeltrådet DNA til enkelttråder. Temperaturen senkes i det neste trinnet og de syntetiske primerne fester seg til de komplementære områdene av det enkelt-trådede DNAet. I det tredje trinnet økes temperaturen, noe som fører til at DNA- polymerasen fester seg til primerne og DNA tråden forlenges. Ved endt PCR tilsettes Dpn I som kutter det ikke muterte plasmidet ved at den kjenner igjen metylerte og hemimetylerte grupper i DNAet. (Premier Biosoft 2014), (Agilent Technologies 2014)

Materialer:

- 10 x Reaksjonsbuffer
- 75-100 ng templat
- Primer forward
- Primer reverse
- dNTP miks
- H₂O
- Pfu Ultra DNA polymerase
- pWhitescript 4,5 kb kontroll plasmid
- Oligonukleotid kontroll primer forward
- Oligonukleotid kontroll primer reverse
- dH₂O

Metode:

Reagentene ble tilsatt i oppgitt rekkefølge i et PCR rør som tabell 3.3 på kuldeblokk. PCR programmet oppgitt i tabell 3.4 ble kjørt med en gradient i forlengelsestrinnet på mellom 55 og 75 °C for å finne optimal forlengelsestemperatur.

Tabell 3.3: Tillaging av prøvereaksjon og kontrollreaksjon før PCR.

Komponent	Prøvereaksjon Volum [μL]	Kontrollreaksjon Volum [μL]
10 x reaksjonsbuffer	5	5
pWhitescript 4,5 kb kontroll plasmid	-	2
Oligonukleotid kontroll primer forward	-	1,25
Oligonukleotid kontroll primer reverse	-	1,25
Templat	75-100 ng	-
NTP mix	1	1
Primer forward	1,25	-
Primer reverse	1,25	-
<i>Pfu Ultra</i> DNA polymerase	1	1
H ₂ O	Til 50	38,5

Tabell 3.4 Oversikt over PCR programmet som ble benyttet.

Program	Antall sykluser	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Tid
Varme lokk	1	110	
Denaturering	18	95	30 sekunder
Hybridisering		95	30 sekunder
Forlengelse		55-75	7 minutter*
Nedkjøling	1	10	

*1 minutt per kb plasmid

Etter endt PCR ble 1 μL Dpn I tilsatt. Løsningene ble deretter inkubert i 1 time ved 37 $^{\circ}\text{C}$.

3.1.6 Oppkonsentrering av plasmid med Pellet Paint[®] Co- Precipitant Kit

Etter inkubasjonen med Dpn I ble plasmidet oppkonsentrert ved å bruke Pellet Paint[®] Co-Precipitant Kit (referanse). Kittet inneholder et synlig rosa fargestoff som er spesielt utformet for bruk til utfelling av nukleinsyrer. DNAet blir effektivt utfelt i løsninger med konsentrasjoner helt ned til 2 ng / ml. Den rosa pelleten er lett synlig under hele prosessen, noe som forhindrer tap underveis. Primere og andre reaktanter fra løsningen fjernes samtidig som plasmidet ble oppkonsentrert (EMD Millipore 2014).

Materialer:

- Pellet Paint[®] Co- Precipitant Kit
- PCR produkt
- 96 % etanol
- 70 % etanol
- dH₂O

Metode:

0,1 volum 3 M NaAc og 1 µl Pellet Paint ble blandet forsiktig inn i PCR løsningen. Deretter ble 2 volum 96 % etanol tilsatt før løsningen lett ble blandet med vortex. Etter en 2 minutters inkubasjon ved romtemperatur ble reaksjonene sentrifugert ved 16 000 x g i 5 minutter. Etter endt sentrifugering, ble supernatanten forsiktig tatt bort. 500 µl 70 % etanol ble tilsatt og røret ble igjen sentrifugert på samme måte. Supernatanten ble igjen tatt bort og 500 µl 96 % etanol ble tilsatt for å rense pelleten. En siste gang ble røret sentrifugert og supernatanten ble fjernet. Pelleten lufttørket til all etanolen fordampet. Pelleten ble deretter resuspendert i 5 µl dH₂O.

3.1.7 Transformering av plasmid inn i One Shot[®] TOP10 superkompetente *E. coli* celler

Plasmidet ble etter oppkonsentreringen transformert inn i One Shot[®] TOP10 superkompetente *Escherichia coli* celler. TOP 10 celler har en høy transformasjonseffektivitet på 1×10^9 cfu/µg plasmid DNA og er derfor i god stand til å ta opp fremmede plasmid. (Life Technologies 2014d). Vektoren med det muterte plasmidet inneholdt ampicillin-resistens og agarskålene inneholdt derfor ampicillin for å unngå at uønskede celler ble dyrket opp.

Materialer:

- One Shot[®] TOP10 superkompetente *E. coli* celler
- Oppkonsentrert DNA
- S.O.C-medium
- LB agarplater med 100 µg/ml ampicillin

Metode:

Rørene med TOP10 celler ble tint forsiktig på is. All Dpn I behandlet DNA ble overført til de superkompetente TOP10 cellene. Dette ble blandet forsiktig og inkubert på is i 30 minutter. Reaksjonene ble så varmebehandlet i 30 sekunder i et vannbad ved 42 °C før de ble avkjølt på is i 2 minutter. S.O.C-mediet var forvarmet til 42 °C før det ble tilsatt 250 µl i hver reaksjon. Reaksjonene ble inkubert i 37 °C ved 200 rpm i en time. Etter inkubasjonen ble henholdsvis 50 og 100 µl cellekultur platet ut på to LB-plater med 100 µg/ml ampicillin. Platene ble inkubert i inkubatorskap ved 37 °C over natt.

3.1.8 Oppdyrking av transformanter

Enkeltkolonier på platene ble plukket ut og dyrket opp for å oppamplifisere de transformerte cellene.

Materialer:

- Transformerte kolonier fra LB-platene
- LB-medium
- 50 mg/ml ampicillin

Metode:

Enkeltkolonier med transformanter fra agarplatene ble inokulert i 5 ml LB-medium og 5 µl 50 mg/ml ampicillin. Cellekulturene ble inkubert ved 200 rpm og 37 °C over natt.

3.1.10 Sekvensering

For å kontrollere at plasmidet hadde den korrekte mutasjonen måtte plasmidet sekvenseres. Plasmidet fra cellekulturen i avsnitt 3.1.9 ble isolert med E.Z.N.A® Plasmid DNA Mini Kit I som beskrevet i avsnitt 3.1.3. DNA konsentrasjonen ble målt med Nano Drop 1000 som beskrevet i avsnitt 3.1.4. For å sjekke om seterettet mutagenese hadde blitt gjennomført, ble programmet Clustal Omega benyttet for å analysere DNA sekvensene. Det muterte plasmidet ble sammenliknet med sekvensen til vill type plasmidet. Sekvensen til det muterte plasmidet og det ikke muterte plasmidet skal da være like, bortsett fra nukleotidene som er endret for den nye mutasjonen.

Materialer:

- Sekvenseringsprimere
- Mutert plasmid
- Elueringsbuffer fra E.Z.N.A® Plasmid DNA Mini Kit I

Metode:

400 til 500 ng mutert plasmid ble blandet med 25 pmol sekvenseringsprimere og elueringsbuffer til et totalvolum på 10 µl. Det ble tillaget en reaksjon per primer (tabell 3.5.) det vil si totalt fire sekvenseringsreaksjoner. Prøvene ble merket og sendt til GATC Biotech i Constance i Tyskland for sekvensering.

Tabell 3.5: Oversikt over PCR programmet som ble benyttet.

Sekvenseringsprimer	Sekvens (5' - 3')
ChiB fwd 537	TGAAGGATTACGGCTTCGAC
ChiB rew 1568	CCAGACGTAGCCTTGGTAGG
SP6	ATTAGGTGACACTATAG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG

3.1.11 Transformeringsinn i One Shot® BL21 Star (DE3) E.coli celler.

Ved korrekt sekvensering ble det muterte plasmidet transformert inn i One Shot® BL21 Star™ (DE3) Chemically Competent *E. coli* celler. Cellene gir høyere ekspressjon enn TOP 10 cellene fordi genotypen til BL21Star (DE3) fremmer høy mRNA stabilitet og proteinuttrykk. Dette kommer blant annet av en mutasjon i genet RNaseE (*rne131*) som reduserer nivåene av mRNA degradering. Transformantene ble dyrket opp på LB-agarplater med ampicillin (Life Technologies 2014c).

Materialer:

- Mutert plasmid
- One Shot® BL21 Star (DE3) *E.coli* celler
- S.O.C-medium
- LB agarplater med 100 µg/ml ampicillin

Metode:

One Shot® BL21 Star (DE3) *E.coli* celler fra ble tint forsiktig på is.

10 ng mutert plasmid ble tilsatt, blandet forsiktig og inkubert på is i 30 minutter. Reaksjonene ble deretter varmebehandlet i 30 sekunder i et vannbad ved 42 °C før de ble avkjølt på is i 2 minutter. S.O.C-mediet var forvarmet til 42 °C før det ble tilsatt 250 µl i hver reaksjon.

Reaksjonene ble inkubert ved 37 °C på 200 rpm i en time. Etter inkubasjonen ble henholdsvis 50 og 100 µl av cellekulturen platet ut på to LB-plater med 100 µg/ml ampicillin. Platene ble inkubert ved 37 °C over natt.

3.1.12 Oppdyrking av BL 21 Star (DE3) transformanter

Dette ble utført som i avsnitt 3.1.8.

3.1.13 Tillaging av frysestock

Glyserol frysestocker ble laget slik at de transformerte cellene kunne lagres over lang tid ved – 80 °C.

Materialer:

- Cellekultur
- 87 % glyserol

Metode:

1050 µl cellekultur og 450 µl 87 % glyserol ble overført til et cryorør. Cryorørene ble oppbevart ved -80 °C

3.2 Produksjon av kitinaser

3.2.1 Overekspresjon av kitinaser

E. coli stammen One Shot® BL21 Star (DE3) ble benyttet som vert for å få en overekspresjon av de ulike kitinase mutantene. Det næringsrike LB-mediet ble benyttet og ampicillin ble tilsatt for å hindre vekst av uønskede bakterier som ikke var ampicillin resistente. Dyrkning kolbene ble ikke fylt opp mer enn 20 % slik at det var nok oksygentilførsel til cellene.

Materialer:

- LB-medium
- Ampicillin (50 mg/ml)
- Frysestock med ønsket kitinase

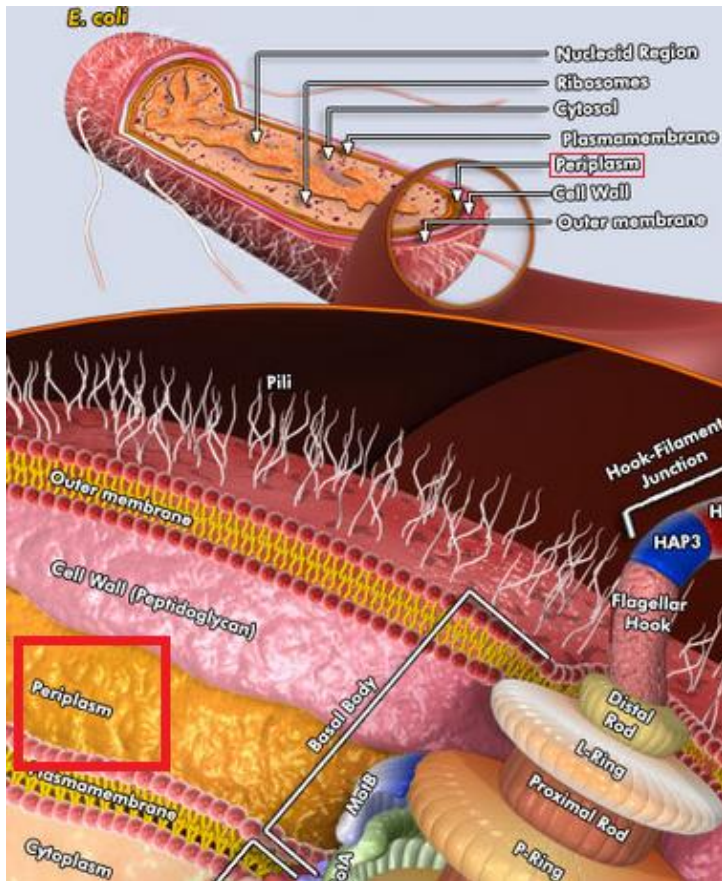
Metode:

500 ml LB-mediet ble tilsatt 500 µl ampicillin i en 2 L dyrkningskolbe. Hver kolbe ble inokulert med celler fra ønsket frysestock. Kolbene ble inkubert over natt (~15 timer) ved 200 rpm og 37 °C.

3.2.2 Tillaging av periplasmatisk ekstrakt

E. coli er en gram negativ bakteriecelle som inneholder et periplasmatisk området som er mellom inner- og yttermembranen som vist på figur 3.2. Den består av en tynn cellevegg av peptidoglykan. Periplasmaen inneholder ulike ioner og proteiner, som er involvert i mange forskjellige prosesser blant annet transport, nedbryting og protein folding. I dette området uttrykkes også kitinaser fra *Serratia marscescens* (Brurberg et al. 1995)

For å få tilgang til disse proteinene lyses cellene ved hjelp av et osmotisk sjokk. En spheroplastbuffer med høy sukkerkonsentrasjon øker sukkerkonsentrasjonen inni cellene. Ved å tilsette kaldt vann vil det transporteres for mye vann inn gjennom cellemembranen noe som fører til at cellene til slutt vil sprekke (Tortora et al. 2009). Magnesium klorid stabiliserer den periplasmatiske løsningen.



Figur 3.2: Utsnitt av en *E.coli* celle som viser det periplasmatiske området i cellen (Qiagen 2014)

Materialer

- Cellekultur
- Kald fersk spheroplastbuffer
- Kaldt sterilt H₂O
- 1 M MgCl₂
- PMFS
- 0,22 µm sterilfilter

Metode:

Cellekulturen ble overført til 500 mL sentrifugerør og spunnet ned ved 8000 rpm ved 4 °C i 10 minutter i en JA-10 sentrifugerotor. Supernatanten ble deretter dekantert, og pelleten ble resuspendert i 25 mL kald, fersk spheroplastbuffer. Løsningen ble overført til 30 mL sentrifugerør som ble inkubert på is i 5 minutter. Cellene ble deretter spunnet ned ved 8000 rpm ved 4 °C i 10 minutter. Supernatanten ble dekantert og cellepelletene ble inkubert i 10 minutter i romtemperatur. Deretter ble cellepelleten resuspendert i 15 mL kaldt sterilt H₂O.

Cellesuspensjonene ble satt på is i 45 sekunder før 1,5 mL 1M MgCl₂ ble tilsatt.

Celleløsningen ble igjen spunnet ved 8000 rpm og 4 °C i 10 minutter. Supernatanten ble overført til et 0,22 µm filter og steriltfiltrert ved hjelp av vakuum sug. Cellepelletene ble deretter sonikert (se avsnitt 3.2.3) Det periplasmatiske ekstraktet ble lagret ved 4 °C frem til rensing. Dersom løsningen skulle bli lagret over lang tid ble 2 µL/mL av proteasehemmeren PMFS tilsatt for å forhindre spalting av proteiner i løsningen.

3.2.3 Tillaging av cytoplasmatisk ekstrakt

Kitinaser fra *Serratia marscescens* uttrykkes i periplasmaen men det har vist seg at de også vil forkomme i cytoplasmaen (Brurberg et al. 1995) For å få tilgang til disse proteinene må cellene lyses. Dette kan gjøres med en sonikator. Et sonikatorsystem består av tre hovedkomponenter; generator, konverter og probe. Generatoren leverer høyspenningpulsenergi med energi ved en frekvens på 20 kHz til konverter. Denne omformer elektrisk energi til mekanisk vibrasjon, og denne vibrasjonen blir overført langs proben. Proben som er plassert i celleløsningen påfører cellene høyfrekvente ultralydbølger, noe som fører til celleoppbrytning (QSonica 2012).

Materialer

- Cellepellet fra avsnitt 3.2.2
- 100 mM TrisHCl (pH 8,0)
- Sonikator
- 0,22 µm sterilfilter

Metode:

Cellepelletene fra det siste trinnet i tillagingen av periplasmatisk ekstrakt ble resuspendert i 10 ml 100 mM TrisHCl. Rørene ble satt på is og plassert i sonikatorene. Proben ble ført inn i celleduspensjonen, og pulseringen fra ultrabølgene var fem sekunder på før en hviletid på ti sekunder med en amplitude på 30 % i 15 minutter. Løsningene ble deretter spunnet ned i 30 minutter ved 8000 rpm. Supernatanten inneholder det cytoplasmiske ekstraktet. Denne ble filtrert i et 0,22 µm sterilfilter ble oppbevart 4 °C frem til rensing.

3.2.4 Kromatografisk rensing ved bruk av kitinkuler

Det periplasmatiske- og det cytoplasmatiske ekstraktet inneholder flere uønskede proteiner i tillegg til de ønskede kitinasene. Det er derfor nødvendig å utføre et renseseg. Aktive kitinaser har dermed affinitet for kitin, noe som gjør at de vil feste seg på kitinkolonnen, mens alle andre proteiner og molekyler vil vaskes ut med vaskebufferen. En bufferendring med lavere pH fører til eluering av kitinasene.

Materialer:

- Buffer A: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
- Buffer B: 20 mM Eddiksyre
- Prøvemateriale: Periplasmatisk - /cytoplasmatisk ekstrakt
- Kolonnemateriale: Kitinkuler
- 20 % Etanol

Metode:

10 mL kitinkuler ble pakket i en kolonne før buffer A ble påsatt med en flow på 2,5 mL/min til baselinjen ble stabil. Dette er for å vaske ut eventuelle konserveringsmidler som kolonnematerialet kan inneholde. Det periplasmatiske - /cytoplasmatiske ekstraktet ble pH justert til 50 mM Tris-HCL pH 8,0 før det ble applisert på kolonnen. Deretter ble kolonnen igjen vasket med buffer A til baselinjen ble stabil. Buffer B ble da påsatt, og proteinet ble eluert ut isokratisk og samlet opp. Dersom det skulle foretas flere rensinger ble Buffer A tilsatt til baselinjen ble stabil. Systemet ble til slutt vasket med 20 % etanol.

3.2.5 Kontroll av proteinets renhet på Sodium Dodecyl Sulfate- Polyakrylamid Gel Elektroforese (SDS-PAGE)

SDS -PAGE er en teknikk for å separere proteiner basert på molekylets størrelse. Metoden er rask og enkel og brukes ofte for å kontrollere proteiners uttrykk og renhet. En varmebehandling av proteinene sammen med SDS gjør at proteinene denatureres og får en negativ ladning. Proteinløsningen appliseres på polyakrylamidgelen som inneholder et nettverk av tunneler. Et elektrisk felt påsettes som fører til at de negativt ladde proteinene beveger seg gjennom gelen mot det positive anoden. De mest mobile, det vil si de og minste proteinene, har minst motstand i gelen og vil bevege seg hurtig mot den positive anoden.

De større og mindre mobile proteinene vil møte på motstand i gelnettverket og beveger seg sakte mot anoden. Dette fører til spredning av proteinene som kan indentifiseres med en kjent proteinstandard. For å visualisere proteinfraksjonene i gelen blir en løsning med Coomassie Brilliant Blue R-250. Det anioniske fargestoffet har en upolar struktur og har en ikke-spesifikk binding til proteiner. Fargestoffet løses vanligvis i metanol og surgjøres med eddiksyre. For å få bort overskuddet av fargestoffet som innarbeides i gelen, blir en avfargingsløsning tilsatt. (Lesk M. Arthur 2010; Life Technologies 2014e)

Materialer:

- Proteinfraksjoner
- dH₂O
- MOPS SDS Running Buffer (1x)
- NuPAGE ® 10 % Bis-Tris Gel 1,0 mm x 10 well
- NuPAGE® Sample reducing agent (10x)
- NuPAGE® Samplebuffer (4x)
- Bench Mark Protein Ladder
- SDS-PAGE fargeløsning
- SDS-PAGE avfargingsløsning

Metode:

5 µL Sample buffer (4x), 2 µL Sample reducing agent (10x) og 3 µL dH₂O ble blandet med 10 µL av hver proteinfraksjon. Prøvene ble denaturert i et varmebad ved 70 °C i 10 minutter. En NuPAGE ® 10 % Bis-Tris Gel ble montert i et elektroforesekar og kammen ble forsiktig fjernet. Inner kammeret og halve ytterkammeret i gelelektroforesekarer ble fylt opp med MOPS SDS Running Buffer (1x). 7 µL Bench Mark Protein Ladder ble applisert i den første brønnen mens 20 µL denaturert proteinløsning ble applisert i hver sine brønner.

Elektroforesekarer ble koblet til en strømkilde med en stabil spenning på 200 V i 50 minutter. Etter elektroforese ble en SDS-Fargeløsning tilsatt. Etter ett minutt i mikrobølgeovn ble gelen plassert på et ristebrett i 10 minutter. Fargeløsningen ble deretter dekantert og gelen ble vasket med H₂O før avfargingsløsningen ble tilsatt. Deretter ble gelen avfarget ett minutt i mikrobølgeovnen og 10 minutter på et ristebrett. Proteinfragmentene ble observert som blå bånd på en klar bakgrunn.

3.2.6 Oppkonsentrering av enzym

For å oppkonsentrere eluatet fra proteinrensingen og for å bytte buffer ble et Amicon Ultra-30K sentrifugefilter eller et Macrosep® Advance 30 K sentrifugefilter benyttet. Begge sentrifugefilterene har en semipermeabel membran med en porestørrelse på 30 kDa som ved hjelp av hydrostatisk trykk vil tvinge forbindelser og væske med lavere molekylvekt gjennom. ChiA og ChiB har en molekylvekt som er høyere enn 30 kDa og de vil derfor bli værende i membranfilteret. Amicon Ultra-30 har et cellulosefilter (Millipore 2014) mens Macrosep® Advance 30 K har et Omega™ filter (Pall Corporation 2014).

Materialer:

- Proteinfraksjoner
- Amicon Ultra-30K/ Macrosep® Advance 30 K oppkonsentreringsrør
- 100 mM Tris-HCl (pH 8,0)

Metode:

Eluatet fra rensingen ble sentrifugert i oppkonsentreringsrør rør ved 4 °C og 4200 rpm til det var omtrent 1,5 mL væske igjen. Røret ble deretter etterfylt med buffer og sentrifugert ved samme betingelser som tidligere. Dette ble utført fire ganger slik at all bufferen ble byttet ut. Den konsentrerte proteinløsningen ble oppbevart ved 4 °C i et eppendorfrør.

3.2.7 Måling av proteinkonsentrasjon

Bio-Rad Protein Assay som er basert på fremgangsmåten til Bradford er en enkel og nøyaktig fremgangsmåte for å bestemme konsentrasjonen til løselige proteiner. Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent inneholder fargestoffet Coomassie® Brilliant Blue G-250. Den maksimale absorbansen for Coomassie® Brilliant Blue G-250 endrer seg fra 495 nm til 595 nm når binding til protein oppstår. Absorbansen til de ukjente prøvene ble målt ved 595 nm i spektrofotometeret. Denne verdien ble sammenlignet med en kjent standardkurve og proteinkonsentrasjonen ble fastsatt (Bio-Rad 2014).

Materialer:

- Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent
- 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8,0)
- Oppkonsentrert proteinløsning
- Spektrofotometer

Metode:

798 μl buffer ble blandet med 2 μl proteinløsning. Tre paralleller ble laget i tillegg til en blankprøve med 800 μl buffer. 200 μl BioRad Protein Assay Dye Reagent ble deretter tilsatt hver prøve og etter 5 minutters inkubering i romtemperatur ble konsentrasjonen til prøvene målt i et spektrofotometer. Blankprøven ble brukt for å nullstille spektrofotometeret.

3.2.8 Måling av spesifikk enzymaktivitet

Spesifikk aktivitet er aktiviteten til et enzym per milligram av totalt protein, uttrykt i mikromol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Den spesifikke enzymaktiviteten til enzymene ble bestemt fluorimetrisk. Det syntetiske substratet 4-methylumbelliferyl- β -D-N-N'-diacetylchitobiose (4-MU (GlcNAc)₂) består av den fluoriserende gruppen (4- MU) og to sukkerenheter. I en enzym katalysert reaksjon vil bindingene mellom sukkerenhetene og 4-MU brytes, noe som fører til frigjøring av fluoroforen som detekteres i fluorometeret. Absorpsjonen for 4-MU er lys med en bølgelengde på 358 nm mens den fluoriserende gruppen avgir fluorescens med en bølgelengde på 460 nm. Målt fluorescens kan brukes for å beregne spesifikk enzymaktivitet. (Amersham Biosciences 1998), (AA Hoefler 2012).

Materialer:

- 0,2 M Natriumkarbonatbuffer
- 100 x BSA
- Citrat/fosfat buffer (pH 5,2)
- 1,0 μM 4- methylumbelliferone (4-MU)
- 1 mg/mL 4-MU (GlcNAc)₂
- Proteinløsning
- Fluorometer

Metode:

4,95 mL Citrat/fosfat buffer og 50 µL BSA ble blandet sammen til en arbeidsløsning. Tre paralleller for hvert enzym ble laget i tillegg til en blankprøve. 87 µL arbeidsløsning ble tilsatt 8 µL 4-MU (GlcNAc)₂ i et reagensrør. Deretter ble blankprøven tilsatt 5 µL arbeidsløsning mens de resterende rørene ble tilsatt 5 µL proteinløsning. Etter 10 minutter ble reaksjonene stoppet med 1,9 µL 0,2 M natriumkarbonatbuffer. Prøvene ble videre målt fluorometrisk med et fluorometer som ble kalibrert med 1,9 µl natriumkarbonatbuffer og 100 µl 4-methylumbelliferone. Gjennomsnittmålingene for hver enzymreaksjon ble brukt for å regne ut den spesifikke aktiviteten ved hjelp av likningen under:

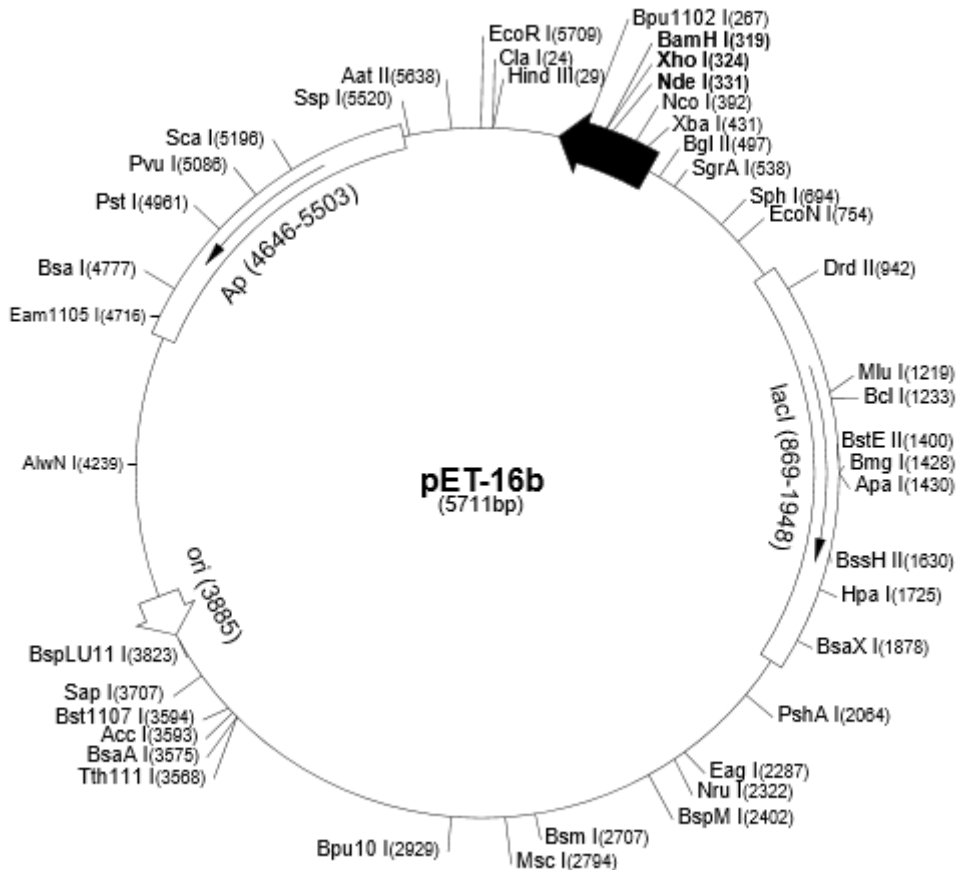
$$\left(vol (L) \times \frac{Gjennomsnittlig fluorescens}{10} \right) / Tid (min) / enzymvolum \times (mg/ml)$$

3.3 Optimalisering av proteinuttrykk

Proteinuttrykket henviser til den måten som proteiner syntetiseres, modifiseres og reguleres på i levende organismer. Dersom proteinuttrykket i cellene er lavt er det flere ulike faktorer som kan endres for å forbedre uttrykket. Dette inkluderer blant annet å benytte ulike spesialiserte vertstammer og vektorer og å endre vekstvilkårene med alternative næringsmedier, inkubasjonstider og temperaturer. (EMBL 2014b). På grunn av et lave proteinkonsentrasjoner var det ønskelig å optimalisere proteinuttrykket i ChiA og ChiB.

3.3.1 Polyhistidine Tag

En DNA sekvens med en tråd av seks til ti histidin residuer er ofte brukt i vektorer til produksjon av rekombinante proteiner. Resultatet av dette er en ekspresjon av et rekombinant protein med en poly-His-tag fusjonert til N- eller C-terminalen. De uttrykte His-taggede proteinene kan enkelt renses og detekteres fordi histidinhalen kan binde seg til flere typer metallioner som for eksempel nikkel, kobolt og kobber under bestemte bufferbetingelser. Nikkel viser høyest affinitet og selektivitet og er derfor mest foretrukket å bruke. Lengre His-tagger produserer en sterkere binding noe som fører til et renere produkt i elueringen. (Roche 2013). I denne oppgaven ble vektoren pET-16b benyttet (se figur 3.3). Denne inneholder en 10xHis tag. Ved å sette DNA fra ønsket kitinase inn i vektoren så vil 10xHis-taggen være på proteinet når det uttrykkes. His-Tag prosedyren ble gjort i samarbeid med post Doc Patrica Wildberger.



Figur 3.3: pET16b –vektor med kuttsete for XhoI i posisjon 324 og kuttsete for NdeI i posisjon 331. N-terminal 10xHis Tag i er ikke med i figuren med befinner seg mellom posisjonene 360 og 389 (Novagen 2014a)

3.3.2 Restriksjonskutting i pET-16b med NdeI og XhoI

For å kunne ligere den ønskede kitinasen sammen med pET-16b ble vektoren kuttet med restriksjonsenzymene NdeI og XhoI (se figur 3.3) NEBuffer 2 ble tilsatt for å sørge for at aktiviteten til restriksjonsenzymene er optimal (New England BioLabs inc 2014b). Bovine Serum Albumin (BSA) ble tilsatt fordi det inneholder restriksjonsenzymmer som forhindret adhesjon av enzymet til reaksjonsrør eller pipetter (New England BioLabs inc 2014a).

Materialer:

- Plasmid av pET-16b
- NdeI
- XhoI
- BSA
- NEBuffer 2

Metode:

I et eppendorfrør ble en kuttereksjon laget som beskrevet i tabell 3.6.

Tabell 3.6: Mengdeforholdet for ulike komponentene i restriksjonskuttingen av pET-16b vektoren ved hjelp av XhoI og NdeI.

Komponent	Volume [μ L]
NEBuffer 2	5
XhoI	2
NdeI	2
BSA	0,5
pET16b plasmid	33

Plasmidkonsentrasjonen var totalt 1 μ g, og reaksjonen ble inkubert i 2 timer ved 37 °C.

3.3.3 Analyse av DNA med agarose-gelelektroforese

Agarose-gelelektroforese er den enkleste og mest brukte måten for å separere og analysere DNA. Prøvene blir applisert i brønnene i agarosegelen og DNA-molekylene blir separert ved å påføre et elektrisk felt til den elektroforetiske anordningen. Glycerol innholdet i loadingbufferen sørger for at DNA-fragmentene synker ned i brønnene. De negativt ladde fosfatgruppene i DNA vil gjøre at fragmentene vil vandre gjennom porene i agarosegelen fra den negativt ladde anoden til den positive katoden. Kortere molekyler migrerer lettere og beveger seg raskere enn større molekyler (Edvotek 2003). Ved å sammenligne den restriksjonskuttete pET-16b vektoren med en kjent DNA størrelsesmarkør vil det være mulig å sjekke om det kuttete plasmidet er korrekt. DNA fragmentene visualiseres i UV lys ved tilsetning av et fargestoff. GelRed™ er brukt i denne oppgaven.

Materialer:

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

Metode:

Det ble laget en 1 % agarosegel bestående av 0,5 g agarose og 50 ml 1 x TAE buffer. Dette ble blandet i en erlenmeyerkolbe og varmet i en mikrobølgeovn til all agarose var løst opp. 1 µL GelRed ble blandet inn, og løsningen ble overført til et støpekar. En åtte brønners kam ble plassert i formen. Da gelen var stivnet ble kammen tatt ut. Gelen ble overført til et elektroforesekar med 1 x TAE buffer. 5 µl DNA ladder ble applisert i første brønn. 10 µL loadingbuffer ble tilsatt kuttereaksjonen før denne ble applisert i de neste brønnene. Elektroforesekarret ble koblet til en strømkilde med en stabil spenning på 90 V til DNA-fragmentene hadde vandret gjennom gelen. En UV lampe ble brukt for å visualisere DNA-fragmentene. DNA fragmentene med korrekt størrelse ble kuttet ut av gelen og overført til forhåndsveide eppendorfrør som ble oppbevart ved -20 °C.

3.3.4 Oppamplifisering av DNA med kuttsetter for NdeI og XhoI

Plasmidet til kitinasene måtte ha et kuttsete for både NdeI og XhoI for å kunne liggeres sammen med pET-16b vektoren. For å lage og oppamplifisere DNA som inneholder disse kuttsetene ble PCR benyttet. Primerne ble designet Anne Line Nordberg og er presentert i Subsite Energies FEBS Letters 2010 (Norberg et al. 2010). For å få et best mulig PCR resultat var det viktig at primeren var 18-25 baser lang med en T_m på mellom 58 og 65 °C og et GC innhold på 40-60 %. 5'-enden til primeren burde bestå av 15 baser som var homologe med vektoren DNAet skulle limes inn i og 3'-enden måtte passe med DNAer som skulle oppamplifiseres og burde ikke inneholde mer enn to guanin (G) eller to cytosin (C) residuer (Clontech Laboratories 2014). Primerne som ble benyttet er presentert i Tabell 3.7 3.7.

Tabell 3.7: Primerne som ble benyttet med kuttsete for NdeI og XhoI.

Kitinase	Primer	Sekvens (5' – 3')
ChiB D142N	Forward	TCGACATATGTCCACACGCAAAGCCGTTATT
	Reverse	CCCTCGAGTTACGCTACGCGGCCACCTT

Materialer:

- Plasmid fra ønsket kitinase
- Primer forward
- Primer reverse
- dNTP mix
- Phusion polymerase

3. Metdoder

- 5x Phusion HF buffer
- dH₂O

Metode:

Prøvereaksjonen i tabell 3.8 ble blandet i PCR rør på is. Phusion polymerase ble tilsatt like før PCR programmet i tabell 3.9 ble startet

Tabell 3.8: Prøvereaksjon for oppamplifisering av kitinase plasmid med kuttsetter for XhoI og NdeI.

Prøvereaksjon: Komponent	Volum [μL]	Endelig konsentrasjon
H ₂ O	39.5	
5x Phusion HF buffer	5	1x
10 mM dNTP mix	1	200 μM
Plasmid fra kitinase	1	100 ng/ μL
10 μM Primer fwd	2.5	0.5 μM
10 μM Primer rew	2.5	0.5 μM
Phusion polymerase	0.5	1 U

Tabell 3.9: PCR program med en gradient i hybridiseringstrinnet brukt ved oppamplifisering av kitinase DNA med kuttsetter for NdeI og XhoI.

Reaksjonstrinn	Antall sykluser	Temperatur	Tid
Oppvarming	1	110 °C	
Initiell denaturering	1	98 °C	30 sek
Denaturering	35	98 °C	10 sek
Hybridisering		72, 66 °C	30 sek
Forlengelse		72 °C	3 min
Endelig forlengelse	1	72 °C	7 min
Avkjøling	1	10 °C	

3.3.5 Analyse av DNA etter PCR reaksjon

Etter endt reaksjon ble PCR produktene analysert på en agarosegel som beskrevet i XX. DNA-fragment på rundt 1500 basepar ble kuttet ut av gelen og plassert i eppendorfrør som var veid på forhånd. Rørene ble oppbevart ved -20 °C

3.3.6 Rensing av kitinase-DNA og pET-16b DNA fra agarosegel

Før kitinasen ble ligert sammen med pET-16b vektoren var det nødvendig å rense DNA-fragmentene ut av gelen. For å få DNA-fragmentene fri for nukleotider, enzymer, salter og andre urenheter ble det benyttet et NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel 2014). I første trinn ble gelen varmet opp og oppløst i en bindingsbuffer. DNA-fragmentene ble deretter bundet til en NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kolonne. Kontamineringene ble fjernet med en etanolholdig buffer, før DNA-fragmentene til slutt ble eluert ut ved hjelp av en svak alkalisk buffer med lav ionestyrke (Macherey-Nagel 2014).

Materialer:

- Agarosegel med oppamplifisert kitinase DNA og restriksjonskuttet pET-16b
- NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit

Metode:

De ulike gelbitene ble veid, og det ble tilsatt 200 µL Buffer NTI for hver 100 mg agarosegel. Denne blandingen ble inkubert i et vannbad ved 50 °C og blandet med en vortex med jevne mellomrom til all gelen var løst i bufferen (cirka 10 minutter). 700 µL prøve ble tilsatt en NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kolonne som var plassert i et oppsamlingsrør. Dette ble sentrifugert i 30 sekunder ved 11 000 x g. Flow-through ble dekantert, og prosessen ble gjentatt til all den løste gelen var spunnet ned. Da ble 2 x 700 µL Buffer NT3 tilsatt og sentrifugert i 30 sekunder ved 11 000 x g. Flow-through ble dekantert etter hver gang. For å fjerne all Buffer NT3 ble kolonnen sentrifugert 1 minutt ved 11 000 x g før kolonnen ble satt i et rent eppendorfrør. Buffer NE ble varmet opp til 72 °C og 15 µl ble tilsatt kolonnen før den ble inkubert i 1 minutt ved romtemperatur. Eppendorfrøret med kolonnen sentrifugert i 1 minutt ved 11 000 x g. DNA konsentrasjonen ble målt som beskrevet i avsnitt 3.1.4. Det isolerte DNAet ble oppbevart ved - 20 °C.

3.3.6 Ligering av aktuelt kitinase-DNA med pET-16b

Ligeringen av kitinase-DNA og pET-16b ble gjort ved hjelp av In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech Laboratories 2014). Kitet inneholder et In-Fusion enzym som kan klonere en eller flere DNA-fragmenter samtidig i en enkelt reaksjon med en effektivitet på over 95 %.

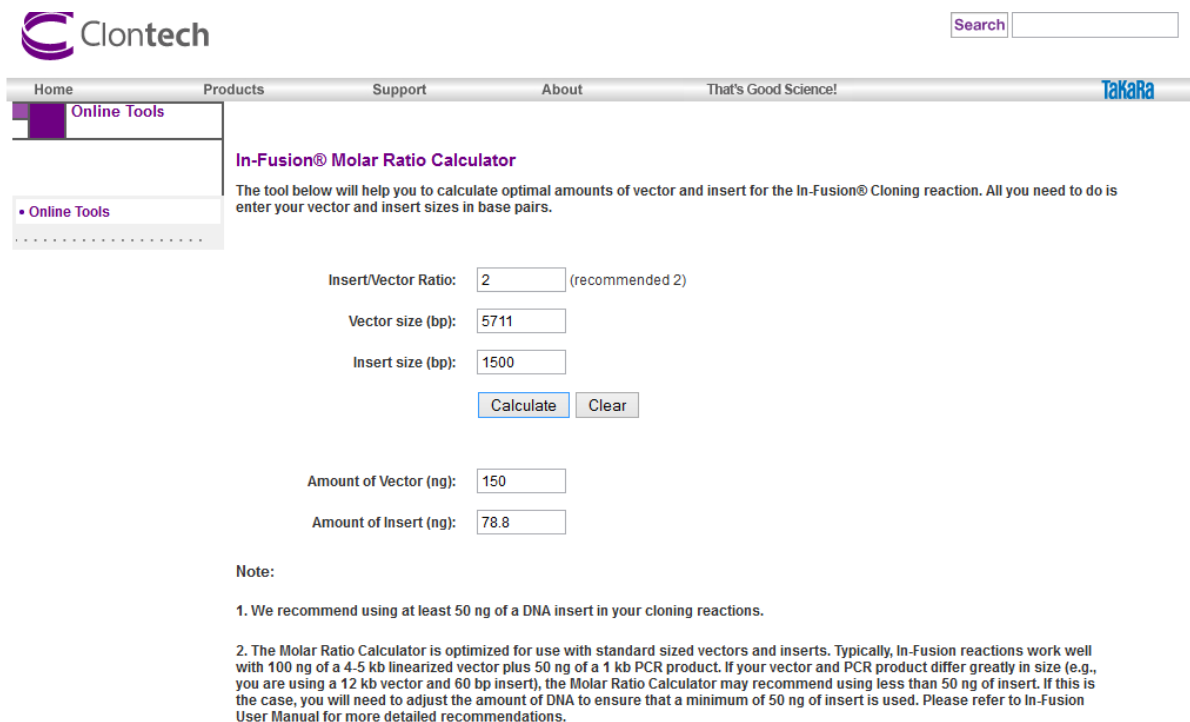
Enzymet gjenkjenner et 15 basepar overlapp på PCR-genererte sekvenser og lineære vektorer (Clontech 2014b). For å finne konsentrasjonen av vektoren og insertet som skulle adderes i reaksjonen ble en online In-Fusion® Molar Ratio Calculator benyttet (Clontech 2014a).

Materialer:

- In-Fusion® HD Cloning Kit
- pET-16b DNA kuttet med NdeI og XhoI
- Kitinase-DNA med kuttsetter for NdeI og XhoI

Metode:

Ved hjelp av In-Fusion® Molar Ratio kalkulatoren ble det bestemt at 150 ng pET16b DNA og 78,8 ng kitinaseDNA skulle blandes (figur 3.4).



Clontech

Home Products Support About That's Good Science! Takara

Online Tools

In-Fusion® Molar Ratio Calculator

The tool below will help you to calculate optimal amounts of vector and insert for the In-Fusion® Cloning reaction. All you need to do is enter your vector and insert sizes in base pairs.

Insert/Vector Ratio: (recommended 2)

Vector size (bp):

Insert size (bp):

Amount of Vector (ng):

Amount of Insert (ng):

Note:

1. We recommend using at least 50 ng of a DNA insert in your cloning reactions.
2. The Molar Ratio Calculator is optimized for use with standard sized vectors and inserts. Typically, In-Fusion reactions work well with 100 ng of a 4-5 kb linearized vector plus 50 ng of a 1 kb PCR product. If your vector and PCR product differ greatly in size (e.g., you are using a 12 kb vector and 60 bp insert), the Molar Ratio Calculator may recommend using less than 50 ng of insert. If this is the case, you will need to adjust the amount of DNA to ensure that a minimum of 50 ng of insert is used. Please refer to In-Fusion User Manual for more detailed recommendations.

Figur 3.4: Online In-Fusion® Molar Ratio Calculator med kalkulert vektor og insert konsentrasjon.

3. Metdoder

I hvert sitt eppendorfrør ble en ligeringsreaksjon, en positiv og en negativ kontrollreaksjon tillaget som vist i tabell 3.10.

Tabell 3.10: Ligerings- og kontroll reaksjonene ved bruk av In-Fusion® HD Cloning Kit.

Komponent	Kloningsreaksjon	Negativ kontroll	Positiv kontroll
Insert (kitinase DNA)	78,8 ng	0 µL	2 µL (2kb kontroll insert)
Vektor pET-16b	150 ng	1 µL (pUC19 kontroll vektor)	1 µL (pUC19 kontroll vektor)
5x In-fusion HD enzyme premix	2 µL	2 µL	2 µL
H ₂ O	Til 10 µL	7 µL	5 µL

Ligeringsreaksjonene ble inkubert i vannbad ved 50 °C i 15 minutter før de ble satt på is. Reaksjonene kan oppbevares ved -20 °C

3.3.7 Transformering av ligeringsprodukt i TOP10 superkompetente *E.coli* celler

Transformeringen ble utført som beskrevet i avsnitt 3.1.7. 2 µl ligeringsprodukt ble transformert inn i cellene.

3.3.8 Transformering av kitinaser i *E. coli* Rosetta 2™ (DE3)celler

ChiA wt og ChiB wt inneholder det sjeldne kodonet CCC som koder for prolin (se vedlegg 1)(NIH MBI 2003). Dette kodonet kan ikke transleres av BL 21 (DE3) celler. For å øke translaseffekten ble Rosetta 2™ (DE3) celler benyttet. Rosetta 2™ (DE3) cellene inneholder tRNA som koder for de sjeldent brukte kodon kombinasjonene i *E.coli* AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, og GGA. Dette gjør at Rosetta cellene sørger for å oversette en større andel av kodonene (EMBL 2014a). Rosetta celler er motstandsdyktige både for ampicillin og kloramfenikol, og dette tilsettes for unngå at andre celler vokser opp (Novagen 2004).

Materialer:

- Plasmid fra ønsket kitinase
- Rosetta 2™(DE3) celler
- S.O.C-medium
- LB agarplater med 100 µg/ml ampicillin og 50 µl/ml kloramfenikol

Metode:

Plasmid fra ønsket kitinase ble isolert slik som beskrevet i avsnitt 3.1.3. Røret med 50 µl Rosetta 2™(DE3)celler ble tint forsiktig på is. Mellom 100 og 200 ng plasmid ble tilsatt cellene. Løsningen ble blandet forsiktig og inkubert på is i 30 minutter. Reaksjonene ble deretter varmebehandlet i 30 sekunder ved 42 °C før de ble avkjølt på is i 2 minutter. S.O.C-mediet var forvarmet til 42 °C før det ble tilsatt 250 µl til hver reaksjon. Reaksjonene ble inkubert ved 37 °C og 200 rpm i en time. Etter inkubasjonen ble henholdsvis 20 og 250 µl av cellekulturen platet ut på to LB-plater med 100 µg/ml ampicillin og 50 µg/ml kloramfenikol. Platene ble inkubert ved 37 °C over natt.

3.3.9 Oppdyrking av Rosetta 2™(DE3) transformanter

Dette ble utført på samme måte som beskrevet i avsnitt 3.1.8. Det ble også laget frysestock av Rosetta 2™(DE3) transformantene slik som beskrevet i avsnitt 3.1.13.

3.3.10 Overeksposisjon av kitinaser i Rosetta 2™(DE3) *E. coli* celler

For å få forbedre proteinuttrykket ble oppdyrkingen av kitinasene startet med en forkultur. Ved å tilføre like mengder av forkulturen til hovedkulturen hver gang, vil cellene ha en mer lik vekstkurve og prosedyren være mer reproducerbar. En forkultur vil også hindre overvekst av hovedkulturen, og det vil være lettere å anslå når OD har nådd et bestemt nivå. OD måles i et spektrofotometer hvor hovedprinsippet er at det meste av lyset blir spredt av cellene slik at lyset ikke når den fotoelektriske cellen. Dette gjør at det elektriske signalet blir svakere sammenlignet med en blank prøve, og dette signalet blir konvertert til en OD verdi. Tallet 600 refererer til bølgelengden i nm (W. Friedrich 2007). *E. coli* celler har eksponentiell vekst og veksten er beregnet til å avta når OD₆₀₀ er mellom 0,6 og 1,0 (Sezonov et al. 2007). Rosetta 2™(DE3)cellene inneholder DE3 lysogen som har genet for T7 RNA-polymerase under kontroll av lac UV5-promotoren.

IPTG er nødvendig for inducere ekspresjon av T7 RNA-polymerase (Life Technologies 2014c). IPTG binder seg til lac repressoren og frigjør lac repressoren fra lac-operatoren, noe som fører til transkripsjon av genene i lac operonet (Life Technologies 2014b). Anbefalt IPTG mengde er mellom 0.05 -2.0 mM for T7 promotoren. Etter induseringen senkes temperaturen og cellene vil ikke vokse like raskt, men de vil bruke de fleste av sine ressurser på fremstilling av målproteinet (EMBL 2014a). For å øke næringsgrunnlaget ble Terrific Broth (TB) mediet benyttet som har et høyere innhold av gjær enn LB-mediet.

Materialer:

- TB-medium
- Ampicillin (115 mg/ml)
- Kloramfenikol (50 mg/ml)
- Frysestock med Rosetta 2TM (DE3)
- 1 M IPTG

Metode:

En forkultur ble startet med 50 ml TB-medie, 50 µl ampicillin og 50 µl kloramfenikol i en 250 ml dyrkningskolbe. Hver kolbe ble inokulert med celler fra bestemte frysestocker. Kolbene ble inkubert ved 200 rpm og 37 °C over natt (~15 timer).

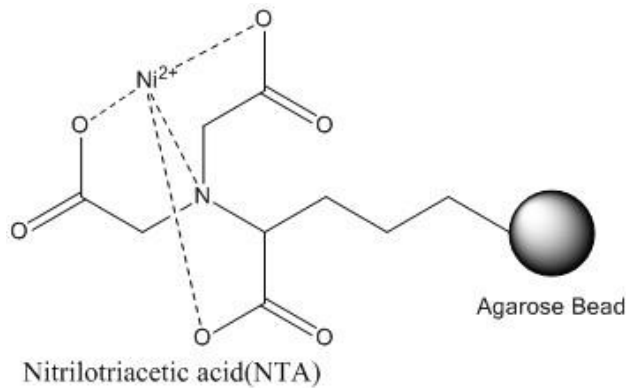
250 ml TB-medium og ble tilsatt i dyrkningskolber med 250 µl ampicillin. OD₆₀₀ ble målt på forkulturen og x ml ble tilsatt slik at OD₆₀₀ på hoved kulturen ble 0,1. Dyrkningskolbene ble inkubert ved 200 rpm og 37 °C til hoved kulturen hadde en OD₆₀₀ mellom 0,7 og 1,0. Da ble 25 µl IPTG, 250 µl ampicillin og 250 µl kloramfenikol tilsatt. Cellekulturene ble inkubert ved 200 rpm og 22 °C over natt (~15 timer).

3.3.11 Tillaging av periplasmatisk - og cytoplasmatisk ekstrakt

Av overnatt kulturen ble periplasmatisk - og cytoplasmatisk laget som i henholdsvis avsnitt 3.2.2 og 3.2.3.

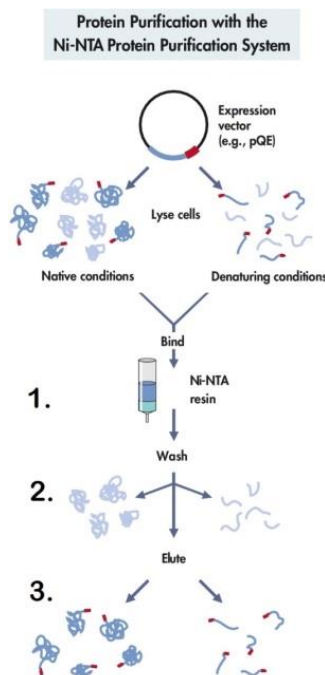
3.3.12 Kromatografisk rensing av proteiner med pET-16b vektor med bruk av nikkel – nitrilotrieddiksyre (Ni – NTA) agarose

His-taggede proteiner med pET16b vektor har en effektiv bindingskapasitet til nikkel, og det brukes derfor et kolonnemateriale med Nikkel -NTA agarose kuler ved rensing. Agarosen er derivatisert av NTA som er en chelator som immobiliserer det toverdige nikkel ionet og som dermed fungerer som en ligand for binding av His-tagget protein (figur 3.5).



Figur 3.5: Strukturoversikt over en Nikkel nitrilotrieddiksyre (Ni – NTA) agarose kule (ECPlaza 2014).

Dette er også kjent som immobilisert metall affinitetskromatografi (IMAC). Ni -NTA Agarosen ligger i en Sepharose CL - 6B matrix og har en bindingskapasitet på opp til 50 mg/ml. Rensing av His –taggede proteiner består av tre stadier etter lysing av cellen; binding, vasking og eluering (figur 3.6) (Qiagen 2013).



Figur 3.6: De ulike trinnene ved affinitets kromatografi med Ni-NTA kolonne. 1: Proteiner med His tag binder seg til Ni-NTA kolonnen. 2: Proteiner og andre kontamineringer uten His tag vaskes ut. 3: Økt imidazole konsentrasjon eluerer ut proteinene med His tag (Qiagen 2013).

Materialer

- Buffer A: 20 mM Imidazole, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,0
- Buffer B: 250 mM Imidazole, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,0
- Periplasmatisk- / cytoplasmatisk ekstrakt
- Kolonnemateriale: nikkell – nitrilotrieddiksyre (Ni – NTA) agarose
- 20 % Etanol
- 0,5 M NaOH

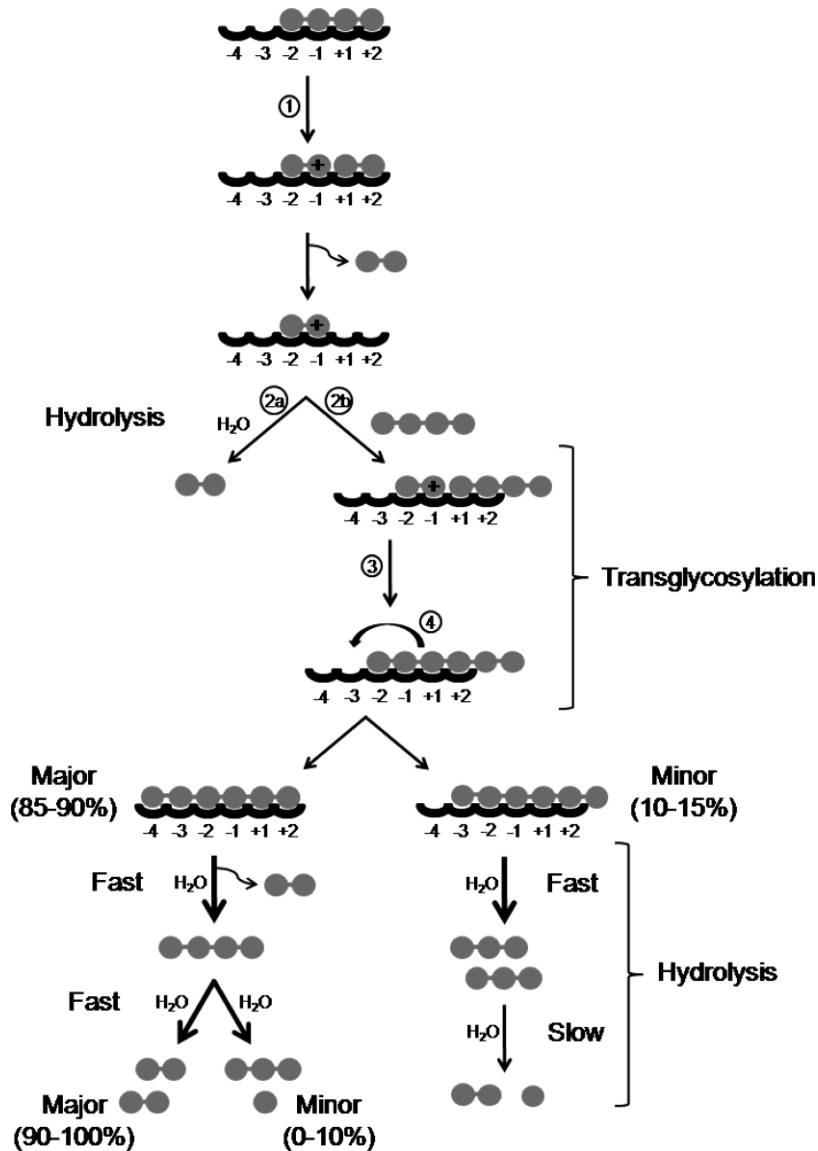
Metode:

15 mL Ni-NTA agarose ble pakket i en kolonne. Buffer A ble påsatt med en flow på 2,5 mL/min til baselinjen ble stabil. Kolonnematerialet kan inneholde ulike konserveringsmidler og Buffer A vil dermed veske ut disse. Det periplasmatiske/ cytoplasmatiske ekstraktet ble applisert på kolonnen. Kolonnen ble igjen vasket med buffer A til baselinjen ble stabil. Deretter ble buffer B ble da påsatt, og proteinet ble eluert og samlet opp. Dersom det skulle flere rensinger skulle ble foretatt ble Buffer A tilsatt til baselinjen ble stabil. Systemet ble til slutt vasket med 20 % etanol og 0,5 M NaOH.

Proteinelueringen ble kontrollert på SDS gel som beskrevet i avsnitt 3.2.5 og oppkonsentrert som beskrevet i avsnitt 3.2.6. Proteinkonsentrasjonen og den spesifikke aktiviteten ble målt som beskrevet i henholdsvis avsnitt 3.2.7 og 3.2.8.

3.4 Transglykosylering

Som tidligere nevnt har kitinaser i familie 18 vist transglykosylerende egenskaper ved å danne nye glykosidbindinger mellom donor -og akseptor sakkarider. Dersom enzymene er i stand til katalyserte transglykosylerings reaksjoner, ville dette danne oligosakkaridkjeder som er lenger enn utgangssubstratet. Sluttproduktet ved hydrolyserings reaksjoner for kitinaser er (GlcNAc)₂, mens transglykosylerings reaksjoner vil kunne produsere (GlcNAc)₃ (se figur 3.7). Konsentrasjonen av (GlcNAc)₃, vil derfor være en underestimert indikasjon på at transglykosylering har funnet sted (Zakariassen et al. 2011).



Figur 3.7: Interaksjon av (GlcNAc)₄ med det aktive setet i ChiA. 1) Det produktive bindings utbyttet er en dimer oxazolinium ion i subsetet -2 og -1. 2a) Angrep av et vannmolekyl frigir et hydrolysert sukker. 2b) Transglykosylering reaksjonen finner sted når en ny (GlcNAc)₄ favoriseres og danner en (GlcNAc)₆ med oxazolinium ionet. 3 og 4) (GlcNAc)₆ kan binder hovedsakelig (major) fra subsetet -4 til +2, men kan også starte bindingen i -3 til +3 (minor). Her finner en ny transglykosylering sted som fører til fremstilling av et lengre oligosakkarid eller en hydrolyse av substratet. Produktene ved hydrolysering er henholdsvis (GlcNAc)₄ og (GlcNAc)₂ og 2 x (GlcNAc)₃ som igjen hydrolyseres videre (Zakariassen et al. 2011)

3.4.1 Transglykosylerings assay:

For å studere disse egenskapene til de ulike mutantene i tabell 3.11 ble det gjennomført et transglykosylerings assay. Human chitotriosidase (HCHT) er en familie 18 kitinase som har egenskaper som viser et høyt transglykosylerende potensial. I humane makrofager syntetiseres og utskilles HCHT i to varianter med to ulike størrelser, henholdsvis 50 og 39 kDa (Eide et al. 2013). I denne oppgaven ble HCHT med en molekylvekt på 39 kDa benyttet.

3. Metdoder

For å stoppe enzymreaksjonene ble pH senket ved bruk av H₂SO₄ etter bestemte tidsintervaller og resultatene ble tolket ved hjelp av High Performance Liquid Chromotography (HPLC) og/eller Matrix- assisted laser desorption ionization Time-of-flight (MALDI-TOF).

Tabell 3. 11: Oversikt over enzymene som ble benyttet i transglykosylerings assayet.

Enzym
ChiA wt
ChiA F396W
ChiA D313N/F396W
ChiB wt
ChiB Y214F
ChiB R294A
HCHT

Materialer:

- Buffer: 20 mM Ammoniumacetat pH 6.1
- BSA 1 mg/ml
- Substrat: 1 mM A4
- 20 mM H₂SO₄
- Oppkonsentrerte enzymer
- 15 mg/ml 2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB) i 30 % Acetonitrile (AcN)
- MALDI plate

Metode:

En løsning med 1 mM A4 ble tillaget med 10 µl BSA og buffer. Løsningen ble inkubert ved 37 °C og 300 rpm i en thermomixer. Etter 10 minutter preinkubering ble 75 µl blank prøve tatt ut og stoppet med 75 µl H₂SO₄ i en 96-brønners plate. 1 µl ble også tatt ut og stoppet i 1 µl DHB løsning direkte på MALDI-platen. Deretter ble oppkonsentrert enzym tilsatt til en sluttkonsentrasjon lik 3 µM. Det ble videre tatt ut prøver, som for nullprøven, etter 0.5, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40, 60 og 90 minutter til HPLC og etter 1, 3, 6, 11, 21, 31, 41, 61, 91 og 121 minutter til MALDI. HPLC prøvene ble lagret ved -20 °C frem til analyse mens MALDI platen ble oppbevart i romtemperatur.

3.4.2 High Performance Liquid Chromotography (HPLC)

High Performance Liquid Chromotography (HPLC) er en kromatografisk teknikk som anvendes for å separere, identifisere og kvantifisere komponenter i en blanding ved å benytte høyt trykk og høy temperatur. Det finnes ulike kromatografiske prosesser for å separere forskjellige komponenter. For å separere ioner i en løsning, benyttes ionebytterkromatografi. Metoden baseres på at ulike komponenter har ulik affinitet til kolonnematerialet, noe som fører til at komponentene vil elueres ved ulik tid. En pumpe sørger for at det trykksatte løsningsmiddelet passerer en kolonne med et fast adsorberende materiale (Miller M. James 2009). Det ble benyttet en Rezex RFQ-Fast Fruit H+ kolonne i HPLC analysene. Kolonnematerialet består av kryssbundet styrene-divinyl benzene (SDVB) som har en negativ ladning (Phenomenex Rezex 2014). De ulike GlcNAc forbindelsene mottar et proton fra mobilfasen (H_2SO_4) og får en positiv ladning. Forbindelsene vil dermed interagere med SDVB. De ulike komponentene vil ha forskjellig interaksjon med kolonnematerialet og vil ved isokratisk eluering elueres på ulike tidspunkt.

Materialer:

- Mobilfase: 5 mM H_2SO_4
- Forkolonne: Carbo-H 4 x 3,0mm
- Kolonne: Rezex RFQ-Fast Fruit H+ 7,8 x 100mm
- Standarder:
 - Standard 1: 300 μ M A1, 2000 μ M A2, 300 μ M A3, 1000 μ M A4
 - Standard 2: 100 μ M A1, 750 μ M A2, 100 μ M A3, 500 μ M A4
 - Standard 3: 50 μ M A1, 50 μ M A2, 50 μ M A3, 50 μ M A4

Metode:

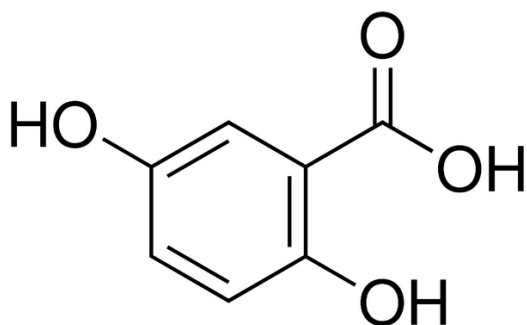
8 μ L prøve ble injisert på kolonnen ved hjelp av en auto injektor. Kitoooligosakkaridene ble eluert isokratisk ved 85 °C og en flow lik 1 mL/min. Deteksjonen av kitoooligosakkaridene ble gjort i en UV- detektor ved 195 nm. For å analysere kromatogrammene ble programvaren Chromeleon 7 brukt. Konsentrasjonen mono-, di-, tri- og tetramer i de ulike prøvene ble bestemt ved å sammenligne med kjente standarder. Dette ble gjort ved hjelp av programvaren Chromeleon 7.

3.4.3 Databehandling av HPLC resultater med Chromeleon 7

Programvaren Chromeleon 7 ble benyttet for å behandle dataresultatene fra HPLC. Fraksjonene fra HPLC kjøringen ble eluert ut i individuelle topper etter gitte retensjonstider. De ulike toppene representerte A1, A2, A3 og A4. Det ble laget en kalibreringskurve av de kjente standardene og arealet under toppene og konsentrasjon i μM ble beregnet av programvaren. Konsentrasjonen av A3 ble sammenlignet for alle mutantene og villtypen.

3.4.4 Matrix- assisted laser desorption ionization (MALDI) Time of flight (TOF)

Et massespektrometer brukes for å bestemme atomers og molekylers struktur, masse og konsentrasjon. Det finnes mange ulike massespektrometre, men felles for dem alle er at de består av en ionekilde, en masseanalysator og en detektor som er knyttet til et datasystem. I denne oppgaven ble Matrix- assisted laser desorption ionization (MALDI) brukt som ionekilde og Time-of-flight (TOF) som masseanalysator. MALDI er en myk ioniseringsteknikk som er nyttig å bruke når store biologiske molekyler skal analyseres, fordi ioniseringen i liten grad vil fragmentere molekylet. MALDI utføres i to steg. Først løses analytten i en løsning med små organiske molekyler – en matrix. Denne blandingen påføres en MALDI-plate som settes inn i et massespektrometer i vakuum betingelser. Matrixen pulseres med en laser og matriksen absorberer energi som blir overført til analyttene i prøven. Analyttene ioniseres og analyseres av masseanalysatoren (Hoffmann & Stroobant 2011). Matrixen som ble brukt i denne oppgaven var 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) (se figur 3.8) som er en god MALDI matrix for både proteiner og karbohydrater. Den absorberes med λ_{max} på 337 og 355 nm og vil ioniseres lett (ProteoChem 2014).



Figur 3.8: Struktur av 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) matrix (ProteoChem 2014).

Masseanalysatoren TOF separerer de ulike ionene i en «flight tube» der masse over ladning (m/z) bestemmes ved hjelp av en tidsmåling over en kjent avstand. Ionene blir akselerert av et elektrisk felt med en kjent styrke. Akselerasjonen resulterer i at ioner som har samme kinetiske energi har den samme ladningen. Tiden det tar før ionene treffer detektoren er avhengig av partikkelens størrelse. Lette partikler vil ha en høy hastighet, mens tyngre partikler kommer med lavere hastigheter (Hoffmann & Stroobant 2011).

Materialer:

- MALDI plate med enzymfraksjoner fra 3.4.1
- Kitoooligosakkaridstandard (GlcNAc)₂-(GlcNAc)₆.

Metode:

1 μ l (GlcNAc)₂-(GlcNAc)₆ standard ble påført MALDI-platen og brukt for kalibrering av de gitte oligosakkaridene. Hver prøve ble skutt på av laseren 1000 ganger styrke på cirka 35 %. Programvaren FlexControl 2.4 ble brukt for analysen.

3.4.5 Databehandling med FlexControl 2.4

For å behandle de resultatene fra MALDI-TOF ble FlexControl 2.4 benyttet. M/Z for hver topp i massespekteret ble bestemt før toppene ble annotert, det vil si at massene ble sammenlignet med teoretiske masser slik at det ble bestemt hvilke oligomerer som var tilstede.

3.5 Hydrolyse av (GlcNAc)₆

(GlcNAc)₆ er det første produktet som blir dannet ved transglykolysering. Nedbrytningen av (GlcNAc)₆ med kitinase gir opplysninger om hydrolyserings preferanser for substratet, der substratet enten kan binde seg i subsete -3 til +3 som fører til produksjon to trimerer, eller i subsete -2 til +4 som fører til produksjon av en dimer og en tetramer. Dette ble gjort for å undersøke hvor mye (GlcNAc)₃ som ble dannet, i og med at dette er en indikasjon på transglykosylering. Nedbrytningsreaksjonene ble analysert ved hjelp av HPLC.

Materialer:

- Buffer: 20 mM Ammoniumacetat pH 6.1
- BSA 1 mg/ml
- Substrat: 150 nM A6
- 20 mM H₂SO₄
- Oppkonsentrert enzym ChiB Y214F
- Standarder: 150 µM A6, 50 µM A6 og standard 1-3 fra avsnitt 3.4.2

Metode:

En løsning med 1 mM A6 ble tillaget med 10 µl BSA og buffer. Løsningen ble inkubert ved 37 °C og 300 rpm i en thermomixer. Etter 10 minutter preinkubering ble 75 µl blank prøve tatt ut og stoppet med 75 µl H₂SO₄ i en 96-brønners plate. Deretter ble oppkonsentrert enzym tilsatt til en sluttkonsentrasjon lik 10 µM. Det ble videre tatt ut prøver, som for nullprøven etter 0.5, 1, 2, 3, 5, 10, 15 minutter til HPLC. Prøvene ble lagret ved -20 °C frem til analyse. Resultatene ble behandlet i Chromeleon 7 som beskrevet i avsnitt 3.4.3

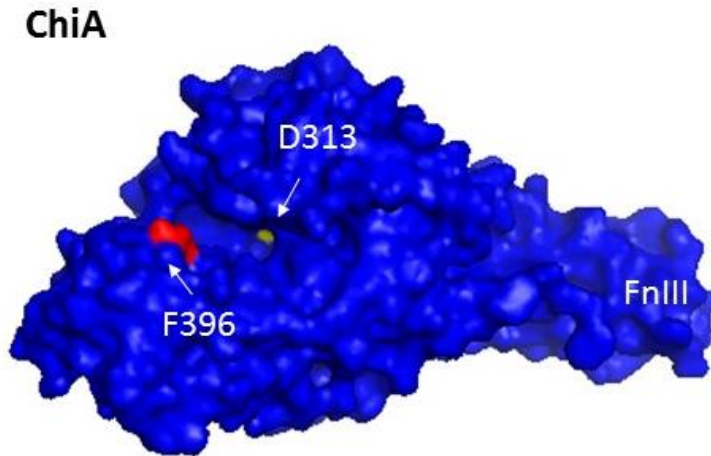
4. Resultat og diskusjon

Det overordnede målet med oppgaven var som tidligere nevnt å undersøke transglykosylerings effekten til ulike muterte kitinaser fra *Serratia marcescens*. I tillegg ble det gjort ulike studier for å forsøke å forbedre protein uttrykket.

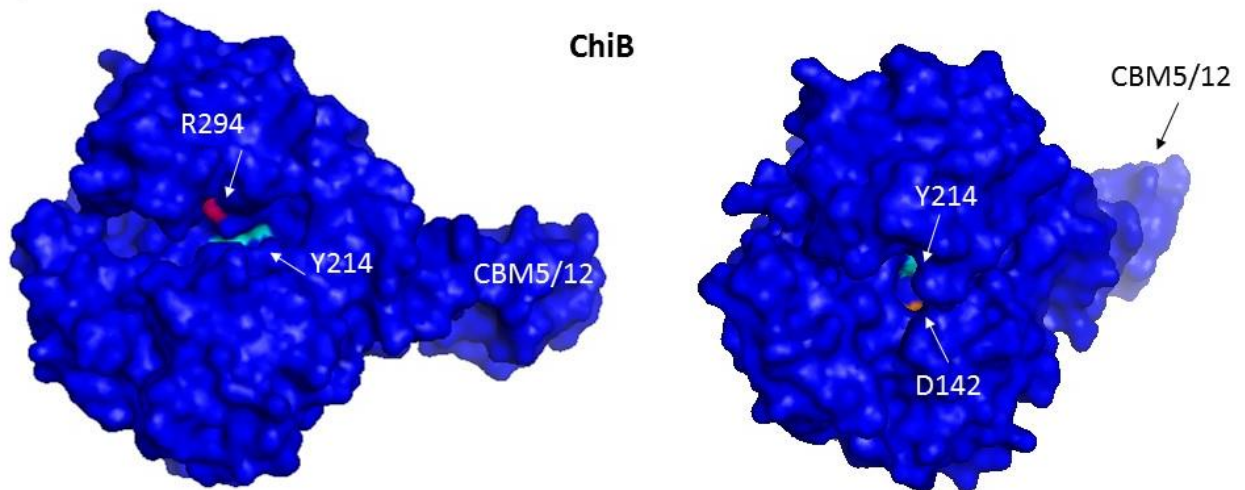
4.1 Valg av mutanter

En mulig optimalisering av transglykosylerings utbyttet til kitinasene kan oppnås ved å anvende betingelser som minimerer det hydrolytiske produktet og/eller maksimerer enzymenes tendens til å binde til en sukkerakseptor i stedet for vann. Dette medfører at en sterk binding til akseptor vil kunne favorisere transglykosylering (Zakariassen et al. 2011). Det ble derfor benyttet mutanter som har en antatt betydelig rolle innen stabilisering og binding i den substratassisterte mekanismen beskrevet i avsnitt 1.4.1.2. Det er også tidligere vist at aromatiske residuer i det aktive setet er med på å styre de transglykosylerende egenskapene. De ulike mutantene som ble benyttet i oppgaven står oppført i tabell 3.11.

ChiB D142 og ChiA D313 har en viktig rolle i forhold til stabiliseringen av N-acetylgruppen i -1 sukkeret under den substratassisterte mekanismen. ChiB Y214 har også en viktig rolle i posisjoneringen av N-acetyl gruppen i -1 sukkeret da residuet fremmer det nukleofile angrepet på det anomere karbonet (Synstad et al. 2004). R294 har vist sterk binding til substratet og danner hydrogenbinding med karbonyloksygenet på N-acetylgruppen i +1 sukkeret. F396 er en aromatisk aminosyre som er viktig både for initiell binding av substratet (Zakariassen 2011) samt produktdissosiasjon (Schaupp 2014). En mer detaljert beskrivelse av de muterte residuene er presentert i avsnittene 4.1.1 til 4.1.4. En modell av strukturene med aktuelle residuer markert vises i figur 4.1 (ChiA) og i 4.2 (ChiB).



Figur 4.1: Overflatestrukturen til ChiA hvor aktuelle aminosyrer er markert. D313 er markert gult og F396 er markert rødt.



Figur 4.2: Overflatestrukturen til ChiB hvor aktuelle aminosyrer er markert. R294 er markert rosa, Y214 er markert lyseblå og D142 er markert orange.

4.1.1 ChiA F396W

Fenylalanin (Phe/F) i posisjon 396 i aminosyresekvensen til ChiA er plassert i subsete +2. Dette residuet ble mutert til tryptofan (Trp/W) for å øke den aromatiske overflaten til enzymet slik at interaksjonen med innkommende sukkerakseptorer skulle bli økt i aminosyresekvensen til ChiA i subsete +2. Phe ble mutert til tryptofan (Trp/W) for å øke den aromatiske overflaten til enzymet for å få en økt interaksjon av innkommende sukkerakseptorer (Zakariassen et al. 2011).

4.1.2 ChiA D313N og ChiB D142N

Asparbinsyre (Asp/D) i posisjon 313 i aminosyresekvensen til ChiA og posisjon 142 i ChiB er plassert subsete -1. Asp 313/142 påvirker stabiliseringen av oxazoliniumionintermediatet sin interaksjon med acetamidogruppen på karbon nummer 6 i -1 sukkeret. Asp 313/142 stabiliserer og posisjonerer også den katalytiske syren som aktiverer det katalytiske vannmolekylet. Kvantemekaniske beregninger har vist at mutering fra Asp til Asparagin (Asn/N) fører til en endring i elektrostatikken i det aktive setet noe som kan føre til lavere hydrostabilitet av oxazoliniumionet (Jitonnom et al. 2011). Dette kan øke sannsynligheten for å bli angrepet av et innkommende sukker i stedet for vann (Zakariassen 2011).

4.1.3 ChiB Y214F

Tyrosin (Tyr/Y) i posisjon 214 i aminosyresekvensen til ChiB er plassert i subsete -1. Tyr 214 er med på å stabilisere båtkonformasjonen hos sukker og oxazoliniumionintermediat. Tyr ble mutert til fenylalanin. Denne mutasjonen fører til at færre hydrogenbindinger blir dannet med hydrolytisk vann, noe som kan være en faktor som bidrar til økt transglykosylerings aktivitet (Vaaje-Kolstad et al. 2013; Zakariassen 2011).

4.1.4. ChiB R294A

Arginin (Arg/R) i posisjon 294 er en polar aminosyre i plassert i subsete +1. Tilstedeværelsen av en sterk salt bro mellom R294 og D215 fører til en lav pKa verdi for D215 som er viktig for den katalytiske syren (Synstad et al. 2004). Arg ble mutert til Alanin (Ala/A), og tidligere studier har vist at denne mutasjonen reduserer den hydrolytiske evnen og forbedrer transglykosylerings effekten (Madhuprakash et al. 2012).

4.2 Sekvensering av mutanter

Som nevnt i avsnitt 3.1.10 ble det muterte plasmidet sendt til GATC Biotech i Tyskland for sekvensering. Sekvensene fra GATC Biotech ble analysert i Clustal Omega (EMBL-EBI 2014). Villtypesekvensen ble sammenlignet med de muterte sekvensene. Likheter i sekvensen ble markert med en stjerne og ulikheter uten stjerne. Sekvensene skal være identiske bortsett der mutasjonen forekommer.

4.2.1 ChiB D142N

Etter mutering av D142N ble plasmid fra 4 transformanter sendt til sekvensering (benevnes 78, 79, 80 og 81). Sekvensene vises i vedlegg 2 og riktig mutasjon er markert i gult. Som det vises i vedlegget hadde alle sekvensene riktig mutasjon. Det ble valgt å arbeide videre med nummer 79, men i ettertid kom det frem at mutanten hadde feilaktig sekvens etter mutasjonspunktet. Dette er markert blått og fikk store konsekvenser for videre mutering.

4.2.2 ChiB D142N/Y214F

Etter mutering av D142N/Y214F ble plasmid fra 4 transformanter sendt til sekvensering. En av sekvensene vises i vedlegg 3 sammenlignet med sekvensen til ChiB wt. Mutasjonene er markert i gult og et ukjent insert er markert rødt. Det feilaktige ChiB D142N templatet kan være årsaken til dette ukjente insertet. ChiB D142N/Y214F ble derfor ikke brukt i de videre forsøkene.

4.2.3 ChiB D142N/R294A

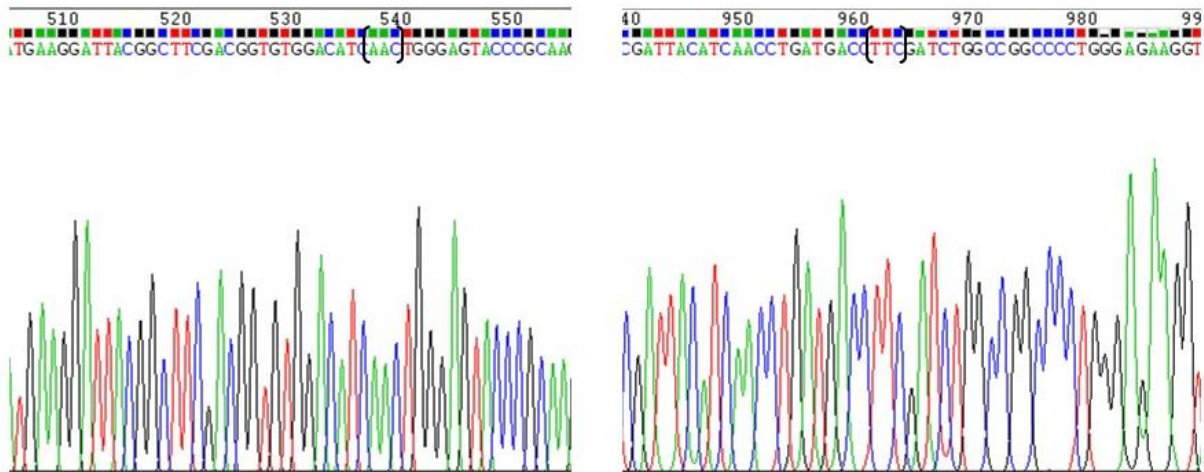
Etter mutering av D142N/Y214F ble plasmid fra 4 transformanter sendt til sekvensering. En av sekvensene vises i vedlegg 4 sammenlignet med sekvensen til ChiB wt. Mutasjonene er markert gult og et ukjent insert er markert rødt. Rødt 300 nukleotider etter det ukjente insertet stopper DNA sekvensen. Dette er markert grønt og er årsaken til at R294A mutasjonen som er markert lilla, ikke er tilstede. Det ukjente insertet har store likheter med det ukjente insertet i D142N/Y214F sekvensen, hvilket forsterker teorien om at det er ChiB D142N templatet som forårsaker dette.

4.2.4 ChiB D142N - Ny mutasjon

Etter ny mutering av D142N ble plasmid fra 3 transformanter sendt til sekvensering (benevnes 06,07 og 08). Sekvensene vises i vedlegg 5. Mutasjonene er markert gult. Hele sekvensen er korrekt for alle tre. ChiB D142N ble overuttrykt og rensset, men templatet ble ikke brukt til videre mutasjoner på grunn av tidsmangel.

4.2.5 Chromas

De ulike sekvensene ble også kontrollert i Chromas, og et eksempel er vist i figur 4.3 for sekvensen til ChiB D142N/Y214F.. Her er GAC (D) mutert til AAC (N) i posisjon 142 og TAC (Y) mutert til TTC(F) i posisjon 214. En topp representer et nukleotid og sekvensen har en god kvalitet dersom toppene i sekvensdiagrammet har like avstander for hvert nukleotid og er skarpe.

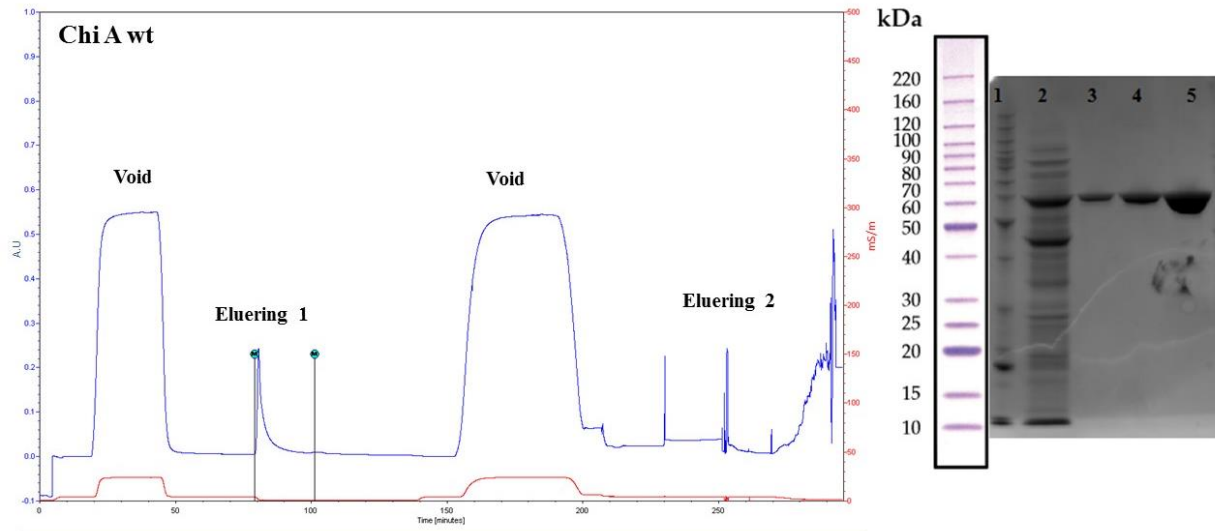


Figur 4.3: Sekvenseringsdiagram for ChiB D142N/Y214F ved bruk av programvaren Chomas. T7 primeren ble benyttet under sekvensering. Mutasjonene AAC (D142N) og TTC (Y214F) er markert i sekvensoversikten. Det ukjente insertet gjør at TTC har en høyere plassering i nukleotidsekvensen enn posisjon 214.

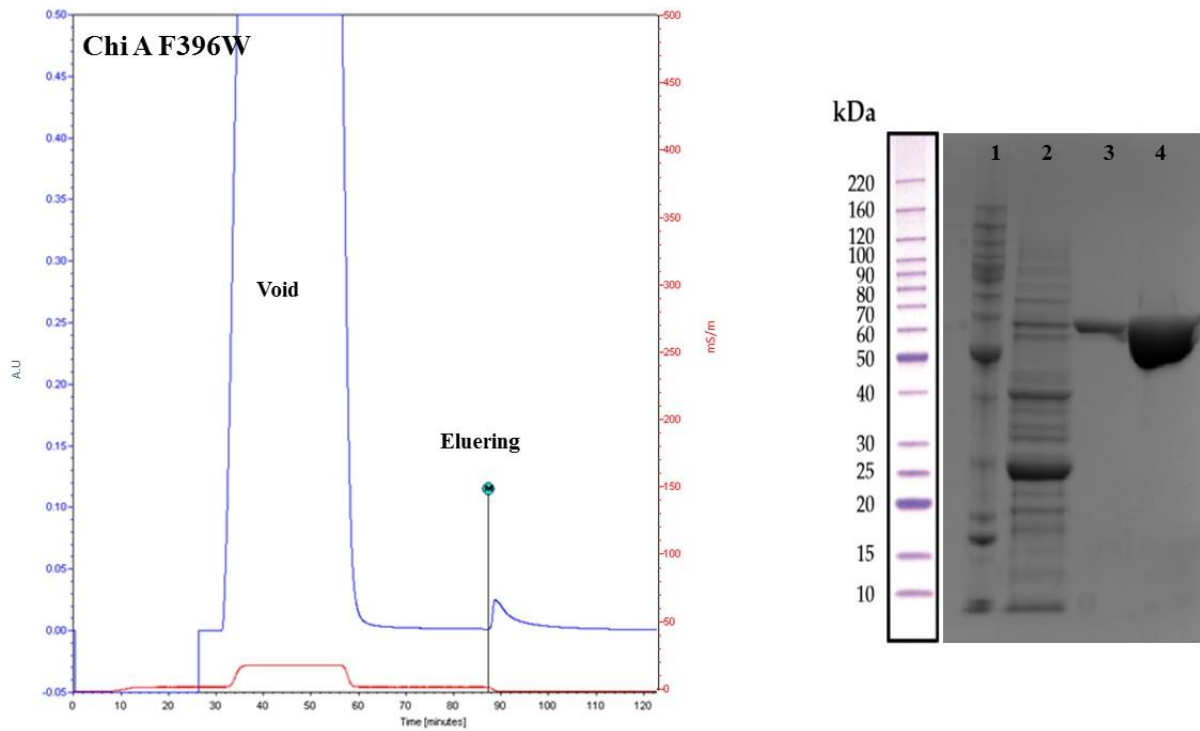
4.3 Rensing av mutanter på kitinkuler

De ulike enzymene som var klonet inn i pMay2-10 vektor ble rensset på kitinkuler som beskrevet i avsnitt 3.2.4. Kromatogrammene fra rensingene vises i figur 4.4 til 4.10. Voidtoppene inneholder ulike proteiner og komponenter fra det periplasmatiske ekstraktet mens elueringsstoppene inneholder ønsket protein. Det periplasmatiske produktet, elueringsproduktene og det oppkonsentrerte produktet ble kontrollert med SDS-PAGE som beskrevet i avsnitt 3.2.5. Som tidligere nevnt har ChiA og ChiB en molekylvekt på henholdsvis 58,4 og 55,4 kDa. Mutantene vil ha tilnærmet samme størrelse. Ved å sammenligne båndene i prøvene med en proteinladder med kjente størrelser kunne det bekreftes om proteiner med riktig størrelse var tilstede. Figur av BenchMark™ protein ladder ble hentet fra Life Technologies som viser disse kjente størrelsene for proteinladder på SDS-PAGE (Life Technologies 2014a). Rensingen på kitinkolonner gav meget rene produkter etter oppkonsentreringen, men ikke alle proteinene var like godt uttrykt i periplasmaen (se figur 4.4 til 4.10).

4. Resultat og diskusjon

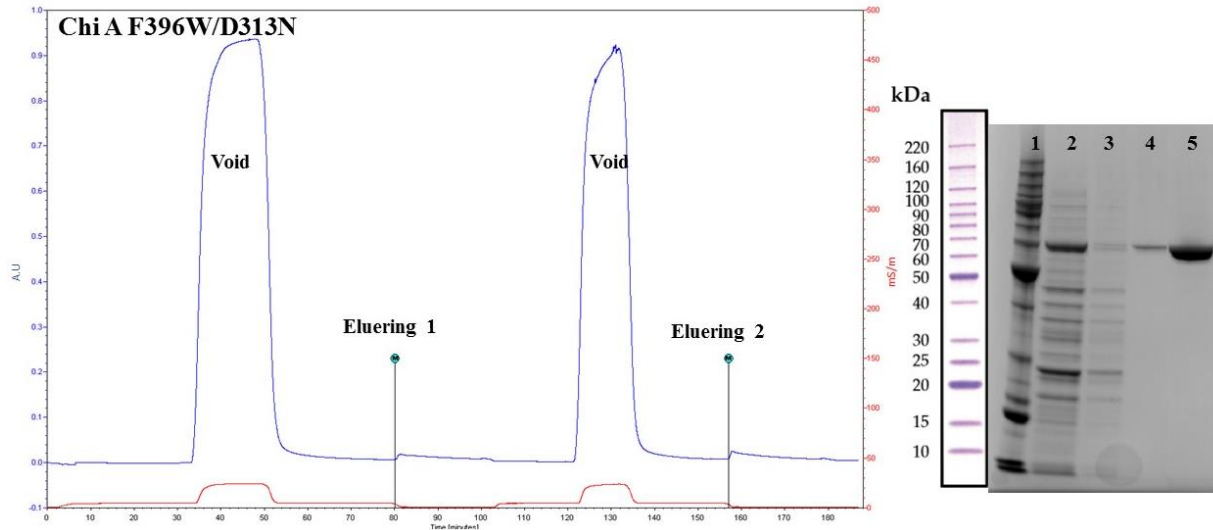


Figur 4.4: Kromatogram og SDS-PAGE gel av ChiA villtype klonet inn i pMay2-10 vektor, uttrykt i *E.coli* BL21 StarTM (DE3) celler og dyrket i LB-vekstmedie. Det periplasmatiske ekstraktet ble delt i to for å unngå overload på kitinkolonnen. SDS-PAGE gelen inneholder (1) ladder (2) periplasmatisk ekstrakt (3) eluering 1 (4) eluering 2 og (5) oppkonsentrert enzym.

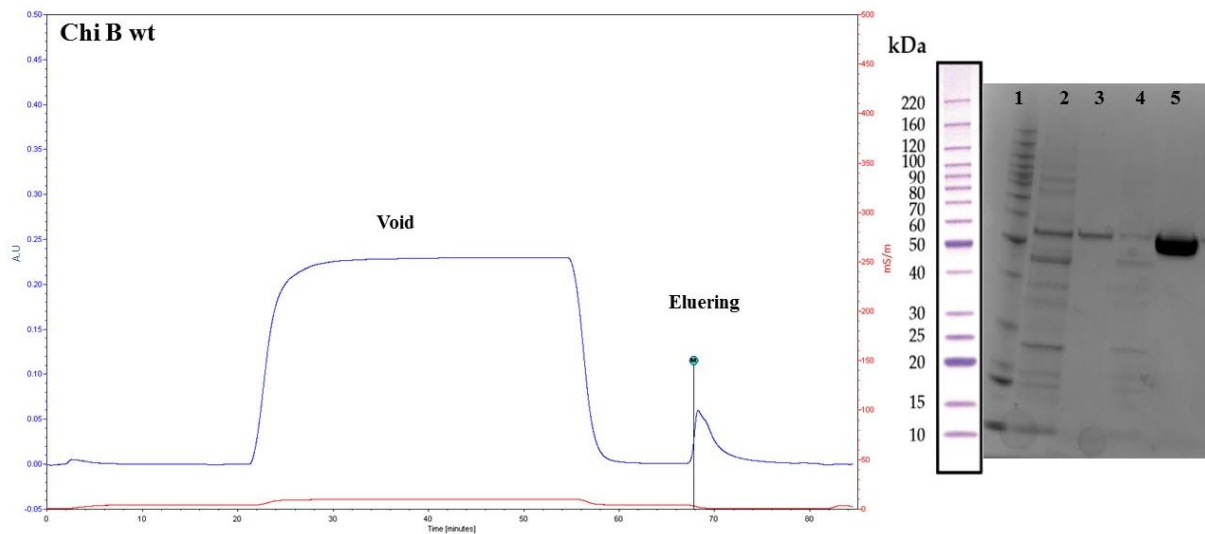


Figur 4.5: Kromatogram og SDS-PAGE gel av ChiA F396W villtype klonet inn i pMay2-10 vektor, uttrykt i *E.coli* BL21 StarTM (DE3) celler og dyrket i LB-vekstmedie. SDS-PAGE gelen inneholder (1) ladder (2) periplasmatisk ekstrakt (3) eluering og (4) oppkonsentrert enzym.

4. Resultat og diskusjon

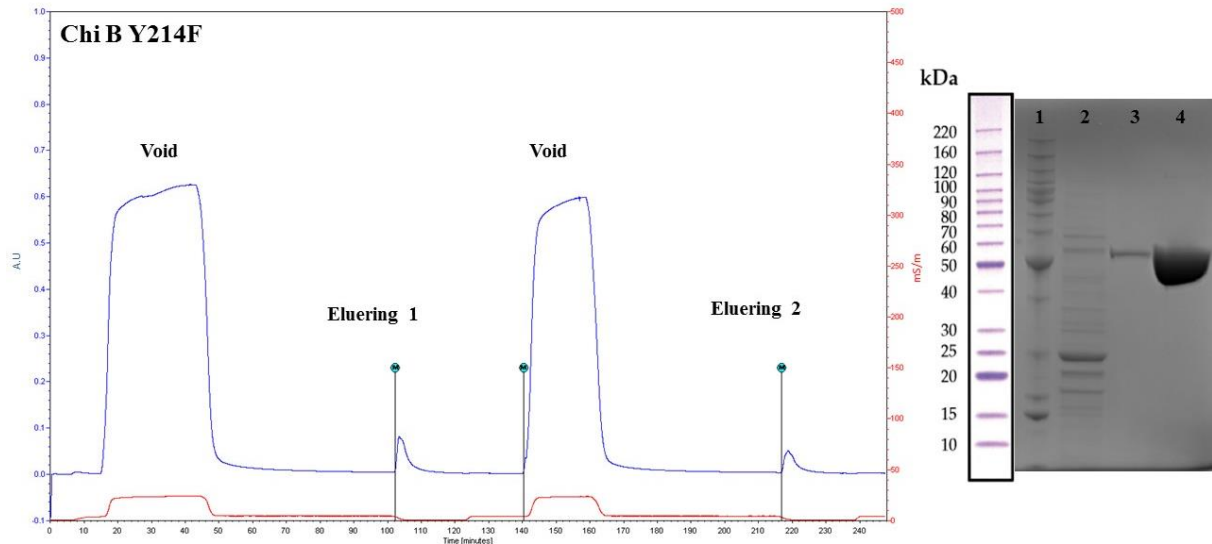


Figur 4.6: Kromatogram og SDS-PAGE gel av ChiA F396W/D313N klonet inn i pMay2-10 vektor, uttrykt i *E.coli* BL21 StarTM (DE3) celler og dyrket i LB-vekstmedie. Det periplasmatiske ekstraktet ble delt i to for å unngå overload på kitinkolonnen. SDS-PAGE gelen inneholder (1) Ladder (2) periplasmatiske ekstrakt (3) void (4) eluering 1 og 2 og (5) oppkonsentrert enzym.

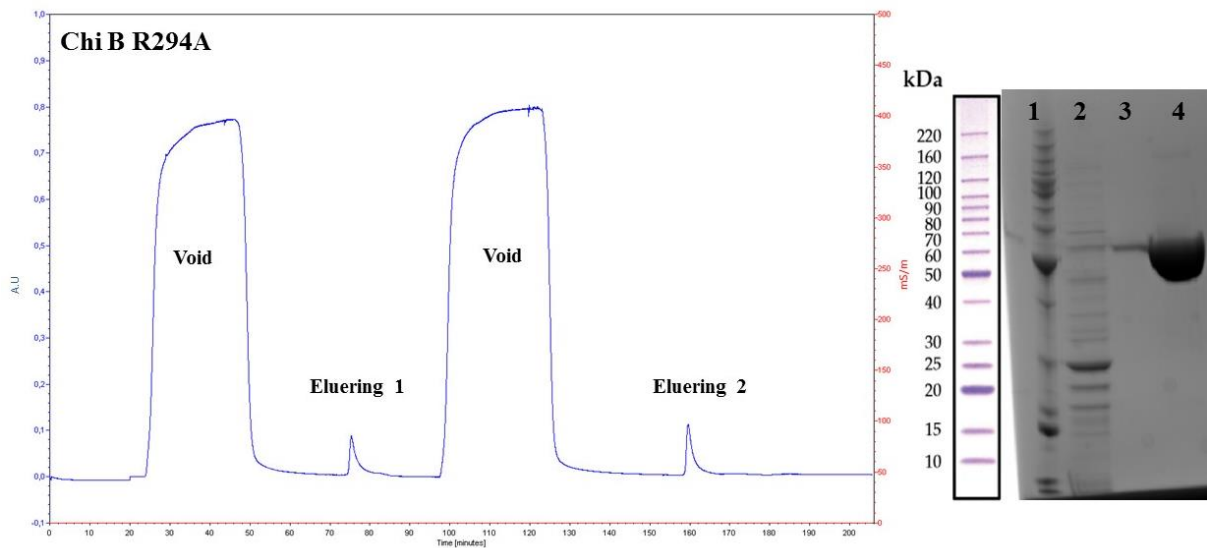


Figur 4.7: Kromatogram og SDS-PAGE gel av ChiB villtype klonet inn i pMay2-10 vektor, uttrykt i *E.coli* BL21 StarTM (DE3) celler og dyrket i LB-vekstmedie. SDS-PAGE gelen inneholder (1) ladder (2) periplasmatiske ekstrakt (3) void (4) eluering og (5) oppkonsentrert enzym.

4. Resultat og diskusjon

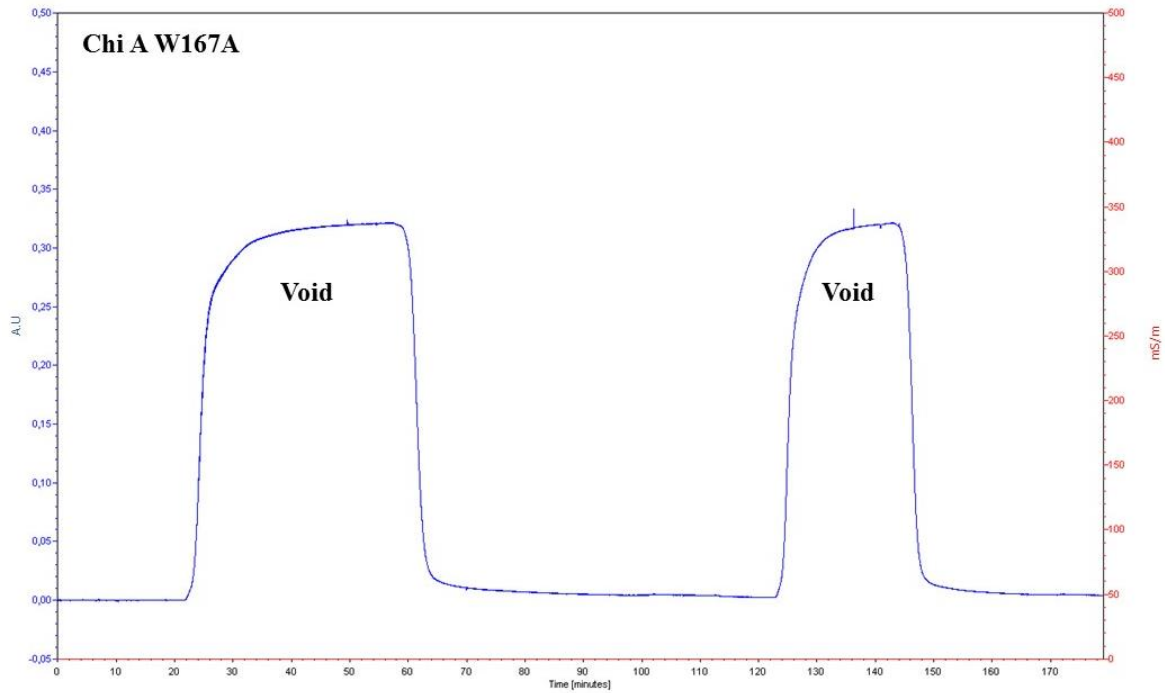


Figur 4.8: Kromatogram og SDS-PAGE gel av ChiB Y214F klonet inn i pMay2-10 vektor, uttrykt i *E.coli* BL21 StarTM (DE3) celler og dyrket i LB-vekstmedie.. SDS-PAGE gelen inneholder (1) ladder (2) periplasmatisk ekstrakt (3) void (4) eluering 1 og 2 og (5) oppkonsentrert enzym.



Figur 4.9: Kromatogram og SDS-PAGE gel av ChiB R294A klonet inn i pMay2-10 vektor, uttrykt i *E.coli* BL21 StarTM (DE3) celler og dyrket i LB-vekstmedie. SDS-PAGE gelen inneholder (1) ladder (2) periplasmatisk ekstrakt (4) eluering 1 og 2 og (5) oppkonsentrert enzym.

Mutantene ChiA W167A og ChiA Y390F skulle opprinnelig også studeres, men mutantene lot seg ikke rense på kitinkuler. Mutantene var uttrykt i periplasmaene med veldig svake bånd på SDS-PAGE (resultat ikke vist).

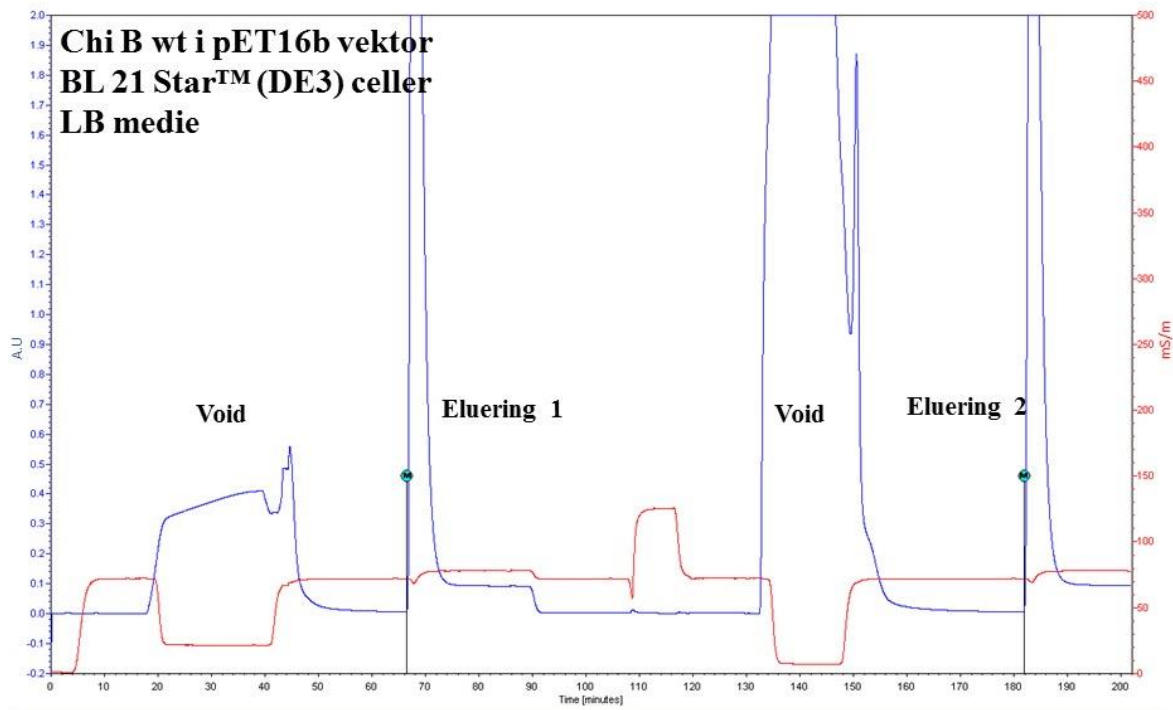


Figur 4.10: Kromatogram av ChiA W167A klonet inn i pMay2-10 vektor, uttykt i *E.coli* BL21 StarTM (DE3) celler og dyrket i LB-vekstmedie. Kromatogrammet inneholder ingen elueringstopper.

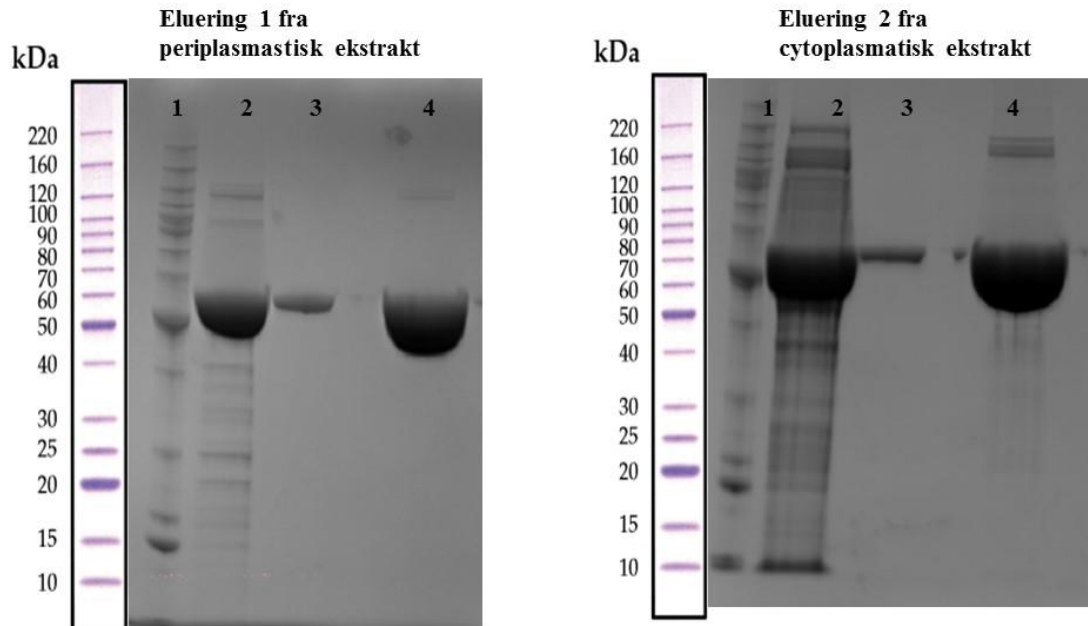
4.4 Rensing av his-taggede kitinaser med Ni-NTA

Kitinasene som var klonet inn i et pET-16b vektor ble rensset på nikkelkolonne slik som beskrevet i avsnitt 3.3.12. Kromatogrammene og SDS-PAGE gelene fra rensingen vises i figur 4.11 til 4.19. Det periplasmatiske elueringene og det oppkonsentrerte produktet ble kontrollert på SDS-PAGE gel slik som beskrevet i avsnitt 3.2.5. Rensing på nikkelkolonne gav høye elueringer og rene produkter for ChiB wt og ChiB D142N. ChiA wt fikk lave elueringer og noe urene produkter. Årsaken til dette er ikke kjent.

4. Resultat og diskusjon

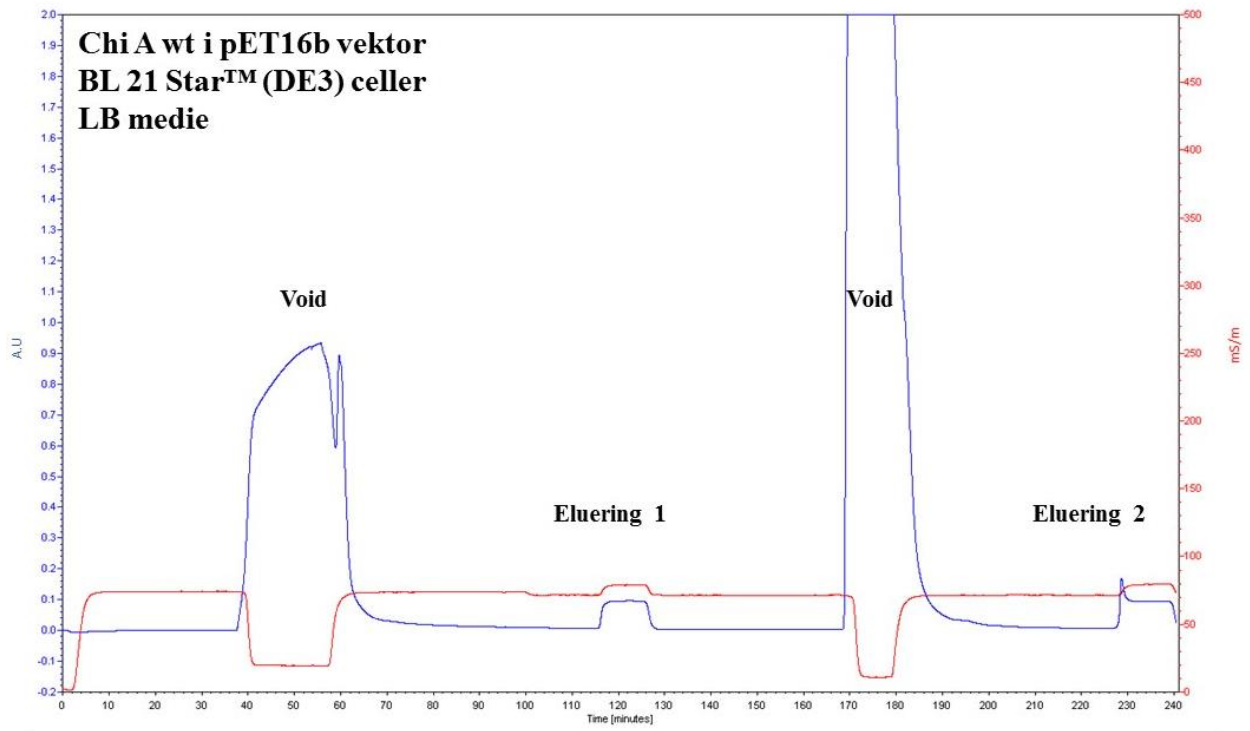


Figur 4. 11 Kromatogram av ChiB villtype klonet inn i pET-16b vektor, uttrykt i *E.coli* BL21 Star™ (DE3) celler og dyrket i LB-vekstmedie. Første void og eluering var fra det periplasmatiske ekstraktet og andre void og eluering var fra det cytoplasmatiske ekstraktet.

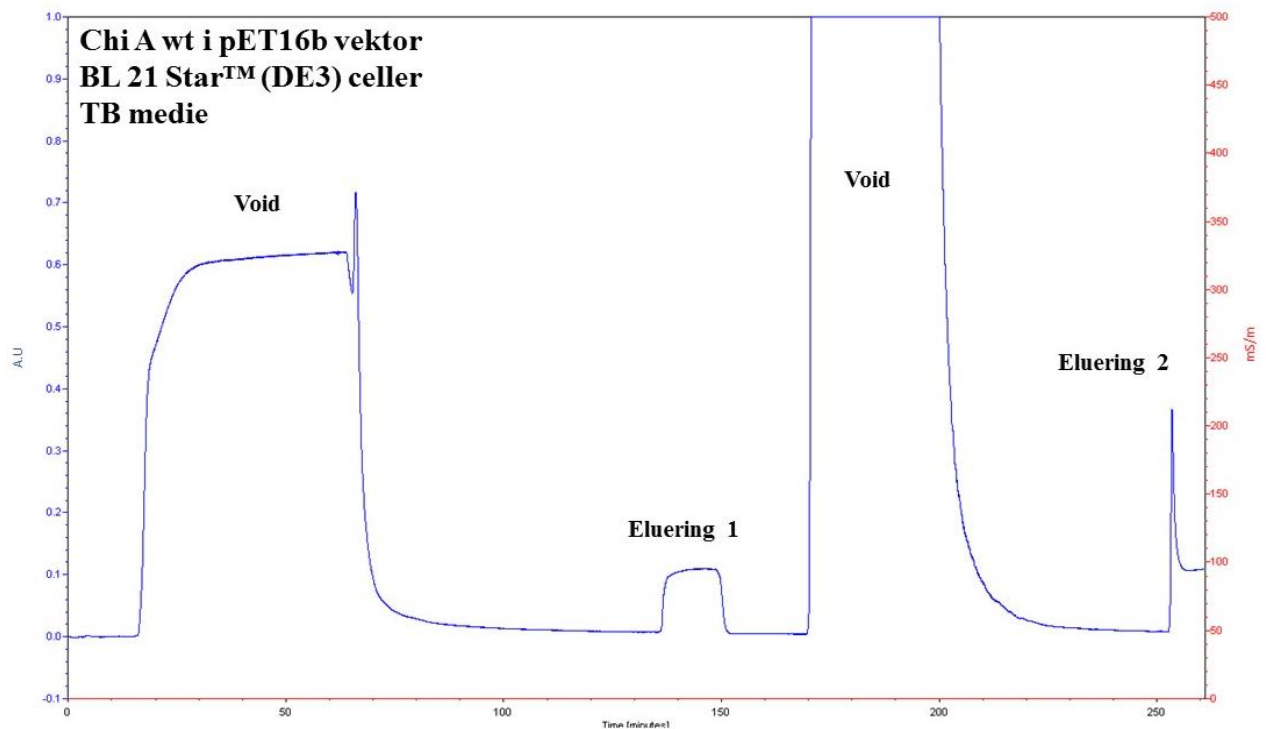


Figur 4. 12: SDS-PAGE gel fra ChiB villtype klonet inn i pET-16b vektor. Begge gelene inneholder (1) ladder (2) periplasmatiske/cytoplasmatiske ekstrakt (1µl) (4) eluering (1µl) og (5) oppkonsentrert enzym (1µl).

4. Resultat og diskusjon

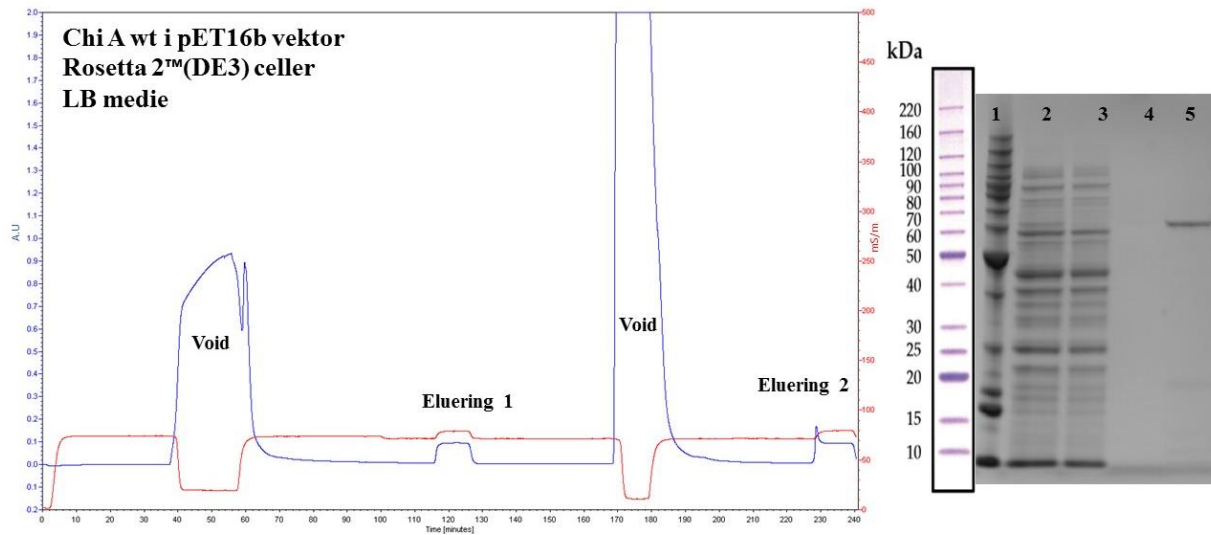


Figur 4.13: Kromatogram av ChiA villtype klonet inn i pET-16b vektor, uttrykt i *E.coli* BL21 Star™ (DE3) celler og dyrket i LB-vekstmedie. Første void og eluering var fra det periplasmatiske ekstraktet og andre void og eluering var fra det cytoplasmatiske ekstraktet. SDS-PAGE gel av eluering 1 og 2 er i figur 4.17.

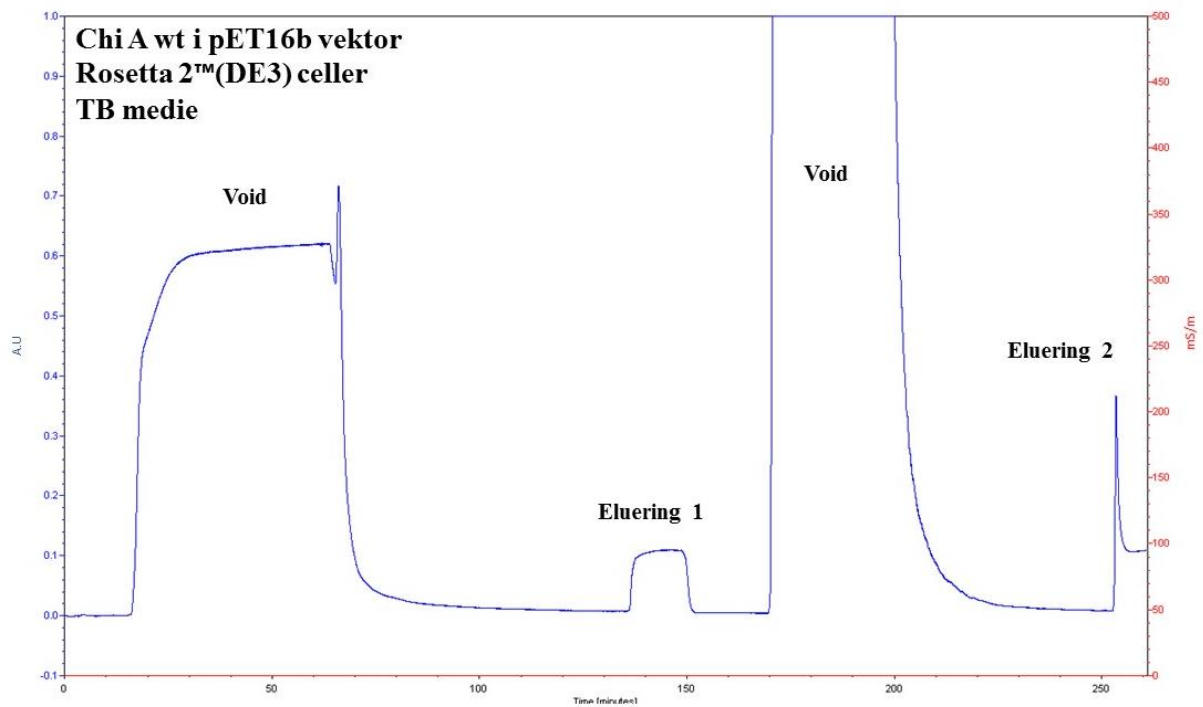


Figur 4.14: Kromatogram av ChiA villtype klonet inn i pET-16b vektor, uttrykt i *E.coli* BL21 Star™ (DE3) celler og dyrket i TB-vekstmedie. Første void og eluering var fra det periplasmatiske ekstraktet og andre void og eluering var fra det cytoplasmatiske ekstraktet. SDS-PAGE gel av eluering 1 og 2 er i figur 4.17.

4. Resultat og diskusjon

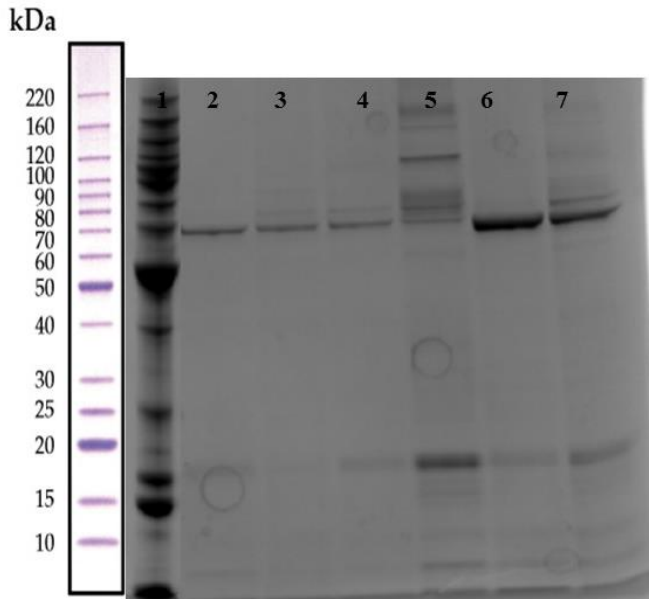


Figur 4.15: Kromatogram og SDS-PAGE gel av ChiB villtype klonet inn i pET-16b vektor, uttrykt i *E.coli* Rosetta2™ (DE3) celler og dyrket i LB-vekstmedie. Første void og eluering var fra det periplasmatiske ekstraktet og andre void og eluering var fra det cytoplasmatiske ekstraktet. SDS-PAGE gelen inneholder (1) ladder (2) periplasmatiske ekstrakt (3) cytoplasmatiske ekstrakt (4) eluering 1 og (5) eluering 2.

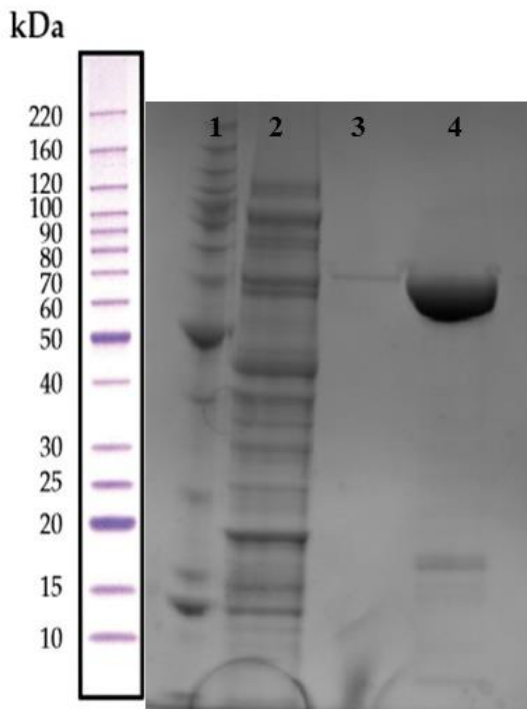


Figur 4.16: Kromatogram av ChiA villtype klonet inn i pET-16b vektor, uttrykt i *E.coli* Rosetta2™ (DE3) celler og dyrket i TB-vekstmedie. Første void og eluering var fra det periplasmatiske ekstraktet og andre void og eluering var fra det cytoplasmatiske ekstraktet. SDS-PAGE gel av eluering 1 og 2 er i figur 4.17.

4. Resultat og diskusjon

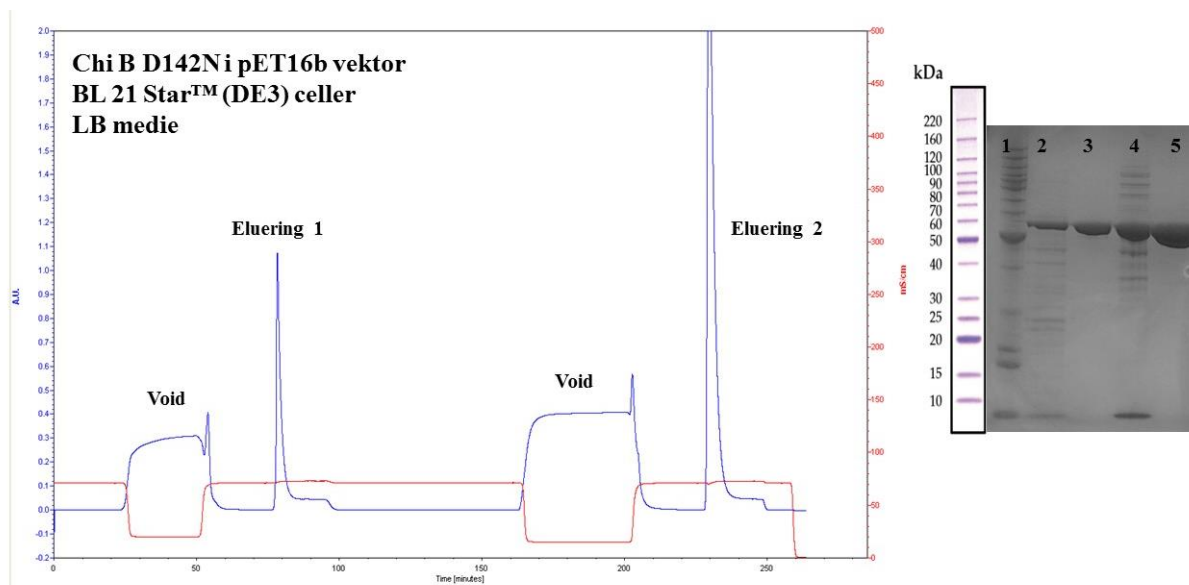


Figur 4.17: SDS-PAGE gel for tre seks ulike elueringer fra ChiA klonet inn i pET- 16b vektor (1) ladder (2) eluering 1 i BL21 Star™ (DE3) i TB-medium (3) eluering 2 i BL21 Star™ (DE3) i TB-medium (4) eluering 1 i BL21 Star™ (DE3) i LB-medium (5) eluering 2 i BL21 Star™ (DE3) i LB-medium (6) eluering 1 i Rosetta 2™ (DE3) i TB-medium og (7) eluering 2 i Rosetta 2™ (DE3) i TB-medium



Figur 4.18: SDS-PAGE gel fra ChiA villtype klonet inn i pET-16b vektor, uttrykt i Rosetta 2™ (DE3) celler, dyrket i TB-medium (1) ladder (2) periplasmatisk ekstrakt (3) Eluering 1 (1µl) og (4) oppkonsentrert enzym (1µl)

4. Resultat og diskusjon



Figur 4.19: Kromatogram og SDS-PAGE gel av ChiB D142N klonet inn i pET-16b vektor, uttrykt i *E.coli* BL21 Star™ (DE3) celler og dyrket i LB-vekstmedie. Første void og eluering var fra det periplasmatiske ekstraktet og andre void og eluering var fra det cytoplasmatiske ekstraktet. SDS-PAGE gelen inneholder (1) ladder (2) periplasmatiske ekstrakt (3) eluering 1 (4) cytoplasmatiske ekstrakt og (5) eluering 2.

4.5 Proteinkonsentrasjon

Proteinkonsentrasjonen ble bestemt fluorometrisk med Bradfordmetoden som beskrevet i avsnitt 3.2.7. Gjennomsnittskonsentrasjonene for ChiA wt, ChiB wt og deres mutanter presentert i tabell 4.1 til tabell 4.4.

Tabell 4.1: Gjennomsnittlig proteinkonsentrasjon for ChiA og ChiB villtype samt mutanter hiB D142N klonet inn i pMay2-10 vektor, uttrykt i etter rensing på kitinkuler.

Enzym klonet i pMay2-10 vektor	Proteinkonsentrasjon (mg/mL)	Oppkonsentrert volum (mL)	Protein mengde (mg)	Vekstmedium (L)
ChiA wt	1,7	1,0	1,7	3
ChiA F396W	2,9	0,5	1,5	3
ChiA F396W/D313N	3,40	0,5	1,7	6
ChiB wt	0,5	1,0	0,5	2
ChiB Y214F	1,3	1,0	1,3	2
ChiB R294A	2,3	0,7	1,6	3

Tabell 4.2: Gjennomsnittlig proteinkonsentrasjon for ChiB klonet i pET-16b før og etter rensing med Ni-NTA agarose.

ChiB klonet i pET-16b vektor	Proteinkonsentrasjon (mg/mL)	Volum (mL)	Protein mengde (mg)	Vekstmedium (L)
ChiB wt periplastma	3,0	60	178,1	1,5
ChiB wt eluering 1	2,7	45	119,7	1,5
ChiB wt oppkonsentrert Eluering 1	26,1	1,4	36,6	1,5

4. Resultat og diskusjon

ChiB wt cytoplasma	2,8	37	314,9	1,5
ChiB wt eluering 2	8,5	45	127,1	1,5
ChiB wt oppkonsentrert Eluering 2	36,3	1,4	50,9	1,5
ChiB D142N periplasma	0,6	60	33,6	1,5
ChiB D142N eluering 1	0,6	25	13,9	1,5
ChiB D142N eluering 2	2,3	45	89,4	1,5

Tabell 4.3: Gjennomsnittlig proteinkonsentrasjon for ChiA villtype i pET-16b vektor transformert inn i BL21 StarTM (DE3) eller Rosetta 2TM (DE3) celler og dyrket i LB- eller TB-medium..

ChiA klonet inn i pET-16b vektor	Proteinmengde i eluering 1 (mg)	Proteinmengde i eluering 2 (mg)	Vekstmedium (L)
BL21 Star TM (DE3) i LB medium	1,9	4,2	1,5
BL21 Star TM (DE3) i TB-medium	0,2	4,6	1,5
Rosetta 2 TM (DE3) i LB-medium	0,1	2,0	1,5
Rosetta 2 TM (DE3) i TB-medium	2,5	7,2	1,5

Tabell 4.4: Oversikt over gjennomsnittlig proteinkonsentrasjon for ChiA villtype i pET-16b vektor med Rosetta 2 (DE3) celler med TB-medium før og etter rensing med (Ni-NTA) agarose. Dette enzymet inneholdt den høyeste proteinmengden fra tabell 4.3.

ChiA wt klonet i pET-16b uttrykt med Rosetta 2 TM (DE3) i TB-medium	Proteinkonsentrasjon (mg/mL)	Volum (mL)	Protein mengde (mg)	Vekstmedium (L)
ChiA wt periplasma	0,1	50	3,7	1,5
ChiA wt eluering 1	0,2	17	2,5	1,5
ChiA wt Oppkonsentrert	1,2	2	2,3	1,5

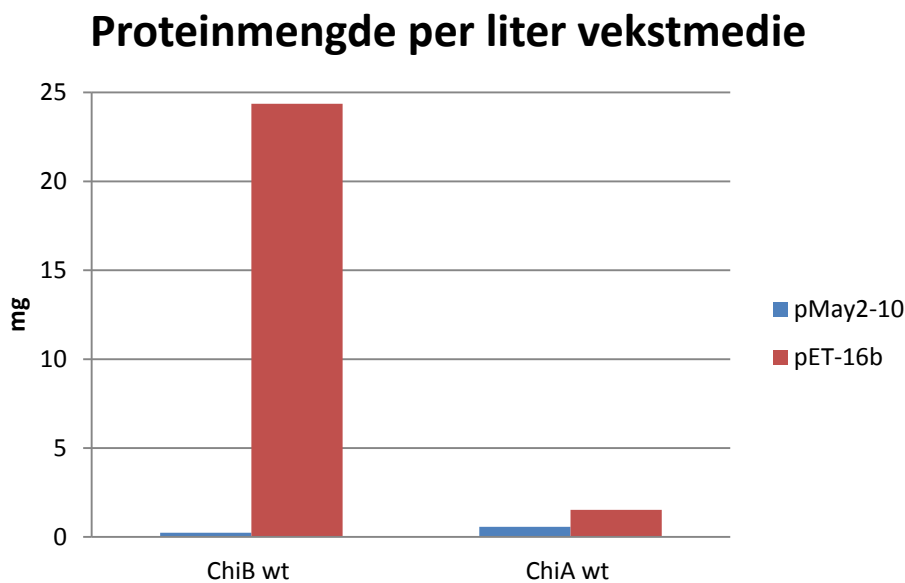
4.5.1 Proteinkonsentrasjon i ChiB wt

Ved å endre vektor for ChiB wt fra pMay2-10 til pET-16b, økte proteinmengden fra 0,47 mg (2 liter vekstmedie) til 36,55 mg (1,5 liter vekstmedie) Dette er en økning på ≈ 105 ganger per liter vekstmedie (se figur 4.20). Figuren er ikke ment som en direkte indikasjon på proteinkonsentrasjonen per liter, men er ment som en sammenligning av de ulike resultatene med likt volum vekstmedie. Årsaken til denne økningen ved bytte av vektor kan være det på grunn av PET systemet. Det er det kraftigste systemet som er utviklet for kloning og uttrykk av rekombinante proteiner i E. coli. Målgene i det klonete PET plasmidet er under kontroll av bakteriofagen T7 sine transkripsjon og translasjon signaler. T7 RNA-polymerase er så selektiv at når den er fullt induert, så vil nesten alt av cellens ressurser bli konvertert til den målrettede genekspressjonen (Novagen 2014b).

Fra tabell 4.2 er det tydelig at proteinmengden reduseres med over 50 % fra elueringene til det oppkonsentrerte produktet. En av årsakene til dette kan være proteinene bandt seg til cellulosefilteret i Amicon Ultra-30K oppkonsentreringsrøret.

4.5.2 Proteinkonsentrasjon i ChiA wt

For ChiA wt i pET-16b vektor var ikke endringen like stor som for ChiB i forhold til pMay2-10 vektoren. Det ble derfor prøvd ut ulike vekstmedier og celletyper der RosettaTM (DE3) celler i TB medium gav den høyeste proteinkonsentrasjonen på som vist i tabell 4.3 med en proteinmengde på 2,5 mg etter eluering fra det periplasmatiske ekstraktet (1,5 liter vekstmedie). Dette er en ≈ 3 gangers proteinmengde økning per liter vekstmedie (se figur 4.20). Figuren er i likhet med ChiB villtype ikke ment som en direkte indikasjon på proteinkonsentrasjonen per liter. Ved oppkonsentrering ble et Macrosep® Advance 30 K oppkonsentreringsrør benyttet og kun 8,8 % av proteinmengden ble tapt ved oppkonsentrering



Figur 4.20: Proteinmengde i milligram per liter vekstmedie for ChiA og ChiB villtype i pMay2-10 og pET-16b vektor.

4.5.3. Øvrige mutanter

De øvrige mutantene viser samme trend som ChiB villtype der mutantene klonet i pMay2-10 vektor har et lavere proteinuttrykk (se tabell 4.1) enn ChiB D142N klonet i pET-16b vektor (representert med det periplasmatiske produktet i tabell 4.2).

4.6 Spesifikk enzymaktivitet.

Den spesifikke enzymaktiviteten ble målt fluorometrisk som beskrevet i avsnitt 3.2.8.

Gjennomsnittsmålingene for enzymaktiviteten for de ulike mutantene og villtypene for ChiA og ChiB er presentert i tabell 4.5 og i tabell 4.6. Det kunstige substratet ((GlcNAc)₂-4MU) ble benyttet for å bestemme enzymets aktivitet. Resultatene er derfor ikke en direkte måling, men en indikasjon på hvor aktivt enzymet er i forhold til de naturlige substratene kitin og kitosan.

Tabell 4.5: Oversikt over enzymaktiviteten til enzymene rensset på kitinkuler.

Oppkonsentrerte enzymer fra kitinkulekromatografi	Gjennomsnittlig absorbens (fortynning)	Spesifikk aktivitet (nm/min/mg)	Aktivitet relativt til villtype (%)
ChiA wt	1975(1:5000)	6754	100
ChiA F396W	4289(1:1000)	5112	75,7
ChiA F396W/D313N	264(1:10000)	3600	53,3
ChiB wt	717(1:10000)	1348	100
ChiB Y214F	1497(1:1000)	1266	94
ChiB R294A	1228(1:1000)	1120	83,1

Tabell 4.6: Oversikt over enzymaktiviteten til ChiA og ChiB klonet inn i pET-16b vektor.

Enzymer klonet i pET-16b vektor	Gjennomsnittlig absorbens (fortynning)	Spesifikk aktivitet (nm/min/mg)
ChiA wt* periplasma	3870(1:10000)	1145
ChiA wt* oppkonsentrert eluering 1	1726(1:5000)	3935
ChiB wt periplasma	2011 (1:10000)	2389
ChiB wt oppkonsentrert eluering 1	2265 (1:1000)	2366
ChiB wt oppkonsentrert eluering 2	3348(1:1000)	4864
ChiB D142N periplasma	4220(1:10000)	2453

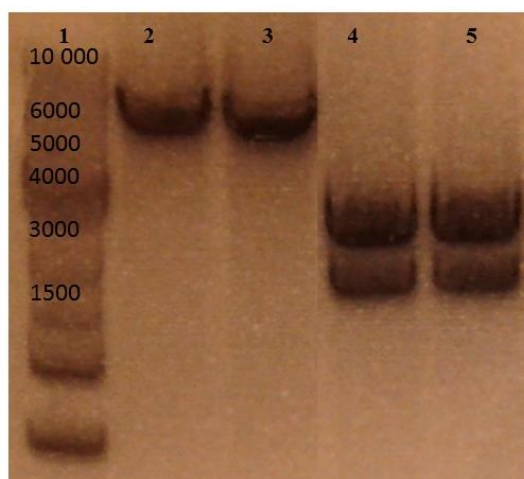
* i Rosetta 2TM (DE3) i TB-medium

4.6.1 Analyse av spesifikk enzymaktivitet

Faktorer som påvirker enzymaktiviteten er enzymkonsentrasjon, substratkonsentrasjon, inhibitorer, temperatur og pH. Enzymaktiviteten for ChiB wt klonet i pMay2-10 vektor oppført i tabell 4.5 viser lavere enzymaktivitet enn ChiB mutert i pET16-b vektor. Dette kan skyldes enzymkonsentrasjonen som økte ved vektorbyttet. Aktiviteten for ChiA wt ble redusert ved vektor byttet fra pMay2-10 til pET16b. Årsaken til dette er ukjent, men flere av mutantene viser lavere spesifikk enzymaktivitet enn tidligere studier og kan ha en sammenheng med metode utførelsen..

4.7 Tillaging av His₁₀ChiB D142N

For å optimalisere det lave proteinuttrykket ble ChiB D142N ligert inn i pET-16b vektoren som innehar en10x-histidintag. Det ble gjennomført en restriksjonskutting av pET-16b vektoren med NdeI og XhoI som beskrevet i avsnitt 3.3.2. Deretter ble DNA fra kitinasen oppamplifisert med kuttsetter for NdeI og XhoI som beskrevet i avsnitt 3.3.4. Etter henholdsvis restriksjonskutting og oppamplifisering ble DNA fragmentene analysert ved hjelp av agarose-gelelektroforese som beskrevet i 3.3.3. Gelen vises i figur 4.21.



Figur 4.21: Agarosegel av restriksjonskuttet pET-16b vektor med NdeI og XhoI og oppamplifisert ChiB D142N med kuttsetter for NdeI og XhoI. (1) 1Kb DNA Ladder, (2) pET-16b vektor (5711 bp), (3) pET-16b vektor (5711 bp), (4) ChiB D142N 66°C hybridisering (nedre bånd 1527 bp) og (5) ChiB D142N 72°C hybridisering (nedre bånd 1527 bp)

DNA fragmentene i agarosegelen ble rensert som beskrevet i avsnitt 3.3.6. DNA konsentrasjonene til ChiB D142N og pET-16b er vist i tabell 4.7.

Tabell 4.7: DNA konsentrasjon for vektorene og ChiB D142N etter restriksjonskutting med NdeI og XhoI.

DNA fraksjoner fra agarosegel	Konsentrasjon etter rensing av DNA agarosegel
Vektor pET-16b (2)	15.1 ng/μL
Vektor pET-16b (3)	17.1 ng/μL
ChiB D142N nedre bånd (4)	25.3 ng/μL
ChiB D142N nedre bånd (5)	8.7 ng/μL

Ved hjelp av In-Fusion® Molar Ratio kalkulatoren ble det kalkulert at 150 ng pET-16b DNA og 78,8 ng kitinaseDNA skulle blandes sammen (se figur 3.4) i liggeringsreaksjonen. Det ble tilsatt 8 μl vektor pET-16b (3) og 3 μl ChiB D142N (4) i liggeringstrinnet som beskrevet i avsnitt 3.3.6.

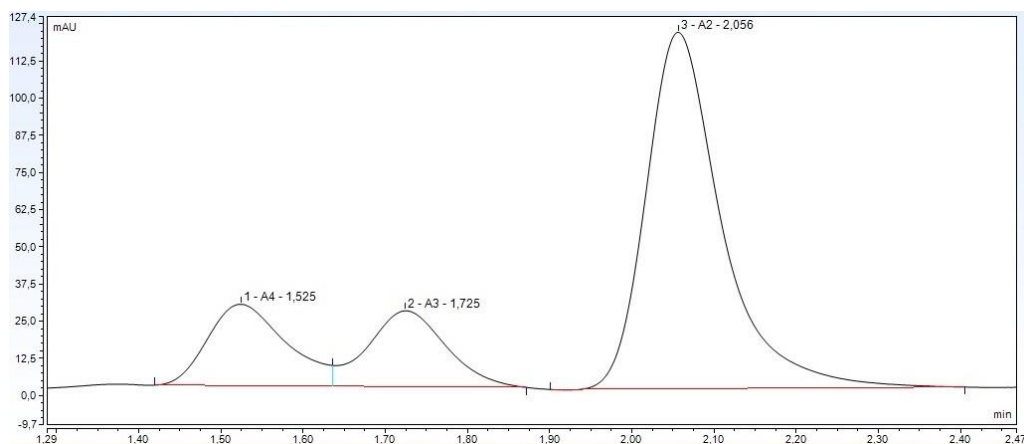
Ligeringsproduktet ble transformert inn i TOP10 superkompetente *E.coli* celler uten at det resulterte i et vellykket transformeringsprodukt ChiB D142N ble derfor mutert som beskrevet i avsnitt 3.1.1 til avsnitt 3.1.13 med His₁₀ ChiB wt som templat. Resultatene fra muteringen ble beskrevet i avsnitt 4.2.1 og 4.2.4.

4.8 Transglykosylerings assay

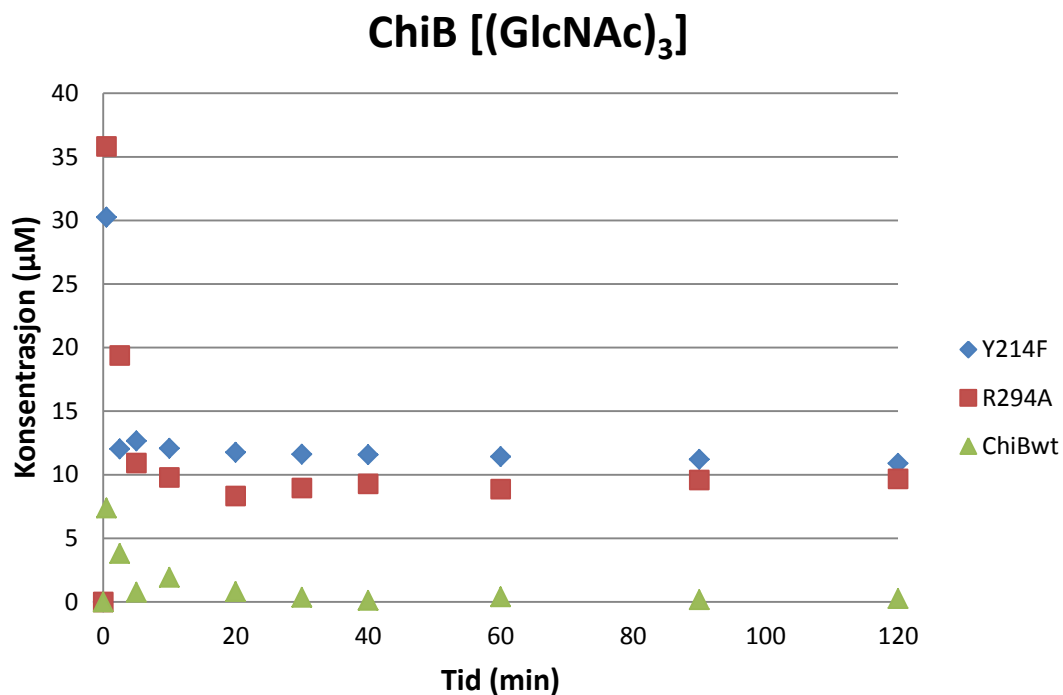
For å studere de transglykosylerende egenskapene til de ulike enzymene ble transglykosylerings assay gjennomført som beskrevet i avsnitt 3.4.1. Som tidligere nevnt er er produksjon av (GlcNAc)₃ når (GlcNAc)₄ er benyttet som substrat en indikasjon og mål på transglykosylerings aktivitet. Ved å kvantifisere [(GlcNAc)₃] produsert av villtype ChiA og ChiB og sammenlikne disse konsentrasjonene mot de som produseres av de ulike mutantene, vil man kunne si noe om mutasjonenes effekt. HPLC er velegnet metode for dette (Zakariassen et al. 2011). (GlcNAc)₆, og lengere oligosakkarider som dannes, er vanskelig å detektere ved bruk av HPLC grunnet deres relativt lave konsentrasjoner fordi disse er drastisk bedre substrat enn (GlcNAc)₃. MALDI-TOF-MS er mer sensitivt enn HPLC og kan benyttes til å detektere disse lengre oligosakkaridene.

4.8.1 HPLC

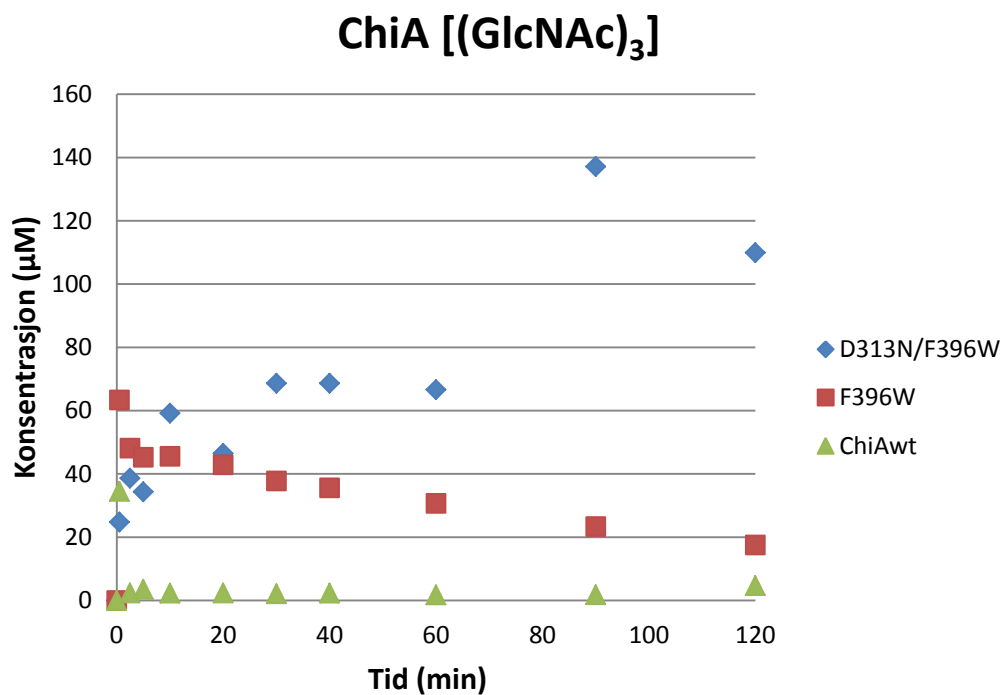
Etter fullført transglykosylerings assay, ble prøvene analysert på HPLC som beskrevet i avsnitt 3.4.3. Et eksempel på et kromatogram fra analysen vises i figur 4.22. Plottene i figur 4.23 (ChiB) og figur 4.24 (ChiA) (ChiA) viser hvor mye (GlcNAc)₃ som ble dannet ved ulike tidspunkter. Hvor mye mono- di- og trimer som ble dannet ved de ulike tidspunktene er gitt i vedlegg 6.



Figur 4.22: Kromatogram etter transglykosylerings assay med ChiA D313N/F396W etter 90 sekunder . Kromatogrammet viser separasjon av [GlcNAc]₄ (retensjonstid 1,5 min), [GlcNAc]₃ (retensjonstid 1,7 min), og [GlcNAc]₂ (retensjonstid 2,1 min).



Figur 4.23: [(GlcNAc)₃] som ble dannet i løpet av reaksjonen mellom 3,0 µM ChiB wt og 1,0 mM (GlcNAc)₄ i 20mM ammoniumacetat (0,1 mg / ml BSA, pH 6,1) ved 37 °.



Figur 4.24: [(GlcNAc)₃] som ble dannet i løpet av reaksjonen mellom 3,0 µM ChiA wt og 1,0 mM (GlcNAc)₄ i 20mM ammoniumacetat (0,1 mg / ml BSA, pH 6,1) ved 37 °.

4.8.2 HPLC analyse

Figur 4.23 viser at mutantene Y214F og R294A har en høyere konsentrasjon av $(\text{GlcNAc})_3$ enheter enn ChiB wt, noe som kan tyde på at disse mutantene har bedre transglykosylerings egenskaper enn ChiB wt. Det samme gjelder for mutantene ChiA F396W og D313N/F396W i forhold til ChiA wt i figur 4.24.

4.8.2.1 ChiB mutanter

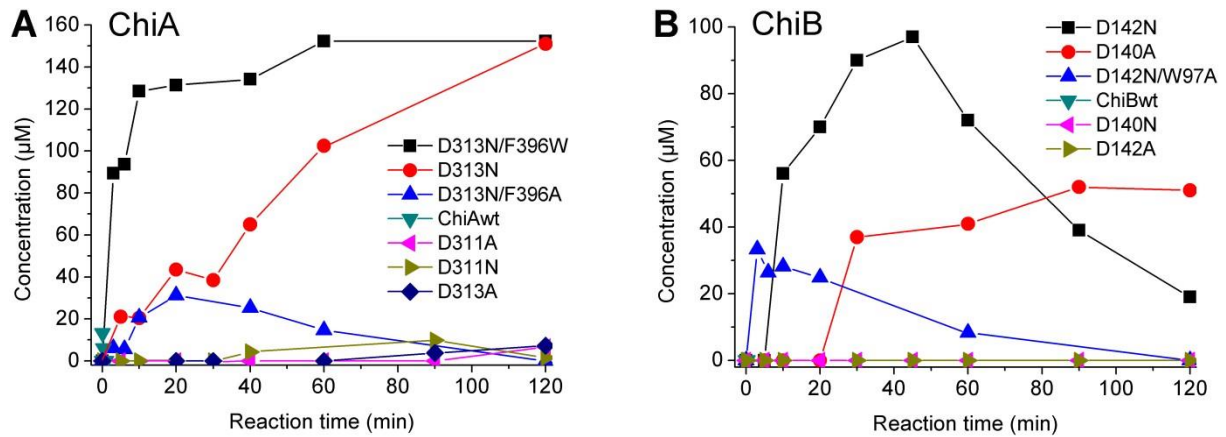
Den høyeste konsentrasjonen av $(\text{GlcNAc})_3$ er etter 30 sekunder der begge mutantene har en konsentrasjon på over 30 μM i forhold til ChiB wt som har en konsentrasjon på 7,4 μM ved samme tidspunkt. Ved å sammenligne med dette med figur 4.25 fra tidligere studier (Zakariassen et al. 2011) har både Y214F og R294A har en tilnærmet kurve som mutantene ChiB D142N/W97A som viser transglykosylerings effekt. Tidligere forskning har vist at ChiB D142N som har en høy transglykosylerings aktivitet (se figur 4.25) påvirker stabiliseringen av oxazoliniumion intermedietet (Jitonnom et al. 2011). Det kan tyde på at Y214F førte til økt stabilisering av oxazoliniumionintermedietet som igjen førte til en økt transglykosylering effekt (Synstad et al. 2004). Videre så observerer vi, som Madhuprakash et al., at mutering av R294 til A øker transglykosylerings aktiviteten. En spekulasjon er at muteringen endrer den dynamiske ioneparinteraksjonen Arg har med substratet og/eller deler av proteinet uten at dette har blitt studert nærmere (Madhuprakash et al. 2012).

4.8.2.2 ChiA mutanter

D313N/F396W har tidligere vist å ha hypertransglykosylerende egenskaper og viser ikke uventet de høyeste $(\text{GlcNAc})_3$ konsentrasjonene. Kurven for D313N/F396W i figur 4.25 har store likheter som kurven i figur 4.24 og kan betraktes som en positiv kontroll på at forsøket har hatt de korrekte betingelsene. Mutasjonen F396W tyder også på at aromatiske residuer påvirker transglykosylerings effekten. Mutanten F396W har en kurve med den høyeste konsentrasjonen (på 63 μM) etter 30 sekunder (slik som de to ChiB mutantene). Kurven for ChiA D313N i figur 4.25 har en langsommere økning av $(\text{GlcNAc})_3$. Ved å ha to mutasjoner i ChiA som hver seg har en effekt på transglykosylerings aktiviteten oppnås en additiv effekt

4. Resultat og diskusjon

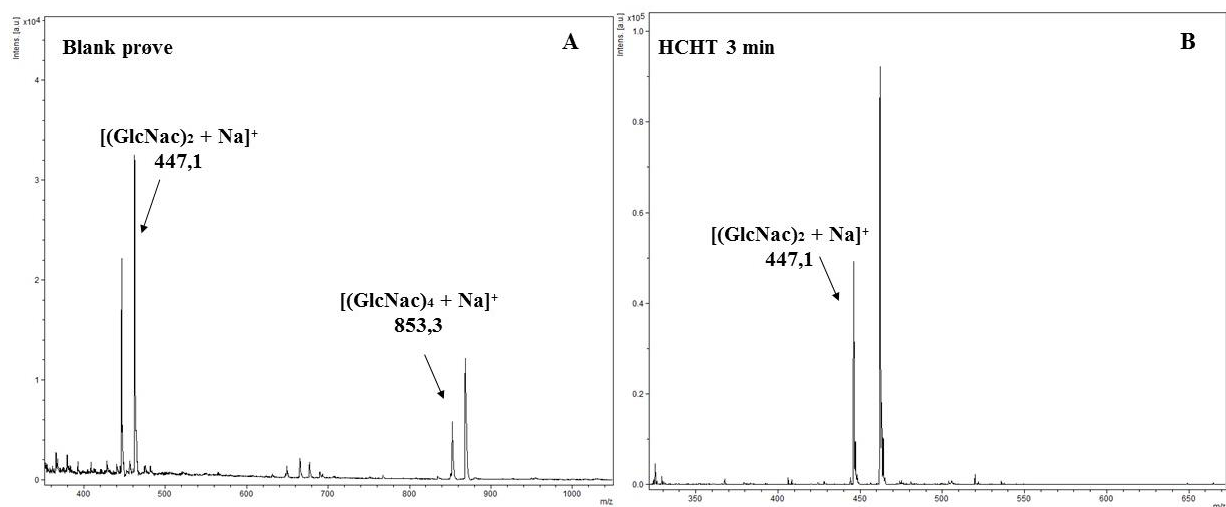
Videre støtter hastighetsøkningen for ChiA F396A i forhold til ChiA D313N at deglykosylasjonstrinnet, trinnet for addering av nukleofilen, kan være hastighetsbestemmende trinn som foreslått av Zakariassen et al. hvor deglykosylasjonen forsterkes av raskere transglykosylering (Zakariassen et al. 2011).



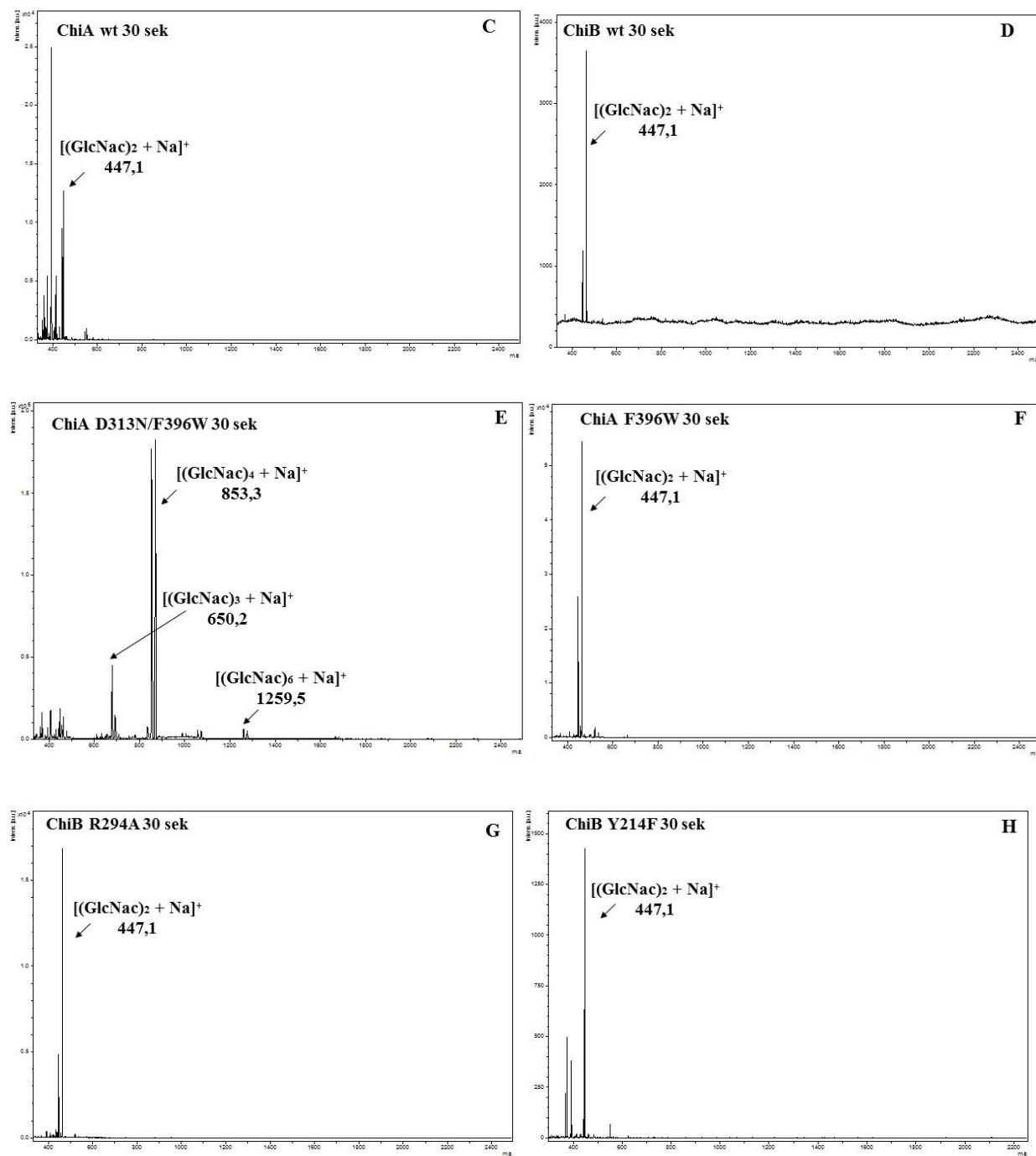
Figur 4.25: Transglykosylering av ChiA og ChiB med $(\text{GlcNAc})_4$ som substrat. Plottene viser konsentrasjonen av $(\text{GlcNAc})_3$ som ble dannet i løpet av reaksjonen mellom $3,0 \mu\text{M}$ enzym og $1,0 \text{ mM}$ $(\text{GlcNAc})_4$ i 20 mM ammonium acetat ($0,1 \text{ mg/mL}$ BSA, $\text{pH } 6.1$) ved $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (Zakariassen et al. 2011).

4.8.3 MALDI-TOF MS

MALDI-TOF-MS ble benyttet for å undersøke om oligosakkaridkjeder lengre enn utgangssubstratet hadde blitt dannet. For å detektere transglykosylerings produkter ble $(\text{GlcNAc})_4$ inkubert med enzymene oppført i tabell 3.11 under forholdene som beskrevet i avsnitt 3.4.1. Et av disse enzymene var fra humane kitotriosidase (HCHT) som ble analysert for sammenlikning. Denne har en høy iboende transglykosylerings evne (Aguilera et al. 2003). De ulike spektrene er presentert fra A til F i figur 4.26 .



4. Resultat og diskusjon



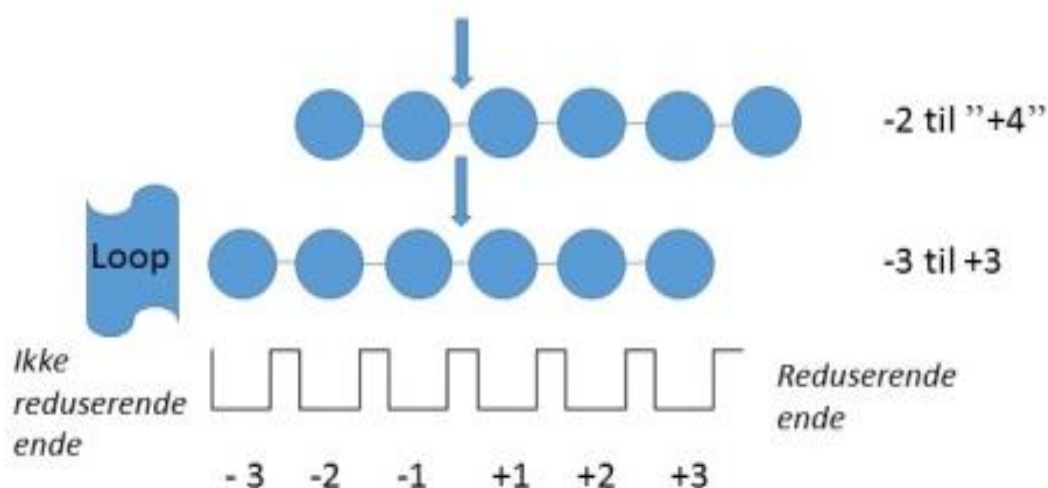
Figur 4.26: MALDI-TOF analyse av (A) 1,0 mM (GlcNac)₄ blank prøve og av reaksjonsblandinger inneholdende 1,0 mM (GlcNac)₄ og 3,0 μM HCHT (B), ChiA wt (C), ChiB wt (D), ChiA D313N/F396W (E), ChiA F396W (F), ChiB R294 (G) og ChiB Y214F (H) i 20 mM ammonium-acetat (0,1 mg/ml BSA, pH 6,1) etter 30 sekunder, inkubasjon ved 37,0 °C.

4.8.4 MALDI-TOF MS analyse

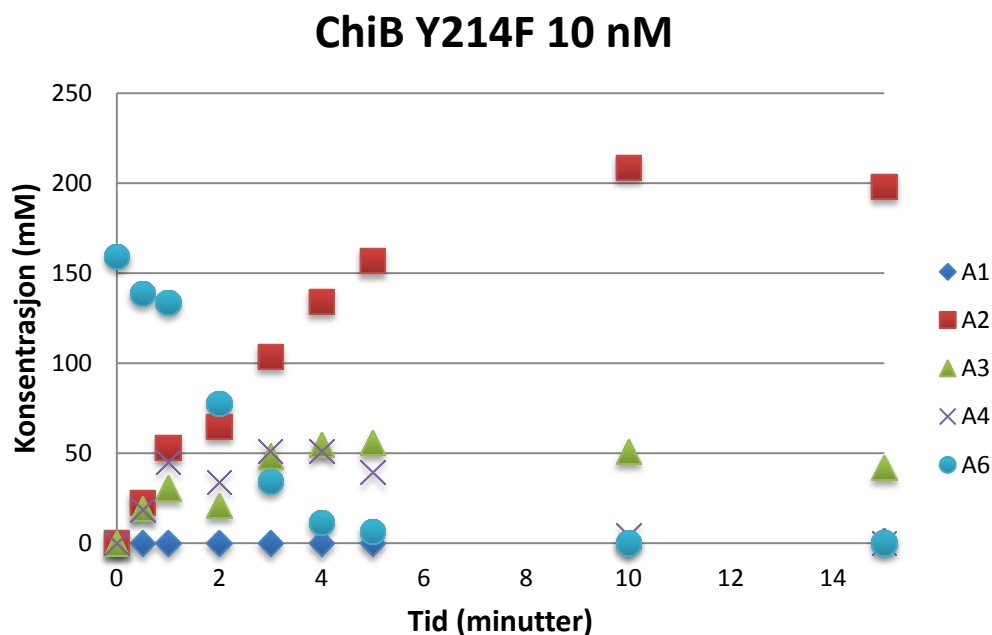
Fra figur 4.26 viser det seg at $(\text{GlcNAc})_4$ ble brutt ned til $(\text{GlcNAc})_2$ for alle enzymene allerede etter første uttak på 30 sekunder, bortsett fra mutanten ChiA D313N/F396W hvor $(\text{GlcNAc})_3$, $(\text{GlcNAc})_4$ og $(\text{GlcNAc})_6$ ble detektert. Denne mutanten har den høyeste $(\text{GlcNAc})_3$ konsentrasjonen i HPLC analysen fra figur 4.24. Ingen av mutantene eller HCHT har derfor en bedre transglykosylerings evne enn ChiA D313N/F396W. Det er tydelig at $(\text{GlcNAc})_4$ og $(\text{GlcNAc})_6$ hydrolyseres hurtig til $(\text{GlcNAc})_2$, så for videre forsøk bør tidspunkt for prøveuttak endres slik at det fortsatt er igjen ca 50 % av utgangssubstratet $(\text{GlcNAc})_4$. Dette gjør at en bedre relativ sammenlikning mellom de ulike enzymene kan utføres.

4.9 Hydrolyse av $(\text{GlcNAc})_6$ med ChiB Y214F

$(\text{GlcNAc})_6$ ble hydrolysert med ChiB Y214F som beskrevet i avsnitt 3.4.6. Nedbrytningen kan gi en oversikt over hvordan heksameren binder seg i det aktive setet. Tidligere enzymologiske studier har vist at $(\text{GlcNAc})_6$ binder seg til ChiB i subsetene -3 til +3 og i subsetene -2 til "+4", på grunn av porch loopen som hindrer binding i subsetene "-4" til +2 (se figur 4.27). (van Aalten et al. 2000). En tetramer og en dimer dannes som et resultat av binding i subsetene -2 til "+4" og to trimerer dannes som et resultat av binding i subsetene -3 til +3. Resultatene fra hydrolysen av $(\text{GlcNAc})_6$ med ChiB Y214F er presentert i figur 4.28 og tabell 4.8.



Figur 4.27: Oversikt over bindings muligheter i ChiB med $(\text{GlcNAc})_6$ som substrat. Hydrolysekutt forekommer mellom subsetene +1 og -1 og gir bindings muligheter i subsetene -2 til "+4" eller -3 til +3.



Figur 4.28: Mono-, di-, tri-, tetra- og heksamer dannet ved ulike tidspunkt etter hydrolyse av 150 μM $(\text{GlcNAc})_6$ med 10 nM ChiB Y214F i 20mM ammonium-acetat (0,1 mg/ml BSA), pH 6,1 ved 37 $^\circ$.

Tabell 4.8: Konsentrasjonene til de ulike nedbrytningsproduktene etter hydrolyse av 150 μM $(\text{GlcNAc})_6$ med 10 Nm Y214F i 20mM ammonium-acetat (0,1 mg/ml BSA, pH 6,1) ved 37 $^\circ$ over tid.

Tid (min)	[A1] (μM)	[A2] (μM)	[A3] (μM)	[A4] (μM)	[A6] (μM)
0	0	0	0	0	159
0,5	0	22	19	19	138
1	0	53	30	45	133
2	0	64	21	34	77
3	0	103	48	51	34
4	0	134	55	51	12
5	0	156	56	39	7
10	0	209	51	4	0
15	1	198	42	0	0

4.9.1 Analyse av nedbrytningsreaksjonen $(\text{GlcNAc})_6$ med ChiB Y214F

Konsentrasjonene til $(\text{GlcNAc})_2$ og $(\text{GlcNAc})_3$ etter 1 minutt hydrolyse viser at binding i -2 til +4 binding er mer dominerende (~78 %) en binding i -3 til +3 (~22 %). Dette samsvarer med det som er observert for ChiB wt (Horn et al. 2006b). Dette viser at mutasjonen ikke endrer substratposisjoneringen. Videre observeres det at det dannes en tydelig høyere andel av $(\text{GlcNAc})_2$ i forhold til $(\text{GlcNAc})_4$. Dette er i overenstemmelse med at etter en produktiv binding fra -2 til +4, vil $(\text{GlcNAc})_4$ være nært tilgjengelig substrat for en prosessiv hydrolyse. Dette er også som vist for ChiB wt (Horn et al. 2006a; Horn et al. 2006b).

5. Videre arbeid

5.1 ChiB R294A og Y214F

Både ChiB R294A og ChiBY214F viste økt transglykosylerings aktivitet relativt til ChiB wt. Dette betyr at til nå er identifisert tre residuer i ChiB som påvirker transglykosylerings aktiviteten, D142, Y214 og R294. Det vil være av stor interesse å lage dobbelmutantene ChiB Y214F/R294A, ChiB D142N/R294A og D142N/Y214F og trippelmutanten ChiB D142N/R294A/Y214F for å se om noen disse får en videre forhøyet transglykosylerings aktivitet

5.2 ChiA D313N/F396W, F396W, W167A og Y390F

ChiA D313N/F396W er blitt undersøkt i denne oppgaven og i tidligere forskning. Resultatene var reproduserbare og viste høye transglykosylerende egenskaper både for ChiA D313N/F396W og enkelt mutasjonen F396W alene. ChiA W167A og Y390F ble ikke suksessfullt rensset på kitinkule kolonne. Det kan være aktuelt å mutere disse inn i pET-16b vektorer for å rense dem på en (Ni – NTA) kolonne. Disse kan testes hver for seg eller brukes for å konstruere potensielle hypertransglykosylerende trippel mutantene ChiA D313N/F396W/W167A eller ChiA D313N/F396W/Y390F. En mutasjon med alle fire enzymene er også aktuell.

5.3 Nedbrytning av (GlcNAc)₆ med ChiB Y214F

Dette hydrolyserings forsøket ble gjort for å undersøke om mutasjonen endret substrat posisjonen i det aktive setet. Dette forsøket ble foretatt for ChiB Y214F, men burde også blitt foretatt med de andre mutasjonene. Det kunne også blitt foretatt en kontroll analyse med (GlcNAc)₄ under ikke-transglykosylerende betingelser (lav enzym og substratkonsentrasjon) som substrat for å undersøke om mutasjonene endrer binding fra -2 til +2 som observert for begge villtype enzymer, men på grunn av tidsbegrensningen ble ikke disse analysene gjennomførbare.

5.4 Tillaging av kitooligosakkarider

Det hadde vært interessant å bruke de ulike hypertransglykosylerende enzymene til å lage bestemte kitooligosakkarider. Dette kan for eksempel gjennomføres ved å bruke et kitolakton (TS analog) eller et kitooksazoliniumion (intermediat analog) som sukkerdonor (vil binde i negative subsester) og koble med ulike sukkerakseptorgrupper f.eks. andre sukkere, peptider, og andre forbindelser som kan kobles til for å gi sukkerne økt funksjonalitet.

6. Kilder

- AA Hoefler. (2012). *Hoefler DQ 300 Fluorometer*. Tilgjengelig fra: <http://www.hoeflerinc.com/media/PDFs/Manuals/DQ300-IMC0-English.pdf> (lest 06.03).
- Aam, B. B., Heggset, B. E., Norberg, A. L., Sørli, M., Vårum, M. K. & Vincent, G. H. E. (2010). Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine. *Marine Drugs*, 8 (5).
- AFMB. (2014). *Glycoside Hydrolase family classification*. Université d'Aix-Marseille. Tilgjengelig fra: <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html> (lest 10.05).
- Agilent Technologies. (2014). *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit - Instruction Manual* Tilgjengelig fra: <http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/200521.pdf> (lest 26.02).
- Aguilera, B., Ghauharali-van der Vlugt, K., Helmond, M. T., Out, J. M., Donker-Koopman, W. E., Groener, J. E., Boot, R. G., Renkema, G. H., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., et al. (2003). Transglycosidase activity of chitotriosidase: improved enzymatic assay for the human macrophage chitinase. *J Biol Chem*, 278 (42): 40911-6.
- Aligent Technologies. (2004). *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* Tilgjengelig fra: <http://www.chem.uky.edu/courses/che554/quikchange.pdf>.
- Aligent Technologies. (2014). *QuikChange Primer Design*. Tilgjengelig fra: <http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp>.
- Amersham Biosciences. (1998). *DyNA Quant®200 Fluorometer User Manual*. Tilgjengelig fra: https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314723116657/litdoc80623124_20131103235646.pdf (lest 06.03).
- Bio-Rad. (2014). *Bio-Rad Protein Assay*. Tilgjengelig fra: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_9004.pdf.
- Brurberg, M. B., Eijnsink, V. G., Haandrikman, A. J., Venema, G. & Nes, I. F. (1995). Chitinase B from *Serratia marcescens* BJL200 is exported to the periplasm without processing. *Microbiology*, 141 (Pt 1): 123-31.
- Brurberg, M. B., Synstad, B., Klemsdal, S. S., Van Aalten, D. M. F., Sundheim, L. & Eijnsink, V. G. H. (2000). Chitinases from *Serratia marcescens*. *Recent Res Dev Microbiol* 5, 187–204.
- Bueter, C. L., Specht, C. A. & Levitz, S. M. (2013). Innate sensing of chitin and chitosan. *PLoS Pathog*, 9 (1): e1003080.
- Clontech. (2014a). *In-Fusion® Molar Ratio Calculator*. Tilgjengelig fra: http://www.clontech.com/US/Support/xxclt_onlineToolsLoad.jsp?citemId=http://bioinfo.clontech.com/infusion/molarRatio.do§ion=16260&xxheight=750.
- Clontech. (2014b). PCR Cloning Kit—Seamless DNA Cloning with In-Fusion HD Cloning Plus.
- Clontech Laboratories. (2014). *In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual*. Mountain View, CA 94043, USA: Inc. A Takara Bio Company. 15 s.
- Davies, G. & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3 (9): 853-859.
- Davies, G. J., Wilson, K. S. & Henrissat, B. (1997). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem J*, 321 (Pt 2): 557-9.
- Dutta, P. K., Dutta, J. & Tripathi, V. S. (2004). Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 63 (1): 20-31.

- ECPlaza. (2014). *Ni-NTA- Agarose Beads*. Tilgjengelig fra: <http://qmbio.en.ecplaza.net/nianta-agarose-beads--154143-2876403.html> (lest 10.03).
- Edvotek. (2003). *Principles and Practice of Agarose Gel Electrophoresis*. Tilgjengelig fra: <https://www.wou.edu/las/physci/ch462/Gel%20Electrophoresis.pdf>.
- Eide, K. B., Lindbom, A. R., Eijsink, V. G. H., Norberg, A. L. & Sørli, M. (2013). Analysis of productive binding modes in the human chitotriosidase. *FEBS Letters*, 587 (21): 3508-3513.
- EMBL-EBI. (2014). *Clustal Omega, Multiple Sequence Alignment*. Tilgjengelig fra: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.
- EMBL. (2014a). *Protein Expression and Purification Core Facility*. Tilgjengelig fra: https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_expression/ecoli/index.html (lest 10.03).
- EMBL. (2014b). *Protein Expression E.coli - Optimisation of Expression Levels*. Tilgjengelig fra: https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_expression/ecoli/optimisation_expression_levels/index.html (lest 10.03).
- EMD Millipore. (2014). *Pellet Paint® Co-Precipitant*. Tilgjengelig fra: http://www.emdmillipore.com/life-science-research/pellet-paint-co-precipitant/c_UiOb.s1On6kAAAEhesAsgmlp (lest 26.02).
- Fukamizo, T. (2000). Chitinolytic enzymes: catalysis, substrate binding, and their application. *Curr Protein Pept Sci*, 1 (1): 105-24.
- Gooday, G. (1990). Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. *Biodegradation*, 1 (2-3): 177-190.
- Hamman, J. H. (2010). Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. *Mar Drugs*, 8 (4): 1305-22.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, 280 (Pt 2): 309-16.
- Henrissat, B. & Davies, G. J. (2000). Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules, and implications for genomics. *Plant Physiol*, 124 (4): 1515-9.
- Hoffmann & Stroobant. (2011). *Mass Spectrometry - Principles and Applications*. 3 utg. West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd 489 s.
- Horn, S. J., Sorbotten, A., Synstad, B., Sikorski, P., Sørli, M., Varum, K. M. & Eijsink, V. G. (2006a). 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. (2006b). Comparative studies of chitinases A, B and C from *Serratia marcescens*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 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.
- Jitonnom, J., Lee, V. S., Nimmanpipug, P., Rowlands, H. A. & Mulholland, A. J. (2011). Quantum mechanics/molecular mechanics modeling of substrate-assisted catalysis in family 18 chitinases: conformational changes and the role of Asp142 in catalysis in ChiB. *Biochemistry*, 50 (21): 4697-711.
- Lesk M. Arthur. (2010). *Introduction to protein science - Architecture, Function and Genomics*. 2 utg. Oxford, New York: Oxford University Press Inc. 455 s.
- Life Technologies. (2014a). *BenchMark™ Protein Ladder* Tilgjengelig fra: <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/10747012>.
- Life Technologies. (2014b). *IPTG*. Tilgjengelig fra: <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/15529019>.

- Life Technologies. (2014c). *One Shot® BL21 Star™ (DE3) Chemically Competent E. coli*. Tilgjengelig fra: <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/C601003> (lest 27.02).
- Life Technologies. (2014d). *One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli*. Tilgjengelig fra: <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/C404003> (lest 26.02).
- Life Technologies. (2014e). *SDS-PAGE Electrophoresis of Proteins*. Tilgjengelig fra: <http://www.lifetechnologies.com/no/en/home/life-science/protein-expression-and-analysis/protein-gel-electrophoresis/sds-page.html>.
- Macherey-Nagel. (2014). *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up*. Tilgjengelig fra: <http://www.mn-net.com/ProductsBioanalysis/DNAandRNAPurification/Cleanup/NucleoSpinGelandPCRcleanup/tabid/1452/language/en-US/Default.aspx> (lest 02.03).
- Madhuprakash, J., Tanneeru, K., Purushotham, P., Guruprasad, L. & Podile, A. R. (2012). Transglycosylation by chitinase D from *Serratia proteamaculans* improved through altered substrate interactions. *J Biol Chem*, 287 (53): 44619-27.
- Madhuprakash, J., Singh, A., Kumar, S., Sinha, M., Kaur, P., Sharma, S., Podile, A. R. & Singh, T. P. (2013). Structure of chitinase D from *Serratia proteamaculans* reveals the structural basis of its dual action of hydrolysis and transglycosylation. *Int J Biochem Mol Biol*, 4 (4): 166-78.
- Miller M. James. (2009). *Chromatography Concepts and Contrasts*. 2 utg. Hoboken New Jersey, Canada: John Wiley & Sons inc. 490 s.
- Millipore. (2014). *Protein Sample Preparation, Protein Concentration*. Tilgjengelig fra: http://www.millipore.com/lab_filtration/flx4/psp_concentration#tab1=1 (lest 10.02).
- Monreal, J. & Reese, E. T. (1969). The chitinase of *Serratia marcescens*. *Canadian Journal of Microbiology*, 15 (7): 689-696.
- New England BioLabs inc. (2014a). *BSA*. Tilgjengelig fra: <https://www.neb.com/products/b9001-bsa> (lest 14.03).
- New England BioLabs inc. (2014b). *NEBuffer 2*. Tilgjengelig fra: <https://www.neb.com/products/b7002-nebuffer-2>.
- NIH MBI. (2003). *Rare Codon Calculator (RaCC)*. Tilgjengelig fra: <http://nihserver.mbi.ucla.edu/RACC/> (lest 15.02).
- Norberg, A. L., Karlsen, V., Hoell, I. A., Bakke, I., Eijsink, V. G. & Sorlie, M. (2010). Determination of substrate binding energies in individual subsites of a family 18 chitinase. *FEBS Lett*, 584 (22): 4581-5.
- Novagen. (2004). *Competent cells*. Tilgjengelig fra: http://www.med.unc.edu/pharm/sondeklab/Lab%20Resources/manuals/novagen_competent_cells2.pdf.
- Novagen. (2014a). *pET-16b vektor* Tilgjengelig fra: <http://biochem.web.utah.edu/hill/links/pET16b.pdf> (lest 07.03).
- Novagen. (2014b). *pET System Manual 11th Edition*. Tilgjengelig fra: http://www.merckmillipore.se/life-science-research/vector-table-novagen-pet-vector-table/c_HdSb.s1O77QAAAEhPqsLdcab?back=true%3Fopen&cid=bios-x-goog-1056-2380-sp&PortalCatalogID=merck4biosciences&CountryName=Sweden (lest 30.05).
- Omega Bio-tek. (2014). *Product Manual E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I*. Tilgjengelig fra: <http://www.omegabiotek.com/files/resource/Handbook/44864900.pdf> (lest 24.02).
- Pall Corporation. (2014). *Macrosep® Advance Centrifugal Devices*. Tilgjengelig fra: <http://www.pall.com/main/laboratory/product.page?id=53353> (lest 04.03).

- 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.
- 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.
- Phenomenex Rezex. (2014). *Rezex HPLC Information*. Tilgjengelig fra: <http://www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/rezex>.
- Pillai, C. K. S., Paul, W. & Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34 (7): 641-678.
- Premier Biosoft. (2014). *PCR Primer Design Guidelines*. Tilgjengelig fra: http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html (lest 25.02).
- ProteoChem. (2014). *DHB Matrix*. Tilgjengelig fra: <http://www.proteochem.com/dhb4x25mg-p-79.html> (lest 24.02).
- Qiagen. (2013). *Ni-NTA Agarose*. Tilgjengelig fra: <http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/protein-sample-technologies/purification-kits-and-resins/ni-nta-agarose#orderinginformation> (lest 10.03).
- Qiagen. (2014). *Flagellar Assembly of E. coli*. Tilgjengelig fra: <http://www.qiagen.com/products/genes%20and%20pathways/pathway%20details?pwd=183> (lest 04.03).
- QSonica. (2012). *Sonicator - Ultrasonic Liquid Processors*. Tilgjengelig fra: <http://www.sonicator.com/literature/manuals/Catalog.pdf> (lest 06.03).
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31 (7): 603-632.
- Roche. (2013). *His-Tag*. Tilgjengelig fra: <http://www.roche-applied-science.com/campaigns/DeveloperTips/protein-purification/his-tag.html> (lest 10.03).
- Rye, C. S. & Withers, S. G. (2000). Glycosidase mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4 (5): 573-580.
- Schaupp, D. (2014). *Direksjonaliteten på prosessive enzymer som virker på krystallinske polysakkarider gjenspeiles i de kinetiske signaturer av oligomer degradering*. Ås: NMBU, IKBM.
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D. & D'Ari, R. (2007). Escherichia coli physiology in Luria-Bertani broth. *J Bacteriol*, 189 (23): 8746-9.
- Sikorski, P., Stokke, B. T., Sørbotten, A., Vårum, K. M., Horn, S. J. & Eijsink, V. G. H. (2005). Development and application of a model for chitosan hydrolysis by a family 18 chitinase. *Biopolymers*, 77 (5): 273-285.
- Sikorski, P., Sørbotten, A., Horn, S. J., Eijsink, V. G. H. & Vårum, K. M. (2006). *Serratia marcescens* Chitinases with Tunnel-Shaped Substrate-Binding Grooves Show Endo Activity and Different Degrees of Processivity during Enzymatic Hydrolysis of Chitosan†. *Biochemistry*, 45 (31): 9566-9574.
- Sinnott, M. L. (1990). Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer. *Chemical Reviews*, 90 (7): 1171-1202.
- Suzuki, K., Sugawara, N., Suzuki, M., Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N. & Watanabe, T. (2002). Chitinases A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: enzymatic properties and synergism on chitin degradation. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66 (5): 1075-83.
- 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., Gåseidnes, S., van Aalten, D. M. F., Vriend, G., Nielsen, J. E. & Eijsink, V. G. H. (2004). Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase. *European Journal of Biochemistry*, 271 (2): 253-262.
- Thermo Scientific. (2008). *NanoDrop 100 Spectrophotometer V3.7 Users's Manual*. Tilgjengelig fra: <http://www.nanodrop.com/library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf> (lest 10.02).
- Tortora, G. J., Funke, B. R. & Case, C. L. (2009). *Microbiology An introduction*. 10 utg.: Benjamin Cummings. 812 s.
- Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., Sørli, M. & Eijsink, V. G. H. (2013). The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens* – a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *FEBS Journal*, 280 (13): 3028-3049.
- 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.
- van Aalten, D. M. F., Synstad, B., Brurberg, M. B., Hough, E., Riise, B. W., Eijsink, V. G. H. & Wierenga, R. K. (2000). Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1.9-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (11): 5842-5847.
- W. Friedrich. (2007). *Theory and Measurement of Bacterial Growth* Universität Bremen. Tilgjengelig fra: <https://www.mpi-bremen.de/Binaries/Binary13037/Wachstumsversuch.pdf> (lest 03.03).
- 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. (2011). *Processivity, substrate-binding specificity and transglycosylation in family 18 chitinases from Serratia marcescens*. Philosophiae Doctor (PhD) Thesis. Ås: NMBU, The Department of Chemistry, Biotechnology and Food Science.
- Zakariassen, H., Hansen, M. C., Joranli, M., Eijsink, V. G. & Sorlie, M. (2011). Mutational effects on transglycosylating activity of family 18 chitinases and construction of a hypertransglycosylating mutant. *Biochemistry*, 50 (25): 5693-703.

7. Vedlegg

Vedlegg 1

RaCC results:

Red = rare Arg codons **AGG, AGA, CGA**

Green = rare Leu codon **CTA**

Blue = rare Ile codon **ATA**

Orange = rare Pro codon **CCC**

ChiB wt

```
atg tcc aca cgc aaa gcc gtt att ggg tat tat ttt att cca acc aac caa atc aat aac tac
acc gag acc gat acg tcc gtc gtg cca ttc ccg gtt tcc aac att acg ccg gcc aaa gcc aaa
cag ctg acg cac atc aac ttc tcg ttc ctg gat atc aac agc aat ctg gaa tgc gcc tgg gat
ccg gcc acc aac gac gcc aag gcg cgc gat gtg gtc aac cgt ctg acc gcg ctc aaa gcg cac
aac CCC agc ctg cgc atc atg ttc tcc atc ggc ggc tgg tac tac tcc aac gat ctg ggc gtg
tcg cac gcc aac tat gtc aac gcg gtg aaa acc ccg gcg tcg cgc gcc aag ttc gcc caa tcc
tgc gtg cgc atc atg aag gat tac ggc ttc gac ggt gtg gac atc gac tgg gag tac ccg caa
gcg gcg gaa gtg gac ggc ttc atc gcc gcg ctg cag gag atc cgc acc ttg ctg aac cag caa
acc atc aca gac ggc cgc cag gcg ttg ccg tac cag ttg acc atc gcc ggc gcc ggc gcc gcc
ttc ttc ctg tcg cgc tat tac agc aag ctg gcg cag atc gtc gcg ccg ctc gat tac atc aac
ctg atg acc tac gat ctg gcc ggc CCC tgg gag aag gta acc aac cac cag gcg gcg ctg ttc
ggc gac gcg gcc ggg ccg acc ttc tac aac gcg ctg cgc gaa gcc aat ctg ggc tgg agc tgg
gaa gag ctg acc cgc gcc ttc CCC agc ccg ttc agc ctg acg gtc gac gcc gcc gtg cag caa
cac ctg atg atg gaa ggc gtg ccg agc gcc aaa atc gtc atg ggc gtg CCC ttc tat ggc cgc
gcc ttc aag ggc gtc agc ggc ggc aac ggt ggg caa tac agc agc cac agc acg ccg ggc gaa
gat ccg tat ccg agc acc gac tac tgg ctg gtg ggc tgc gaa gag tgc gtg cgc gac aag gat
ccg cgc atc gcc tcc tat cgc cag ttg gag cag atg ctg cag ggc aac tac ggc tat cag ccg
ttg tgg aac gac aag acc aaa acc cct tat ctg tat cat gcg cag aac ggg ctg ttc gtc acc
tat gac gat gcc gag agc ttc aaa tac aaa gcg aag tac atc aag cag cag cag ctg ggc ggc
gtg atg ttc tgg cat ctg ggg caa gac aac cgc aac ggc gat ctg ctg gcc gcg ctg gat cgc
tat ttc aac gcc gcg gac tac gac gac agc cag ctg gat atg ggc acc ggg ctg cgc tac acc
ggc gtc ggc CCC ggc aac ctg cct atc atg acc gcg ccg gcc tat gtg ccg ggc acc act tac
gcg cag ggc gcg ctg gtg tcc tac cag ggc tac gtc tgg cag acc aag tgg ggt tac atc acc
tct gca ccg ggt tca gac agc gcc tgg ctg aag gtg ggc cgc gta gcg taa
```

ChiA wt:

```
atg cgc aaa ttt aat aaa ccg ctg ttg gcg ctg ttg atc ggc agc acg ctg tgt tcc gcg gcg
cag gcc gcc gcg ccg ggc aag ccg acc atc gcc tgg ggc aac acc aag ttc gcc atc gtt gaa
ggt gac cag gcg gct acc gct tat aat agt ttg gtg aag gta aaa aat gcc gcc gat gtt tcg
gtc tcc tgg aat tta tgg aat ggc gac acc ggt acg acg gca aaa gtt tta tta aat ggc aaa
gag gcg tgg agc ggc ccg tca acc ggt tct tcc ggt acg gcg aat ttt aaa gtc aat aaa ggc
ggc cgt tat caa atg cag gtg gca ttg tgc aat gcc gac ggc tgc agc gcc agc gat gcc acc
gaa att gtg gtg gcc gac acc gac ggc agc cat ttg gcg ccg ttg aaa gag ccg ctg ctg gaa
aag aat aaa ccg tat aaa cag aac tcc ggc aaa gtg gtc ggt tct tat ttc gtc gag tgg ggc
```

7. Vedlegg

ggt tac ggg cgc aat ttc acc gtc gac aag atc ccg gcg cag aac ctg acc cac ctg ctg tac
ggc ttt atc ccg atc tgc ggt ggc aac ggc atc aac gac agc ctg aaa gag atc gaa ggc agc
ttc cag gcg ctg cag cgc tcc tgc cag ggc cgc gag gac ttc aaa gtc tgc atc cac gat ccg
ttc gcc gcg ctg caa aaa gcg cag aag ggc gtt acc gcc tgg gat gac **ccc** tac aag ggc aac
ttc ggc cag ctg atg gcg ctg aaa cag gcg cat cct gac ctg aaa att ctg ccg tgc atc ggc
ggc tgg acg ctg tcc gac ccg ttc ttc ttc atg ggc gat aag gtg aag cgc gat cgc ttc gtc
ggt tgc gtg aaa gag ttc ctg cag acc tgg aag ttc ttc gat ggc gtg gat atc gac tgg gag
ttc ccg ggc ggc aaa ggc gcc aac ccg aac ctg ggc agc ccg cag gac ggg gaa acc tat gtg
ctg ctg atg aag gag ctg cgc gcg atg ctg gat cag ctg tgc gcg gaa acc ggc cgc aaa tat
gaa ctg acc tct gcc atc agc gcc ggc aag gac aag atc gac aag gtg gct tac aac gtt gcg
cag aac tgc atg gat cac atc ttc ctg atg agc tac gac ttc tat ggc gcc ttc gat ctg aag
aac ctg ggg cat cag acc gcg ctg aat gcg ccg gcc tgg aag ccg gac acc gct tac acc acg
gtg aac ggc gtc aat gcg ctg ctg gcg cag ggc gtc aag ccg ggc aag atc gtg gtc ggc acc
gcc atg tat ggc cgc ggc tgg acc ggg gtg aac ggc tac cag aac aac att ccg ttc act ggt
acc gcc acc ggg ccg gtc aaa ggc acc tgg gag aac ggc atc gtg gac tac cgc caa atc gcc
ggc cag ttc atg agc ggc gag tgg cag tat acc tac gac gcc acg gcg gaa gcg cct tac gtg
ttc aaa cct tcc acc ggc gat ctg atc acc ttc gac gat gcc cgc tgc gtg cag gcc aaa ggc
aag tac gtg ctg gat aag cag ctg ggc ggc ctg ttc tcc tgg gag atc gac gcg gat aac ggc
gat att ctc aac agc atg aac gcc agc ctg ggc aac agc gcc ggc gtt caa taa

Vedlegg 2

Sammenstilling av sekvensen til ChiB villtype med sekvensene til 4 ulike pET16b-ChiB-D142N plasmid

```
79      CATcntCatCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCATATCGAAGGTCGTCATATGTCCACA
ChiBWT  -----atgtccaca
78      CATCATCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCATATCGAAGGTCGTCATATGTCCACA
80      CATCATCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCATATCGAAGGTCGTCATATGTCCACA
81      CATCATCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCATATCGAAGGTCGTCATATGTCCACA
          *****

79      CGCAAAGCCGTTATTGGgtATtATTTATTCCAACcaACCAAATCAATAACTACACCGAG
ChiBWT  cgcaaagccgttattgggtattatTTTTATTCCAACcaACCAAATCAATAACTACACCGAG
78      CGCAAAGCCGTTATTGGGTATTATTTATTCCAACCAACCAAATCAATAACTACACCGAG
80      CGCAAAGCCGTTATTGGGTATTATTTATTCCAACCAACCAAATCAATAACTACACCGAG
81      CGCAAAGCCGTTATTGGGTATTATTTATTCCAACCAACCAAATCAATAACTACACCGAG
          *****

79      ACCGATACGTCcgtCgtGCCATTCCCGGTTTCCAACATTACGCCGGCCAAAGCCAAACAG
ChiBWT  accgatacgtccgctcgtgccattcccggtttccaacattacgccggccaaagccaaacag
78      ACCGATACGTCcgtCgtGCCATTCCCGGTTTCCAACATTACGCCGGCCAAAGCCAAACAG
80      ACCGATACGTCcgtCgtGCCATTCCCGGTTTCCAACATTACGCCGGCCAAAGCCAAACAG
81      ACCGATACGTCcgtCgtGCCATTCCCGGTTTCCAACATTACGCCGGCCAAAGCCAAACAG
          *****

79      CTGACGCACATCAACTTCTCGTTCCTGGATATCAACAGCAATCTGGAATGCGCCTGGGAT
ChiBWT  ctgacgcacatcaacttctcgttcctggatatacaacagcaatctggaatgcgctgggat
78      CTGACGCACATCAACTTCTCGTTCCTGGATATCAACAGCAATCTGGAATGCGCCTGGGAT
80      CTGACGCACATCAACTTCTCGTTCCTGGATATCAACAGCAATCTGGAATGCGCCTGGGAT
81      CTGACGCACATCAACTTCTCGTTCCTGGATATCAACAGCAATCTGGAATGCGCCTGGGAT
          *****

79      CCGGCCACCAACGACGCCAAGGCGCGGATGTGGTCAACCGTCTGACCGCGCTCAAAGCG
ChiBWT  ccggccaccaacgacgccaaaggcgcggatgtggtcaaccgtctgaccgcgctcaaagcg
78      CCGGCCACCAACGACGCCAAGGCGCGGATGTGGTCAACCGTCTGACCGCGCTCAAAGCG
80      CCGGCCACCAACGACGCCAAGGCGCGGATGTGGTCAACCGTCTGACCGCGCTCAAAGCG
81      CCGGCCACCAACGACGCCAAGGCGCGGATGTGGTCAACCGTCTGACCGCGCTCAAAGCG
          *****

79      CACAACCCAGCCTGCGCATCATGTTCTCCATCGGGCGGCTGGTACTACTCCAACGATCTG
ChiBWT  cacaacccagcctgcgcatcatgttctccatcgggcggtggtactactccaacgatctg
78      CACAACCCAGCCTGCGCATCATGTTCTCCATCGGGCGGCTGGTACTACTCCAACGATCTG
80      CACAACCCAGCCTGCGCATCATGTTCTCCATCGGGCGGCTGGTACTACTCCAACGATCTG
81      CACAACCCAGCCTGCGCATCATGTTCTCCATCGGGCGGCTGGTACTACTCCAACGATCTG
          *****
```

7. Vedlegg

```
79      GCGGTGTCGCACGCCAACTATGTCAACGCGGTGAAAACCCCGCGTTCGCGGCCAAGTTC
ChiBWT  ggcgtgtcgcacgccaaactatgtcaacgcggtgaaaaccccgcgctcgcgcccagttc
78      GCGGTGTCGCACGCCAACTATGTCAACGCGGTGAAAACCCCGCGTTCGCGGCCAAGTTC
80      GCGGTGTCGCACGCCAACTATGTCAACGCGGTGAAAACCCCGCGTTCGCGGCCAAGTTC
81      GCGGTGTCGCACGCCAACTATGTCAACGCGGTGAAAACCCCGCGTTCGCGGCCAAGTTC
*****

79      GCCCAATCCTGCGTGCATCATGAAGGATTACGGCTTCGACGGTGTGGACATCAACTGG
ChiBWT  gcccaatcctgcggtgcgcatcatgaaggattacggcttcgacgggtgtggacatcgaactgg
78      GCCCAATCCTGCGTGCATCATGAAGGATTACGGCTTCGACGGTGTGGACATCAACTGG
80      GCCCAATCCTGCGTGCATCATGAAGGATTACGGCTTCGACGGTGTGGACATCAACTGG
81      GCCCAATCCTGCGTGCATCATGAAGGATTACGGCTTCGACGGTGTGGACATCAACTGG
*****

79      GAGTACCCGCAAGCGCGGAAGTGGACGGCTTCATCGCCGCGTGCAGGAGATCCGCACC
ChiBWT  gagtaccgcgaagcgcggaagtggacggcttcacgcccgcgtgcaggagatccgcacc
78      GAGTACCCGCAAGCGCGGAAGTGGACGGCTTCATCGCCGCGTGCAGGAGATCCGCACC
80      GAGTACCCGCAAGCGCGGAAGTGGACGGCTTCATCGCCGCGTGCAGGAGATCCGCACC
81      GAGTACCCGCAAGCGCGGAAGTGGACGGCTTCATCGCCGCGTGCAGGAGATCCGCACC
*****

79      TTGCTGAACCAGCAAACCATCACAGACGGCCGAGGCGTTGCCGTACCAGTTGACCATC
ChiBWT  ttgctgaaccagcaaacccatcacagacggccgagcgcttgccgtaccagttgaccatc
78      TTGCTGAACCAGCAAACCATCACAGACGGCCGAGGCGTTGCCGTACCAGTTGACCATC
80      TTGCTGAACCAGCAAACCATCACAGACGGCCGAGGCGTTGCCGTACCAGTTGACCATC
81      TTGCTGAACCAGCAAACCATCACAGACGGCCGAGGCGTTGCCGTACCAGTTGACCATC
*****

79      GCCGGCGCGCGTTCGCGCGCAAGTTCGCCAATCCTGCGTGCATCATGAAGGATTA
ChiBWT  gccggcgcgcggttcgcgcgcaagttcgccaatcctgcggtgcgcatcatgaaggatta
78      GCCGGCGCGCGTTCGCGCGCAAGTTCGCCAATCCTGCGTGCATCATGAAGGATTA
80      GCCGGCGCGCGTTCGCGCGCAAGTTCGCCAATCCTGCGTGCATCATGAAGGATTA
81      GCCGGCGCGCGTTCGCGCGCAAGTTCGCCAATCCTGCGTGCATCATGAAGGATTA
*****

79      CG--GCTTCGACGGTGTGGACATCA-----ACTGgGAGTACcCGCAAGCGCGGAAGTG
ChiBWT  gcgcccgtcgattacatcaacctgatgacctacgatctggccggcccttgggagaagta
78      GCGCCGCTCGATTACATCAACCTGATGACCTACGATCTGGCCGGCCCTGGGAGAAGGTA
80      GCGCCGCTCGATTACATCAACCTGATGACCTACGATCTGGCCGGCCCTGGGAGAAGGTA
81      GCGCCGCTCGATTACATCAACCTGATGACCTACGATCTGGCCGGCCCTGGGAGAAGGTA
****          * * * * *          **          * *          * * * * *

79      GACGGCTTCATCGCCGCGTGCAGGAGATCCGC-----ACCTTGCTGAACCAGC--
ChiBWT  accaaccaccaggcggcgtgttcggcgacgcgccggcggccgaccttctacaacgcgctg
78      ACCAACCACCAGGCGCGCTGTTGCGCGACGCGCCGGCCGACCTTCTACAACGCGCTG
80      ACCAACCACCAGGCGCGCTGTTGCGCGACGCGCCGGCCGACCTTCTACAACGCGCTG
81      ACCAACCACCAGGCGCGCTGTTGCGCGACGCGCCGGCCGACCTTCTACAACGCGCTG
* * * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *

79      ---AAACCATCACAGACGgCCGcngCGTTCGCCtnc-----
ChiBWT  cgcaagccaatctgggtgagctggaagagctgaccgcgcccttccccagcccgttc
78      CGCGAAGCCAATCTGGGCTGGAGCTGGGAAGAGCTGACCCGCGCTTCCCCAGCCGTTT
80      CGCGAAGCCAATCTGGGCTGGAGCTGGGAAGAGCTGACCCGCGCTTCCCCAGCCGTTT
81      CGCGAAGCCAATCTGGGCTGGAGCTGGGAAGAGCTGACCCGCGCTTCCCCAGCCGTTT
** * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *

79      -----
ChiBWT  agcctgacggtcgcagccgcccgtgcagcaaacacctgatgatggaaggcgtgcccagcggc
78      AGCCTGACGGTCGACGCCCGCTGCAGCAACACCTGATGATGGAAGGCGTGCCGAGCGCC
80      AGCCTGACGGTCGACGCCCGCTGCAGCAACACCTGATGATGGAAGGCGTGCCGAGCGCC
81      AGCCTGacGGTCGACGCCCGCTGCAGCAACACCTGATGATGGAAGGCGTGCCGAGCGCC

79      -----
ChiBWT  aaaatcgatgggctgccccttctatggccgccccttcaaggcgtcagcggcggcaac
78      AAAATCGTCATGGGCTGCCCTTCTATGGCCGCGCTTCAAGGGCGTCAGCGCGGCAAC
80      AAAATCGTCATGGGCTGCCCTTCTATGGCCGCGCTTCAAGGGCGTCAGCGCGGCAAC
81      AAAATCGTCATGGGCTGCCCTTCTATGGCCGCGCTTCAAGGGCGTCAGCGCGGCAAC
```


7. Vedlegg

Vedlegg 3

Sammenstilling av sekvensen til ChiB villtype med sekvensene til ett pET16b-ChiB-D142N/Y214F plasmid

```
D142N_Y214F      GggaaTCCTCTagaTaTTTTtGTTtaCTTtAAaGaAGGagaTATACCATGGGCCATCATC
wt      -----

D142N_Y214F      ATCATCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCATATCGAAGGTCGTCATATGTCCACAC
wt      -----atgtccacac
                                           *****

D142N_Y214F      GCAAAGCCGTTATTGGGTATTATTTTATTCCAACCAACCAAAATCAATAACTACACCGAGA
wt      gcaaagccgttattgggtattatTTTTATTCCAACCAACCAAAATCAATAACTACACCGAGA
                                           *****

D142N_Y214F      CCGATACGTCCGTTCGTCGCATTCCCGGTTTCCAACATTACGCCGCAAGCCAAACAGC
wt      ccgatacgtccgttcgtgccattcccggtttccaacattacgccgcaagccaaacagc
                                           *****

D142N_Y214F      TGACGCACATCAACTTCTCGTTCCTGGATATCAACAGCAATCTGGAATGCGCCTGGGATC
wt      tgacgcacatcaacttctcgttcctggatatcaacagcaatctggaatgcgctgggatc
                                           *****

D142N_Y214F      CGGCCACCAACGACGCCAAGGCGCGGATGTGGTCAACCGTCTGACCGCGCTCAAAGCGC
wt      cggccaccaacgacgccaaaggcgcggatgtggtcaaccgtctgaccgcgctcaaagcgc
                                           *****

D142N_Y214F      ACAACCCAGCCTGCGCATCATGTTCTCCATCGGCGGCTGGTACTACTCCAACGATCTGG
wt      acaacccagcctgcgcatcatgttctccatcggcggctggtactactccaacgatctgg
                                           *****

D142N_Y214F      GCGTGTGCGCACGCCAACTATGTCAACGCGGTGAAAACCCCGCGTTCGCGCGCAAGTTCG
wt      gcgtgtgcgcacgccaaactatgtcaacgcggtgaaaaccccgcgctcgcgcgcaagtctc
                                           *****

D142N_Y214F      CCCAATCCTGCGTTCGCGCATCATGAAGGATTACGGCTTCGACGGTGTGGACATCAACTGGG
wt      cccaatcctgctgcgcatcatgaaggattacggcttcgacgggtgtggacatcaactggg
                                           gactggg
                                           *****

D142N_Y214F      AGTACCCGCAAGCGCGGAAGTGGACGGCTTCATCGCCGCGCTGCAGGAGATCCGCACCT
wt      agtaccgcaagcgcggaagtggacggcttc-----
                                           *****

D142N_Y214F      TGCTGAACAGCAAACCATCACAGACGGCCGCGGCTGCGGTACCAGTTGACCATCG
wt      -----

D142N_Y214F      CCGGCGCCGCGCTCGCGCGCAAGTTCGCCAATCCTGCGTTCGCGCATCATGAAGGATTAC
wt      -----

D142N_Y214F      GGCTTCGACGGTGTGGACATCAACTGGGAGTACCCGCAAGCGCGGAAGTGGACGGCTTC
wt      -----gcttc
                                           *****

D142N_Y214F      ATCGCCGCGCTGCAGGAGATCCGCACCTTGCTGAACCAGCAnACCATCACAGACGGCCGC
wt      atcgcgctgagcagatccgcaccttgcgaaccagcaaacatcacagacggccgc
                                           *****

D142N_Y214F      CAGGCGTTGCCGTACCAGTTGACCATCGCCGCGCCGCGCGCCTTCTTCTGTGCGCGC
wt      caggcgttgccgtaccagttgaccatcgcgcgccgcgcgcccttcttctgtgcgcg
                                           *****

D142N_Y214F      TATTACAGCAAGCTGGCGCAGATCGTTCGCGCGCTCGATTACATCAACCTGATGACCTTC
wt      tattacagcaagctggcgcagatcgttcgcgcgctcgattacatcaacctgatgacctac
                                           *****

D142N_Y214F      GATCTGGCCGCCCCCTGgGAGAAGGTAACCAACCACCAGGCGCGCTGTTGCGCGACGCG
wt      gatctggccgccccctgggagaaggtaaccaaccaccaggcgcgctgcttcgcgacgcg
                                           *****
```

Vedlegg 4

Sammenstilling av sekvensen til ChiB villtype med sekvensene til ett pET16b-ChiB-D142N/R294A plasmid

D142N_R294A wt AtgTCCACACGCAAAGCCGTTATTGGGTATTATTTTATTCCAACCAACCAAATCAATAAC
atgtccacacgcaaagccggttattgggtattatTTTTATTCCAACCAACCAAATCAATAAC

D142N_R294A wt TACACCGAGACCGATACGTCCGTCgtGCCATTCCCGGTTTCCAACATTACGCCGGCCAAA
tacaccgagaccgatacgtccgtcgtgccattcccggtttccaacattacgccggccaaa

D142N_R294A wt GCCAAACAGCTGACGCACATCAACTTCTCGTTCCTGGATATCAACAGCAATCTGGAATGC
gccaaacagctgacgcacatcaacttctcgttcctggatatacaacagcaatctggaatgc

D142N_R294A wt GCCTGGGATCCGGCCCAACGACGCCAAGGCGCGCATGTGGTCAACCGTCTGACCCGG
gcctgggatccggcccaacgacgcccaaggcgcgcgatgtggTCAACCGTCTGACCCGG

D142N_R294A wt CTCAAAGCGCACAAACCCAGCCTGCGCATCATGTTCTCCATCGGCGGCTGGTACTACTCC
ctcaaagcgcacaacccagcctgCGCATCATGTTCTCCATCGGCGGCTGGTACTACTCC

D142N_R294A wt AACGATCTGGGCGTGTGCGCACGCAACTATGTCAACGCGGTGAAAACCCGGCGTTCGCGC
aacgatctgggCGTGTGCGCACGCAACTATGTCAACGCGGTGAAAACCCGGCGTTCGCGC

D142N_R294A wt GCCAAGTTCGCCAATCCTGCGTGCATCATGAAGGATTACGGCTTCGACGGTGTGGAC
gccaagtTCGCCAATCCTGCGTGCATCATGAAGGATTACGGCTTCGACGGTGTGGAC

D142N_R294A wt ATCAACTGGGAGTACCCGCAAGCGGGGAAGTGGACGGCTTCATCGCCGCGCTGCAGGAG
atcgaactgggagTACCCGCAAGCGGGGAAGTGGACGGCTTCATCGCCGCGCTGCAGGAG
*** *****

D142N_R294A wt ATCCGCACCTTGCTGAACCAGCAAACCATCACAGACGGCCGCGGCGTTCGCGTACCAG

D142N_R294A wt TTGACCATCGCCGCGCGCGGCTCGCGCGCCAAGTTCGCCAATCCTGCGTGCATCAT

D142N_R294A wt GAAGGATTACGGCTTCGACGGTGTGGACATCAACTGGGAGTACCCGCAAGCGGGGAAGT
-----agt

D142N_R294A wt GGACGGCTTCATCGCCGCGCTGCAGGAGATCCGCACCTTGCTGAACCAGCAAACCATCAC
ggacggctTCATCGCCGCGCTGCAGGAGATCCGCACCTTGCTGAACCAGCAAACCATCAC

D142N_R294A wt AGACGGCCGCGAGGCGTTCGCGTACCAGTTGACCATCGCCGCGCGGCGGCGCTTCTT
agacggccgCGAGGCGTTCGCGTACCAGTTGACCATCGCCGCGCGGCGGCGCTTCTT

D142N_R294A wt CCTGTGCGCTATTACAGCAAGCTGGCGCAGATCGTCGCGCGCTCGATTACATCAACCT
cctgtGCGCTATTACAGCAAGCTGGCGCAGATCGTCGCGCGCTCGATTACATCAACCT

D142N_R294A wt GATGACCTACGATCTGGCCGGCCCTGGGAagAAGGTAACCAACCACAGGCGGCGTGT
gatgacctacgATCTGGCCGGCCCTGGGAagAAGGTAACCAACCACAGGCGGCGTGT

D142N_R294A wt TCGGCgannCGccgGGCCGACCTTCTACAacnncTGcgcnaagCCAATCTGnct
tcggcgacgcggccggccgaccttctacaacgcgctgcgcgaagccaatctgggctgga
***** *****

D142N_R294A wt -----
gctggaagagctgaccgcgcttccccagccgttcagcctgacggtcgacgcgcgcg

D142N_R294A wt -----
tgcageaacacctgatgatggaaggcgtgcccagcgcgcaaaatcgatggcgctgcct

7. Vedlegg

D142N_R294A
wt tctatggcgcgagccttcaagggcgtcagcggcggaacgggtgggcaatacagcagccaca

D142N_R294A
wt gcacgcccggcggaagatccgtatccgagcaccgactactggctggtgggctgcgaagagt

Vedlegg 5

Ny sammenstilling av sekvensen til ChiB villtype med sekvensene til 3 ulike pET16b-ChiB-D142N plasmid

Templat -----atgtccac
08 TccncatcaTCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCATATCGAAGGTCGTATATGTCCAC
06 TCATCATCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCATATCGAAGGTCGTATATGTCCAC
07 tcnncATCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCATATCGAAGGTCGTATATGTCCAC

Templat acgcaaagccggttattgggtattatTTTTATTCCAACCAACCAAAATCAATAACTACACCGA
08 ACGCAAAGCCGTTATTGGGTATTATTTTTATTCCAACCAACCAAAATCAATAACTACACCGA
06 ACGCAAAGCCGTTATTGGGTATTATTTTTATTCCAACCAACCAAAATCAATAACTACACCGA
07 ACGCAAAGCCGTTATTGGGTATTATTTTTATTCCAACCAACCAAAATCAATAACTACACCGA

Templat gaccgatacgtccgctcgtgccattcccgggtttccaacattacgcccggccaaagccaaaca
08 GACCGATACTCCGTCgtGCCATTCCCCTTTCCAACATTACGCCGGCCAAAGCCAAACA
06 GACCGATACTCCGTCGTGCCATTCCCCTTTCCAACATTACGCCGGCCAAAGCCAAACA
07 GACCGATACTCCGTCGTGCCATTCCCCTTTCCAACATTACGCCGGCCAAAGCCAAACA

Templat gctgacgcacatcaacttctcgttccctggatatcaacagcaatctggaatgcgcctggga
08 GCTGACGCACATCAACTTCTCGTTCCTGGATATCAACAGCAATCTGGAATGCGCCTGGGA
06 GCTGACGCACATCAACTTCTCGTTCCTGGATATCAACAGCAATCTGGAATGCGCCTGGGA
07 GCTGACGCACATCAACTTCTCGTTCCTGGATATCAACAGCAATCTGGAATGCGCCTGGGA

Templat tccggccaccaacgacgccaagggcgcgcatggtggtcaaccgctcgtaccgctcaaagc
08 TCCGGCCACCAACGACGCCAAGGCGCGCATGTGGTCAACCGCTCGACCGCGCTCAAAGC
06 TCCGGCCACCAACGACGCCAAGGCGCGCATGTGGTCAACCGCTCGACCGCGCTCAAAGC
07 TCCGGCCACCAACGACGCCAAGGCGCGCATGTGGTCAACCGCTCGACCGCGCTCAAAGC

Templat gcacaaccgagcctgcgcatcatggttctccatcggcggtggtactactccaacgatct
08 GCACAACCCAGCCTGCGCATCATGTTCTCCATCGGCGGCTGGTACTACTCCAACGATCT
06 GCACAACCCAGCCTGCGCATCATGTTCTCCATCGGCGGCTGGTACTACTCCAACGATCT
07 GCACAACCCAGCCTGCGCATCATGTTCTCCATCGGCGGCTGGTACTACTCCAACGATCT

Templat gggcgtgtcgcacgccaactatgtcaacgcggtgaaaacccggcgtcgcgcgccaagtt
08 GGGCGTGTGCGACGCCAATATGTCAACGCGGTGAAAACCCGGCGTTCGCGCGCCAAGTT
06 GGGCGTGTGCGACGCCAATATGTCAACGCGGTGAAAACCCGGCGTTCGCGCGCCAAGTT
07 GGGCGTGTGCGACGCCAATATGTCAACGCGGTGAAAACCCGGCGTTCGCGCGCCAAGTT

Templat cgccaatcctgctgctgcatcatgaaggattacggcttcgacggtggtgacatcgaactg
08 CGCCAATCCTGCGTGCATCATGAAGGATTACGGCTTCGACGGTGTGGACATCAACTG
06 CGCCAATCCTGCGTGCATCATGAAGGATTACGGCTTCGACGGTGTGGACATCAACTG
07 CGCCAATCCTGCGTGCATCATGAAGGATTACGGCTTCGACGGTGTGGACATCAACTG

Templat ggagtaccgcaagcggcggaagtggacggttccatcgccgctgcaggagatccgcac
08 GGAGTACCCGCAAGCGCGGAAGTGGACGGCTTCATCGCCGCGCTGCAGGAGATCCGCAC
06 GGAGTACCCGCAAGCGCGGAAGTGGACGGCTTCATCGCCGCGCTGCAGGAGATCCGCAC
07 GGAGTACCCGCAAGCGCGGAAGTGGACGGCTTCATCGCCGCGCTGCAGGAGATCCGCAC

Templat cttgctgaaccagcaaaccatcacagacgcccggcggcgttgccgtaccagttgaccat
08 CTTGCTGAACCAGCAAACCATCACAGACGGCCGCGGCTTGCCGTACCAGTTGACCAT
06 CTTGCTGAACCAGCAAACCATCACAGACGGCCGCGGCTTGCCGTACCAGTTGACCAT
07 CTTGCTGAACCAGCAAACCATCACAGACGGCCGCGGCTTGCCGTACCAGTTGACCAT

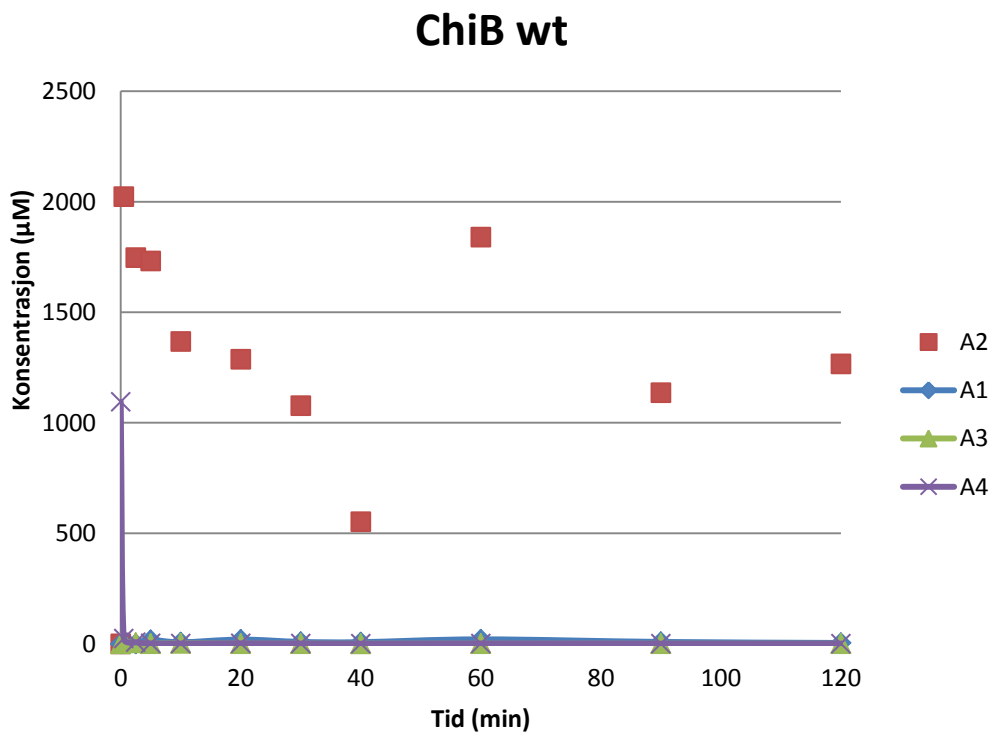
7. Vedlegg

```
Templat      cgccggcgccggcgccgccttcttctgtcgcgctattacagcaagctggcgagatcgt
08           CGCCGGcgCCGGCGGCGCCTTCTTCCTGTTCGCGCTATTACAGCAAGctgGCGCAGATCGT
06           CGCCGGCGCCGGCGGCGCCTTCTTCCTGTTCGCGCTATTACAGCAAGCTGGCGCAGATCGT
07           CGCCGGCGCCGGCGGCGCCTTCTTCCTGTTCGCGCTATTACAGCAAGCTGGCGCAGATCGT
*****
```

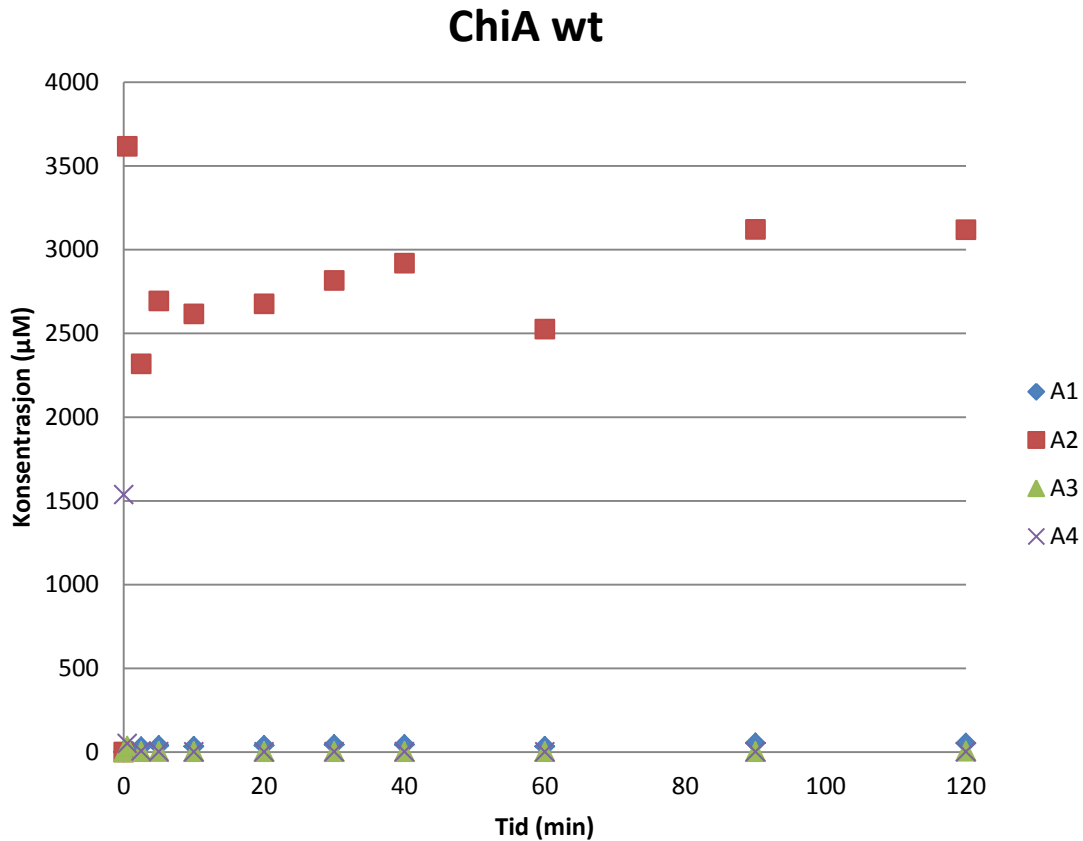
```
Templat      cgcgccgctcgattacatcaacctgatgacctacgatctggccggcccctgggagaaggt
08           CGCGCCGCTCGATTACATCAACCTGATGACCTACGATCTGGCCGGCCcctGGGAGAAGGT
06           CGCGCCGCTCGATTACATCAACCTGATGACCTACGATCTGGCCGGCCcctGGGAGAAGGT
07           CGCGCCGCTCGATTACATcaACCTGATGACCTACGATCTGGCCGGCCcctggGAGAAGGT
*****
```

Vedlegg 6

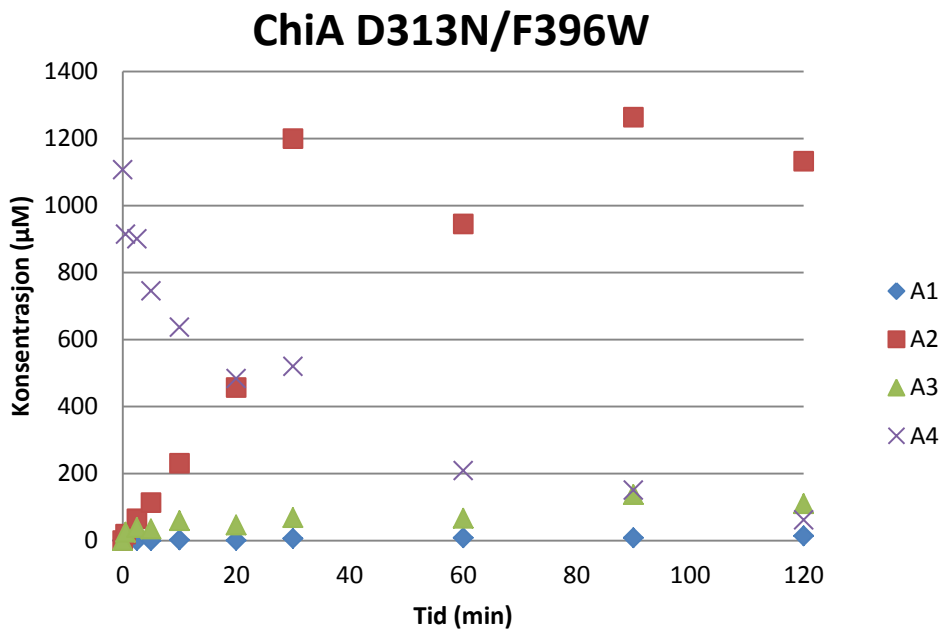
Oversikt over konsentrasjonen ene av (GlcNAc)₁, (GlcNAc)₂, (GlcNAc)₃ og (GlcNAc)₄ som ble dannet i transglykosylerings asseyet i avsnitt 4.8.1 for de ulike mutantene.



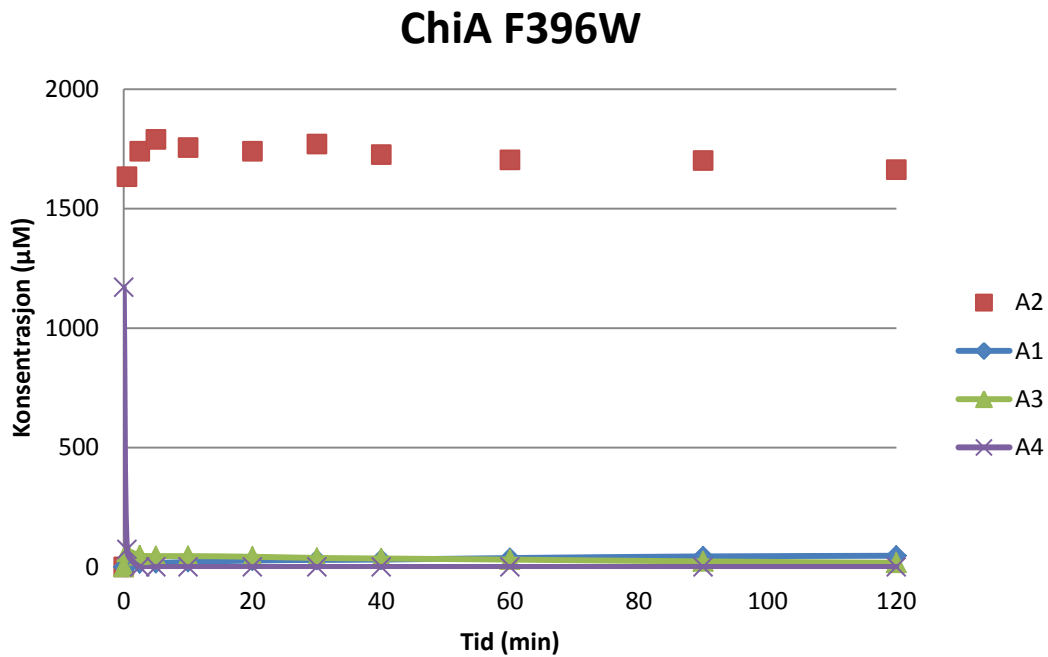
Figur 7.1: Konsentrasjonene av (GlcNAc)₁, (GlcNAc)₂, (GlcNAc)₃ og (GlcNAc)₄ ved ulike tidspunkter under reaksjonen mellom 3,0 µM ChiB villtype og med 1,0 mM (GlcNAc)₄ i 20mM ammonium-acetat (0,1 mg / ml BSA, pH 6,1) ved 37 °C.



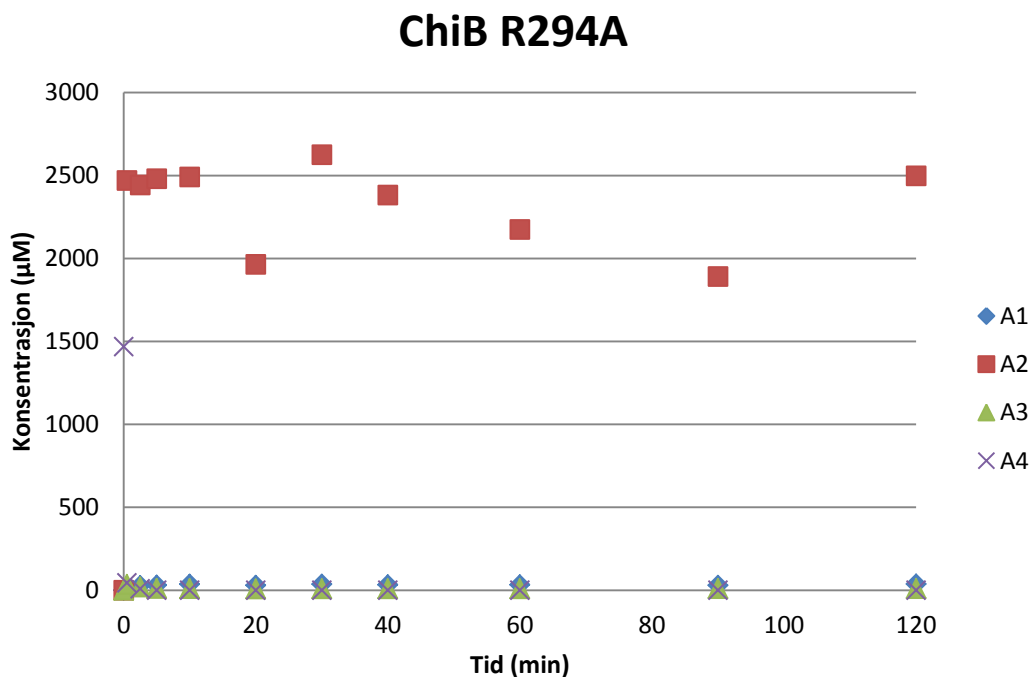
Figur 7.2: Konsentrasjonene av (GlcNAc)₁ (GlcNAc)₂ (GlcNAc)₃ og (GlcNAc)₄ ved ulike tidspunkter under reaksjonen mellom 3,0 µM ChiA villtype og med 1,0 mM (GlcNAc)₄ i 20mM ammonium-acetat (0,1 mg / ml BSA, pH 6,1) ved 37 °.



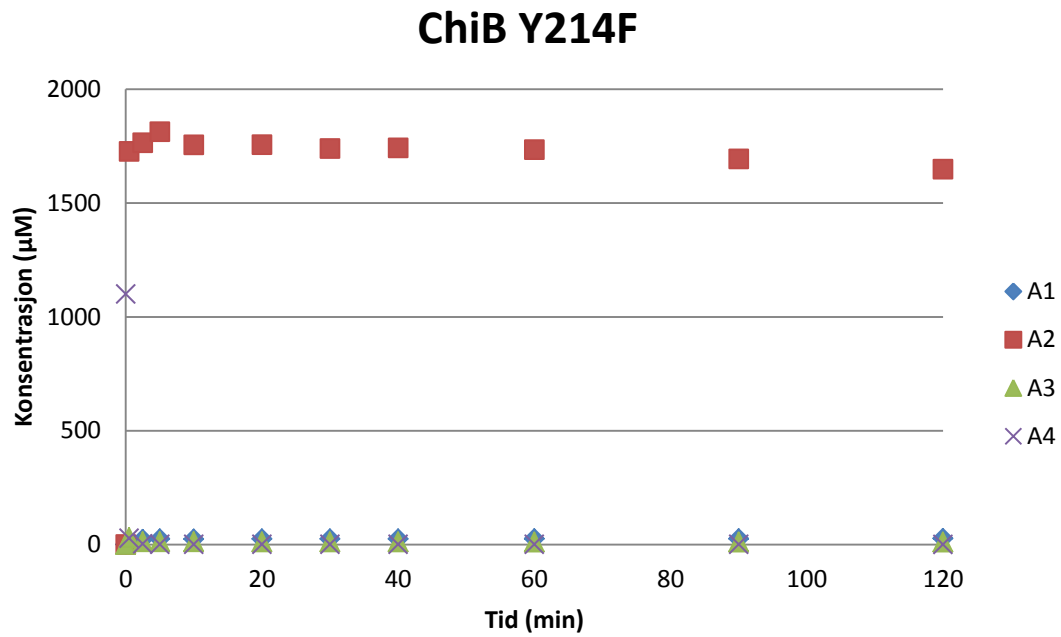
Figur 7.3: Konsentrasjonene av (GlcNAc)₁ (GlcNAc)₂ (GlcNAc)₃ og (GlcNAc)₄ ved ulike tidspunkter under reaksjonen mellom 3,0 µM ChiA D313N/F396W og med 1,0 mM (GlcNAc)₄ i 20mM ammonium-acetat (0,1 mg / ml BSA, pH 6,1) ved 37 °.



Figur 7.4: Konsentrasjonene av (GlcNAc)₁ (GlcNAc)₂ (GlcNAc)₃ og (GlcNAc)₄ ved ulike tidspunkter under reaksjonen mellom 3,0 µM ChiA F396W og med 1,0 mM (GlcNAc)₄ i 20mM ammonium-acetat (0,1 mg / ml BSA, pH 6,1) ved 37 °.



Figur 7.5: Konsentrasjonene av (GlcNAc)₁ (GlcNAc)₂ (GlcNAc)₃ og (GlcNAc)₄ ved ulike tidspunkter under reaksjonen mellom 3,0 µM ChiB R294A og med 1,0 mM (GlcNAc)₄ i 20mM ammonium-acetat (0,1 mg / ml BSA, pH 6,1) ved 37 °.



Figur 7.6: Konsentrasjonene av (GlcNAc)₁, (GlcNAc)₂, (GlcNAc)₃, og (GlcNAc)₄ ved ulike tidspunkter under reaksjonen mellom 3,0 µM ChiB Y214F og med 1,0 mM (GlcNAc)₄ i 20mM ammonium-acetat (0,1 mg / ml BSA, pH 6,1) ved 37 °.



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no