



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2016 60 stp
Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Elektron paramagnetisk resonans signaturer av CBP21 fra *Serratia marcescens* med ulike kitinsubstrater

Electron paramagnetic resonance signatures of
CBP21 from *Serratia marcescens* with different
chitin substrates

Karianne Moe
Master kjemi

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM) ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) i perioden februar 2015 - mai 2016. Oppgaven har vært del av et større forskningsprosjekt ved Bioorganiske forskningsgruppe i samarbeid med Protein Engineering and Proteomics (PEP) gruppen.

Jeg ønsker først og fremst å takke hovedveileder Morten Sørlie for god veiledning og kunnskap gjennom hele oppgaven. Jeg ønsker også å rette en stor takk til medveileder, Åsmund Kjendseth Røhr, som har vært til stor hjelp og støtte. Videre ønsker jeg å takke Anne Grethe Hamre, Kristine B. Eide og mine medstudenter for å ha bidratt med hjelp, oppmuntring og godt humør!

Til slutt ønsker jeg å takke venner og familie for all engasjementet og støtte; dere har vært fantastiske!

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Ås, mai 2016

Karianne Moe

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Innholdsfortegnelse	II
Sammendrag	VI
Abstract	VII
Forkortelser	VIII
1 Introduksjon	1
1.1 Karbohydrater	1
1.2 Cellulose	1
1.2.1 Struktur	2
1.2.2 Hemicelluloser	2
1.3 Kitin	3
1.3.1 Struktur	3
1.3.2 Acetyleringsgrad	4
1.3.3 Anvendelser	4
1.4 Mikrobiell degradering	5
1.4.1 Kitinolytiske systemet til <i>Serratia marcescens</i>	6
1.5 Auxiliary activities	7
1.6 Lytisk polysakkarid monooksygenaser (LPMO)	8
1.6.1 Substrater	9
1.6.2 Tredimensjonal struktur	9
1.6.3 Det aktive setet	10
1.6.4 Elektron donorer	12
1.6.5 Mekanisme	13
1.7 Raman-spektroskopi	15

1.7.1	Introduksjon	15
1.7.2	Fysikalske prinsipper.....	16
1.7.3	Resonans-forsterkning.....	17
1.8	Elektron paramagnetisk resonans (EPR)	18
1.8.1	Introduksjon	18
1.8.2	Cu ²⁺ -senter.....	18
1.8.3	Zeeman-effekt med $m_s \pm 1/2$	19
1.8.4	Hyperfin og superhyperfin struktur	20
1.8.5	Temperaturavhengighet.....	20
1.9	Potensiometri	21
1.9.1	Generelle prinsipper	21
1.9.2	Referanse- og indikatorelektroder	21
1.9.3	Nernsts likning	22
1.10	Målet med oppgaven.....	23
2	Materialer	24
2.1	Laboratorieutstyr	24
2.2	Programvare til dataanalyser	26
2.3	Kjemikalier	26
2.4	Substrater/enzymer	27
2.5	Reduktanter.....	28
2.6	Medier.....	28
2.6.1	Selvlagde medier	28
2.6.2	Ferdiglagde medier.....	28
2.7	Bakteriestamme	29
2.8	Kit	29
2.9	Buffere og løsninger	29
3	Metode.....	31

3.1	Proteinuttrykk	31
3.1.1	Plasmidisolering ved bruk av ® E.N.Z.A. Plasmid Kit	31
3.1.2	Transformerer av plasmid inn i One Shot® BL21 Star™ (DE3)-celler	32
3.1.3	Glyserolstokker	32
3.1.4	Overekspressjon	33
3.1.5	Periplasmatisk ekstrakt av <i>E. coli</i>	33
3.2	Proteinrensing	34
3.2.1	Rensing <i>SmCBP21</i> på kitinkuler	34
3.2.2	Sodium Dodecyl Sulfat-Polyakrylamid Gel Elektroforese (SDS-PAGE)	35
3.2.3	Oppkonsentrering og bufferbytte	36
3.2.4	Konsentrasjonsbestemmelse ved UV ₂₈₀	37
3.2.5	Generering av apoenzymer	38
3.2.6	Cu ²⁺ -metning av apoenzym	39
3.3	Acetylering av α- og β- kitin	39
3.4	Elektron paramagnetisk resonans (EPR)	40
3.4.1	Fremstilling av EPR-prøver	40
3.4.2	Elektron paramagnetisk resonans	41
3.5	Raman-spektroskopi	42
3.6	Potensiometri	42
3.6.1	Kalibrering	43
3.6.2	Potensiometrisk undersøkelse av reduktanter i biologiske bufferløsninger	43
4	Resultater	46
4.1	Rensing av <i>SmCBP21</i> ved affinitetskromatografi	46
4.1.1	Bestemmelse av proteinkonsentrasjon ved UV ₂₈₀	46
4.2	EPR-spektra av <i>SmCBP21</i> -Cu ²⁺ og kitinsubstrater	47
4.2.1	Heksaacetylkitohexaose	47
4.2.2	β-kitin	48

4.2.3	α -kitin	48
4.2.4	Acetylerert α - og β -kitin	49
4.3	Raman-spektroskopi	51
4.3.1	β -kitin	51
4.3.2	α -kitin	52
4.3.3	Acetylerert α - og β -kitin	53
4.4	Elektrokjemi	56
4.4.1	Kalibrering etter Ag/AgCl-referanseelektrode	56
4.4.2	Forsøksoppsett	56
5	Diskusjon	60
5.1	EPR av <i>Sm</i> CBP21-Cu ²⁺ med kitinsubstrater	60
5.2	Raman-spektroskopi av kitinsubstrater	62
5.3	Potensiometri	63
5.3.1	Reduktanter	64
5.4	Oppsummering	65
5.5	Videre arbeid	65
6	Vedlegg	66
7	Referanser	69

Sammendrag

Denne oppgaven er skrevet som en del av et større forskningsprosjekt der hovedmålet er å tilegne seg kunnskap om enzymer som katalyserer hydrolyse av glykosidbindinger i uløselige biopolymeren kitin. Kitin er den nest mest utbredte karbohydratet i naturen og består av β -(1,4)-linkede enheter av *N*-acetyl-D-glukosamin. Årlig blir det produsert over en milliard tonn kitin i biosfæren, hovedsakelig av insekter, sopp, skalldyr og andre marine organismer. Det kitinolytiske maskineriet til den gram-negative jordbakterien *Serratia marcescens* består av fire kitinaktive enzymer; kitinase A (ChiA), kitinase B (ChiB), kitinase C (ChiC) og karbohydrat bindingsmodul 21 (*SmCBP21*). I dette systemet degraderer kitinasene amorf kitin, mens *SmCBP21* lager oksidative kjedebrudd i krystalline deler av polysakkaridet. Kjedebruddene gir en økt effekt av kitinasene i systemet. *SmCBP21* er en kopper-avhengig lytisk polysakkarid monooksygenase som er avhengig av molekylært dioksygen og en ekstern elektron-donor for katalytisk aktivitet.

I denne oppgaven har elektron paramagnetisk resonans signaturer for *SmCBP21*-Cu²⁺ med ulike kitinsubstrater blitt undersøkt. Spektre av *SmCBP21*-Cu²⁺ med og uten kitinsubstrat viser signifikante forskjeller, sannsynligvis grunnet ulike konfigurasjoner av Cu²⁺ når enzymet danner interaksjoner med substrater. I studien viste alle krystallinske substrater liknende EPR-signaturer i kompleks med *SmCBP21*-Cu²⁺, mens spekteret for heksaacetylkitoheksaose viste små ulikheter.

Kitinsubstratene ble videre studert med Raman-spektroskopi. Spektre skilte mellom α - og β -kitin, men ikke fra deres respektive acetylerede derivater. Videre var det noen forskjeller i Raman-linje (sannsynligvis δ NH vibrasjon) assosiert med acetyleringsgrad i området rundt 1620 cm⁻¹ av spektrumet.

I siste del av oppgaven ble tre eksterne elektron-donorer undersøkt ved potensiometri. Reduktantene viste forskjeller i deres elektrokjemiske egenskaper, hvor gallussyre var den svakeste reduktanten ved alle gitte betingelser. Eksperimentelle data viste at L-cystein var den sterkeste reduktanten ved høy pH, mens L-askorbat var den sterkeste under mildt syrlige forhold. Alle reduktantene hadde en sterkere reduseringsevne ved økt pH. L-cystein var reduktanten som ble minst påvirket av endringer i pH. En mulig forklaring er at de reduserende agentene har ulike reduksjons-mekanismer, hvor L-askorbat donerer et ulikt antall elektroner i forhold til L-cystein og gallussyre.

Abstract

This thesis is written as a part of a larger research project where the main goal is to acquire knowledge about enzymes that catalyze the hydrolysis of the insoluble polymer chitin. Chitin is the second most abundant carbohydrate in nature and consists of β -(1,4)-linked units of *N*-acetyl-D-glucosamine. The annual production of chitin is over a billion tons in the biosphere, mainly by insects, fungi, crustaceans and other marine organisms. The chitinolytic machinery of the gram-negative soil bacterium *Serratia marcescens* consists of four chitin active enzymes; chitinase A (ChiA), chitinase B (ChiB), chitinase C (ChiC) and chitin binding protein 21 (*SmCBP21*). In this system the chitinases degrade amorphous chitin while *SmCBP21* produces oxidative chain breaks in crystalline parts of the polysaccharide. The chain breaks give a boosting effect of the chitinases in the system. *SmCBP21* is a copper-containing lytic polysaccharide monooxygenase which is dependent on molecular dioxygen and an external electron donor for catalytic activity.

In this thesis, the electron paramagnetic resonance signatures of the binding of AA10 *SmCBP21*-Cu²⁺ to chitin substrates have been investigated. The spectra of *SmCBP21*-Cu²⁺ with and without chitin substrates show significant differences, probably because of different configurations of the Cu²⁺ when the enzyme interacts with the substrates. All the crystalline substrates show similar EPR signatures in complex with *SmCBP21*-Cu²⁺, whereas the spectra with the soluble hexaacetylchitohexaose show slightly different features.

The chitin substrates were also studied with Raman spectroscopy. The spectra of α - and β -chitin were distinguished from each other, but not from their respective modified acetylated derivatives. There were some differences in the Raman scattering associated with acetylation (probably δ NH vibration) in the 1620 cm⁻¹ region of the spectrum.

In the last part of this thesis three external electron donors were investigated with potentiometry. They showed differences in their electrochemical properties where gallic acid was the weaker reducing agent in all the specified cases. Experimental data showed that L-cysteine was the strongest reducing agent with high pH-value, whereas L-ascorbate was the strongest under mild acidic conditions. All reducing agents showed stronger reducing power with higher pH values. Moreover the redox potential of L-cysteine wasn't affected as much as the remaining reducing agents. A possible solution is that the reducing agents carry out different reducing mechanisms, where L-ascorbate donates a different number of electrons.

Forkortelser

β	Bohr magneton
ΔE	Seperasjonsenergi mellom to spinntilstander
ϵ	Absorpsjonskoeffesient
μg	Mikrogram
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar
A	Absorbans
<i>A</i>	Hyperfin koblings konstant
A₆	Heksaacetylkitohexaose
AA	Auxiliary Activity
B	Eksternt magnetfelt
CAZy	Karbohydrat aktiv enzym
C_{oks}	Konsentrasjon oksidant
C_{red}	Konsentrasjon reduktant
CBM	Karbohydrat bindingsmodul
CDH	Cellobiose dehydrogenase
CE	Karbohydrat esterase
Da	Dalton
DA	N-acetylerings grad
DD	Deacetylerings grad
dH₂O	Sterilt vann av Milli-Q kvalitet
E	Målt potensialet mellom indikator- og referanseelektrode
E₀	Målt potensialet mellom indikator- og referanseelektrode når C _{oks} =C _{red}
EPR	Elektron paramagnetisk resonans
F	Faradays konstant, F=96485 C·mol ⁻¹
g	g-verdi
g	Gram
h	Plancks konstant
I	Nukleært spinn
IR	Infrarød
ITC	Isotermisk kalorimetri
GH	Glykosylhydrolase
GT	Glykosyltransferase
GlcN	D-glukosamin
GlcNAc	N-acetyl-D-glukosamin
K	Kelvin
KOS	Kitooligosakkarider
LB	Luria-Bertani
LDS	Litium docedyl sulfat
LPMO	Lytisk polysakkarid monooksygenase
M	Molar

MES	2-(<i>N</i> -morfolino)etansulfonsyre
mg	Milligram
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mV	Millivolt
<i>n</i>	Elektronisk ladning
<i>Nc</i>	<i>Neurospora crassa</i>
NMR	Nukleær magnetisk resonans
ORP	Oksidasjon-reduksjonspotensiale
PL	Polysakkarid lysase
PASC	Fosforsyre-svellet cellulose
PMSF	Fenylmetylsulfonylfluorid
<i>R</i>	Universale gass-konstanten, 8,314 J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹
Rpm	Antall omdreininger per minutt
<i>S</i>	Spinn angulær momentum
<i>Sc</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>
SDS-PAGE	Natirumdodecylsulfat polyakrylamid gelelektroforese
<i>Sm</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>SmCBP21</i>	Kitin-bindende protein 21 fra <i>Serratia marcescens</i>
<i>SmCBP21</i>-Cu²⁺	Kompleks av <i>SmCBP21</i> og Cu ²⁺
<i>SmChiA</i>	Kitinase A fra <i>Serratia marcescens</i>
<i>SmChiB</i>	Kitinase B fra <i>Serratia marcescens</i>
<i>SmChiC</i>	Kitinase C fra <i>Serratia marcescens</i>
T	Temperatur
UV-vis	Ultrafiolett - synlig lys
<i>v</i>	Frekvens

1 Introduksjon

1.1 Karbohydrater

Karbohydrater (eller sakkarider), sammen med proteiner, nukleinsyrer og lipider utgjør de fire store klassene av biomolekyler. Den generelle støkiometriske formelen til karbohydrater er $(\text{CH}_2\text{O})_n$, men denne er sterkt forenklet siden mange sakkarider er modifiserte og kan inneholde amino-, sulfat- og fosfatgrupper (Mathews *et al.* 2013). Den minste enheten i karbohydrater kalles monosakkarider. Disse basisenhetene kan danne glykosidbindinger med kondensasjonsreaksjoner og danne disakkarider eller lengre oligo- og polysakkarider. Kjemien og strukturen til oligo- og polysakkarider viser en utrolig diversitet siden det finnes mange ulike typer monosakkarider (samt modifikasjoner av disse) og ulike typer glykosid bånd som binder dem sammen til lineære eller forgrenede sukkerkjeder. Hovedsakelig er polysakkarider delt inn i to klasser; homopolysakkarider (satt sammen av like monosakkarideneheter) og heteropolysakkarider (består av to eller flere typer monosakkarider). Homopolysakkarider er sammensatt av like monosakkarider, mens heteropolysakkarider har to eller flere ulike typer monosakkarider. Videre kan homopolysakkaridene klassifiseres etter hvilken type glykosidbånd polymeren inneholder.

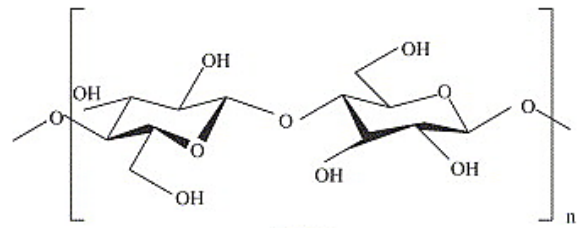
Karbohydrater utgjør mesteparten av det organiske materialet på jorden og er viktig for alle former for liv. Karbohydratene har et utrolig bredt spekter av funksjoner og er blant annet viktig i celledisorganisering, genereringen og lagringen av metabolsk energi, samt som strukturelle elementer i cellevegger (eksempelvis kitin og cellulose).

1.2 Cellulose

Cellulose er det mest utbredte karbohydratet på jorden og finnes i blant annet tre, bomull, hamp og andre plantebaserte materialer og fungerer som den dominerende forsterkede polymeren i plantestrukturen. Cellulose syntetiseres også av ulike alger, tunicater og bestemte bakterier. Til tross for sin relativt enkle kjemiske sammensetning er fysikalske og morfologiske strukturer av cellulose meget kompliserte. Spesielt er dette tilfellet i høyere plantesystemer der cellulose assosierer med andre polysakkarider og lignin (Siró & Plackett 2010).

1.2.1 Struktur

Cellulose er en lineær ikke-forgrenet homopolymer bestående av β -(1,4)-D-glukose enheter (figur 1). Den repetitive strukturelle enheten er dimeren cellobiose, der glukoseenheterne er orientert tilnærmet 180° i forhold til hverandre rundt glykosidbindingen. Kort tid etter syntese kan cellulosekjeder danne interaksjoner med hverandre og bygge fibriller med krystallinske regioner. Dette skjer ved hjelp av hydrogenbindinger og hydrofobe interaksjoner (Beckham *et al.* 2011; Cocinero *et al.* 2009).



Figur 1: Repeterende enhet i cellulose (Zhou *et al.* 2005).

Det er oppdaget syv ulike former av cellulose; $I\alpha$, $I\beta$, II, III_I, IV_I og IV_{II} (O'sullivan 1997). I naturen er cellulose en kombinasjon av $I\alpha$ og $I\beta$, som begge holdes sammen av et nettverk av hydrogenbånd og hydrofobe interaksjoner. Dette gjør enzymatisk nedbrytning vanskelig og energikrevende. Cellulose $I\alpha$ har færre hydrogenbindinger innad i samme kjede sammenlignet med cellulose $I\beta$, mens antallet hydrogenbindinger i samme lag er tilnærmet likt. Dette gjør $I\beta$ til den mest termodynamisk stabile formen i naturen (Beckham *et al.* 2011). De resterende formene av cellulose er fremstilt syntetisk fra cellulose $I\alpha$ og $I\beta$ (Beckham *et al.* 2011; O'sullivan 1997).

1.2.2 Hemicelluloser

Hemicelluloser er polysakkarider i plantenes cellevegg som vanligvis har en β -(1,4)-linket hovedkjede med forgreninger. Gruppen inkluderer xyloglukaner, xylaner, mannaner og gluomannaner, samt miks-linkede glukaner. Den viktigste rollen til hemicelluloser er å styrke celleveggen ved interaksjoner med cellulose, og i noen tilfeller også lignin (Scheller & Ulvskov 2010).

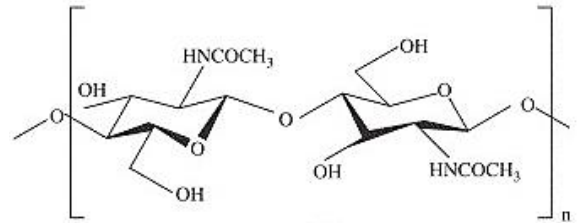
Struktur og utbredelse av hemicelluloser varierer mye mellom ulike celletyper og arter (Scheller & Ulvskov 2010). Hemicellulosene er korte (mellom 500-3000 monomerer), ustrukturerte polysakkarider som ofte består av flere ulike monomerer og deres tilhørende syrer (Gibson 2012). Eksempler på monomerer er aldoheksosene; glukose, mannose og galaktose, samt pentosene xylose og arabinose (Scheller & Ulvskov).

1.3 Kitin

Kitin er etter cellulose det mest utbredte polysakkaridet på jorden, og hvert år produseres det over en milliard tonn kitin i biosfæren. Hovedsakelig er det insekter, sopp, krepsdyr og andre marine organismer som står for kitin-produksjonen (Vaaje-Kolstad *et al.* 2005a).

1.3.1 Struktur

Kitin er et uløselig, lineært homopolysakkarid bestående av β -(1,4)-linkede enheter av *N*-acetyl-D-glukosamin (GlcNAc) rotert 180° relativt til hverandre (figur 2). Kitin er strukturelt lik cellulose, bortsatt fra at OH-gruppen i C-2 posisjonen er erstattet med en acetamin gruppe (-NHCOCH₃) (Dutta *et al.* 2004).



Figur 2: Repeterende enhet i kitin (Zhou *et al.* 2005).

Etter at kitin-molekylene er syntetisert, assosierer kjedene med hverandre via hydrogenbånd. Dette gir opphav til to ulike krystallinske former; α -kitin og β -kitin. α -kitin består av antiparallele kjeder som gir sterke intermolekulære hydrogenbindinger og gjør α -kitin svært stabilt (Synowiecki & Al-Khateeb 2003). Denne varianten er den vanligste allomorfen og finnes blant annet i krill, hummer, krabber, skjell, overflaten på insekter, samt i celleveggene til sopp. β -kitin er mindre utbredt og finnes hovedsakelig i blekksprutskall og rørrormer (Rinaudo 2006). β -kitin består av parallelle kjeder, og det gis rom for at hver GlcNAc-enhet kan danne interaksjoner med to vannmolekyler. Dette gjør at denne allomorfen ikke er like tett pakket som α -kitin (Kobayashi *et al.* 2010).

Kitosan er en *N*-deacetyllert analog av kitin og er et heteropolysakkarid bestående av lineære β -(1,4)-linkede GlcN- og GlcNAc-enheter. Fordelingen og sekvensen av disse enhetene er viktige i forhold til de fysikalske, kjemiske og biologiske egenskapene til polymeren (Prashanth & Tharanathan 2007).

1.3.2 Acetyleringsgrad

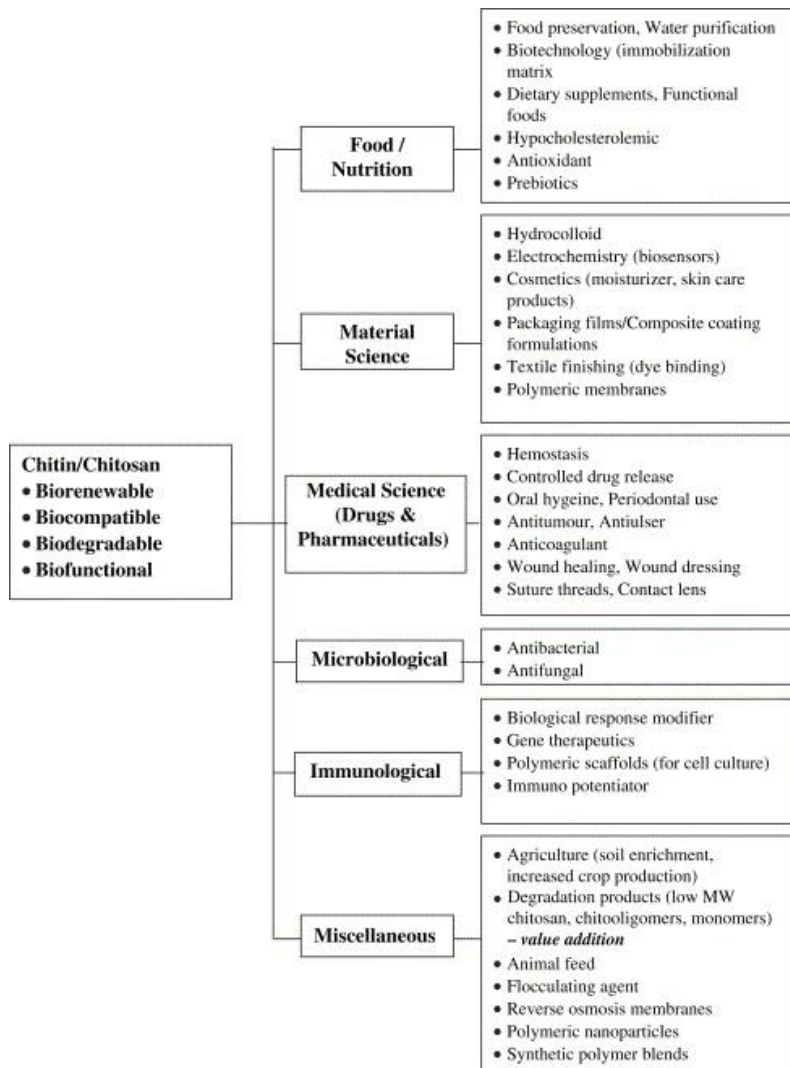
Mange av de kjemiske og fysikalske egenskapene til kitin og kitosan er relatert til N-acetyleringsgraden (DA), blant annet reaktivitet og løselighet (Horn *et al.* 2006). Siden deacetylering av kitin er en typisk prosedyre for å produsere kitosan, benyttes også parameteren deacetyleringsgrad (DD), hvor $DA=100-DD$ (Horn *et al.* 2006; Zajac *et al.* 2015).

Hvis acetyleringsgraden i kitin og kitosan er kjent, kan enkelte fysikalske og kjemiske egenskaper forutses. I flere tiår har det derfor vært forsøkt å finne en effektiv og nøyaktig metode for kvantifisering av acetyleringsgrad i disse substratene. Analytiske metoder som kan nevnes er; pH-metrisk titrering, UV-Vis spektroskopi, elementanalyser, 1H - og ^{13}C -NMR-spektroskopi, samt IR- og Raman-spektroskopi (Zajac *et al.* 2015).

1.3.3 Anvendelser

Kitin og kitosan har begge i deres native og modifiserte former mange anvendelser (figur 3), og kan benyttes i ulike områder som i matvitenskapen, bioteknologi, materialvitenskap, medisin og farmasi, agrikultur og genterapi. Hydrolyse av kitin og kitosan genererer såkalte kito-oligosakkarider (KOS). KOS kan produseres ved delvis degradering av kitin og kitosan. For å generere KOS-substrater utvikles det en rekke kjemiske, fysiske og enzymatiske metoder (Prashanth & Tharanathan 2007).

Innen medisin har det vært indikasjoner på at KOS kan benyttes som astmamedisin, antibakterielt middel, ingrediens i bandasjer og vektor i genterapi. Det er også mulig at KOS reduserer vekst av kreftsvulster, øker beinstyrke ved osteoporose og kan inhibere *Plasmodium* parasitten (malaria parasitten). Videre kan KOS potensielt benyttes for å senke glukosenivået i serumet til diabetikere og som antifungale midler (Aam *et al.* 2010).



Figur 3: Aktuelle og potensielle anvendelser av kitin og kitosan (Prashanth & Tharanathan 2007).

1.4 Mikrobiell degradering

Som beskrevet tidligere er polysakkarider som kitin og cellulose uløselige og har en høy strukturell orden. Dette gjør dem svært stabile og vanskelige å degradere. Likevel har mikroorganismer utviklet enzymatiske nedbrytningssystemer for å utnytte potensialet i polysakkaridene. Slike mikrobielle degraderingssystemer er et godt utgangspunkt for å designe industrielle enzytblandinger for biomasse-konvertering.

Cellolytiske mikroorganismer inkluderer bakterier, protister og sopp, og finnes i mange ulike økosystemer, inkludert jord, elver, innsjøer og sjøsedimenter (Forsberg 2014). Det er også funnet cellulaser i insekter, mollusker, nematoder, drøvtyggere, pæleorm og termitter (Wilson 2011).

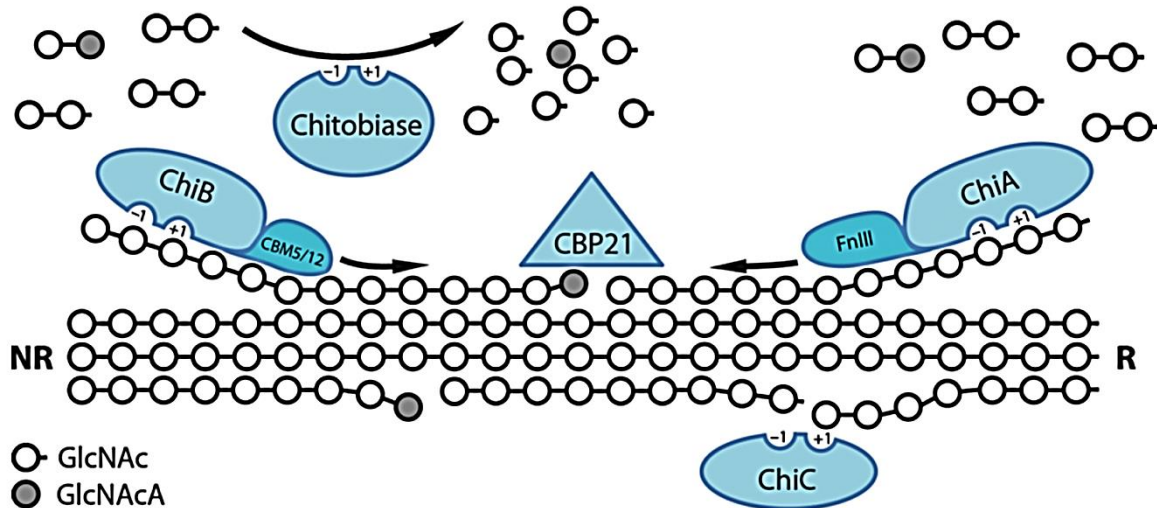
Selv i tilfellene der drøvtyggere og andre organismer (som ikke er mikroorganismer) utnytter cellulose som energikilde er det vanligvis mikroorganismer som er ansvarlig for spaltingen av polysakkaridene. Samtidig er det vist at termitter har utviklet egne enzymer som hjelper til i degraderingen av cellulose (Wilson 2011).

Kitindegraderings-enzymet er også godt utbredt i naturen. I likhet med cellulolytiske enzymer er det også funnet kitindegraderingsenzymet hos sopp, bakterier og i fordøyelsessystemet til enkelte pattedyr, men også hos archaea, hjuldyr, noen algetyper og kjøttetende planter (Beier & Bertilsson 2014).

1.4.1 Kitinolytiske systemet til *Serratia marcescens*

Et av de mest kjente systemene for konvertering av uløselige polysakkarider er det kitinolytiske maskineriet til den gram-negativ jordbakterien *Serratia marcescens* (fra familien Enterobacteriaceae). Maskineriet (figur 4) inneholder fire kitinaktive enzymer; *SmChiA*, *SmChiB*, *SmChiC* og *SmCBP21* (kitin-bindende protein 21, *SmLPMO10A*), samt en kitobiase. *SmChiA* og *SmChiB* er begge eksoaktive enzymer som degraderer kitinkjeder fra hhv. reduserende og ikke-reduserende ende ved bruk av en prosessiv (flere kutt langs kjeden før proteinet faller av) mekanisme som hovedsakelig produserer kitobiose. Videre konverterer kitobiase kitobiose og korte kito-oligosakkarider til monomerer. *SmChiC* er en ikke-prosessiv, endoaktiv kitinase som virker på amorfe deler av kitinet. Det siste kitinaktive enzymet er *SmCBP21*, en overflateaktiv lytisk polysakkarid monooksygenase (LPMO) som danner kjedebrudd ved oksidativ kløyving. (Vaaje-Kolstad *et al.* 2013)

ChiA, B og C kitinasene tilhører glykosylhydrolaser familie 18 (GH18), mens *SmCBP21* tilhører “auxiliary activities” familie 10 (AA10) (Vaaje-Kolstad *et al.* 2013).



Figur 4: En skjematisk oversikt over det kitinolytiske maskineriet til *S. marcescens* og dens virkning på kitin. Kitinasene *SmChiA* og *SmChiB* katalyserer hydrolysen av kitin fra hver sin respektive ende, mens *SmChiC* har endoaktivitet og lager tilfeldige kutt i amorfede deler av substratet. *SmCBP21* lager oksidative kutt i krystallinske områder og øker tilgjengeligheten for kitinasene, Kitobiasen konverterer små kitooligomerer og kitobiose til monomerer (Vaaje-Kolstad *et al.* 2013).

1.5 Auxiliary activities

Den karbohydrataktive enzymdatabasen (CAZy; www.cazy.org) har siden oppstarten beskrevet enzymer som kløyver, syntetiserer eller danner komplekser med karbohydrater. Disse enzymene var hovedsakelig delt inn i enzymklassene; glykosylhydrolaser (GH), polysakkaridlyasaser (PL), karbohydrateraser (CE), glykosyltransferaser (GT) og deres oppfattede ikke-katalytiske karbohydrat-bindingsmoduler (CBM) (cazy.org ; Levasseur *et al.* 2013).

Enkelte enzymer fra familiene CBM33 og GH61 viste seg å være lytisk polysakkarid monooksygenaser (LPMO). Dette førte til at det ble nødvendig med en reklassifisering. I 2013 ble det derfor opprettet en ny klasse med navnet “auxiliary activities” (AA), eller hjelpeenzymer på norsk. Klassen dekker redokszymer som øker aktiviteten til karbohydrataktive enzymer. Unntaket er lignin-degraderingsenzymer som også er inkludert i AA-klassen. Disse enzymene degraderer ikke karbohydrater men er sterkt assosiert med LPMOer og karbohydrater i celleveggen (Levasseur *et al.* 2013).

1.6 Lytisk polysakkarid monooksygenaser (LPMO)

Etter omorganiseringen i CAZy-databasen i 2013 ble proteinene i CBM33 og GH61 reklassifisert til henholdsvis familie AA10 og AA9. Sammen ble disse referert til som lytisk polysakkarid monooksygenaser (LPMOer) (Levasseur *et al.* 2013). I senere tid er det opprettet to nye familier; AA11 og AA13, fordi enzymene i disse klassene hverken passet inn under definisjonen av AA9 eller AA10 (Hemsworth *et al.* 2015).

AA10 har blitt isolert fra en rekke kitinolytiske bakterier og mange viser høy affinitet mot kitinsubstrater, men familien inneholder også celluloseaktive enzymer. Den høye affiniteten mot kitin, kombinert med et høyt antall konserverte aromatiske resider, er årsaken til at disse enzymene tidligere ble klassifisert som karbohydrat-bindingsmoduler (CBM). Det første enzymet som ble karakterisert var det 21 kDa store enzymet *SmCBP21* fra *S. marcescens* (Vaaje-Kolstad *et al.* 2005b). Enzymet forsterket kitinase-aktiviteten i nedbrytningen av β -kitin (Vaaje-Kolstad *et al.* 2005a). Senere ble det kjent at *SmCBP21* virket på overflaten av krystallinsk kitin, hvor den introduserte kjedebrudd og genererte oksiderte kjedeender som promoterte videre degradering av kitinaser (Vaaje-Kolstad *et al.* 2010).

I 1997 ble det oppdaget et nytt enzym fra *Trichoderma reesei* som viste seg å ha en svak endoglucanase-aktivitet på cellulosesubstrater. Enzymet la grunnlaget for en ny familie glykosylhydrolaser; GH61. Siden cellulose-aktiviteten var svært lav sammenlignet med andre cellulaser ble en rekke polysakkarider fra celleveggen testet som potensielle substrater, men ingen signifikant aktivitet ble oppdaget. Det var ikke før den første strukturbestemmelsen av en GH61 kom det fram at enzymet hadde strukturelle likheter med *smCBP21*. Videre ble det vist at et GH61-enzym isolert fra soppen *Thielavia terrestris* forsterker cellulase-aktivitet, og dermed funksjonelle likheter med *smCBP21* (Vaaje-Kolstad *et al.* 2005a; Vaaje-Kolstad *et al.* 2005b). I 2011 ble det vist at enzymer fra GH61 laget oksidative kløyvinger i cellulose. I 2011 ble det publisert artikler som omhandlet den oksidative kløyvingen av cellulose (Forsberg 2014).

I 2014 ble AA11 opprettet i CAZy-klassifiseringen. Årsaken til dette var oppdagelsen av LPMOen Ao(AA11) fra fra *Aspergillus oryzae*. Enzymet delte enkelte strukturelle og spektroskopiske egenskaper med AA9 og AA11, men var ulik i det aktive setet og hadde et særegent EPR-spekter (Hemsworth *et al.* 2014).

Nylig ble AA13-familien grunnlagt etter oppdagelsen av at kopperenzymet NCU08746 fra soppen *Neurospora crassa* oksiderte C1-posisjonen i glykosidbindinger fra stivelse. Enzymet viste seg å være kopperavhengig, og trengte molekylært dioksygen og en ekstern elektron donor for katalytisk aktivitet (Vu *et al.* 2014). Enzymet dannet aldonske syre-terminerte malto-oligosakkarider, og økte konvertering av dette substratet videre til maltose ved tilstedeværelse av β -amylase (Leggio *et al.* 2015).

1.6.1 Substrater

Den første LPMOen som ble oppdaget var *SmCBP21* (*SmLPMO10A*) fra *S. marcescens* (Vaaje-Kolstad *et al.* 2005b). Den viste seg å være aktiv mot krystallinsk β -kitin, og i mindre omfang α -kitin (Vaaje-Kolstad *et al.* 2010). Videre har eksperimenter med *SmCBP21* og kitinaser fra *S. marcescens* vist at synergien mellom enzymene reduseres etter hvert som den krystallinske andelen av substratet avtar. Dette indikerer at LPMOer er aktive på krystallinske polysakkarider (Nakagawa *et al.* 2013). Videre har enzymer fra familiene AA9 og AA10 vist aktivitet på cellulose (Forsberg *et al.* 2011; Quinlan *et al.* 2011).

I 2014 ble det vist at AA9-enzymet *NcLPMO9C* fra *Neurospora crassa* (*N. crassa*) er aktiv på både krystallinske og løselige celluoligosakkarider (Isaksen *et al.* 2014). Enzymet degraderte også enkelte hemicelluloser, spesielt xyloglukan (Agger *et al.* 2014). Som nevnt tidligere ble det nylig demonstrert at enzymer fra den nydannede AA13-familien kan øke nedbrytningen av stivelse (Leggio *et al.* 2015). Stivelse inneholder $\alpha(1,4)$ - og $\alpha(1,6)$ -bindinger og viser en høyere orden av struktur sammenlignet med kitin og cellulose (Vu *et al.* 2014).

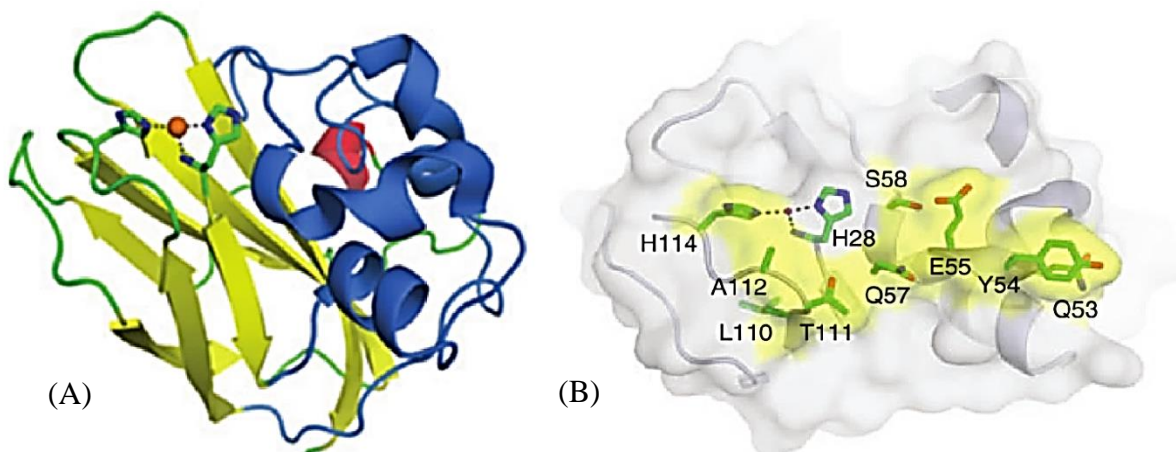
Helt nylig er det gjort forsøk med LPMOer tilsatt thylakoid eller klorofyllin. Ved eksponering for lys endret enzymet substratspesifisitet etter hvilken reduktant som var tilgjengelig. På denne måten ble det påvist aktivitet på heimicellulosen xyloglukan for et enzym som tidligere kun hadde vist celluloseaktivitet (Cannella *et al.* 2016).

1.6.2 Tredimensjonal struktur

Enzymene fra de fire ulike LPMO-familiene viser en lik strukturell fold, men deler ikke sekvenslikhet (Aachmann *et al.* 2015; Leggio *et al.* 2015). Den generelle strukturen for en LPMO er en immunoglobulin-liknende forvridt β -“sandwich”. Strukturen består av antiparallele β -plater festet sammen med loops og med et varierende antall α -heliks-

insersjoner (figur 5A). Den største variasjonen i strukturene finnes i området referert til som “loop 2” (L2). Denne loopen varierer i lengde og konfirmasjon og kan spille en rolle i forhold til substratspesifisitet (Aachmann *et al.* 2015). β -“sandwich” inneholder flere konserverte aromatiske aminosyrer som muligens er med i overføringsprosessen av elektroner til kobberionet i det aktive setet (Forsberg *et al.* 2014a).

LPMOer har det aktive setet plassert i midten av en flat overflate. Dette er i motsetning til glykosylhydrolaser hvor setet vanligvis ligger i substrat-bindende renner eller tunneller (Hemsworth *et al.* 2015). Det flate bindingssetet gir en dårlig indikasjon på hvilke interaksjoner som oppstår mellom LPMO og substrat. Det er foreslått at konserverte aromatiske sidekjeder på overflaten av det aktive setet binder seg til cellulose, analogt til karbohydrat-bindingsmoduler (CBM). Det er blitt implisert at disse aromatiske aminosyrene er med på å bestemme AA9-regions selektivitet (Hemsworth *et al.* 2015). For *SmCBP21* (AA10) er aminosyrene assosiert med substratbinding kartlagt (figur 5B) (Aachmann *et al.* 2015).

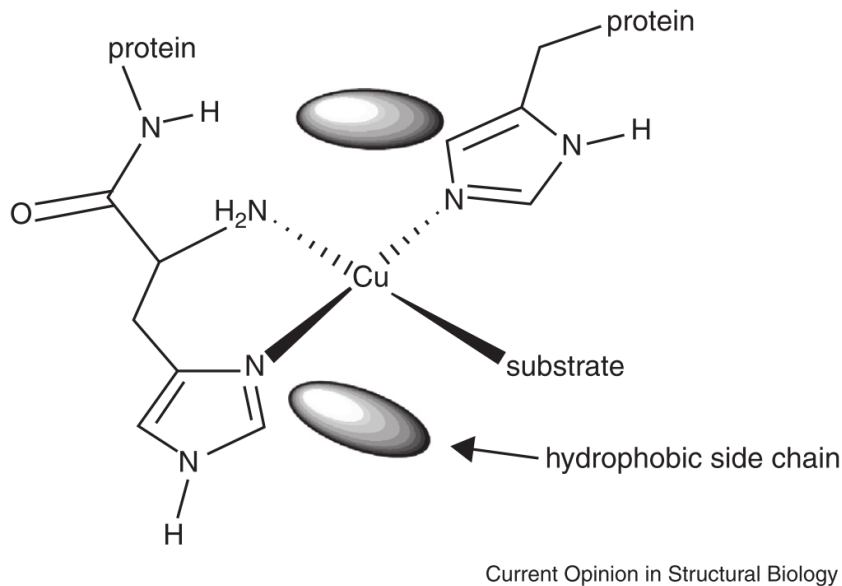


Figur 5: Strukturer av *smLPMO10A* (*SmCBP21*, PDB kode: 2BEM). (A) Ribbon struktur av *SmLPMO10A* hvor området med størst variasjon i lengde og struktur (“loop 2”) er markert i blå. (B) Kartlagte aminosyrer på overflaten av det aktive setet til *smLPMO10A* (Aachmann *et al.* 2015).

1.6.3 Det aktive setet

Det aktive setet til LPMOer består av et type 2-koppersenter. Kopperionet er koordinert av tre nitrogen i en T-formet geometri, omtalt som en “histidin brace” (figur 6). To av nitrogenatomene tilhører det N-terminale histidinet (første fra imidazol i sidekjede og det andre fra aminogruppen i hovedkjede), mens det tredje stammer fra sidekjeden til en konservert histidin lengre borte (Aachmann *et al.* 2015; Hemsworth *et al.* 2015).

LPMOer har kun et aktivt koppersete. Dette er i kontrast med andre kopperavhengige monoooksygenaser, hvor det er vanlig å ha to eller tre seter der det oppstår en multireduksjon av oksygen for å generere reaktive intermediater (Hemsworth *et al.* 2015).



Figur 6: Skissert representasjon av det steriske oppsettet til det aktive setet av AA10. Det aksiale koordinasjonssetet på Cu-ionet er okkupert av en sidekjede fra en hydrofob aminosyre som styrer substrat mot ekvatoriale posisjoner. (Hemsworth *et al.* 2013)

I 2011 ble det vist at AA9 var kopperavhengige enzymer. Ved bruk av røntgenkristallografi og elektron paramagnetisk resonans (EPR) ble det vist at kopperet var koordinert med tre nitrogen i en "histidin brace", samt et vannmolekyl i det ekvatoriale planet. Lengre vekk fra kopperionet var det et vannmolekyl, samt en OH-gruppe fra en tyrosin sidekjede som okkuperte aksiale posisjoner (Quinlan *et al.* 2011).

Videre arbeid har vist ulikheter i de aktive setene på LPMOer. Blant annet har kitinaktive AA10 vist seg å ha et mer rombisk EPR-spektra, sammenliknet med resterende LPMOer (Hemsworth *et al.* 2015). En annen interessant forskjell er at celluloseaktive AA10-enzymmer viser EPR-spektre liknede de fra AA9, deriblant C1-oksiderende CelS2 (ScLPMO10C) og C1/C4-oksiderende ScLPMO10B (Forsberg *et al.* 2014a; Forsberg *et al.* 2014b). Strukturene til disse enzymene viser at en sterkt konservert alanin i kitinaktive AA10 ikke har den samme posisjonen i de celluloseaktive enzymene CelS2 og ScLPMO10B. Dette har ført til spekulasjoner om en økt tilgjengelighet til den aksiale posisjonen i kobbersete i forhold til løsemiddel (i noen AA10), eller at fravær av alanin (i AA9) kan være viktig for C4-oksidasjon.

I tillegg har CelS2 en konservert fenylalanin i det aktive setet, mens denne er byttet ut med tyrosin i ScLPMO10B. (Hemsworth *et al.* 2015)

Det aktive setet i AA11- og AA13-familiene viser også type 2-EPR-kopperspektra, men også i dette tilfellet er det forskjeller rundt kopperionet. I likhet til ScLPMO10B, har AoAA11 en aksial tyrosin, men også alanin i den andre aksiale posisjonen i koppersete. Arrangementet av aminosyrene i AoAA13 er også litt annerledes; der en tyrosin okkuperer en aksial posisjon, mens en glysin er byttet ut med en alanin i nærheten av den andre aksiale posisjonen. Det er av stor interesse hvordan disse ulikhetene i geometri påvirker reaksjonsmekanismen i det aktive setet. Spesielt interessant er det hvordan AA13 angriper α -linkede polysakkarider med kun små endringer i det aktive setet (Hemsworth *et al.* 2015).

1.6.4 Elektrondonorer

LPMOer krever en ekstern elektrondonor for å fullføre den katalytiske syklusen. Eksperimentelt har både proteiner og plantederivatprodukter fungert som donorer, men hvilke molekyler som utfører denne reaksjonen i naturen er for det meste ukjent. Det samme gjelder elektrondonorenes reaksjonsmekanismer. Det finnes mange ulike potensielle reduktanter i naturen. Blant annet er det vist at biopolymeren lignin virker som en elektrondonor. Eksperimentelt har det vært vanlig å benytte gallussyre som er tilstede i biomasse som ikke inneholder lignin (Cannella *et al.* 2016).

For enkelte AA9-LPMOer er det vist at de donerte elektronene kan komme fra enzymet cellulose-dehydrogenase (CDH). CDH finnes i enkelte sopp, og katalyserer endringen av cellobioser til cellobiono-1,5-laktoner, samtidig som den reduserer FAD til FADH₂. CDH fra *Podospora anserina* har også aktivert en AA13 fra *Neurospora crassa* slik at den kan oksidere stivelse. Det er trolig at CDH har interaksjoner med en liten del på siden av enkelte AA9-enzymmer. Elektronene sendes via cytokromdomene i CDH og videre langs hydrofile sidekjeder til LPMOens aktive sete (Hemsworth *et al.* 2015). På denne måten kan Cu²⁺ reduseres til Cu⁺ slik at enzymet får katalytisk aktivitet.

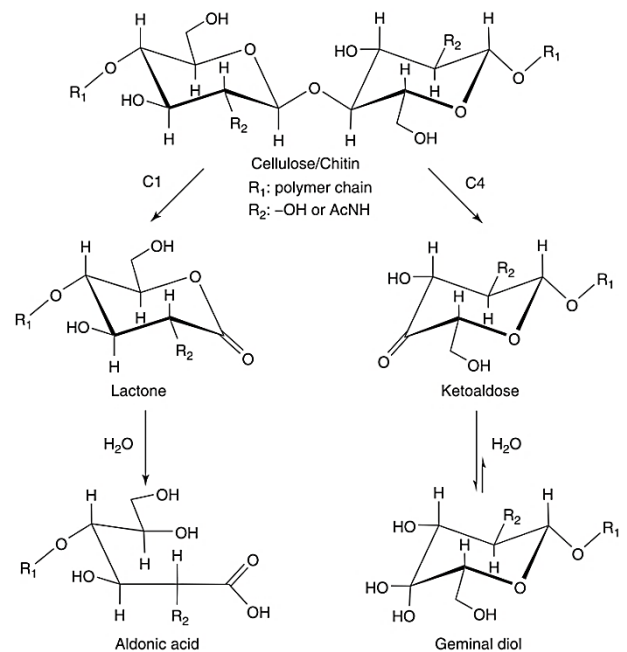
Nylig ble det vist at det finnes flere ulike systemer for elektrondonering. I forsøket ble det vist at CDH brukte protein/protein-interaksjoner i en ekstracellulær elektrontransportkjede. Alternativt kunne fenoler og lignin fra ferskt plantemateriale fungere som elektrondonor gjennom en uspesifikk reduseringsmekanisme. Videre kunne difenoler/quioner fungere som en redoksmediator mellom LPMO og en spesifikk elektrondonor (Kracher *et al.* 2016).

Det er også forsket på muligheten for å kombinere energi fra elektromagnetisk stråling med pigmenter og LPMOer. Nylig viste Cannella *et al.* at det var mulig å øke LPMO-aktivitet opptil 100 ganger ved å eksponere enzym, pigment og en ekstern elektrondonor for lys. Spesielt interessant var det at ulike elektrondonorer kunne påvirke enzymets substrataktivitet (Cannella *et al.* 2016).

1.6.5 Mekanisme

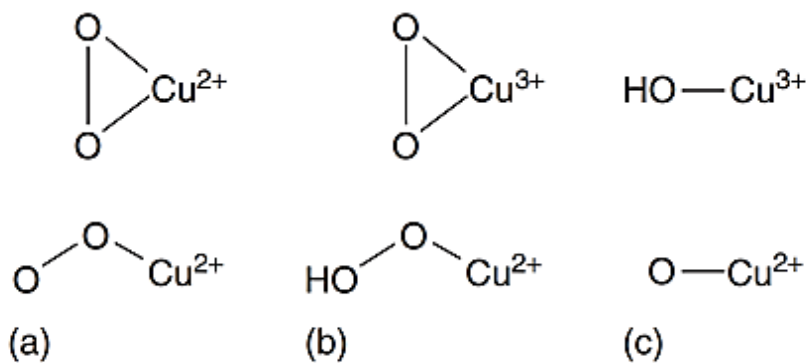
I 2010 ble det med isotopmerket oksygen ($H_2^{18}O$ og $^{18}O_2$) vist at *SmCBP21* (*SmLMPO10A*) kløyver glykosidbånd ved å inkorporere et atom fra molekylært oksygen inn i substratet. Forsøkene viste også at det var nødvendig med en ekstern elektrondonor (i dette tilfellet askorbinsyre) for enzymatisk aktivitet. (Vaaje-Kolstad *et al.* 2010)

Videre følger en foreslått reaksjonsmekanisme for den oksidative kløyvingen av krystallinske polysakkarider (figur 7). Det starter med at redusert kopper aktiverer molekylært O_2 . Det aktiverte oksygenet fjerner et hydrogen fra enten C1 eller C4 i glykosidbindingen. Deretter følger en hydroksylering av det samme karbonet, etterfulgt av en spontan eliminasjonsreaksjon som fører til oppløsning av glykosidbindingen. Hvilket karbonatom som oksideres varierer hos de ulike LPMOene. Noen oksiderer kun C1 og danner laktoner som spontant konverteres videre til aldonske syrer. Andre oksiderer kun C4 atomet og danner ketoaldoser som vil være i likevekt med den hydrerte diol-formen. Enkelte enzymer har både C1- og C4-oksidasjon.



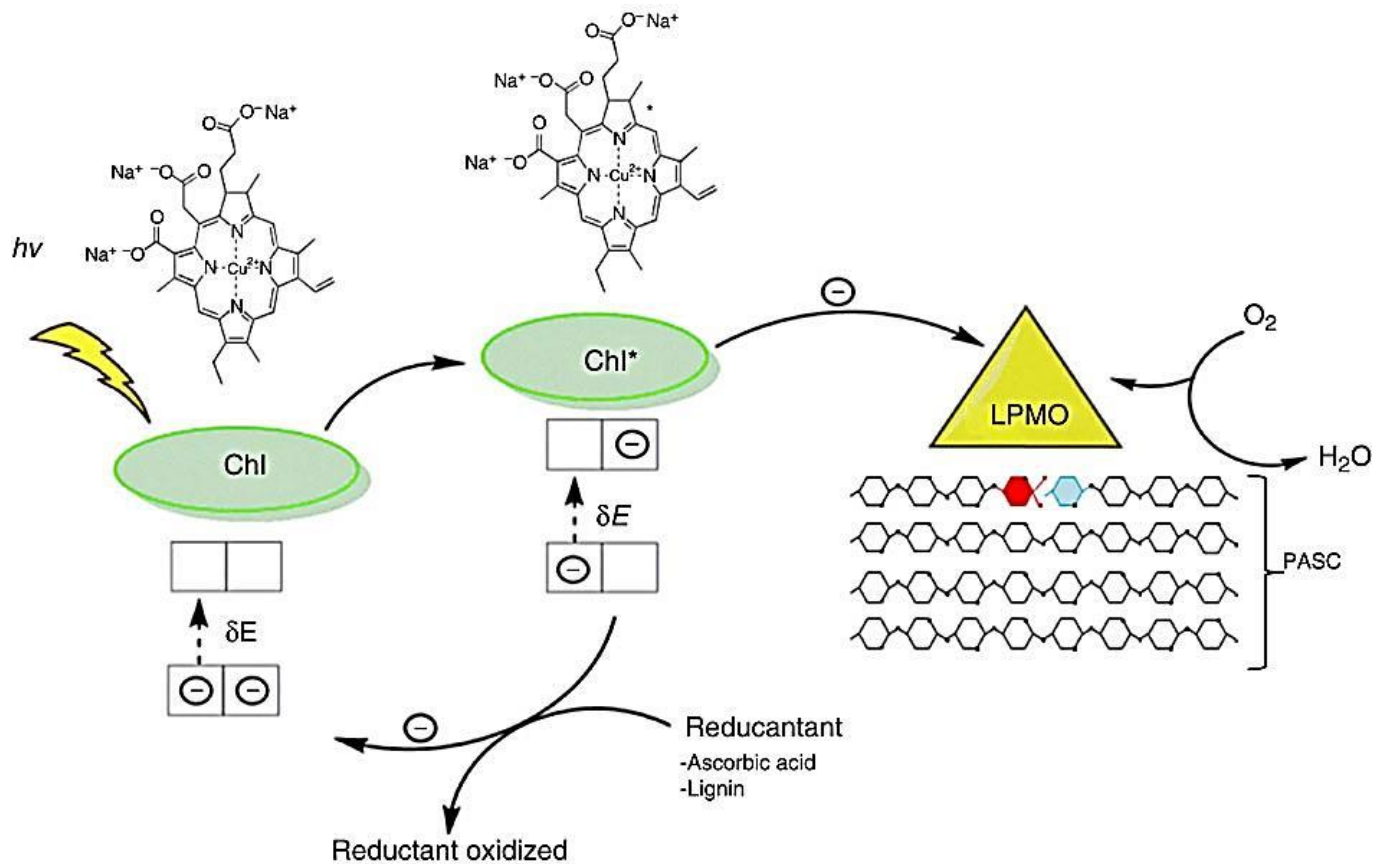
Figur 7: Oksiderte produkter generert av LPMOer og deres videre reaksjoner med vann. De videre reaksjonene er pH-avhengig, og pilene indikerer situasjonen ved pH 7. 0 (Aachmann *et al.* 2015)

Det har i flere tiår vært diskutert hvordan det aktiverte oksygenkomplekset ser ut. I en studie fra 2014 ble det forsøkt å bruke kvantemekaniske kalkuleringer for å identifisere hvilken oksygen-art som ble brukt av LPMOer, samt hovedtrekkene i mekanismen (Aachmann *et al.* 2015). I forsøk ble det brukt en AA9 LPMO for å sammenligne to mulige reaksjonsveier for å fjerne hydrogen og videre hydrolysere polysakkaridet. En av de to foreslåtte mekanismene involverer dannelsen av et Cu^{2+} -oksyl-superokso-intermediat (figur 8a), mens den andre involverte dannelsen av Cu^{2+} -oksyl-radikal (figur 8c, nede). Den sistnevnte viste seg å være mest energetisk gunstig og hadde sterkest oksidativ karakter (Kim *et al.* 2014).



Figur 8: Potensielle oksygenklasser i LPMO mekanisme. (a) Cu^{2+} -superperoksider (b) Cu^{3+} -peroksid (topp) og Cu^{2+} -hydroperoksid (bunn), og (c) Cu^{3+} -hydroksid (topp) og Cu^{2+} -oksyl (bunn). (Aachmann *et al.* 2015)

Nylig ble det foreslått en mekanisme hvor lyseksitering av pigmenter genererer en sterk reduktant som effektivt reduserer det aktive setet i LPMOer (figur 9). Etter modellen blir et elektron i pigmentet eksitert etter å ha fått tilført energi fra lys. I eksitert tilstand overføres elektronet til LPMOen og reduserer kopperet i det aktive setet. Enzymet aktiverer deretter dioksygen som oksiderer polysakkaridkjeden. I siste del av syklusen reduseres det oksiderte pigmentet av en ekstern elektrondonor (i eksperimentet lignin eller askorbinsyre), og syklusen kan starte på nytt. I reaksjonen blir molekylært dioksygen splittet, hvor et av oksygenatomene blir inkorporert i polysakkaridkjeden, mens det andre blir redusert til vann (Cannella *et al.* 2016).



Figur 9: Lys-indusert elektronoverføring til LPMO. Energi fra lys eksiterer pigmentet som overfører det eksiterte elektronet til det kobberet i det aktive setet i LPMOen. Det reduserte kopperionet aktiverer molekylært dioksygen som oksiderer polysakkaridkjeden. Til slutt reduserer en ekstern reduktant (lignin eller askorbinsyre) pigmentet slik at syklusen kan starte på nytt. Den oksiderte delen av polysakkaridkjeden er vist som en rød monomer av glukose oksidert i C1-posisjonen til en aldonsk syre, mens den blå monomeren vil bli frigitt som en ikke-oksidert oligosakkarid. (Cannella *et al.* 2016)

1.7 Raman-spektroskopi

1.7.1 Introduksjon

Raman-spektra blir vanligvis tatt ved laserstråling. Prøven blir bestrålt med monokromatisk lys, og spredd lys blir undersøkt av et spektrometer. Mesteparten av lyset består av Rayleigh-linjer som er absorpsjon og re-emisjon av fotoner fra laserkilden. Linjene som bidrar til Raman-spekteret oppstår når fotonene fra laserkilden får høyere eller lavere energi ved kobling til vibrasjonseksitasjon, eller frigjøring av energi med tilbakefall til et lavere energinivå. Forskjellen i frekvens mellom Rayleigh- og Raman-linjen er frekvensen til den korresponderende vibrasjonen (Williams & Fleming 2008).

1.7.2 Fysikalske prinsipper

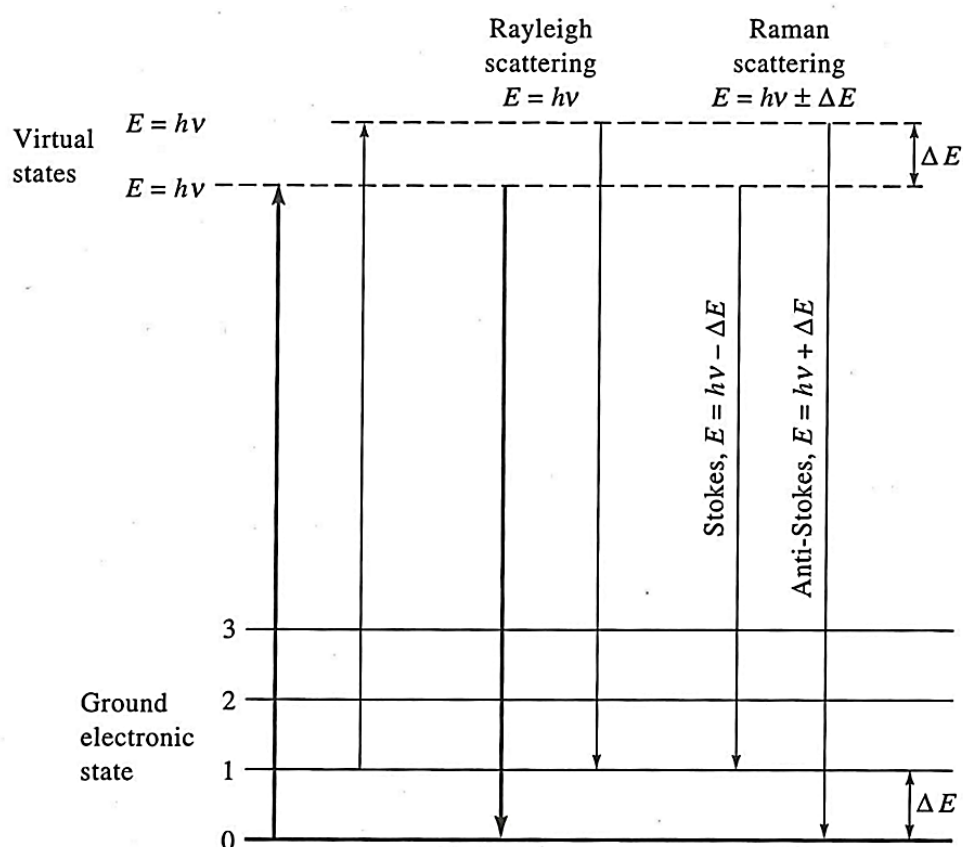
Raman-spektra skapes ved å bestråle en prøve med en laserkilde av monokromatisk stråling i den synlige (ofte nær infrarød) regionen av det elektromagnetiske spekteret. Det er vanlig at laserkilden ståler med en bølgelengde som er langt fra absorpsjons-linjene til analytten. Energinivådiagrammet i figur 10 gir en oversikt over grunnlaget for Raman- og Rayleigh-linjer. Den kraftige pilen helt til venstre i figuren beskriver energiendringen i et molekyl ved interaksjon av et innfallende foton fra laserkilden. Energiendringen tilsvarer energien til fotonet ($h \cdot \nu$). Hvilken tilstand molekylet oppnår er avhengig av frekvensen til det innfallende fotonet, og kan variere fra den elektroniske grunntilstanden til de eksiterte energitilstandene til elektroner. Pil nummer to i diagrammet beskriver energiendringer der et molekyl i første vibrasjonsnivå treffes av et innfallende foton. Andelen av molekyler i denne tilstanden er liten ved romtemperatur (derfor markert med tynn pil). Pilene i midten av figuren indikerer energiendringer som fører til Rayleigh-linjen. Ved re-emisjon av laserfotoner, og dermed dannelse av Rayleigh-linje tapes det ingen energi. Til høyre i diagrammet vises energiendringene som forårsaker Stokes- og anti-Stokes-linjer, hvor energiforskjellen fra Rayleigh-linjen er $\pm \Delta E$, altså energien tilsvarende første vibrasjonsnivå i grunn-stadiet. Dette energinivået kan også absorbere infrarød stråling som er prinsippet for IR spektroskopi. Dermed er forskyvningene i Raman-frekvens og den infrarøde absorpsjonen identiske (Skoog *et al.* 1998).

Raman-spektroskopi gir komplementær informasjon til IR-spekter. For løsninger med H₂O er mange av vibrasjonene som assosieres med H-båndene sterkere i IR-spekter enn Raman-spekter. Dette gjør at H₂O interfererer mindre i et Raman-spekter og gir en fordel i vannløsninger (Luchinat 2000).

Populasjonsfordelingen av Stokes- og anti-Stokes-emisjon er sterkt forskjøvet mot Stokes-emisjon. Samtidig er det størst sannsynlighet for å produsere Rayleigh-emisjon. Årsaken til dette er at sannsynligheten er stor for at molekylet er i laveste energinivå når den blir truffet av et laserfoton, og at re-emisjonen av fotonet fører molekylet tilbake i samme energinivå (Skoog *et al.* 1998). Intensiteten av anti-Stokes-linjer øker med temperatur fordi en større fraksjon av molekylene vil være i første vibrasjonsnivå i grunn-stadiet (Luchinat 2000; Skoog *et al.* 1998).

Raman-linjenes intensitet er avhengig av et vekslende dipolmoment induisert av det innfallende fotonet. Momentet er produkt av fotonets elektriske felt og endringen i molekylets

polarisering. Det er “symmetriske bånd-strekkings”-vibrasjoner som er årsaken til de dominerende linjene i Raman-spektre (Luchinat 2000).



Figur 10: Energivådiagram som viser opphav til Rayleigh- og Raman-linjer (Skoog et al. 1998).

1.7.3 Resonans-forsterkning

Intensiteten av Raman-linjene er sterkt avhengig av eksitasjonsbølgelengde. Når en laser er stilt inn i nærheten av en lovlig elektronisk overgang (resonans), øker effekten av enkelte Raman-bånd. Dette skjer fordi polariserbarheten, og dens avhengighet av molekylære bevegelser, blir forsterket via den elektroniske overgangen. Bare bånd assosiert med vanlige koordinater som fører molekylet til den eksiterte tilstandsgeometrien forsterkes (Luchinat 2000).

Bølgelengden på laseren er dermed viktig i Raman-spektroskopi fordi resonans-forsterkning øker både sensitiviteten og selektiviteten av teknikken. Raman-linjer uten resonans er så svake at det vanligvis er nødvendig med væskeløsninger med konsentrasjoner i molar for å oppnå gode spektre. Resonans-forsterkningen kan senke den nødvendige konsentrasjonen til mM og μM (Luchinat 2000).

1.8 Elektron paramagnetisk resonans (EPR)

1.8.1 Introduksjon

For å forstå overgangsmetall-sentere i biologien er det ofte nyttig å få en grunnleggende forståelse for elektroniske energitilstander og magnetiske egenskaper. Disse karaktertrekkene er oftest korrelert med koordinasjon og geometri til et metallatom, hvor begge egenskapene er med på å påvirke setet. Når en partikkel med et magnetisk moment plasseres i et magnetisk felt, vil momenter orientert i ulike retninger i forhold til magnetfeltet få ulike energitilstander. Overgangen mellom disse tilstandene kan bli induisert med absorpsjon av lys med passende frekvens. Hvis partiklene er elektroner, vil passende frekvens ligge i mikrobølgerregionen, og ved å applisere et magnetfelt kalles metoden elektron paramagnetisk resonans (EPR). Metoden krever et uparet elektron og brukes ideelt på metalloproteiner som inneholder Cu (II), Co(II), Fe(II), Fe(III), Mn(II), Mn(III), Mo(V), samt enkelte metall-klustere (Berg & Lippard 1994).

1.8.2 Cu²⁺-senter

EPR-spektroskopi og bestemmelse av elektronisk struktur, metallkoordinasjon og geometri kan demonstreres med Cu²⁺. Den strukturelle diversiteten av kopper-Cu²⁺-komplekser er hovedsakelig relatert til Cu²⁺ d⁹-systemet. Dette systemet gir grunnlaget for mange ulike koordinasjonsgeometrier, men typiske koordinasjoner for Cu²⁺ er oktaeder, kvadrat-pyramidal og kvadratisk plant. I disse tilfellene er grunntilstandene vanligvis {d_{x²-y²}}, med unntak av {d_{z²}} (Kozlevčar 2008; Luchinat 2000).

Cu²⁺ er spesielt gunstig å undersøke med EPR fordi den kun inneholder et uparet elektron. Basert på spinnsystemer kan Cu²⁺-EPR-spektra deles inn i to store grupper; S=1/2 og S=1. Gruppen med S=1/2 har det enkleste systemet og med to energitilstander (m_s). Systemet er karakteristisk for mononukleære koordinasjonsforbindelser, eller polynukleære komplekser hvor det ikke er interaksjoner mellom paramagnetene i metallsenterne. Spinnsystem S=1 er ofte til stede i bi-nukleære komplekser, hvor to spinnsystemer (S=1/2) er koblet til hverandre via en ligand. Dette resulterer ofte i ferromagnetisk eller antiferromagnetisk adferd (Kozlevčar 2008). Videre brukes eksempelet med spinnsystemet S=1/2 for Cu²⁺.

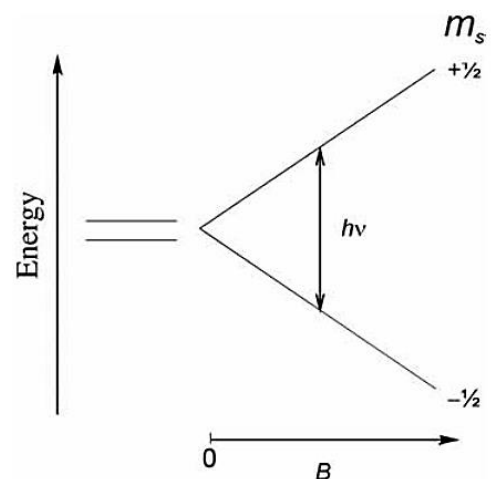
1.8.3 Zeeman-effekt med $m_s \pm 1/2$.

Når et elektron blir eksponert for et magnetfelt (B), kan elektronet enten stabiliseres ($m_s = -1/2$) eller destabiliseres ($m_s = +1/2$), og størrelsesordenen av denne effekten varierer lineært med intensiteten til magnetfeltet. Interaksjonen mellom de magnetiske momentene med magnetfeltet (B) kalles Zeeman-effekten (figur 11). En netto forskjell i elektronpopulasjon er en nødvendighet for EPR-absorpsjon. Det kreves at andelen transisjoner fra den mer stabile til den mindre stabile energitilstanden (resonans) overgår andelen i motsatt retning. Betingelsen for resonans er gitt ved formel;

$$h\nu = \Delta E = g\beta B \quad (1)$$

hvor det må tilføres en energi ($h\nu$) tilsvarende energiforskjellen mellom $m_s \pm 1/2$. Separasjonsenergien ($\Delta E = h\nu$) er variabel og avhengig av intensiteten til magnetfeltet og energikilden. Dette har gitt to alternative instrumentelle konfigurasjoner. I den første konfigurasjonen er magnetstyrken (B) satt til en bestemt verdi og energikilden varierer i et passende frekvensintervall. I den andre konfigurasjonen er frekvensen fastsatt, mens magnetfeltet blir endret over et bestemt intervall. Tekniske årsaker har ført til at standard instrument-innstilling er fastsatt frekvens med et variabelt magnetfelt. Disse instrumentene kalles kontinuerlig bølge-spektrometer (CW) (Luchinat 2000).

Splittingen mellom $m_s \pm 1/2$ -stadiene øker lineært med magnetfeltet frem til resonans-forholdene er tilfredsstillende ($h\nu = g\beta B$) og mikrobølger absorberes. Dette gir en topp i mikrobølge-absorpsjonsspektrum på det spesifikke magnetfeltet som defineres som g -verdien. Denne verdien er 2,0023 for et fritt elektron, og i metallkomplekser er det interessant å studere verdier som avviker fra denne verdien. g -faktoren er ofte anisotropisk, som betyr at de har ulike verdier når komplekset er orientert i ulike retninger relativt til magnetfeltet. Dermed viser et EPR-eksperiment absorpsjon av mikrobølger ved ulike magnetfelt verdier. I EPR-eksperimenter kan oppløsningen forsterkes med å ta den første deriverte av mikrobølge-absorpsjonsspektrumet (Luchinat 2000).

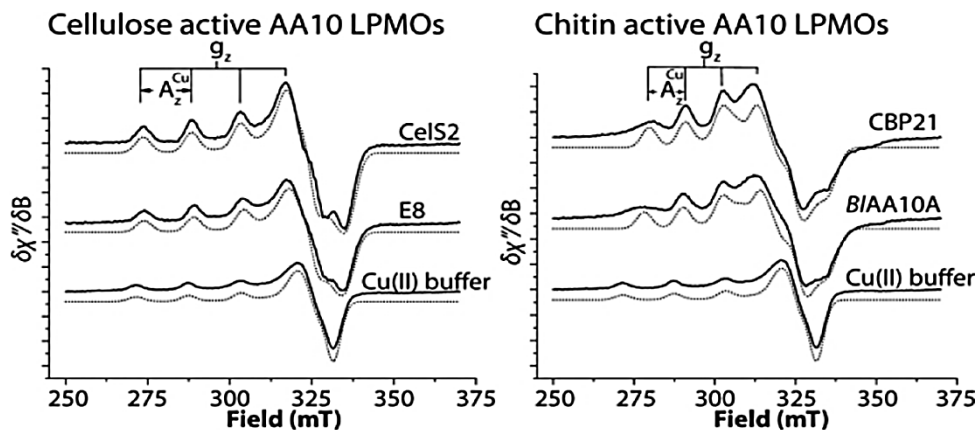


Figur 11: Zeeman-effekten i et EPR-eksperiment med spinn $S=1/2$.

1.8.4 Hyperfin og superhyperfin struktur

Hyperfine interaksjoner oppstår når et paramagnetisk elektron blir influert av en kjerne med et nukleært spinn (nukleært magnetisk moment). Interaksjonene er delt inn i to ulike klasser; hyperfin og superhyperfin (figur 12). Hvis den relevante kjernen er del av foreldreatomet til paramagneten, dvs. at elektronet har interaksjon med sin egen kjerne, kalles det hyperfine interaksjoner. Hvis den relevante kjernen tilhører en annen del av molekylet (vanligvis liganden til metallet), kalles dette superhyperfine interaksjoner (Luchinat 2000).

Når et elektron utsettes for kun et enkelt nukleært moment vil antallet hyperfine linjer være $2I + 1$, hvor linjene har lik intensitet. Dette gir kopper med nukleært spinn $I=3/2$ et EPR-spektrum med karakteristiske “ $2I+1=4$ ”-linjer. Forskjellen i magnetfelt som separerer de ulike linjene blir spesifisert som hyperfin koblingskonstant, A (Luchinat 2000).



Figur 12: Eksempel på hyperfine og syperhyperfine områder i cellulose (venstre)- og kitinaktive (høyre) AA10. Den superhyperfine splittingen skjer rundt 325 mT. Parameterne g_{xy} og A i den hyperfine regionen er ulike for kitin og celluloseaktive LPMOer (Forsberg et al. 2014b).

1.8.5 Temperaturavhengighet

I løsninger er vanligvis relaksasjonstiden for elektronspinn lang nok til å observere spektra i romtemperatur. Dette gjør det mulig å undersøke prøver ved fysiologiske temperaturer (Berg & Lippard 1994). Likevel er den vanligste prosedyren å fryse EPR-prøvene for å endre fordelingen i de ulike populasjonene i $m_s \pm 1/2$ -tilstandene. Ved å senke temperaturen økes andelen molekyler i den mest stabile orienteringen og fremmer sannsynligheten for å absorbere mikrobølger. På denne måten øker sensitiviteten på EPR-målingene ettersom temperaturen senkes. Ved økte temperatur øker bredden på EPR-linjene. Disse sammenhengene er årsaken til at EPR-spektra vanligvis tas opp ved lave temperaturer (Luchinat 2000).

1.9 Potensiometri

1.9.1 Generelle prinsipper

I et potensiometrisk system måles differansen mellom to ulike elektroder i en elektrokjemisk celle. Denne typen systemer involverer minst to typer elektroder; en indikatorelektrode og en referanseelektrode. Disse fungerer som katode og anode og er enten i kontakt med prøve- eller referanseløsning. Det er nødvendig med en saltbru mellom referanse- og indikatorelektrode for å lede elektrisk strøm. Kretsen sluttes ved å gi elektrisk kontakt mellom de to elektrodene. Denne danner grunnlaget for måling av potensial gjennom cellen. Ut ifra definisjonen av potensiometri er det viktig at målinger utføres under forhold der strømmen gjennom systemet er neglisjerbar (tilnærmet null) (Hage & Carr 2011).

1.9.2 Referanse- og indikatorelektroder

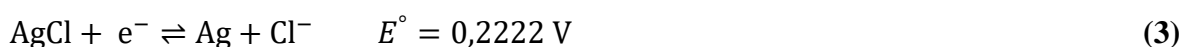
Referanseelektrodene som brukes i potensiometri har den samme rolle i alle typer elektrokjemiske celler. Meningen med en referanseelektrode er å gi reproducerbare, kjente og konstante potensialer som en annen elektrode kan måles opp mot. Den ultimate referanseelektroden er standard-hydrogen-elektroden (SHE) som alle andre potensialer er sammenlignet med (Hage & Carr 2011).

Standard-hydrogen-elektrode baserer seg på halvreaksjonen;



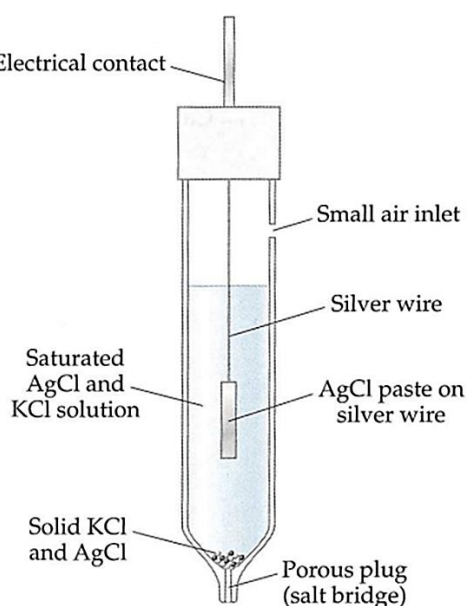
SHE må ha både hydrogenioner og hydrogengass med en aktivitet på 1,000. Dette oppnås greit for hydrogenioner, men er vanskelig med hydrogengass som krever et trykk av gass på 1 bar rundt platinaelektroden. Dessuten kan det dannes et porøst lag av platina som kalles "svart platina". Laget har muligheter for å absorbere andre materialer enn H_2 eller H^+ . Dette fører til at systemet ikke lengre gir reproducerbare resultater (Hage & Carr 2011).

En mer brukervennlig referanseelektrode er sølv/sølvkloridelektroden med følgende halvreaksjon;



Et generelt design for sølv/sølvkloridelektroden er gitt i figur 13. I elektroden er elementært sølv dekket med et uløselig lag av kloridsalt (AgCl), hvor både kloridsalt og element er omgitt av KCl-løsning. Løsningen har kjent konsentrasjon og er mettet med AgCl (Hage & Carr 2011).

Det finnes mange ulike indikatorelektroder i potensiometrien. Et eksempel er å bruke et inert metall som elektrode for å oksidere eller redusere en annen substans. Denne type indikatorelektroder er kjent som metalliske indikatorelektroder og er laget av material som platina, palladium eller gull. (Hage & Carr 2011)



Figur 13: Generelt oppsett av en Ag/AgCl referanse elektrode. (Hage & Carr 2011)

1.9.3 Nernsts likning

Elektrodenes adferd i det potensiometriske systemet defineres av Nernsts likning;

$$E = E_0 - \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \ln \frac{C_{Oks}}{C_{Red}} \quad (4)$$

I likningen defineres E som det målte potensialet mellom indikator- og referanseelektrode. Videre er E_0 -potensialet mellom elektrodene når konsentrasjonen av oksidant og reduktant i den elektrokjemiske cellen er like store. Likningen inneholder også temperaturen (T) i kelvin (K), Faradays konstant ($F=96485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$), den universale gass-konstanten ($R=8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) og antall elektroner (n) i reaksjonen. De siste variablene i likningen; C_{oks} og C_{red} står for hhv. konsentrasjonen av oksidant og reduktant i løsningen (mol/L) (Bier 2009).

1.10 Målet med oppgaven

Det kitinolytiske maskineriet til *Serratia marcescens* inneholder den kopperavhengige LPMOen *SmCBP21*. Enzymet danner oksidative brudd i krystallinske kjeder av kitin ved tilstedeværelse av en ekstern elektrondonor og molekylært dioksygen. Målet med oppgaven er tredelt.

I første del er målet å undersøke om det paramagnetiske elektronet i *SmCBP21*-Cu²⁺ endrer konformasjon/geometri ved tilsetning av ulike modifiserte og ikke-modifiserte kitinsubstrater, ved hjelp av elektron paramagnetisk resonans. Foreliggende hypotese er at det vil skje en endring i Cu²⁺-konformasjon ved tilsetning av kitinsubstrater til den kitinaktive LPMOen.

I del to er målet å undersøke om det er mulig å bruke Raman-spektroskopi for å skille mellom de ulike krystallinske kitinsubstratene for EPR-spektra. Samtidig er det også interessant å undersøke om det er forskjell i Raman-linjer assosiert med vibrasjoner i forhold til acetyleringsgraden i kitin.

I del tre sammenlignes elektrokjemiske egenskaper hos tre ulike elektrondonorer ved hjelp av potensiometri. Målet er å kartlegge eventuelle ulikheter i elektrokjemiske egenskaper og samtidig undersøke hvordan reduktantene påvirkes av pH.

2 Materialer

2.1 Laboratorieutstyr

Laboratorieutstyr	Spesifikasjoner	Leverandør
Autoklavteip	13 mm	VWR
Automatpipette	Finnpipetter	Thermo Scientific
Avtrekkskap	Mc6	Waldner
Blåkorkflasker	1000 mL 500 mL 250 mL 100 mL	VWR
Blåkorkrør Cellstar® tubes	15 ml 50 ml	Greiner Bio-One
Cryorør	2 mL	Starsted
Dyrkningskolber	2L	Nalgene
Eppendorfrør	1,5 mL	Axygen
EPR-system	EleXsyS 560 SuperX ER 4122 SHQE SuperX	Bruker
EPR-rør	O.D. 4 mm, L 250 mm	Sigma-Aldrich
Filter	Steritopp 0,22 µm	Millipore
Fraksjonssamler	BioFrac Fraction Collector	Bio-Rad
Fryser	-20 °C -80 °C	Bosch SANYO
Gelfotoutstyr	Gel Doc EZ Imager	Bio-Rad
Glassutstyr		Schott-Duran
Inkubator	Multitron Standard	Infors HT
Isbitmaskin	KF145	PORKKA
Kitinkuler	I 20 % Etanol	BioLabs
Kjøleskap		Gram
Kolonne	PD Minitrap™ G25	GE Healthcare
Kyvetter	220-1600 nm	Sigma-Aldrich
Magnetrorer		VWR
Mikrobølgovn	L17MSB13E	Logik
Mikrokyvetter		dispolabKartell

Mikrovekt	Sartorius CP-2P	VWR
Oppkonsentreringsrør	Amicon® Ultra -15 Vivaspin®2	Millipore Sartorius
Parafilm	5 cm	BEMIS
Petriskåler	9 cm	Heger
pH-meter	Si series pH probes	Sentron
Pipettespisser		VWR
Potensiometrisk system	Ag/AgCl elektrode (3 M KCl) Platinaelektrode Konverterer; DrDAQ (USB) 4 ml begerglass Magnet	Åsmund Kjendseth Røhr Åsmund Kjendseth Røhr Pico Technology
Raman-spektrofotometer	LabRam HR 800 confocal Raman microscope Diode laser 785 nm 50 X fluotar objektiv 0,55 NA	Horiba Scientific Toptica photonics Leica
Risteinkubator	Multitron Standard	Infors
Sentrifuge	J-265 XP Avanti™ J-25 Sentrifuge- 5430 R Sigma 1-14	Beckman Beckman Eppendorf LABEX
Sentrifugerotor	JLA8.100 JA-10	Beckman
Sentrifugerør	1000 mL 500 mL 30 mL	Nalgene
Spektrofotometer	Biophotometer	Eppendorf
Sprøyter	50 mL 10 mL 1 mL 100 µl 50 µl 10 µl	BD plastipak BD plastipak BD plastipak Hamilton Hamilton Hamilton
Sterilskap	Av-100	TelStar
Termomikser	Comfort	Eppendorf
Ultralydbad	High Power Ultrasonic Cleaner	Sper Scientific
Vannbad		GFL
Vekt	CP2 P Extend LC621P	Sartorius
Vortex	Genie 2	Scientific Industries

2.2 Programvare til dataanalyser

Bruksområde	Programvare	Leverandør
LP-kromatografisystem	LP Data View	Bio-Rad
Gel-visualisering	ImageLab	Bio-Rad
EPR	MatLab	MathWorks
	EasySpin 5,0	EasySpin
Potensiometri	PicoLog	Pico Technology
Raman	MatLab	MathWorks

2.3 Kjemikalier

Kjemikalie	Leverandør
3-(N-morfolin) propansvovelsyre (MOPS) SDS buffer (20x)	Life technologies
Aceton CH_3COCH_3	Sigma-Aldrich
Agar	Merck
Ammoniumacetat $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$	Merk
Ammoniumsulfat NH_4SO_4	Sigma-Aldrich
Ampicillin $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$	Sigma-Aldrich
Bacto TM Gjørekestakt	BD
Trypron	Merck
Coomassie® Brilliant Blue R-250	Bio-Rad
Eddiksyre CH_3COOH	Sigma-Aldrich
Eddiksyreanhydrid $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	Sigma-Aldrich
Etanol $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	VWR
Etylenediaminetetraeddiksyre (EDTA) $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$	Sigma-Aldrich
Fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF) $\text{C}_7\text{H}_7\text{FO}_2\text{S}$	Sigma-Aldrich
Gjærekstrakt	Merk
Glyserol $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3$	Merk
HEPES $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$	Sigma
Hydrogenklorid HCl	Sigma-Aldrich

Kobber(II)klorid dihydrat $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich
Magnesiumklorid MgCl_2	VWR
MES natrium salt $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NNaO}_4\text{S}$	Sigma-Aldrich
Metanol CH_3OH	Sigma-Aldrich
Natriumfosfat dibasisk $\text{H}_2\text{NaO}_4\text{P} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich
Natriumfosfat monobasisk $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P} \cdot \text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich
Natriumhydroksid NaOH	VWR
Natriumklorid NaCl	Sigma-Aldrich
NuPAGE® 10% Bis-Tris Gel 1,0 mm x 10 brønner	Life Technologies
NuPAGE® SDS buffer (20x)	Life Technologies
NuPAGE® LDS prøve buffer(4x)	Life Technologies
NuPAGE® Reduserende agent (500 mM DTT)	Life Technologies
Sukrose $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	VWR
Trizma base $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$	Sigma-Aldrich
Quinhydrone $\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2$	Sigma-Aldrich

2.4 Substrater/enzymer

Proteiner /enzym/substrat	Modifisering	Leverandør/modifiserer
α-kitin, 80 mesh		Seagarden, Chitiner A/S, Norway
α-kitin, 80 mesh	Acetyleret	Seagarden, Chitiner A/S, Norway /Åsmund Kjendseth Røhr
β-kitin (2003)		France Chitine, Orange, France
β-kitin (2003)	Acetyleret	France Chitine, Orange, France /Åsmund Kjendseth Røhr
β-kitin (2015)		France Chitine, Orange, France
β-kitin (2015)	Acetyleret	France Chitine, Orange, France /Åsmund Kjendseth Røhr
BenchMark protein ladder		Life technologies
Heksaacetylkitohexaose		Megazyme
<i>Sm</i>LPMO10A (<i>Sm</i>CBP21)		Selvlaget

2.5 Reduktanter

Reduktant	Leverandør
Natrium L-ascorbat $C_6H_7NaO_6$	Sigma Aldrich
Gallussyre monohydrat $C_7H_6O_5 \cdot H_2O$	Sigma Aldrich
L- Cystein hydroklorid hydrat	Sigma

2.6 Medier

2.6.1 Selvlagde medier

Medium	Innhold eller leverandør
LB-medium med agar	Gjærekstrakt 5 g Trypton 10 g NaCl 10 g Agar 15 g Løses i dH ₂ O til et sluttvolum på 1 L. Ampicillin tilsettes til en konsentrasjon på 100 µg/ml etter autoklaving (under 60 °C)
LB-medium uten agar	Gjærekstrakt 5 g Trypton 10 g NaCl 10 g Løses i dH ₂ O til et sluttvolum på 1 L. Ampicillin tilsettes til en konsentrasjon på 100 µg/ml etter autoklaving (under 60 °C)

2.6.2 Ferdiglagde medier

Medium	Innhold
SOC	2 % Tryptone 0,5 % Gjærekstrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glukose

2.7 Bakteriestamme

Stamme	Spesifikasjon	Bruk	Leverandør
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	One Shot® BL21 Star (DE3)	Ekspresjon	Invitrogen

2.8 Kit

Kit	Innhold	Leverandør
E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit I	Oppsamlingsrør (2 mL) Løsning I/RNase Løsning II (NaOH) Løsning III (Guanidin-HCl, Eddiksyre) HiBind™ DNA minikolonne Ekvibreringsbuffer (NaOH) HB buffer (Guanidin-HCl, isopropanol) DNA vaskebuffer Elueringsbuffer	Omega BIO-TEK

2.9 Buffere og løsninger

Buffere/løsning	Innhold
1 M Tris-HCl pH 8,0	121 g Trizma base ble løst i 800 ml dH ₂ O og pH justert til pH 8,00 med HCl før den ble fortynnet til et totalvolum på 1 L med dH ₂ O
100 mM Ammoniumacetat pH 5,0 og 6,0	3,854 g ammoniumacetat ble løst opp i 450 dH ₂ O, pH justert til pH 5 med 6 med eddiksyre og fortynnet til 0,5 L
100 mM HEPES buffer pH 7,0	11,916 g HEPEs ble løst opp i 450 ml dH ₂ O og pH-justert med HCl til pH 7,00, før den ble fortynnet til 0,5 L
100 mM MES buffer pH 6,0	10,861 g MES ble løst opp i 450 dH ₂ O og pH-justert med konsentrert HCl til pH 7,00 før den ble fortynnet til 0,5 L
100 mM Tris-HCl pH 8,0	6,057 g Trizma base ble løst i 450 ml dH ₂ O og pH justert til pH 8,00 med HCl før den ble fortynnet til et totalvolum på 0,5 L med dH ₂ O
100 mM Natriumfosfatbuffer pH 7,0	200 mM Natriumfosfatbuffer pH 7,0 ble

	fortynnet 1:1 med dH ₂ O
200 mM Natriumacetat buffer pH 4,0	13,608 g natrium acetat trihydrat ble løst i 450 ml dH ₂ O og pH justert til pH 4,00 med eddiksyre før den ble fortynnet til 0,5 L
200 mM Natriumfosfatbuffer pH 7,0	17,800 g NaHPO ₄ og 13,800 g NaH ₂ PO ₄ ble fortynnet til 0,5 L dH ₂ O (hver for seg) før NaHPO ₄ -løsningen ble titrert med NaH ₂ PO ₄ til pH 7,00
Arbeidsløsning til SDS-PAGE	300 µL dH ₂ O 200 µL Reduserende agent (500 mM DTT) 500 µL LDS prøve buffer
Fargeløsning SDS-Page	0,1 % Coomassie® R-250 400 mL etanol 100 mL konsentrert eddiksyre Fortynnes til et totalvolum på 1 L med dH ₂ O
Avfargingsløsning SDS-Page	100 mL etanol 75 mL konsentrert eddiksyre Fortynnes til et totalvolum på 1 L med dH ₂ O
Sferoplastbuffer	20 mL 1 M Tris-HCL pH 8,0 34,2 g sukrose 200 µL 0,5 M EDTA 400 µL 50 mM PMSF Fortynnes til 200 mL med dH ₂ O
20 mM Eddiksyre	1,15 ml konsentrert eddiksyre Fortynnes til 1 L med dH ₂ O
50 mM Tris-Hcl pH 8.0, 1 M (NH₄)₂SO₄	132,14 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 50 mL 1 M Tris-HCL pH 8,0 Fortynnes til 1 L med dH ₂ O
100 mM CuCl₂	0,882 g CuCl ₂ ·2H ₂ O 1 dråpe konsentrert HCl Fortynnes til 50 ml

3 Metode

3.1 Proteinuttrykk

3.1.1 Plasmidisolering ved bruk av ® E.N.Z.A. Plasmid Kit

På grunn av dårlig proteinuttrykk i utdelt bakteriestamme (med gen for fullengde *SmCBP21*) var det nødvendig å isolere og transformere plasmid inn i nye kjemisk kompetente *E. coli*-celler. Isoleringen av plasmid ble utført ved hjelp av ® E.N.Z.A. Plasmid Miniprep Kit 1.

Materialer:

- LB plater med 100 µg/ml ampicillin
- ® E.N.Z.A. Plasmid Miniprep Kit 1
- Cellekultur av *SmCBP21*

Metode:

E. coli-celler fra frysestokk ble plattet ut på LB-plater med 100 µg/ml ampicillin. Platene ble inkubert over natten (ca 16 timer) ved 37 °C. En singel koloni fra hver plate ble inokulert i 4 mL LB-medium med en konsentrasjon på 100 µL/mL og inkubert ved 37 °C og 250 rpm i 12-16 timer. 1,5 ml av cellemediet ble overført til eppendorfrør og sentrifugert ved 10 000 x g i ett minutt (ved romtemperatur). Cellepelletten ble resuspedert i 250 µL av løsning I (tilsatt RNAase A) og vortexet. Deretter ble det tilsatt 250 µL av løsning II (basisk lysning), hvor røret ble rotert forsiktig for å danne et klart lysat. Det ble videre dannet hvitt utfall i løsningen ved å tilsette 350 µL av løsning III og umiddelbart vende røret forsiktig frem og tilbake. For å fjerne utfallet ble løsningen sentrifugert ved 13 000 x g i 10 minutter før supernatanten ble overført til en HiBind® DNA mini kolonne. Løsningen ble igjen sentrifugert i ett minutt med samme hastighet. Kolonnen ble tilsatt 500 µL HP buffer før den ble sentrifugert ved maksimum hastighet i ett minutt. Etter å ha tilsatt 700µL Wash Buffer for å vaske kolonne og plasmid ble kolonnen igjen sentrifugert ved maksimum hastighet i ett minutt. For å tørke kolonnematriksen ble røret sentrifugert ved maksimum hastighet i to minutter. Til slutt ble kolonnen overført til et nytt eppendorfrør og tilsatt 50 µL elueringsbuffer før det ble sentrifugert en siste gang ved maksimum hastighet. Plasmidet ble deretter lagret ved -20 °C.

3.1.2 Transformering av plasmid inn i One Shot® BL21 Star™ (DE3)-celler

One Shot® BL21 Star™ (DE3)-celler er kjemisk kompetente *E. coli*-celler med høy transformasjons-effektivitet. Oppkonsentrert og rensset plasmid fra del 3.1.1 ble transformert inn i de kjemisk kompetente *E. coli*-cellene for å danne celler med stor produksjon av *SmCBP21*.

Materialer:

- One Shot® BL21 Star™ (DE3)-celler
- Plasmid med gen for *SmCBP21*
- SOC medium
- LB – agarplater (100 µl/mL ampicillin)
- Ampicillin (100 µl/mL)

Metode:

Et rør med kjemisk kompetente celler ble tint på is og tilsatt plasmid i et volum på 1 µl. Løsningen ble forsiktig blandet og inkubert på is i 30 minutter. Etter nedkjøling ble cellene varmet i vannbad ved 42 °C i nøyaktig 30 sekunder før de igjen ble nedkjølt på is. Videre ble det tilsatt 250 µl oppvarmet (42 °C) næringsrikt SOC medium i sterilt miljø. Røret ble inkubert i risteskapp ved 37 °C og 225 rpm i en time. Videre ble 25 µl og 150 bakteriekultur platet ut på LB-plater med 100 µg/ml ampicillin og inkubert i varmeskap ved 37 °C over natten (ca 16 timer).

3.1.3 Glyserolstokker

Glyserol stabiliserer og beskytter cellemembranen til bakterier ved frysing og gjør at bakterieceller kan overleve lengre. På denne måten kan ønskede plasmider lagres i en ønsket bakteriestamme over lengre perioder i forhold til petriskåler i kjøleskap.

Materialer:

- 1000 µl bakteriekultur
- 300 µl 85 % (v/v) glyserol (autoklavert)

Bakteriekulturen ble mikset forsiktig med glyserolen i cryo-rør og lagret ved -80 °C.

3.1.4 Overekspressjon

For å overuttrykke *SmCBP21* ble ampicilinresistent *E. coli* fra 3.1.3 inokulert i LB-medium tilsatt ampicillin.

Materialer:

- LB-medium
- Ampicillin (100 mg/ml)
- Frysestokk *SmCBP21*
- 2 L risteflasker

Metode:

500 ml LB-medium (tilsatt 500 µl med 100 mg/ml ampicillin) ble inokulert med *SmCBP21* bakterier fra frysestokk. Deretter ble bakteriekulturen inkubert ved 37 °C og 200 rpm i 16 timer.

3.1.5 Periplasmatisk ekstrakt av *E. coli*

SmCBP21 har sitt naturlige signalpeptid i vektoren. Signalpeptidene driver translokasjonen av det uttrykte *SmCBP21* fra cytoplasma til det periplasmatiske rommet i *E. coli*. Proteinene kan dermed ekstraheres ved lysing av cellens ytre membran, og dette kan oppnås med et kaldt osmotisk sjokk. I denne prosedyren tilsettes en kald sferoplastbuffer med høy konsentrasjon av sukker. Cellene tar opp sukkeret, og ved å tilsette iskaldt vann og $MgCl_2$ får cellene et osmotisk sjokk. Dette fører til at yttermembranen til *E. coli*-cellene sprekker og at det periplasmatiske ekstraktet frigjøres. Sferoplastbufferen inneholder også fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF). Dette er en serin-protease-inhibitor som forhindrer uønsket degradering av protein.

Materialer:

- Sferoplastbuffer
- Sterilt iskaldt dH_2O
- 1 M $MgCl_2$
- Sentrifugerør (1L)
- JLA8.100 rotor

Metode:

En liter ekspresjonskultur ble overført til 1 L sentrifugerør og sentrifugert i 20 minutter ved 8000 rpm i en JLA8.100 rotor ved 4 °C grader. Etter sentrifugering ble pelletene resuspendert i 50 ml iskald spheroplastbuffer og inkubert på is i fem minutter. Løsningen ble deretter overført til to 35 ml sentrifugerør og sentrifugert ved 7200 rpm i 10 minutter. Etter 10 minutter inkubasjon i romtemperatur ble cellepelletene resuspendert i 15 ml iskald dH₂O og satt på is 45 sekunder. Løsningen ble så tilsatt 1500 µl 1 M MgCl før den igjen ble sentrifugert ved 7200 rpm. Supernatanten (periplasmatiske ekstraktet) ble til slutt filtrert gjennom et 0,22 µm filter før det ble lagret ved 4 °C.

3.2 Proteinrensing

Ved proteinkarakterisering er det viktig å jobbe med rene proteiner. Hvilken separasjonsmetode som benyttes ved rensing er avhengig av det ønskede proteinets spesifikke egenskaper. For *SmCBP21* ble det benyttet en relativt enkel prosedyre ved bruk av kitinkuler (affinitetskromatografi).

3.2.1 Rensing *SmCBP21* på kitinkuler

I affinitetskromatografi utnyttes prinsippet om at mange biomolekyler danner sterke og reversible komplekser med ligander, substrater, eller reseptorer. *SmCBP21* har muligheten for å danne slike komplekser med kitin, og interaksjonene er hovedsakelig fremprovosert av konserverte, løsningsmiddeleksponerte og polare sidekjeder på overflaten av det aktive setet (Vaaje-Kolstad *et al.* 2005b). Ved å bruke kitin i kolonnematerialet er det dermed mulig å fremprovosere sterke, reversible og spesifikke interaksjoner mellom *SmCBP21* og kolonnematerialet.

Materialer:

- Periplasmatiske ekstrakt *SmCBP21*
- Kolonne og stempel
- Kitinkuler
- Buffer A: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M (NH₄)₂SO₄
- Buffer B: 20 mM eddiksyre
- 0,5 M NaOH

Metode:

Det ble pakket en kolonne med 25 ml kitinløsning (i 20 % etanol) og denne fikk stå til kitinkulene ble pakket (ca. 20 minutter). Kolonnen ble koblet til BioLogic LP-system og systemet ble skyldt og ekvilibrert i buffer A med en flow på 1 ml/min. Periplasmatisk ekstrakt (31 ml, tilsvarende 1 L medium) ble bufret og saltet til samme konsentrasjon som buffer A og filtrert gjennom et 0,22 µm filter. Løsningen ble deretter applisert på kolonnen med samme flow-hastighet som tidligere. Videre ble kolonnen vasket med buffer A til baselinjen ble gjenopprettet. Dette ble gjort for å fjerne proteiner og urenheter med lav affinitet til kolonnen. Proteinene ble til slutt eluert med buffer B. Etter gjenopprettet baselinje ble kolonnen vasket med 0,5 M NaOH og dH₂O. Til slutt ble kolonnen tilsatt 20 % etanol for å forhindre bakterievekst ved lagring.

Fraksjoner ble analysert med SDS-PAGE (avsnitt 3.2.2), hvor rene fraksjoner gjennomgikk bufferbytte og oppkonsentrering (avsnitt 3.2.3).

3.2.2 Sodium Dodecyl Sulfat-Polyakrylamid Gel Elektroforese (SDS-PAGE)

SDS-page er en rask og enkel metode for å undersøke proteiners relative molekylvekt og renhet. I denne teknikken denatureres proteinet først med behandling av sodium Dodecyl sulfat (SDS) og dithiothreitol (DDT). SDS er en sterk anionisk detergent med en hydrofob del som danner hydrofobe interaksjoner med proteinet, mens en hydrofil sulfatgruppe orienteres mot vann. Dette fører til at proteinet mister den to- og tredimensjonale strukturen. Sulfatgruppens ladning vil også virke frastøtende mot hverandre og fører til at proteinet forblir denaturert. Samtidig gir dette polypeptidet en negativ totalladning som er tilnærmet proporsjonal med antallet aminosyrer. Løsningen behandles også med en sterk reduktant (i dette tilfellet DDT) for å redusere disulfidbindinger. For å øke reaksjonshastigheten tilføres det også varme til systemet (Hage & Carr 2011).

Etter denatureringen blir proteinene applisert på en polyakrylamidgel og plassert i et elektrisk felt. Den negative ladningen på proteinene gjør at de vandrer mot den positive polen. Fordi gelen består av et nettverk av små porer, vil små proteiner vandre raskere og lengre i gelen enn større. Dette kommer av at mindre proteiner møter mindre motstand i gelen. For å identifisere ønsket protein benyttes en proteinmarkør som inneholder proteiner med kjente molekylvekter (Hage & Carr 2011).

Til slutt visualiseres proteinene på gelen ved bruk av Coomassie brilliant blue. Fargestoffet binder til de basiske aminosyrene arginin, lysine og histidine i surt miljø. Dette fører til en fargeendring fra rødbrun til koboltblått som har et absorpsjonsmaksimum ved 595 nm. På denne måten blir fargeintensiteten omtrentlig proporsjonal med antallet positivt ladde aminosyrer (Syrovoy & Chromatog 1991).

Materialer:

- NuPAGE® 10 % Bis-Tris Gel 1,0 mm x 10 brønner
- MES SDS Running buffer (1x)
- Eppendorfrør
- Proteinfraksjoner
- Arbeidsløsning
- BenchMark™ Protein Ladder
- Proteinfraksjoner
- Fargeløsning
- Avfargningsløsning

Metode:

10 µl arbeidsløsning og 10 µl proteinløsning ble blandet i ett eppendorfrør og plassert i vannbad ved 70 °C i ti minutter. I mellomtiden ble en NuPAGE® gel plassert i et gelelektroforesekar og fylt med MES SDS buffer. Proteinmarkør (7 µl) og proteinprøver (20 µl) ble applisert i brønner på gelen før systemet ble påført en spenning på 200 V i 50 minutter. Gelen ble tilsatt rundt en dl fargeløsning og varmet i mikrobølgeovnen i et minutt ved 750 W. Løsningen med gel ble satt på ristebrett i fem minutter før fargeløsningen ble fjernet. Delen ble tilsatt avfargningsløsning, varmet i mikrobølgeovnen og deretter inkubert ved risting i fem minutter. Det siste steget ble gjentatt to ganger. Gelen ble til slutt visualisert i EZ-imager fra Bio-Rad.

3.2.3 Oppkonsentrering og bufferbytte

For å oppkonsentrere, avsalte og skifte buffer på proteiner kan det brukes sentrifugefiltre. Filtrene kommer kommersielt ved ulike porestørrelser og med ulike cut-off-molekylvekter på eksempelvis 3, 10 og 30 kDa. Molekyler ved lavere vekt enn cut-off-verdien vil ideelt sett gå gjennom filteret, mens større molekyler blir værende i filterkammeret. Filtrene burde ha lav

affinitet mot proteinene for unngå tap av analytt med fortetning av porene. Til *SmCBP21* ble det benyttet filter med 10 kDa cut-off.

Materialer:

- Amicon® Ultra-15 Centrifugal filter, 10 kDa cut-off (Millipore)
- Rene proteinfraksjoner
- Lagringsbuffer, 20 mM Tris-HCl pH 8,0

Metode:

Renset protein ble tilsatt passende Amicon®-15 filter og spunnet ned ved 4300 rcf ved 4 °C til ca 1 ml volum. Deretter ble det gjort et bufferbytte til 20 mM Tris-HCl pH 8,0 ved tilføring av fire kolonnevolum med buffer. Proteinet ble deretter oppkonsentrert til ønsket volum og lagret i kjøleskapet ved 4 °C.

3.2.4 Konsentrasjonsbestemmelse ved UV₂₈₀

Absorpsjonen av en homogen prøve kan relateres til konsentrasjon gjennom uttrykket kjent som “Beer-Lamberts Lov”;

$$A = \epsilon bC \quad (5)$$

Dette er nyttig i kjemiske analyser fordi likningen gir det lineære forholdet mellom målt absorpsjon (A) og konsentrasjon av analytt (C). Termen b tilsvarer lysveien gjennom prøven (cm), mens termen ϵ er den molare ekstinksjonskoeffesienten (absorpsjonskoeffesienten). (Hage & Carr 2011). Den teoretiske absorpsjonskoeffesienten for proteiner kan estimeres ved hjelp av programmet ProtParam (web.expasy.org/protparam/). Programmet bruker de teoretiske absorpsjonskoeffesientene til de aromatiske aminosyrene tryptofan og tyrosin (samt disulfidbånd mellom to cystein) ved 280 nm for å estimere en absorpsjonskoeffesient for hele proteinet (Gasteiger *et al.* 2005).

Materialer:

- Spektrofotometer
- Kyvette
- Reint protein
- Korresponderende buffer (til protein)

Metode:

5 µl enzymløsning og 195 µl korresponderende buffer ble tilført en kyvette og homogenisert ved pipettering. Til en annen kyvette ble det tilsatt 200 µl av samme bufferen (blankprøve). Spektrofotometeret ble nullstilt med blankprøven og *SmCBP21*-prøvene ble tatt. Videre ble konsentrasjonen beregnet ved hjelp av "Beer-Lamberts Lov". Det ble benyttet to paralleller for bestemmelse av proteinkonsentrasjon i stokkløsningen av *SmCBP21*-fremstilling av EPR-prøver i 3.4.1.

3.2.5 Generering av apoenzymer

LPMOer har affinitet mot flere ulike metall-ligander. For å vite hvilket metall som er i det aktive sete er det derfor nødvendig å fjerne metallioner fra løsningen, før det tilsettes et overskudd av ønsket ligand (Cu^{2+}). For å fjerne metallioner kan det chelaterende middelet EDTA tilsettes løsningen. EDTA har sterk binding til mange ulike metallioner og trekker dem fra løsning (eller proteiner) i 1:1 ratio. (Hage & Carr 2011). Videre i dette steget blir overskuddet av EDTA fjernet med gelfiltrering hvor det samtidig ble gjort et bufferbytte til 50 mM MES pH 6,0.

Materialer:

- 0,5 M EDTA
- 50 mM MES buffer pH 6,0
- PD minitrap g-25 (GE healthcare)

Metode:

Det ble tilsatt EDTA i løsningen til en totalkonsentrasjon på 10 mM. Deretter ble løsningen sentrifugert i 30 sekunder ($14000 \times g$) før den ble inkubert i romtemperatur i ca. 20 minutter. PD minitrap g-25-kolonnen ble ekvilibrert med tre kolonnevolum (7,5 ml) 50 mM MES buffer pH 6,0. Enzymløsning og MES buffer (til et totalvolum på 0,5 mL) ble applisert på kolonnen, hvor enzymløsningen fikk trekke ned i kolonnen før buffer ble tilsatt. Til slutt ble enzymet eluert med med 700 µl MES buffer.

3.2.6 Cu²⁺-metning av apoenzym

Steget videre er å mette de kopperavhengige enzymene med Cu²⁺ for å få et aktivt enzym. Det er meget viktig at løsningen ikke inneholder EDTA (fra 3.2.5) for å unngå dannelsen av komplekser mellom chelat og tilført Cu²⁺. Samtidig er det viktig at Cu²⁺ tilsettes i et surt miljø for å unngå utfelling av Cu(OH)₂.

Materialer:

- Vivaspin®2
- 100 mM CuCl₂ tilsatt 1 dråpe konsentrert HCl
- 50 mM MES buffer pH 6,0
- Enzymer med kjent konsentrasjon
- PD minitrap g-25 (GE healthcare)

Metode:

For at proteinene skulle få høy nok konsentrasjon til EPR-prøvene (200 µM) ble prøvene oppkonsentrert med Vivaspin®2. Det ble deretter målt konsentrasjonen av proteinene ved hjelp av et UV₂₈₀-spektrofotometer (3.2.4). Videre ble det tilsatt et tre ganger molart overskudd av CuCl₂ i forhold til *SmCBP21*. Deretter ble prøvene applisert på en PD minitrap g-25-kolonne slik som i avsnitt 3.2.5. Den endelige proteinkonsentrasjonen ble bestemt ved bruk av A₂₈₀ (3.2.4).

3.3 Acetylering av α- og β- kitin

Til denne delen av forsøket ble det preparert uløselige kitinsubstrater til EPR- og Raman-spektroskopi-forsøk. I denne delen av oppgaven brukes eddiksyreanhydrid for å acetylere primære aminogrupeer (-NH₂) i krystallinsk α- og β- kitin. Fordi eddiksyreanhydrid omdannes til eddiksyre i nærvær av vann brukes metanol som et vannfritt løsningsmiddel. Det ble også preparert umodifiserte former av de krystallinske α- og β- kitin for videre analyse. Denne delen av forsøket ble utført av Åsmund Kjendseth Røhr.

Materialer:

- Falcon rør, 15 ml
- α- og β-kitin (2.4)
- Metanol

- Eddiksyreanhydrid
- Spinn-filter

Metode:

Ved acetylering av krystallinsk kitin ble ca. 400 mg substrat tilsatt et 15 ml falcon-rør. Deretter ble det tilsatt metanol:eddiksyreanhydrid i 2:1 forhold til et volum på 15 ml. Substratene ble deretter inkubert i vannbad ved 40 °C og risting i 48 timer. Metanol og eddiksyreanhydrid ble deretter vasket bort med bruk av spinn-filter. I denne prosedyren ble substratene først spunnet tørre før den ble vasket med seks kolonnevolum med m_qH₂O. Filteret ble spunnet tørt for hver av rundene med vasking.

For å klargjøre de ikke-modifiserte kitinsubstratene ble ca. 400 mg tilsatt 15 mL m_qH₂O i et falcon-rør. Prøvene ble inkubert ved 4 °C i 48 timer. Substratene ble deretter spunnet tørre med spinnfilter.

3.4 Elektron paramagnetisk resonans (EPR)

For å undersøke endringer i kobbermiljøet for *SmCBP21* med kitinsubstrater ble det benyttet elektron paramagnetisk resonans (del 1.8). I denne oppgaven ble prøvene fryst i flytende nitrogen og bestrålt med elektromagnetisk stråling i mikrobølgerregionen (9,5 GHz). Samtidig ble prøvene utsatt for et varierende magnetfelt.

3.4.1 Fremstilling av EPR-prøver

For å oppnå god intensitet på EPR-signalene er det nødvendig med en relativt høy konsentrasjon av *smCBP21*-Cu²⁺.

Materialer:

- EPR-rør
- 50 mM MES buffer pH 6,0
- Kitinsubstrater (avsnitt 2.4)
- Ledning med skumgummitupp
- Flytende nitrogen (77 K)
- Termoflaske

Metode:

I prøven med løselig substrat ble 55 μl av en 750 μM stockløsning av *smCBP21* tilsatt 145 μl av 6 mg heksaacetylkitohexaose (A_6) løst i 50 mM MES buffer pH 6,0. For prøvene med uløselige substrat ble 55 μl av 750 μM stockløsning av *smCBP21* fortynnet med 50 mM MES buffer pH 6,0 til 200 μl (totalkonsentrasjon 200 μM av LPMO). Løsningene ble deretter overført til EPR-rør ved hjelp av en 200-1000 μl pipette tilkoblet en gummislange. EPR-rørene ble deretter tilsatt uløselig substrat til det dekket 20-25 mm av lengden på røret (lot det pakke seg sammen). For å skyve de klebrige substratene ned i røret ble det brukt en ledning med skumgummitupp. Prøvene ble inkubert over natt ved 4 °C. Påfølgende dag ble overskuddet av væske (sjiktet over uløselig substrat) fjernet før prøvene ble fryst i flytende nitrogen. Det er viktig at prøvene fryses langsomt fra bunnen og oppover for å forhindre at ekspansjonen fra væske til fast stoff sprekker EPR-røret.

3.4.2 Elektron paramagnetisk resonans

For å få god absorpsjon i EPR-prøvene blir prøvene fryst i flytende nitrogen for at flesteparten av elektronene skal stabiliseres i laveste energitilstand i magnetfeltet ($m_s = -1/2$). Den lave temperaturen gir også mindre rotasjon av molekylene. For å øke oppløsningen blir spektra derivert.

Materialer:

- EPR-system
 - BRUKER EleXsyS 560 SuperX
 - ER 4122 SHQE SuperX
- EPR-rør med prøve
- Flytende nitrogen
- Termoflaske

Metode:

EPR-spekter ble tatt opp ved bruk av et BRUKER EleXsyS 560 SuperX-instrument med en ER 4122 SHQE SuperX-prøveholder. Prøveholderen ble festet mellom magnetene på instrumentet og fylt med flytende nitrogen. Nedkjølingssystemet til magnetene ble skrudd på, og en termoflaske med flytende nitrogen ble koblet til EPR-systemet for å forhindre kondens. Fryste EPR-prøver (3.4.1) ble satt inn i prøveholderen og spektra ble tatt opp med en

mikrobølge på 0,1-0,5 mW og en moduleringsamplitude på 10 G. Spektrene ble deretter baselinjekorrigert og derivert i MatLab.

3.5 Raman-spektroskopi

Ved Raman-spektroskopi (del 1.7) er det mulig å lage “kjemiske fingeravtrykk”. Det er også foreslått at Raman-spektroskopi kan brukes for bestemme acetyleringsgrad i kitin og kitosan. (Zajac et al. 2015). I dette forsøket undersøkes α -kitin og to ulike batcher av β -kitin (fra 2003 og 2015), sammen med deres modifiserte acetylerede former.

Materialer:

- Kitinsubstrater (avsnitt 2.4)
- Raman-system
 - LabRam HR 800 confocal Raman mikroskop
 - Diode laser 785 nm
 - 50 x fluotar objektiv 0,55 NA
- Objektglass
- Dekkglass av kvarts

Metode:

Rundt 2 mg kitinsubstrat på et objektglass ble lagt under et dekkglass av kvarts (forhindrer fordampning av vann). Raman-systemet ble skrudd på og prøven lagt under et 50 x forstørrelses objektiv for å lokalisere en enkelt kitinkrystall. Deretter ble lyset i rommet slått av og innstillingen på Raman-apparatet ble stilt fra “visible” til “UV”. Prøvene ble eksponert for rød laser ved 785 nm og det ble undersøkt ulike eksponeringstider og akkumuleringer for å få spektre med best mulig S/N ratio. Spektra ble tatt opp med 15 sekunders eksponeringstid for laser, 20 akkumuleringer og med et intervall fra 300-1800 cm^{-1} .

3.6 Potensiometri

Det potensiometriske systemet i denne oppgaven består av en Ag/AgCl-referanseelektrode og en platina indikatorelektrode. Systemet brukes i denne oppgaven for å undersøke tre ulike reduktanters elektrokjemiske egenskaper, samt deres pH-avhengighet. Reduktantene har tidligere vært benyttet eksperimentelt for å aktivere det aktive setet i LPMOer ved å redusere Cu^{2+} til Cu^{+} .

3.6.1 Kalibrering

For å få representative potensiometriske resultater er det viktig å kalibrere elektrodene mot en referanse. På denne måten er det mulig å korrigere for eventuelle systematiske feil som oppstår på grunn av individuelle forskjeller på elektrodene. I dette tilfellet ble standarden quinhydrone brukt som referanse. Etter teorien skal et overskudd av quinhydrone i buffer 4,01 og 7,00 ved 20 °C ha ORP-verdier på hhv. + 265.1 og + 87.4 mV. (Bier 2009)

Materialer:

- Quinhydrone
- Magneter og magnetrørere
- Kalibreringsbuffere
 - 200 mM Natriumacetat buffer pH 4,01
 - 200 mM Natriumfosfatbuffer pH 7,00
- Potensiometrisk system
 - Platinafolie-elektrode
 - Referanseelektrode (Ag/AgCl 3 M KCl)
 - Konverterer; DrDAQ (USB)

Metode:

10 ml kalibreringsbuffer (både 4,01 og 7,00) i et begerglass ble tilsatt 60 mg quinhydrone. Løsningen ble tilsatt en magnet rørt i 15 minutter ved romtemperatur. Det er viktig at løsningen fortsatt er mettet av quinhydrone etter omrøring. Løsningene ble videre målt av det potensiometriske systemet. ORP-verdiene ble notert etter at systemet hadde oppnådd en stabil baselinje.

3.6.2 Potensiometrisk undersøkelse av reduktanter i biologiske bufferløsninger

LPMOer kan ved hjelp av en ekstern elektrondonor og molekylært oksygen øke effektiviteten til andre enzymer som degraderer amorfe polysakkarider. Det finnes mange biologiske elektrondonorer i naturen og eksperimentelt har reduktanter slik som gallussyre, L- cystein og L-askorbat vært brukt for å redusere LPMOer.

Materialer:

- Reduktanter (2.5)
 - Fortynningsserie: 60 mM, 6 mM og 0,6 mM
- 100 mM buffere (avsnitt 2.9)
- Ultralydbad
- Potensiometrisk system
 - Platina-elektrode
 - Referanseelektrode (Ag/AgCl 3 M KCl)
 - Konverterer; DrDAQ (USB)
 - Beholder (4 mL)
 - Magnetrører
- Hamilton sprøyter (10 µl, 50 µl og 100 µl)

Metode:

Beholderen ble fylt med 3 mL 100 mM buffer og satt i ultralydbad i 180 sekunder. Deretter ble prøven satt inn i det potensiometriske systemet under omrøring. Det tok vanligvis mellom 5-15 minutter for å få en stabil baselinje. Videre fulgte programmet i Tabell 1. Ved injeksjoner på 5 og 7,5 µl reduktant ble det benyttet en Hamilton-sprøyte på 10 µl, mens det ble benyttet en 50 µl sprøyte for volumene mellom fra 12,5 til 50 µl. Siste injeksjon ble utført med en 100 µl Hamilton-sprøyte.

For hver gang sprøytene skulle benyttes ved en høyere konsentrasjon enn ved forrige injeksjon, ble sprøyten vasket med tre volum av den nye reduktantkonsentrasjonen. Ved oppstart av ny parallell (fra lav til høy konsentrasjon) ble sprøytene også vasket med tre volum dH₂O før den ble vasket i tre volum med reduktant. 4 ml beholderen ble også vasket med tre volum av dH₂O og tre volum respektiv buffer før oppstart av en ny parallell. Det ble utført tre paralleller for hver reduktant med hver av de seks 100 mM bufferne.

Tabell 1: Oversikt over volum (μl) og konsentrasjon (mM) av injisert reduktant i forhold til tid (sek) i potensiometriforsøk. Totalkonsentrasjon (mM) av reduktant i bufferløsningen er også tatt med.

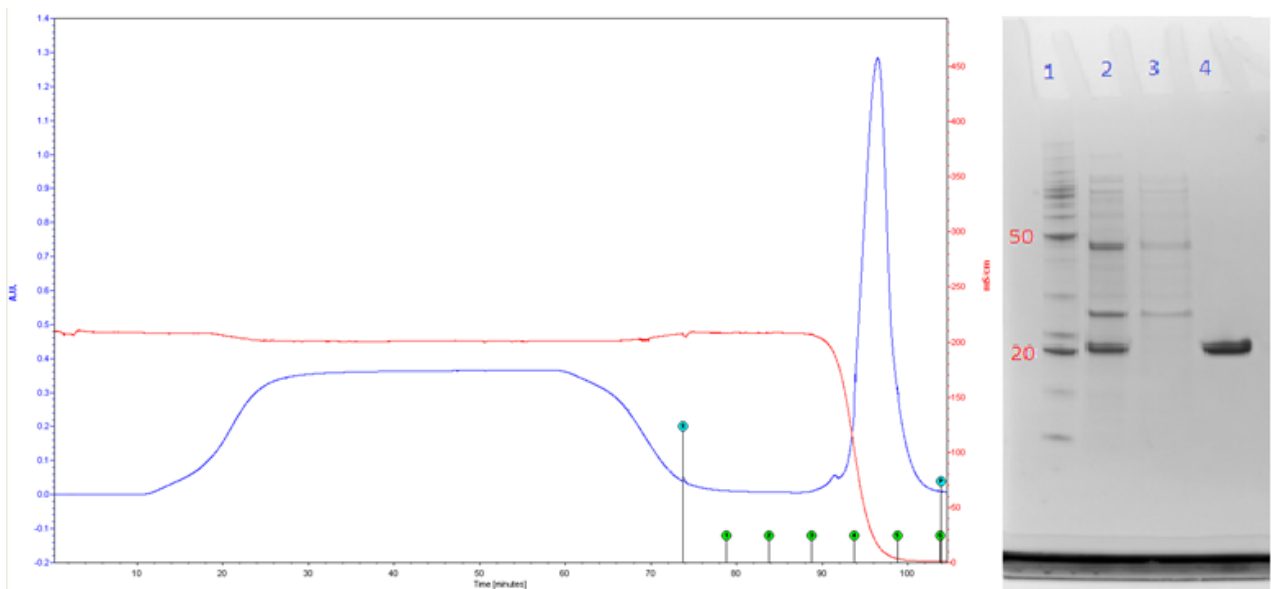
Tid (sek)	Reduktant injeksjon (μl)	Reduktant i sprøyte (mM)	Celle-volum (μl)	Reduktant i celle (mM)
0*	-	-	3000	0
60	5	0,6	3005	0,00098
180	45	0,6	3050	0,0098
270	45	6	3095	0,0969
330	7,5	60	3102,5	0,2417
390	12,5	60	3115	0,4815
420	25	60	3140	0,9554
450	25	60	3165	1,42
480	25	60	3190	1,88
510	50	60	3240	2,778
540	100	60	3340	4,5
570	-	-	3340	4,5

4 Resultater

4.1 Rensing av *SmCBP21* ved affinitetskromatografi

SmCBP21 ble isolert ved rensing av periplasmatisk ekstrakt på kitinkuler (avsnitt 3.2.1). Kromatogrammet for rensing av *SmCBP21*, samt tilhørende SDS-PAGE gel er vist i figur 14.

Den første toppen i kromatogrammet er en såkalt void-topp. Denne inneholder proteiner og andre molekyler fra det periplasmatiske ekstraktet uten affinitet til kitinkulene. Deretter ble kolonnen vasket, før proteinet ble eluert med eddiksyre. Dette utgjør den andre toppen i kromatogrammet. SDS-PAGE ble benyttet for å kontrollere renheten av proteinet. Molekylvekten til *SmCBP21* er 18,8 kDa.



Figur 14: Kromatogram (til venstre) og SDS-PAGE gel (til høyre) for rensing av *SmCBP21* på kitinkuler. I kromatogrammet er den første toppen void-toppen, mens den andre er elueringstoppen fra periplasmatisk ekstrakt. På SDS-gelen er brønn 1 påsatt en størrelsesmarkør, brønn 2 fraksjon av periplasmatisk ekstrakt, brønn 3 fraksjon fra void-toppen og brønn 4 er 5 μg oppkonsentrert *SmCBP21*.

4.1.1 Bestemmelse av proteinkonsentrasjon ved UV_{280}

Det er nødvendig å vite konsentrasjon av *SmCBP21*- Cu^{2+} i stokkløsning for å fremstille EPR-prøver med kjent enzymkonsentrasjon. Konsentrasjonen ble bestemt ved hjelp av UV_{280} (avsnitt 3.2.4). De nødvendige parameterne for estimering av *SmCBP21*- Cu^{2+} -konsentrasjon er gitt i Tabell 2.

Tabell 2: Oversikt over nødvendige parametere for beregning av $SmCBP21-Cu^{2+}$ konsentrasjon ved UV_{280}

A_{280} (gjennomsnitt)	Volum (μ l)	Absorpsjonskoeffesient (ϵ)	Konsentrasjon (mM)	$smCBP21$ (mg)
26,18	1345	35200*	0,74	18,8

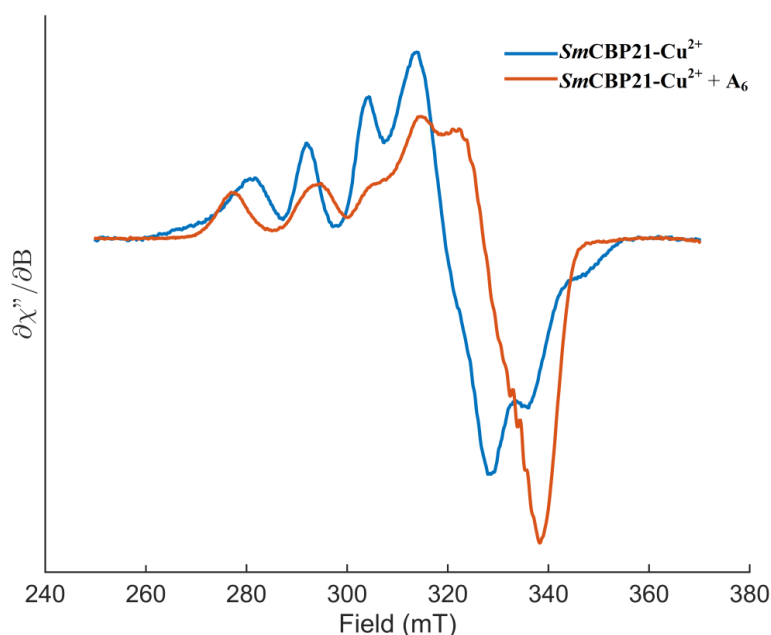
*med antagelse om at alle par av cystein danner cysteinbruer (web.expasy.org/protparam/)

4.2 EPR-spektra av $SmCBP21-Cu^{2+}$ og kitinsubstrater

Målet med EPR-spektra av $SmCBP21-Cu^{2+}$ er å undersøke eventuelle endringer i kompleksets koppermiljø ved tilsetning av ulike former av kitin. I forsøket studeres $SmCBP21-Cu^{2+}$ med det løselige kitinsubstratet heksaacetylkitohexaose (A_6), samt krystallinsk α - og β -kitin. Det er også interessant å undersøke om acetylerede derivater av α - og β -kitin gir lignende resultater som deres ikke modifiserte former.

4.2.1 Heksaacetylkitohexaose

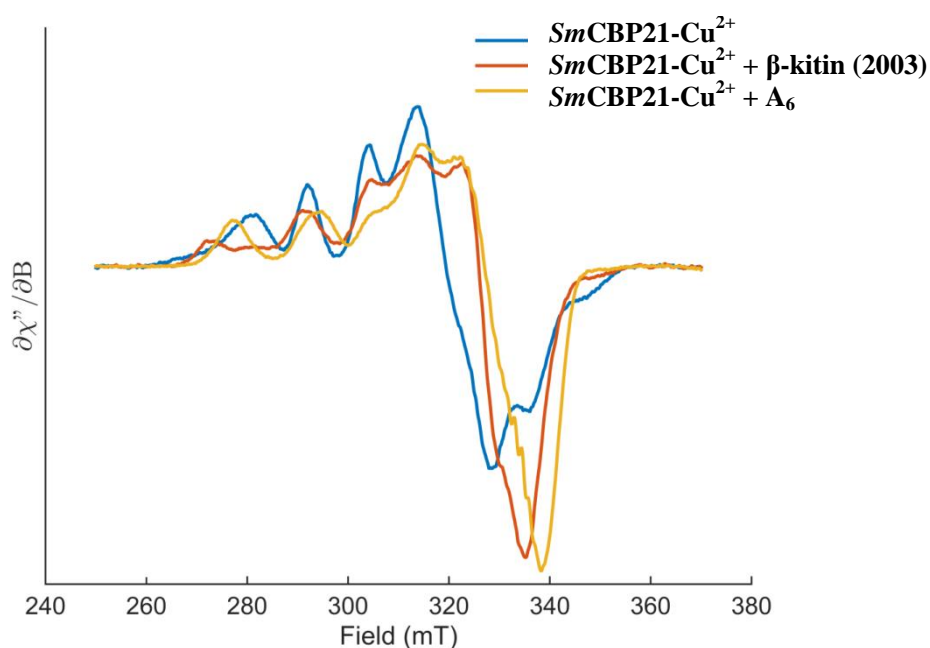
Spekteret av Cu^{2+} $SmCBP21$ er representert i de fleste EPR-figurer som en referanse, samt illustrere eventuelle forskjeller for spekter med og uten kitinsubstrater. Spektra for enzymkomplekset $SmCBP21-Cu^{2+}$ med og uten heksaacetylkitohexaose (A_6) er gitt i figur 15.



Figur 15: X-bånd-spektra av $SmCBP21-Cu^{2+}$ (blå) og Cu^{2+} $SmCBP21$ (rød) med heksaacetylkitohexaose (A_6). Spektra ble registrert ved 77 K med en mikrobølgeenergi på 0,1-5,0 mW.

4.2.2 β -kitin

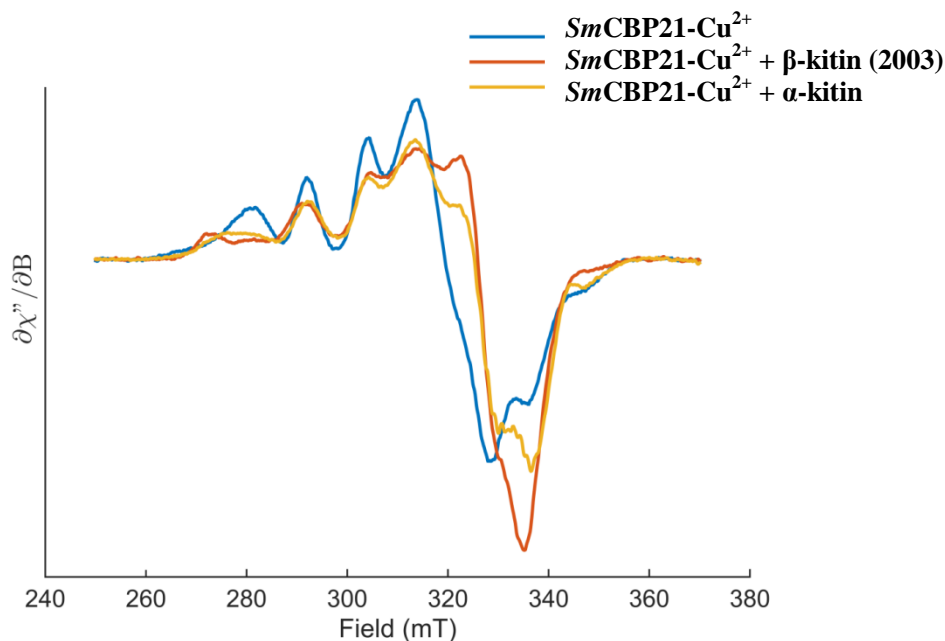
Det ble utført EPR-eksperimenter med to ulike batcher av β -kitin (fra 2003 og 2015). Årsaken til dette var gjentatte problemer ved enzymatiske degraderings- og bindingsforsøk etter overgangen fra β -kitin fra 2003 til 2015. Spekteret for $SmCBP21-Cu^{2+}$ med β -kitin (2003) er gitt i figur 16. Det gjengitte spekteret av $SmCBP21-Cu^{2+}$ med A_6 er også med i denne figuren for sammenligning. Spekteret for $SmCBP21-Cu^{2+}$ med β -kitin (2015) og dens acetylerede derivat vises i figur 18.



Figur 16: X-bånd-spektra av $SmCBP21-Cu^{2+}$ (blå), $SmCBP21-Cu^{2+}$ med β -kitin fra 2003 (rød) og A_6 (gul). Spektra ble registrert ved 77 K med en mikrobølgeenergi på 0,1-5,0 mW.

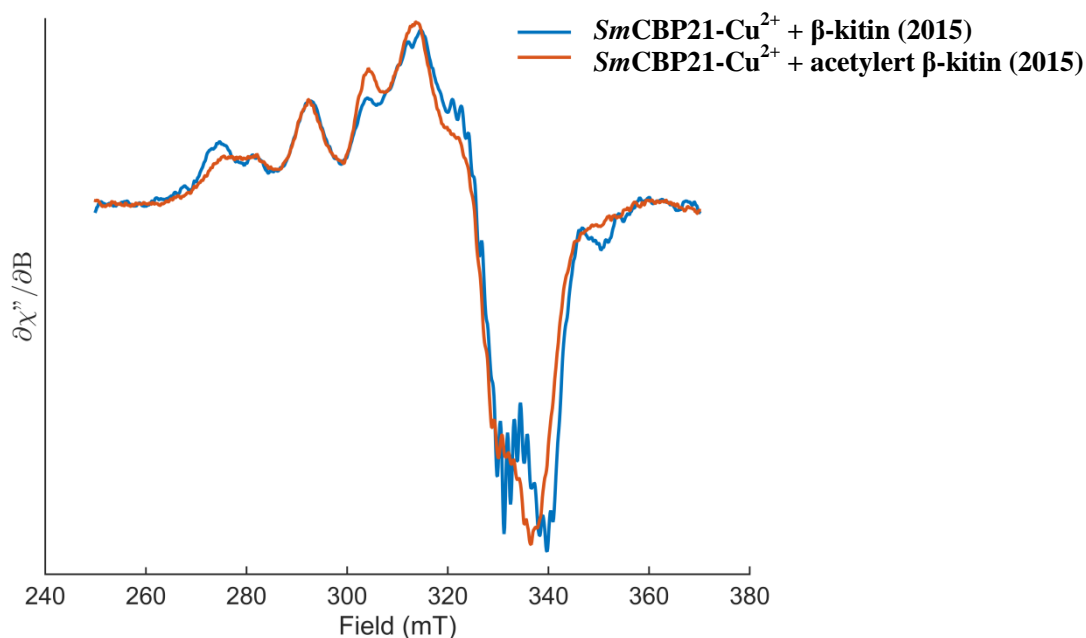
4.2.3 α -kitin

Som nevnt tidligere består α - og β -kitin av antiparallele og parallelle kitinkjeder (respektivt). Sammenstilling for spektra av $SmCBP21-Cu^{2+}$ med α - og β -kitin (2003) er gitt i figur 17.



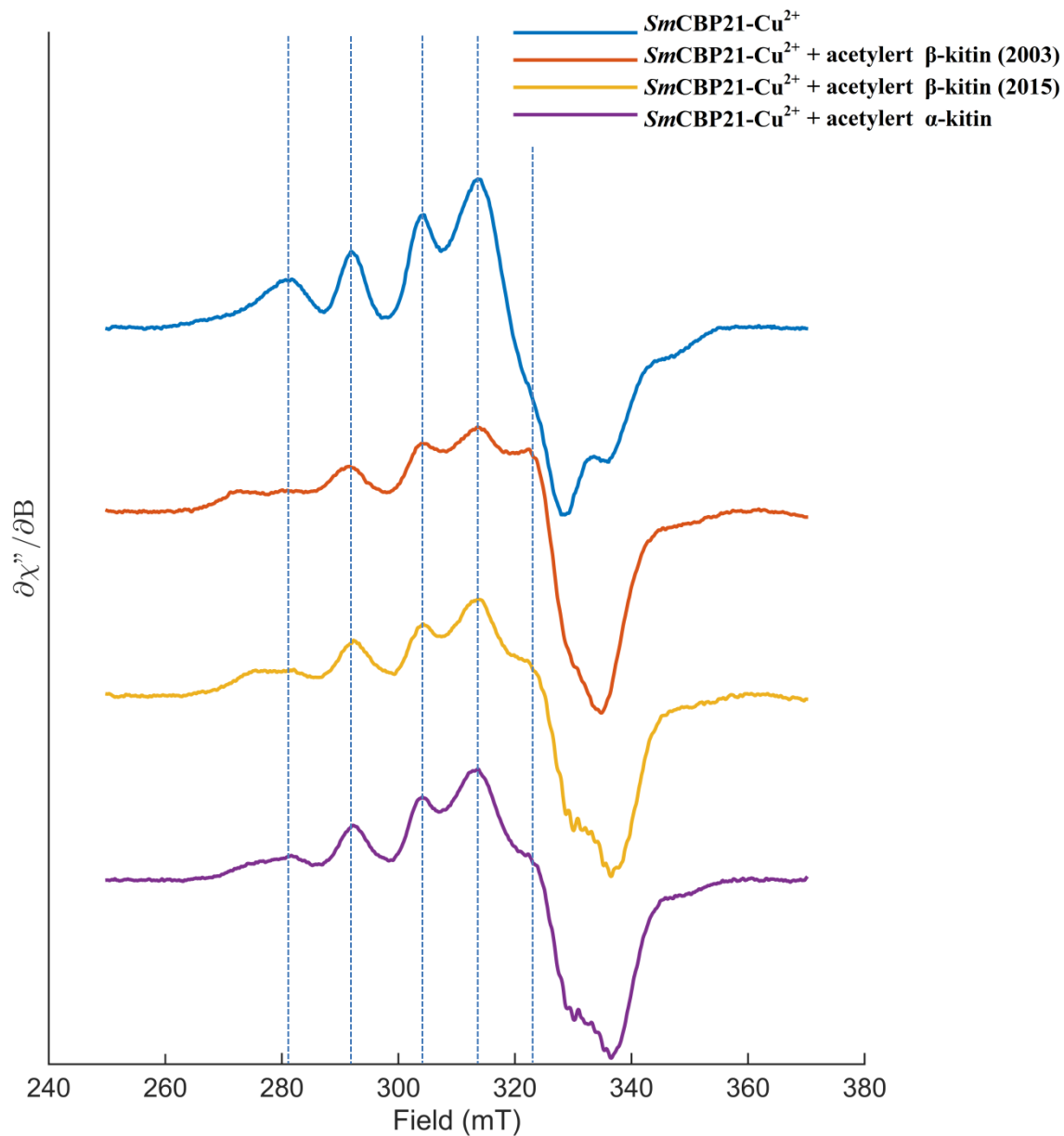
Figur 17: X-bånd-spektra av $SmCBP21-Cu^{2+}$ (blå), samt $SmCBP21-Cu^{2+}$ med krystallinsk β -kittin fra 2003 (rød) og α -kittin (gul). Spektra ble registrert ved 77 K med en mikrobølgeenergi på 0,1-5,0 mW.

De resterende EPR-spektrene for $SmCBP21-Cu^{2+}$ er med acetylerede derivater av α - og β -kittin. I figur 18 sammenstilles spekteret av $SmCBP21-Cu^{2+}$ med acetyleret β -kittin (2015), med det gjengitte spekteret av $SmCBP21-Cu^{2+}$ med umodifisert β -kittin (2015).



Figur 18: X-bånd-spektra av $SmCBP21-Cu^{2+}$ med acetyleret (rød) og ikke-modifisert β -kittin (blå) fra 2015. Spektra ble registrert ved 77 K med en mikrobølgeenergi på 0,1-5,0 mW.

Videre fremstilles spektra av $SmCBP21-Cu^{2+}$ med acetyleret α - og β kitin (figur 19). Stiplede linjer er lagt til på karakteristiske topper i den hyperfine regionen til Cu^{2+} .



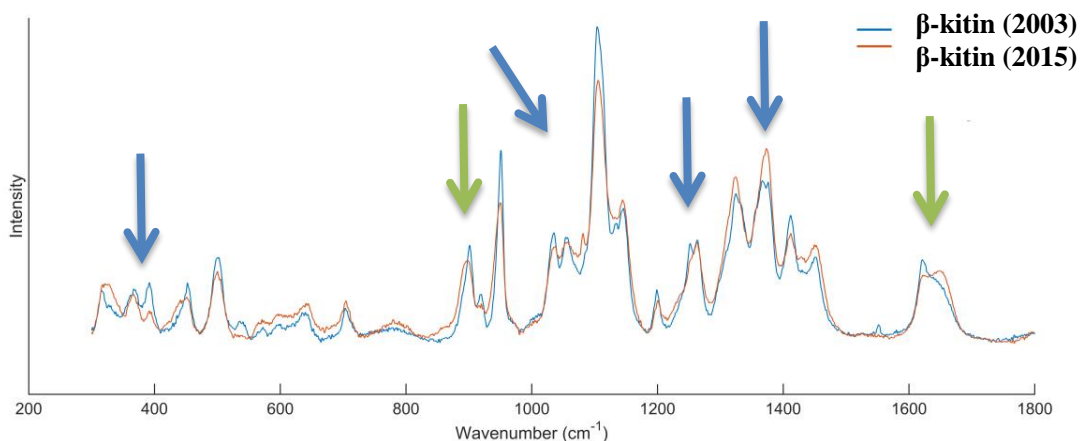
Figur 19: X-bånd-spektra av $SmCBP21-Cu^{2+}$ (blå) og $SmCBP21-Cu^{2+}$ med modifiserte acetyleret substrater av β -kitin fra 2003 (rød), β -kitin fra 2015 (gul) og α -kitin (lilla). Spektra ble registrert ved 77 K med en mikrobølgeenergi på 0,1-5,0 mW.

4.3 Raman-spektroskopi

I dette prosjektet er det ønskelig å bruke Raman-spektroskopi for å undersøke krystallinitet og mulig endring av acetyleringsgrad i de krystallinske α - og β -kitin-substratene, samt deres acetylerede derivater (fra avsnitt 3.3), som ble brukt i EPR-forsøkene. Raman-linjer assosiert med acetylering er ofte forbundet med vibrasjoner i amingrunder.

4.3.1 β -kitin

I 2015 brukte Zajac *et al.* ratioen av utvalgte Raman-linjer (tabell 4) assosiert med acetylgrupper for å kvantifisere acetyleringsgraden i kitosan. Spektra av de to ulike batchene av β -kitin (2003 og 2015) er gitt i figur 20. Interessante Raman-linjer assosiert med acetyleringsgrad fra Zajac *et al.* er markert med grønne piler, mens generelle ulikheter i Raman-linjer er markert med blå. I oppgaven ble det benyttet rød laser med en eksiteringsbølgelengde på 785 nm, og spektra ble tatt opp i området 300 til 1800 cm^{-1} .

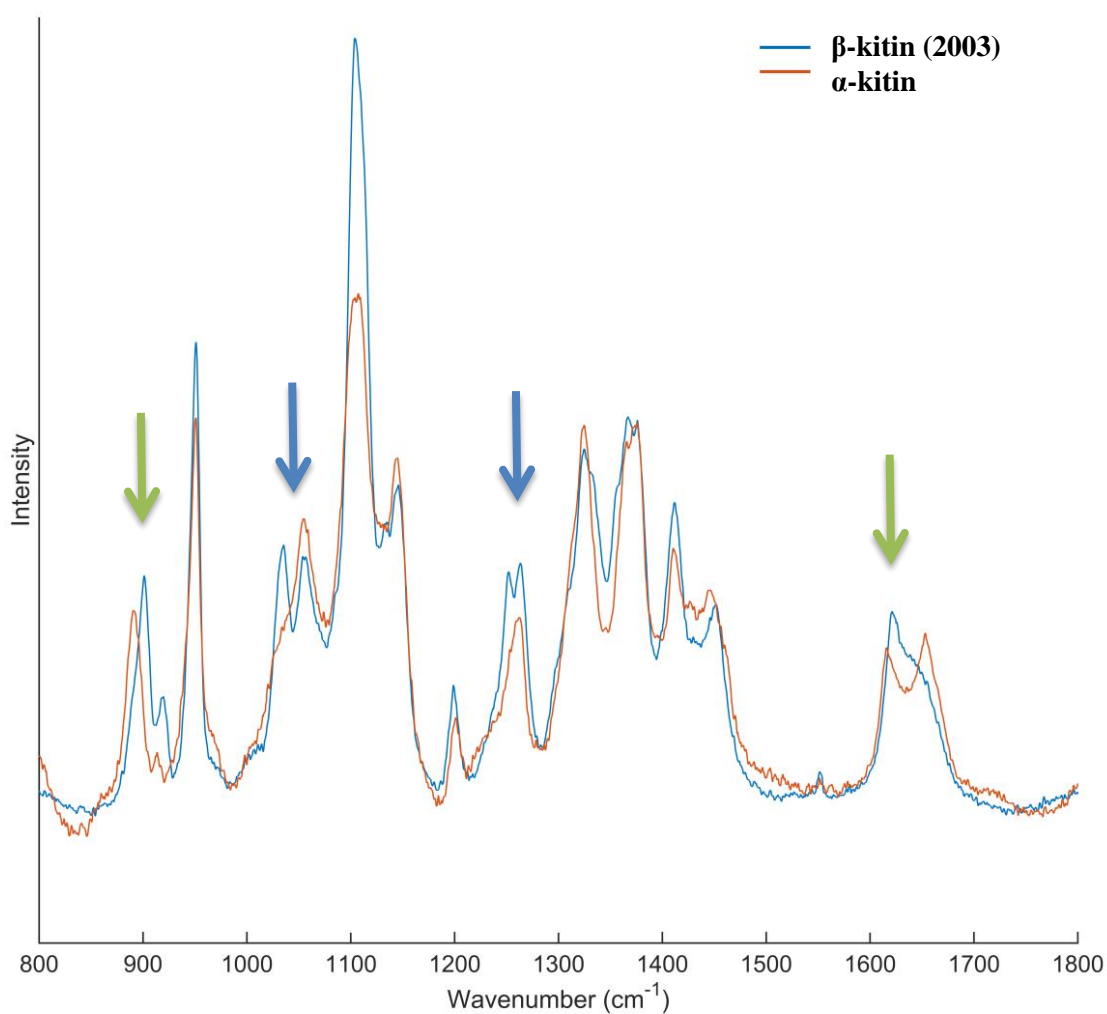


Figur 20: Raman-spektra av to ulike batcher av β -kitin. β -kitin fra 2003 er markert i blå, mens β -kitin fra 2015 er markert i rød. Linjer interessante i forhold til Zajac *et al.* artikkel fra 2015 er markert med grønne piler, mens generelle ulikheter i spektrene er markert med blå. x-aksen viser bølgenummeret (cm^{-1}) og y-aksen relativ intensitet.

De resterende Raman-spektrene i denne oppgaven er vist med bølgetall fra 800-1800 cm^{-1} . Årsaken til dette er at de mest interessante detaljene i forhold til acetylering.

4.3.2 α -kitin

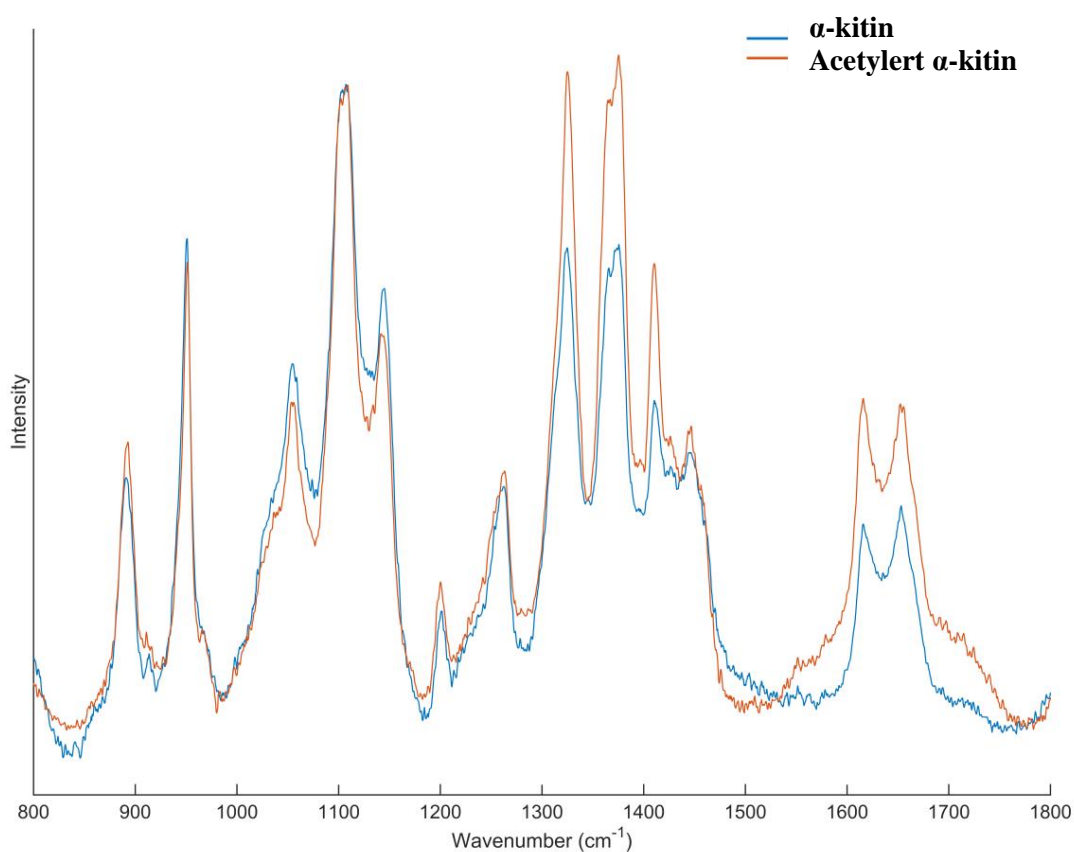
Raman-spekteret for α -kitin er gitt i figur 21. Interessante topper i forhold til Zajac *et al.* artikkel fra 2015 er markert med grønne piler, mens generelle ulikheter i spektrene er markert med blå.



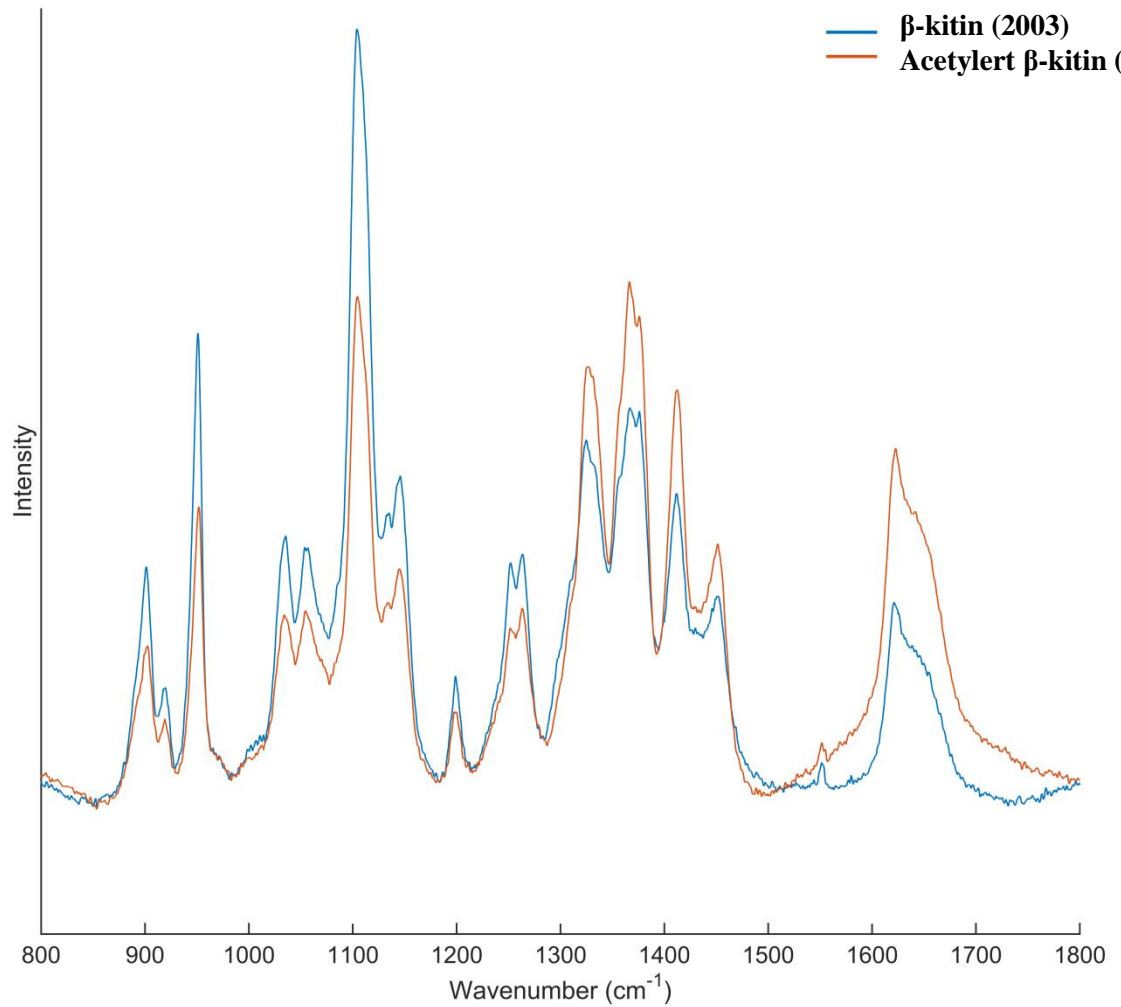
Figur 21: Raman-spektra av β -kitin fra 2003 (blå) og α -kitin (rød). Linjer interessante i forhold til Zajac *et al.* artikkel fra 2015 er markert med grønne piler, mens generelle ulikheter i spektrene er markert med blå. x-aksen viser bølgenumeret (cm⁻¹) og y-aksen relativ intensitet.

4.3.3 Acetykert α - og β -kitin

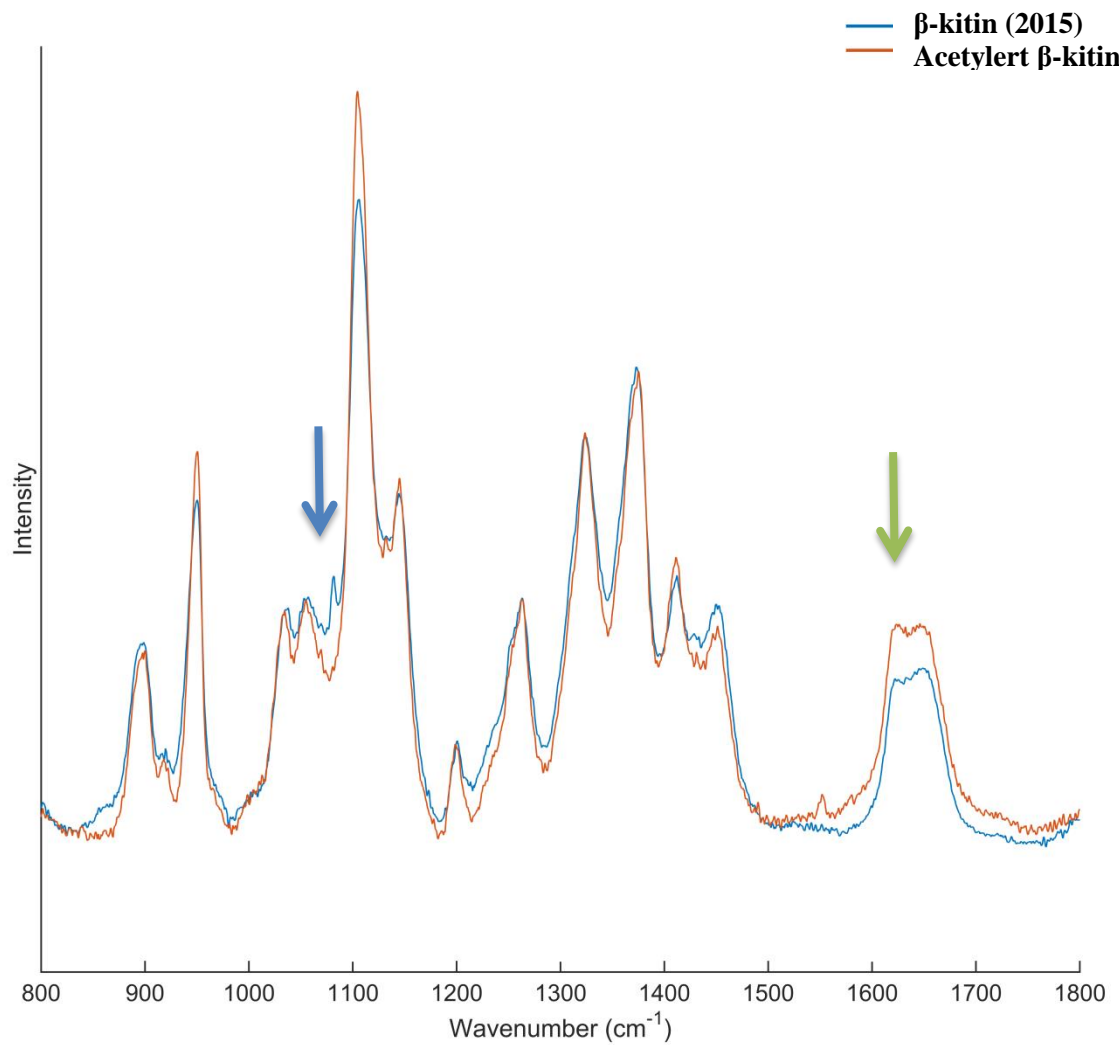
De resterende spektrene er av acetylte derivater av α -kitin, β -kitin (2003) og β -kitin (2015) (figur 22-24, respektivt). Korresponderende spekter med ikke-modifiserte substrater er gjengitt i figurene for sammenligning.



Figur 22: Raman-spektra av α -kitin fra 2015 (blå) og dens acetylte derivat (rød). x -aksen viser bølgetall (cm⁻¹) og y -aksen relativ intensitet.



Figur 23: Raman-spektra av β-kitin fra 2003 (blå) og dens acetylerede derivat (rød). x-aksen viser bølgetall (cm⁻¹) og y-aksen relativ intensitet.



Figur 24: Raman-spektra av β-kitin fra 2015 (blå) og dens acetylerede derivat (rød). Linje interessant i forhold til Zajac et al. artikkel fra 2015 er markert med grønn pil, mens generell ulikhet i spektrene er markert med blå.

4.4 Elektrokjemi

Potensiometri måler potensialet i en løsning mellom to elektroder, med minimal påvirkning på løsningen som måles. I dette forsøket brukes et potensiometrisk system for å gjøre elektrokjemiske undersøkelser av reduktantene L-askorbat, gallussyre og L-cystein. Reduktantene er utbredt i en mengde biologiske materialer og har tidligere vært brukt eksperimentelt for å redusere det aktive setet i LPMOer. Målet med denne delen av oppgaven er å studere de ulike reduktantenes elektrokjemiske egenskaper, samt undersøke hvordan deres ORP-verdi påvirkes av pH. Forsøkene ble utført i seks vanlige biologiske buffere.

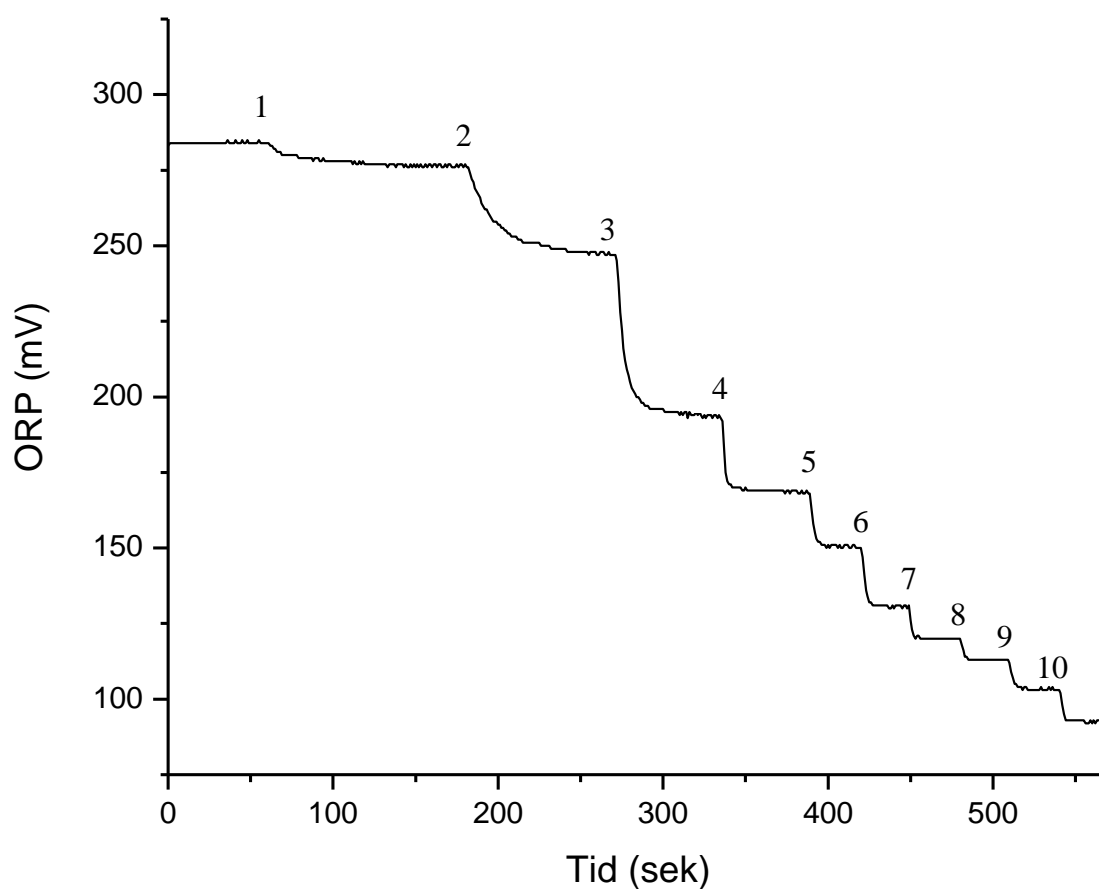
4.4.1 Kalibrering etter Ag/AgCl-referanseelektrode

For å få representative resultater ble det potensiometriske systemet (med Ag/AgCl referanseelektrode) målt i buffere (pH 7,00 og pH 4,01 ved 20 °C) tilsatt et overskudd av standarden quinhydrone. Det ble korrigert for systematisk feil i elektrodene ved å parallellforskyve målte quinhydrone-potensialer i forhold til teoretiske. Teoretiske ORP-verdier (i forhold til Ag/AgCl-referanseelektrode) for quinhydrone ved pH 4,01 og 7,00 er hhv. + 265.1 og + 87.4 mV ved 20 °C (Bier 2009).

4.4.2 Forsøksoppsett

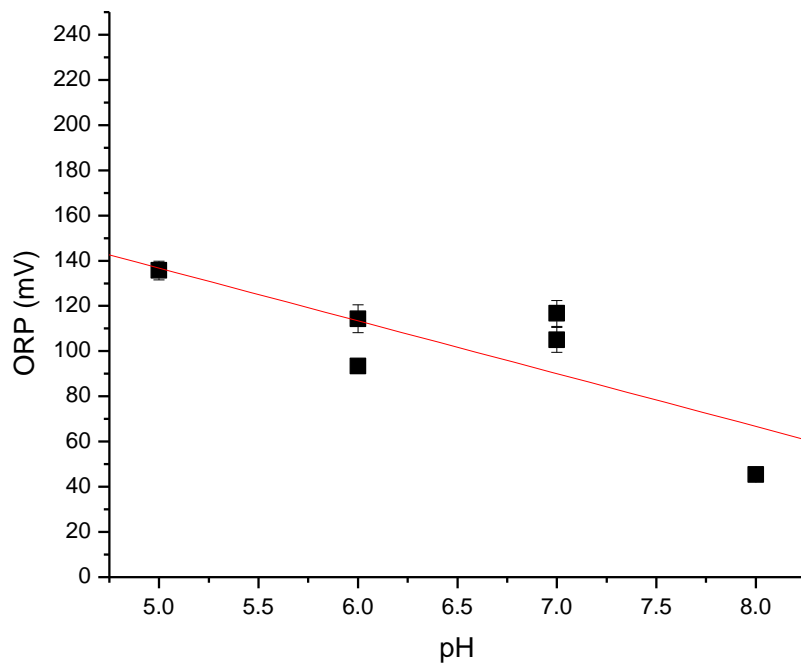
Det potensiometriske systemet brukte mest tid på å oppnå stabil baselinje ved start, og etter de første injeksjonene. Det ble derfor benyttet lengre intervaller mellom injeksjon i starten av forsøkene, i forhold til slutten (tabell 1). ORP-verdier etter injeksjon ble notert etter at baselinjen var gjenopprettet, altså rett før påfølgende injeksjon. Figur 25 viser standardoppsettet for forsøkene, hvor det injiseres ti injeksjoner av reduktant til en totalkonsentrasjon på 4,5 mM i tidsintervallet 60 til 540 sekunder (tabell 1). I eksemplet injiseres reduktanten L-askorbat inn i 100 mM Ammoniumacetat buffer pH 6,0.

Vedlagt (figur 29-34) følger kurver der elektrokjemisk potensial er plottet mot totalkonsentrasjon av reduktantene L-askorbat, gallussyre og L-cystein i seks ulike biologiske buffere.

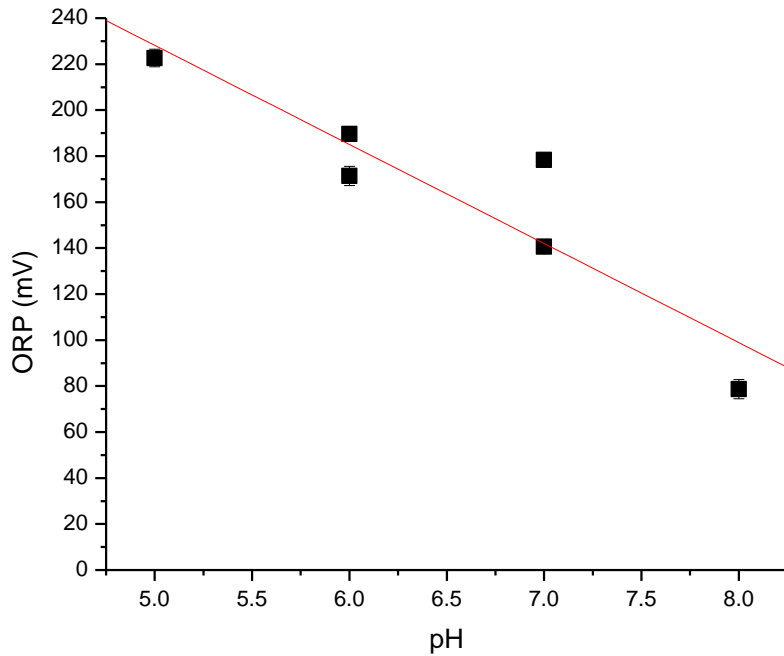


Figur 25: Standardoppsett for elektrokjemiske forsøk. I eksemplet ble ti injeksjoner (markert 1-10) av reduktanten L-askorbat sprøytet inn i 100 mM Ammoniumacetat buffer pH 6,0. *x*-aksen viser tid (sek) og *y*-aksen ORP-verdi (mV) i forhold til Ag/AgCl-referanseelektrode.

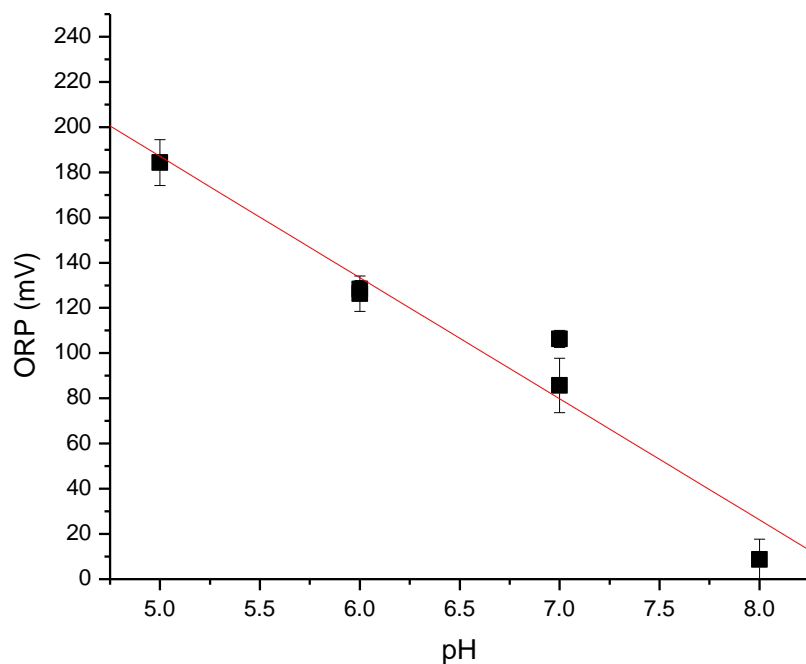
Vider vises tre kurver (figur 26-28) der potensiometriske verdier for L-askorbat, gallussyre og L-cystein ved 4,5 mM konsentrasjon er plottet mot pH.



Figur 26: ORP-verdier for 4,5 mM L-askorbat i potensiometrisk celle. *x*-aksen viser pH-verdier og *y*-aksen ORP-verdi (mV) i forhold til Ag/AgCl-referanseelektrode. Punktene er vist med standardavvik som streker.



Figur 27: ORP-verdier for 4,5 mM gallussyre i potensiometrisk celle. *x*-aksen viser pH-verdier og *y*-aksen ORP-verdi (mV) i forhold til Ag/AgCl-referanseelektrode. Punktene er vist med standardavvik som streker.



Figur 28: ORP-verdier for 4,5 mM L-cystein i potensiometrisk celle. x-aksen viser pH-verdier og y-aksen ORP-verdi (mV) i forhold til Ag/AgCl-referanseelektrode. Punktene er vist med standardavvik som streker.

Kurvene følger uttrykket for lineær regresjon, hvor stigningstallet har en konstant verdi representert av termen m i likningen $y = mx + b$, hvor b er krysningpunktet for linjen på y-aksen. Parameterne for figur 26-28 er gitt i Tabell 3.

Tabell 3: Lineær regresjonsparametere for L-askorbat, gallussyre og L-cystein (figur 26-28). Representerte verdier er stigningstall m (mV), krysningpunkt på y-aksen b (mV), standardavvik (SD) for disse verdiene, samt R-verdi.

Reduktant	m (mV)	SD m (mV)	b (mV)	SD b (mV)	R-verdi
L-askorbat	-23,4	9,0	253,6	59,3	-0,79
gallussyre	-43,1	9,5	443,6	62,2	-0,92
L-cystein	-53,6	7,2	455,0	47,1	-0,97

5 Diskusjon

I denne oppgaven ble det utført EPR-studier av koppersetet til AA10-enzymet *SmCBP21* fra *Serratia marcescens* med substrater fra α - og β -kitin, samt deres acetylerede derivater. Målet er å undersøke om det skjer endringer i miljøet i og rundt koppersetet ved tilsetning av substrater. Videre er substratene undersøkt ved Raman-spektroskopi for å undersøke om det er muligheter for å se forskjell på de umodifiserte formene av α - og β -kitin og deres acetylerede derivater. Til slutt i oppgaven ble det utført potensiometriske undersøkelser av tre ulike reduktanter. Målet var å studere reduktantenes elektrokjemiske karakterer, samt pH-avhengighet.

5.1 EPR av *SmCBP21*-Cu²⁺ med kitinsubstrater

Det er tidligere gjort EPR-undersøkelser av *SmCBP21*-Cu²⁺ (Forsberg *et al.* 2014a; Forsberg *et al.* 2014b), men tilsvarende studier med *SmCBP21*-Cu²⁺ og substrater er ikke publisert.

Spektrene for *SmCBP21*-Cu²⁺ med og uten det løselige substratet heksaacetylkitohexaose (A₆) viser betydelige forskjeller (figur 15). Dette kan observeres i den hyperfine strukturen av spekteret, hvor det er endringer i posisjonen til de (2I+1) fire karakteristiske koppertoppene. Dette er tydelig når du sammenligner med enzym uten substrat. De største forskjellene kan ses i den superhyperfine regionen (rundt 325 mT). Dette kan indikere at det er forskjeller i interaksjoner mellom det paramagnetiske elektronet og en eller flere nukleære magnetiske momenter i enzymet. Samtidig er det stor kompleksitet i superhyperfine regioner, og det er dermed vanskelig å si noe konkret om denne delen av spekteret uten grundigere beregninger av *g*-verdier. Samlet gir ulikhetene i spektra en indikasjon på at det er endringer i kopperstrukturen ved tilsetning av heksaacetylkitohexaose (A₆) til *SmCBP21*-Cu²⁺.

Spektra for *SmCBP21*-Cu²⁺ med krystallinsk β -kitin (2003) og heksaacetylkitohexaose (A₆) (figur 16) er relativt like. De største ulikhetene ligger i den superhyperfine regionen (*g*_{xy}) der spektrene er forskjøvet i forhold til hverandre. β -kitin (2003) har mindre forskyvninger i dette området sammenlignet med A₆, og er dermed litt mer i samsvar med *SmCBP21*-Cu²⁺ uten substrat. Begge spektrene med substrat viser altså endringer fra *SmCBP21*-Cu²⁺-spekteret, men er også noen små forskjellige relatert til hverandre. En mulig forklaring på sistnevnte er at *SmCBP21*-Cu²⁺ danner noe ulike interaksjoner med substratene, og dette fører til små endringer i Cu²⁺-konformasjon/miljø. Dette kan for eksempel komme av at

heksaacetylkitohexaose har høyere fleksibilitet, som gir rom for en litt ulik binding til *SmCBP21-Cu²⁺* i forhold til krystallinsk β -kitin.

α -kitin som substrat gir tilnærmet likt spektrum med β -kitin (figur 17). Dette kan indikere at det er liknende interaksjoner mellom enzym og α - og β -kitin. Dermed er det en mulighet for at det skjer liknede konformasjonsendringer i *SmCBP21-Cu²⁺* ved tilsetning av α - og β -kitin.

SmCBP21-Cu²⁺ med β -kitin (2015) (figur 18) skiller seg distinkt fra spektrene med resterende kitinsubstrater. Denne kitinen viser superhyperfiner i området 325-340 mT (g_{xy}) med en høyere intensitet sammenlignet med de resterende substratene. Årsaken til dette er ukjent, men med tanke om at batchen β -kitin (2015) har gitt problemer ved degraderings- og bindingsstudier av LPMOer, kan en mulig forklaring være at *SmCBP21-Cu²⁺* bindes dårligere/annerledes til β -kitin (2015) sammenlignet med resterende kitinsubstrater.

Det som er meget interessant er at de markerte superhyperfinene forsvinner ved reacetylering av β -kitin (2015) (figur 18). Dette kan tyde på det spesielle spekteret til *SmCBP21-Cu²⁺* med β -kitin (2015) har sammenheng med acetylering. Etter indikasjoner fra respektive Raman-spektra (figur 24) kommer dette sannsynligvis av reacetylering av overflaten til kitinet. I Raman tas spektra av store deler av kitin-molekylet, mens det i EPR-spektra vil være overflaten på karbohydratet som danner interaksjoner med enzymet. Dermed kan en liten økning i acetylering på overflaten ha stor innvirkning på EPR-spektra, mens den vil utgjøre lite av den totale acetyleringsgraden i selve kitin-molekylet (gir lite forskjeller i Raman-spektra). Dermed er det mulig at reacetylering av overflaten til β -kitin (2015) kan endre/ bedre interaksjoner mellom enzym substrat.

Videre er spektra for *SmCBP21-Cu²⁺* med reacetylert α -, β - (2003) og β -kitin (2015) utrolig like (figur 19), hvor toppene i den hyperfine regionen kommer med samme frekvens og samme former. Dette er også tilfellet for topp i den superhyperfine regionen (stiplet linje lengst til høyre i spektra). I og med at alle de krystallinske reacetylerede derivatene ga tilnærmet like spektra med *SmCBP21-Cu²⁺*, kan dette indikere at koordinasjonen av Cu^{2+} i komplekset med enzym og acetylerede og substrat er veldig like. Samtidig er det store likheter mellom samtlige EPR-spektra med krystallinske substrater.

Ved acetylering er det mulig at acetyleringsgrad i de ulike krystallinske substratene ble tilnærmet like og gir dermed tilnærmet like spektra. Det også er også en mulighet for at løseligheten/krystallinsk grad i substratene er med på å påvirke spektra, siden det er

forskjeller i de umodifiserte kitinsubstratene og heksaacetylkitoheksaose. Dette vil være ganske naturlig siden acetyleringsgrad og løselighet spiller inn på hverandre.

Det er tidligere vist at LPMOer kan binde sterkt til substrater uten medfølgende aktivitet (Forsberg *et al.* 2014b). Av denne anledning hadde det vært interessant å undersøke *SmCBP21-Cu²⁺* med et krystallinsk substrat den ikke har affinitet mot for å undersøke binding i forhold til aktivitet.

5.2 Raman-spektroskopi av kitinsubstrater

Raman-spektroskopi har tidligere vært foreslått som analysemetode å bestemme graden av N-acetylering i kitosan (Zajac *et al.* 2015). I dette forsøket er det ønskelig å undersøke om Raman spektra er ulike for α - og β -kitin, samt deres modifiserte acetylerede derivater. I denne sammenheng er det spesielt interessant å undersøke Raman-linjer assosiert med acetylering. Disse linjene kan for eksempel være linjer assosiert med vibrasjoner i NH (acetyleret) og NH₂ (deacetyleret) i kitinsubstratene.

Tabell 4 viser en oversikt over Raman-linjer brukt av Zajac *et al.* for å kvantifisere daetyleringsgraden i kitosan/kitin, hvor Raman-linjen ved 896 cm⁻¹ fungerte som referanse siden ν ($\Phi+\rho(\text{CH}_2)$) vibrasjonen er lik i både acetylerede og uacetylerede monomerer i sukkerkjeden. Videre er ν (CO)-, δ (NH)- og δ (NH₂)-linjene interessante fordi de er relatert til den delvise acetyleringen av NH₂.

Raman-spekteret av β -kitin (2003) og β -kitin (2015) viser at de fleste ulikhetene i spekterene ligger i området mellom 800-1700 cm⁻¹ (figur 20). Videre er det forskjeller i området rundt 1620 cm⁻¹ som er assosiert med δ (NH) vibrasjoner. De blå pilene i figuren indikerer generelle ulikheter i spektra der enkelte topper splittes eller forskyves. Raman-spektra danner såkalte “kjemiske fingeravtrykk” og ulikhetene i spektra tyder på at det er noen forskjeller i de to β -kitin batchene. Videre har spekteret for β -kitin (2003) generelt spissere Raman-linjer enn β -kitin (2015). Dette kan være en indikasjon på at β -kitin (2003) er litt mer krystallinsk, mens β -kitin (2015) har større innhold av amorf kitin. Acetyleringsgraden til β -kitin (2003) har tidligere blitt bestemt med NMR til å være 92 %, men acetyleringsgraden er ikke nødvendigvis homogen (Karlsen *et al.* 2010).

Tabell 4: Raman-linjer av kitin og kitosan som potensielt kan brukes for kvantifisering av acetylering (Zajac *et al.* 2015).

Raman-linjer kitin	Anvisning	Raman-linjer kitosan
1656 m	ν (CO)	1654 w
1620 m	δ (NH)	
	δ (NH ₂)	1591m
954 m	ν (CN)	936m
896 m	ν (Φ + ρ (CH ₂))	896 m

Φ = pyranoid ring, ν = strekking, δ = bøyingsvibrasjoner i plan

Fra Raman-spektrene vist i figur 21 og 20, ser vi at β -kitin prøvene fra 2003 og 2015 er svært like og at de skiller seg noe fra β - kitin. Dette er forventet siden α - og β -kitin har forskjellig krystallstruktur.

Videre viser spektra for acetykert og umodifisert α - og β -kitin (2003) minimale forskjeller (figur 22 og 23). Dette kan bety at det allerede var høy acetyleringsgrad i substratene før de ble acetykert. Samtidig er det ikke garantert at Raman er en egnet teknikk for å undersøke acetyleringsgrad i krystallinske kitinsubstrater. På grunn av dette er det vanskelig å si noe mer konkret om acetyleringsgrad i sammenhengen modifiserte/umodifiserte kitinsubstrater.

5.3 Potensiometri

L-askorbat, gallussyre og L-cystein er naturlige elektrondonorer som finnes i mange ulike biologiske systemer. På grunn av dette har reduktantene vært brukt eksperimentelt på laboratoriet for å donere elektroner til det aktive setet i LPMOer (Forsberg *et al.* 2014a; Vaaje-Kolstad *et al.* 2010). Redoksmekanismene for aktiveringen av enzymet er foreløpig ukjent, men av stor interesse. For å fremstille mulige teorier om redoksmekanismene er det viktig å ha god kunnskap om de individuelle reaktantene i reaksjonen (enzym, reduktant og substrat). Av denne årsak kan det være nyttig å forske på hva som skiller de ulike reduktantene fra hverandre, deres begrensinger og hvilke reduksjonsmekanismer de utfører. I denne oppgaven undersøkes ORP-verdier fra de tre reduktantene L-askorbat, gallussyre og L-cystein ved hjelp av et potensiometri. Reduktantenes avhengighet av pH blir også studert.

5.3.1 Reduktanter

Figurer med rådata (vedlegg, figur 29-34) viser at potensialet flater ut ved en totalkonsentrasjon på 4,5 mM reduktant i den elektrokjemiske cellen. Videre er ORP-verdiene for reduktantene ved denne konsentrasjonen plottet mot pH (figur 26-28).

Galleursyre har den de høyeste ORP-verdiene ved alle de undersøkte pHene, sammenlignet med L-cystein og L-askorbat. Dette tilsier at gallussyre er den svakeste reduktanten av de tre, under gitte betingelser. Videre er L-askorbat den sterkeste reduktanten ved lav pH (under 6,0), mens L-cystein den sterkeste ved høyere pH-verdier (over 7,0). Eksperimentelle data viser dermed at skille mellom hvilken reduktant som er sterkest av L-cystein og L-askorbat er mellom pH 6,0 og 7,0. Alle reduktantenes reduktive egenskaper økte med pH-verdien.

Grafen for L-askorbat har et stigningstall $-23,4 \pm 9,0$ mV/pH (tabell 3) som er noe lavere enn for gallussyre ($-43,1 \pm 9,5$ mV) og L-cystein ($-53,6 \pm 7,2$ mV). Selv med relativ store standardavvik og lavere R-verdi, kan det virke som om stigningstallet til L-askorbat skiller seg ut fra de resterende reduktantene. En mulig forklaring på dette er at L-askorbat kan ha en ulik reduksjonsmekanisme i forhold til gallussyre og L-cystein, hvor reduktantene kan donere et ulikt antall elektroner. Eksempelvis $R \rightarrow R^{2+} + 2 e^{-}$ for gallussyre og L-cystein og $R \rightarrow R^{+} + e^{-}$ for L-askorbat. Videre er L-askorbat kjent for å ha meget spesielle elektrokjemiske egenskaper og har blant annet muligheten til å danne mange ulike frie-radikal-intermediater (Bielski 1982). Dette gjør at løsningen kan inneholde mange ulike derivater av L-askorbat med ulike elektrokjemiske egenskaper.

5.4 Oppsummering

Bruk av EPR er et nyttig verktøy for å studere miljøet til Cu^{2+} i det aktive setet på LPMOer. I denne studien viste EPR signatur til SmCBP21-Cu^{2+} endringer ved tilsetning av samtlige kitinsubstrater. Disse endringene skyldes sannsynligvis endringer i Cu^{2+} -geometri/ulike interaksjoner mellom enzym og kopper, ved binding til kitinsubstrater den har affinitet mot. Videre var det små forskjeller mellom de krystallinske kitinsubstratene og heksaacetylkitoheksaose. Dette kan være på grunn av en høyere fleksibilitet i kitoheksaosen ved binding.

Kitinsubstratene ble videre studert med Raman-spektroskopi. Spektra skilte mellom α - og β -kitin, men ikke fra deres respektive acetylerede derivater. Videre var det noen forskjeller i Raman-linje assosiert med acetyleringsgrad i området rundt 1620 cm^{-1} . Denne Raman-linjen stammer sannsynligvis fra δ (NH) vibrasjoner.

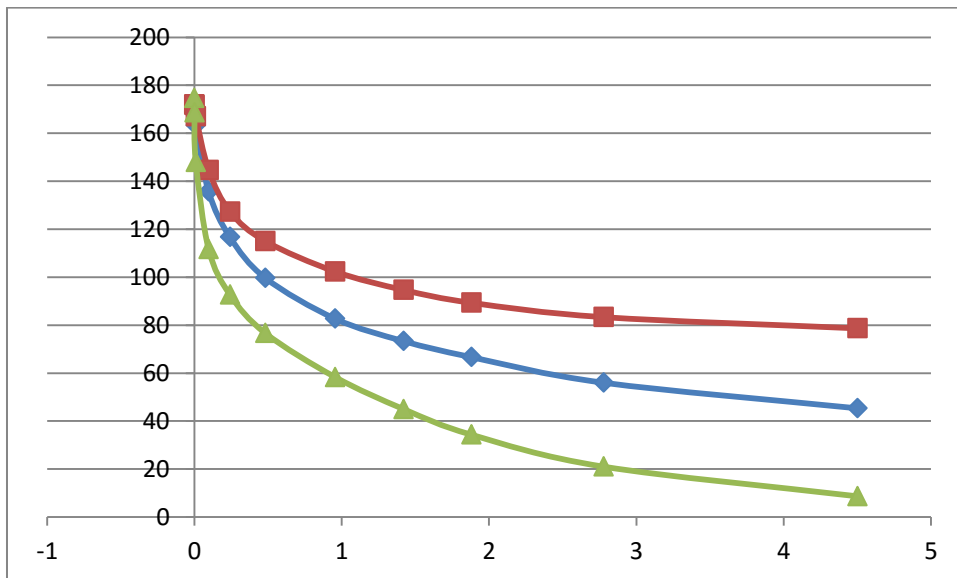
I siste del av forsøket ble tre eksterne elektron-donorer undersøkt ved potensiometri. Reduktantene viste forskjeller i deres elektrokjemiske egenskaper, hvor gallussyre var den svakeste reduktanten ved alle gitte betingelser. Eksperimentelle data viste at L-cystein var den sterkeste reduktanten ved høy pH, mens L-askorbat var den sterkeste under mildt syrlige forhold. Alle reduktantene hadde en sterkere reduseringsevne ved økt pH. L-cystein var reduktanten som ble minst påvirket av endringer i pH. En mulig forklaring på dette er at de reduserende agentene har ulike reduksjons-mekanismer, hvor L-askorbat donerer et ulikt antall elektroner i forhold til L-cystein og gallussyre.

5.5 Videre arbeid

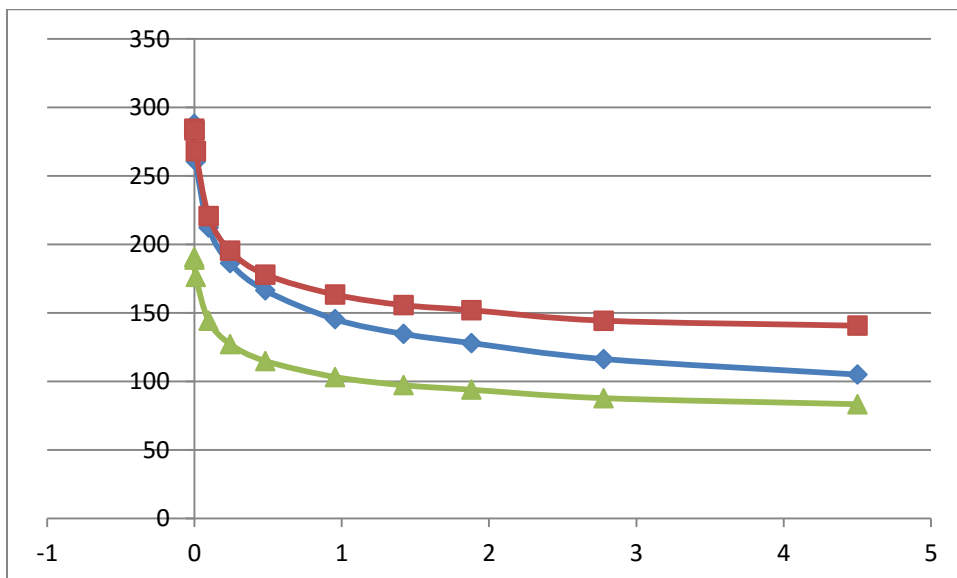
Videre arbeid blir å beregne og analysere g -verdiene fra denne oppgaven. Det hadde også vært interessant å undersøke SmCBP21-Cu^{2+} med et krystallinsk substrat den ikke har affinitet mot, for å undersøke binding i forhold til aktivitet. I denne sammenheng kunne forsøket utvides til å inkludere enzymer fra alle de ulike LPMO-familiene; AA9, AA10, AA11 og AA13. Ved å lage en matrise over utvalgte enzymer og kjente aktiviteter, kan man systematisk undersøke sammenhengen mellom substrataffinitet og aktivitet. I dette tilfellet ville det også være interessant å utføre bindingsforsøk i de tilfellene dette tidligere ikke er utført, eksempelvis med isotermisk kalorimetri (ITC).

6 Vedlegg

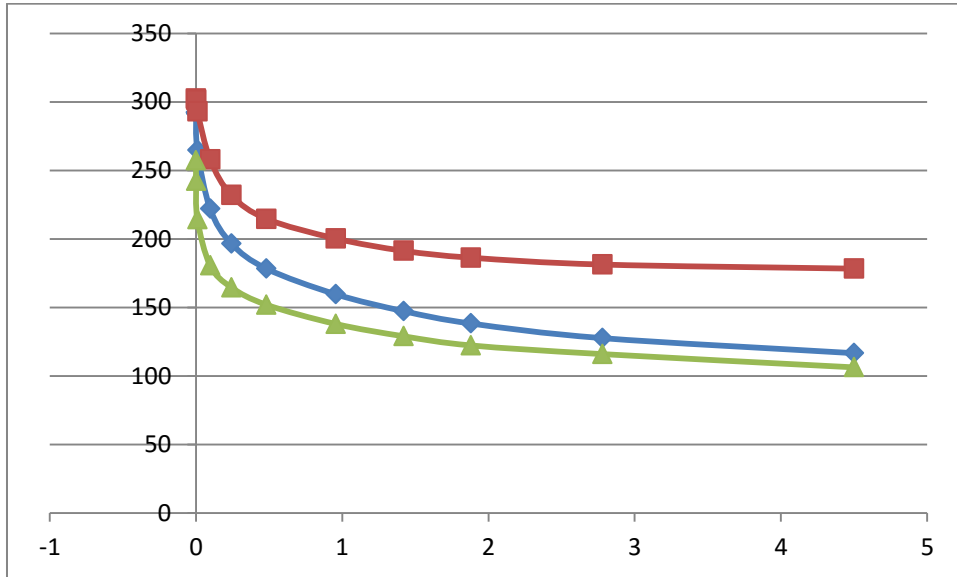
I figur 29-34 vises reduksjonspotensialet til reduktantene L-askorbat, gallussyre og L-cystein ved økt konsentrasjon.



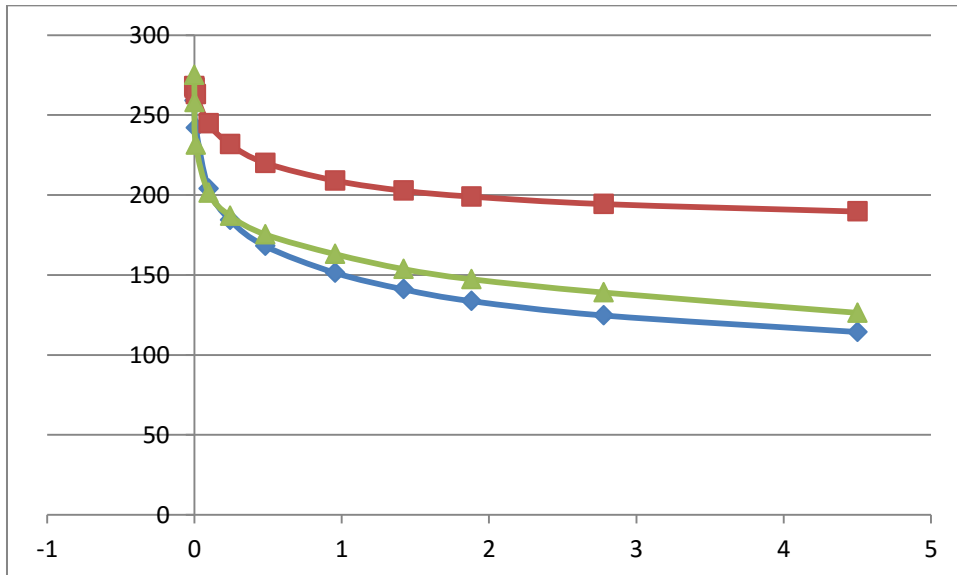
Figur 29: Potensiometriske målinger i 100 mM Tris-HCl pH 8,0 med injeksjoner av reduktantene L-askorbat (blå), gallussyre (rød) og L-cystein (grønn). *x*-aksen viser ORP-verdi (mV) i forhold til Ag/AgCl referanseelektrode mens *y*-aksen viser totalkonsentrasjon av reduktant i den elektrokjemiske cellen (mM).



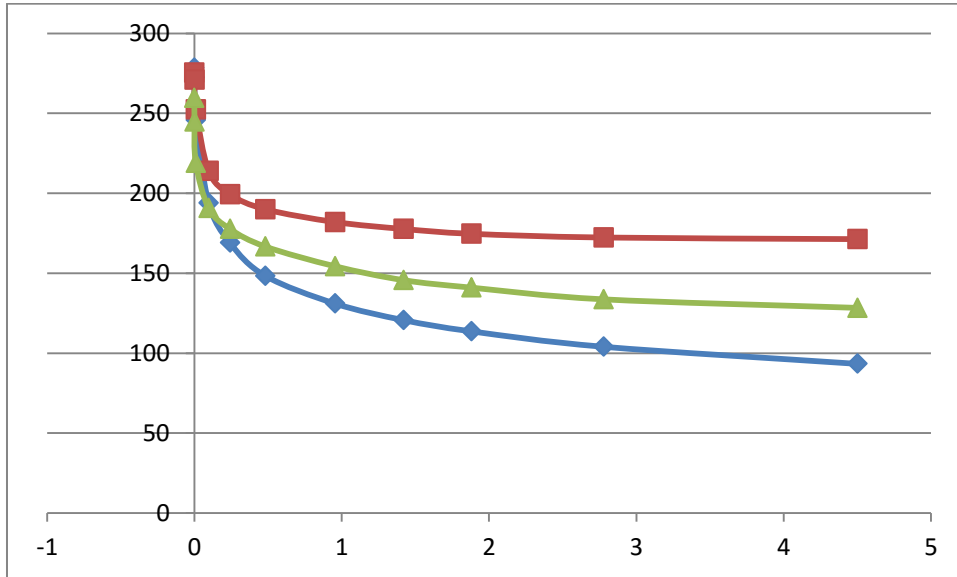
Figur 30: Potensiometriske målinger i 100 mM Natriumfosfat pH 7,0 med injeksjoner av reduktantene L-askorbat (blå), gallussyre (rød) og L-cystein (grønn). *x*-aksen viser ORP-verdi (mV) i forhold til Ag/AgCl referanseelektrode mens *y*-aksen viser totalkonsentrasjon av reduktant i den elektrokjemiske cellen (mM).



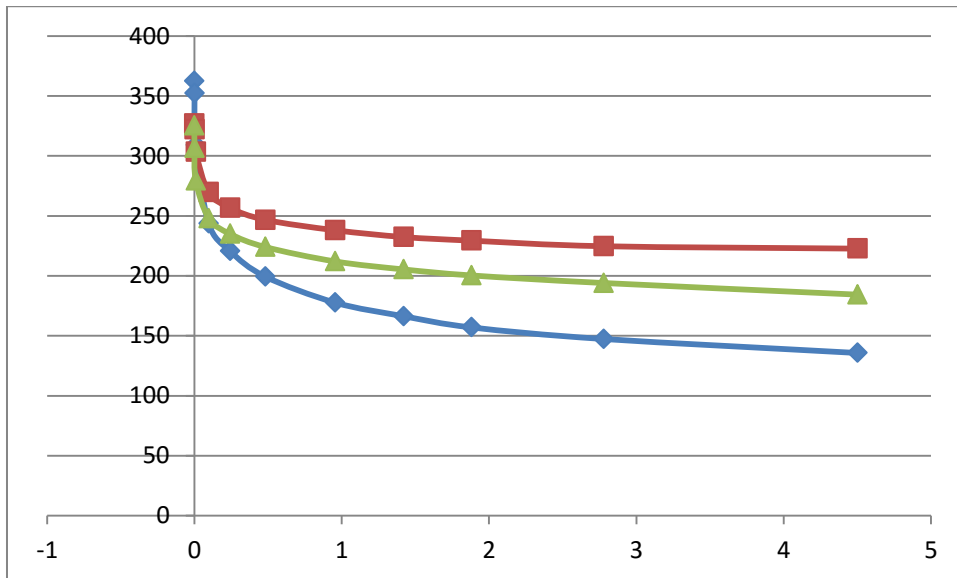
Figur 31: Potensiometriske målinger i 100 mM HEPES pH 7,0 med injeksjoner av reduktantene L-askorbat (blå), gallussyre (rød) og L-cystein (grønn). x-aksen viser ORP-verdi (mV) i forhold til Ag/AgCl referanseelektrode mens y-aksen viser totalkonsentrasjon av reduktant i den elektrokjemiske cellen (mM).



Figur 32 Potensiometriske målinger i 100 mM MES pH 6,0 med injeksjoner av reduktantene L-askorbat (blå), gallussyre (rød) og L-cystein (grønn). x-aksen viser ORP-verdi (mV) i forhold til Ag/AgCl referanseelektrode mens y-aksen viser totalkonsentrasjon av reduktant i den elektrokjemiske cellen (mM).



Figur 33: Potensiometriske målinger i 100 mM Ammoniumacetat pH 6,0 med injeksjoner av reduktantene L-askorbat (blå), gallussyre (rød) og L-cystein (grønn). *x*-aksen viser ORP-verdi (mV) i forhold til Ag/AgCl referanseelektrode mens *y*-aksen viser totalkonsentrasjon av reduktant i den elektrokjemiske cellen (mM).



Figur 34: Potensiometriske målinger i 100 mM Ammoniumacetat pH 5,0 med injeksjoner av reduktantene L-askorbat (blå), gallussyre (rød) og L-cystein (grønn). *x*-aksen viser ORP-verdi (mV) i forhold til Ag/AgCl referanseelektrode mens *y*-aksen viser totalkonsentrasjon av reduktant i den elektrokjemiske cellen (mM).

7 Referanser

- Aachmann, F. L., Vaaje - Kolstad, G., Forsberg, Z., Røhr, Å., Eijsink, V. G. & Sørli, M. (2015). Lytic Polysaccharide Monooxygenase. *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*.
- Aam, B. B., Heggset, E. B., Norberg, A. L., Sørli, M., Vårum, K. M. & Eijsink, V. G. (2010). Production of chitoooligosaccharides and their potential applications in medicine. *Marine drugs*, 8 (5): 1482-1517.
- Agger, J. W., Isaksen, T., Várnai, A., Vidal-Melgosa, S., Willats, W. G., Ludwig, R., Horn, S. J., Eijsink, V. G. & Westereng, B. (2014). Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (17): 6287-6292.
- Beckham, G. T., Matthews, J. F., Peters, B., Bomble, Y. J., Himmel, M. E. & Crowley, M. F. (2011). Molecular-level origins of biomass recalcitrance: decrystallization free energies for four common cellulose polymorphs. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115 (14): 4118-4127.
- Beier, S. & Bertilsson, S. (2014). Bacterial chitin degradation—mechanisms and ecophysiological strategies. *The Microbial Regulation of Global Biogeochemical Cycles*: 9.
- Berg, J. M. & Lippard, S. (1994). Principles of bioinorganic chemistry. *Mill Valley*.
- Bielski, B. H. (1982). Chemistry of ascorbic acid radicals. *Advances in Chemistry Series*, 200.
- Bier, A. W. (2009). Introduction to oxidation reduction potential measurement
- Cannella, D., Möllers, K., Frigaard, N.-U., Jensen, P., Bjerrum, M., Johansen, K. & Felby, C. (2016). Light-driven oxidation of polysaccharides by photosynthetic pigments and a metalloenzyme. *Nature Communications*, 7.
- cazy.org. Tilgjengelig fra: <http://www.cazy.org/Auxiliary-Activities.html> (lest 17.02.2016).
- Cocinero, E. J., Gamblin, D. P., Davis, B. G. & Simons, J. P. (2009). The building blocks of cellulose: the intrinsic conformational structures of cellobiose, its epimer, lactose, and their singly hydrated complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 131 (31): 11117-11123.
- Dutta, P. K., Dutta, J. & Tripathi, V. (2004). Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of scientific and industrial research*, 63 (1): 20-31.
- Forsberg, Z., Vaaje - Kolstad, G., Westereng, B., Bunæs, A. C., Stenstrøm, Y., MacKenzie, A., Sørli, M., Horn, S. J. & Eijsink, V. G. (2011). Cleavage of cellulose by a CBM33 protein. *Protein Science*, 20 (9): 1479-1483.
- Forsberg, Z. (2014). Discovery and characterization of cellulose-active lytic polysaccharide monooxygenases. *Philosophiae Doctor (PhD)*.

- Forsberg, Z., Mackenzie, A. K., Sørli, M., Røhr, Å. K., Helland, R., Arvai, A. S., Vaaje-Kolstad, G. & Eijsink, V. G. (2014a). Structural and functional characterization of a conserved pair of bacterial cellulose-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (23): 8446-8451.
- Forsberg, Z., Røhr, Å. K., Mekasha, S., Andersson, K. K., Eijsink, V. G., Vaaje-Kolstad, G. & Sørli, M. (2014b). Comparative study of two chitin-active and two cellulose-active AA10-type lytic polysaccharide monooxygenases. *Biochemistry*, 53 (10): 1647-1656.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S. e., Wilkins, M. R., Appel, R. D. & Bairoch, A. (2005). *Protein identification and analysis tools on the ExPASy server*: Springer.
- Gibson, L. J. (2012). The hierarchical structure and mechanics of plant materials. *Journal of the Royal Society Interface*: rsif20120341.
- Hage, D. S. & Carr, J. D. (2011). *Analytical chemistry and quantitative analysis*: Prentice Hall Upper Saddle River, NJ.
- Hemsworth, G. R., Davies, G. J. & Walton, P. H. (2013). Recent insights into copper-containing lytic polysaccharide mono-oxygenases. *Current opinion in structural biology*, 23 (5): 660-668.
- Hemsworth, G. R., Henrissat, B., Davies, G. J. & Walton, P. H. (2014). Discovery and characterization of a new family of lytic polysaccharide monooxygenases. *Nature chemical biology*, 10 (2): 122-126.
- Hemsworth, G. R., Johnston, E. M., Davies, G. J. & Walton, P. H. (2015). Lytic Polysaccharide Monooxygenases in Biomass Conversion. *Trends in biotechnology*, 33 (12): 747-761.
- Horn, S. J., Sørbotten, A., Synstad, B., Sikorski, P., Sørli, M., Vårum, K. M. & Eijsink, V. G. (2006). Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. *Febs Journal*, 273 (3): 491-503.
- Karlsen, V., Heggset, E. B. & Sørli, M. (2010). The use of isothermal titration calorimetry to determine the thermodynamics of metal ion binding to low-cost sorbents. *Thermochimica Acta*, 501 (1): 119-121.
- Kim, S., Ståhlberg, J., Sandgren, M., Paton, R. S. & Beckham, G. T. (2014). Quantum mechanical calculations suggest that lytic polysaccharide monooxygenases use a copper-oxyl, oxygen-rebound mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (1): 149-154.
- Kobayashi, K., Kimura, S., Togawa, E. & Wada, M. (2010). Crystal transition between hydrate and anhydrous β -chitin monitored by synchrotron X-ray fiber diffraction. *Carbohydrate Polymers*, 79 (4): 882-889.
- Kozlevčar, B. (2008). Structural analysis of a series of copper (II) coordination compounds and correlation with their magnetic properties. *Croatica Chemica Acta*, 81 (2): 369-379.

- Kracher, D., Scheiblbrandner, S., Felice, A. K., Breslmayr, E., Preims, M., Ludwicka, K., Haltrich, D., Eijsink, V. G. & Ludwig, R. (2016). Extracellular electron transfer systems fuel cellulose oxidative degradation. *Science*: aaf3165.
- Leggio, L. L., Simmons, T. J., Poulsen, J.-C. N., Frandsen, K. E., Hemsworth, G. R., Stringer, M. A., von Freiesleben, P., Tovborg, M., Johansen, K. S. & De Maria, L. (2015). Structure and boosting activity of a starch-degrading lytic polysaccharide monoxygenase. *Nature communications*, 6.
- Levasseur, A., Drula, E., Lombard, V., Coutinho, P. M. & Henrissat, B. (2013). Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnology for biofuels*, 6 (1): 1.
- Luchinat, C. (2000). Physical methods in bioinorganic chemistry: spectroscopy and magnetism. L Que, Jr. (ed), 2000, University Science Books, Sausalito, Calif. Printed pages 556; price: US \$78.00. ISBN 1-891389-02-5. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 5 (6): 784-785.
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E., Appling, D. R. & Anthony-Cahill, S. J. (2013). *Biochemistry*. 4. utg. Toronto, Ont: Pearson.
- Nakagawa, Y. S., Eijsink, V. G., Totani, K. & Vaaje-Kolstad, G. (2013). Conversion of α -chitin substrates with varying particle size and crystallinity reveals substrate preferences of the chitinases and lytic polysaccharide monoxygenase of *Serratia marcescens*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61 (46): 11061-11066.
- O'sullivan, A. C. (1997). Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*, 4 (3): 173-207.
- Prashanth, K. H. & Tharanathan, R. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview. *Trends in food science & technology*, 18 (3): 117-131.
- Quinlan, R. J., Sweeney, M. D., Leggio, L. L., Otten, H., Poulsen, J.-C. N., Johansen, K. S., Krogh, K. B., Jørgensen, C. I., Tovborg, M. & Anthonsen, A. (2011). Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (37): 15079-15084.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in polymer science*, 31 (7): 603-632.
- Scheller, H. V. & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Plant Biology*, 61 (1): 263.
- Siró, I. & Plackett, D. (2010). Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. *Cellulose*, 17 (3): 459-494.
- Skoog, D. A., Holler, J. F. & Nieman, T. A. (1998). *Principles of instrumental analysis*, b. 158: Saunders College Philadelphia.
- Synowiecki, J. & Al-Khateeb, N. A. (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives.

- Syrový, L. a. H., Z. & Chromatog, J. (1991). Staining and quantification of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis (1991) 569:175-196.
- Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., van Aalten, D. M., Synstad, B. & Eijsink, V. G. (2005a). The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (31): 28492-28497.
- Vaaje-Kolstad, G., Houston, D. R., Riemen, A. H., Eijsink, V. G. & van Aalten, D. M. (2005b). Crystal structure and binding properties of the *Serratia marcescens* chitin-binding protein CBP21. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (12): 11313-11319.
- Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Horn, S. J., Liu, Z., Zhai, H., Sørli, M. & Eijsink, V. G. (2010). An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science*, 330 (6001): 219-222.
- Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., Sørli, M. & Eijsink, V. G. (2013). The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens*—a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *FEBS Journal*, 280 (13): 3028-3049.
- Vu, V. V., Beeson, W. T., Span, E. A., Farquhar, E. R. & Marletta, M. A. (2014). A family of starch-active polysaccharide monooxygenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (38): 13822-13827.
- Williams, D. H. & Fleming, I. (2008). *Spectroscopic methods in organic chemistry*. 6th ed. utg. London: McGraw-Hill.
- Wilson, D. B. (2011). Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Current opinion in microbiology*, 14 (3): 259-263.
- Zajac, A., Hanuza, J., Wandas, M. & Dymińska, L. (2015). Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 134: 114-120.
- Zhou, D., Zhang, L. & Guo, S. (2005). Mechanisms of lead biosorption on cellulose/chitin beads. *Water Research*, 39 (16): 3755-3762.



Norges miljø- og biovitenskapelig universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway