

INTERAKSJONER MELLOM KITOOLIGOSAKKARIDER OG  
KITINASE B FRA *SERRATIA MARCESCENS* STUDERT VED  
OVERFLATEPLASMONRESONANS OG ISOTERMISK  
TITRERINGSKALORIMETRI.

CHITTOOLIGOSACCHARIDE INTERACTIONS WITH CHITINASE B FROM  
*SERRATIA MARCESCENS* STUDIED BY SURFACE PLASMON RESONANCE  
AND ISOTHERMAL TITRATION CALORIMETRY.

LISBETH SKÅNØY

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP  
INSTITUTT FOR KJEMI, BIOTEKNOLOGI OG MATVITENSKAP  
MASTEROPPGAVE 30 STP. 2010





## Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap ved Universitetet for Miljø- og Biovitenskap (UMB). Oppgaven ble utført under bioorganisk forskningsgruppe ledet av professor Morten Sørli. Oppgaven markerer slutten på det femårige studiet Lektorutdanning i naturvitenskapelige fag.

Jeg vil først og fremst takke min veileder, Morten Sørli, for oppfølging, faglige innspill og ikke minst et godt lass med motivasjon. Jeg vil også takke stipendiat Anne Line Norberg for all hjelp og oppfølging på laben.

Jeg ønsker å takke mine medstudenter på laben for et trivelig arbeidsmiljø, hyggelige lunsjpauser og faglige diskusjoner.

Takk til mine foreldre, for at dere alltid har troa på meg, og for all hjelp og støtte i løpet av mine 17 år på skolebenken. Sist, men ikke minst vil jeg takke min kjære samboer, Thanh. Du betyr alt.

Alt i alt har dette vært en utrolig lærerik prosess, som innimellom har vært både tøff og krevende. Det viktigste for meg under arbeidet med denne oppgaven har vært å lære om prosessen rundt det å *forske*. Jeg har lært at det å forske på laboratoriet innebærer mye mer enn bare et par reagensrør og en hypotese som skal verifiseres. Dette er erfaringer jeg håper å kunne dra nytte av som kjemilektor.

Ås, mai 2010

---

Lisbeth Skånøy

## Innholdsfortegnelse

Forord.....	I
Sammendrag.....	V
Abstract .....	VI
Forkortelser .....	VII
1. Introduksjon .....	1
1.1 Karbohydrater.....	1
1.2 Kitin og kitosan .....	1
1.2.1 Struktur til kitin og kitosan.....	1
1.2.2 Syre-base egenskaper hos kitin og kitosan.....	2
1.2.3 Anvendelser av kitin og kitosan .....	2
1.3 Kitooligosakkarider (KOS) .....	3
1.4 Glykosylhydrolaser .....	3
Klassifisering.....	3
1.4.1 Struktur hos glykosylhydrolaser.....	4
1.4.2 Katalytisk mekanisme .....	6
1.5 Kitinaser .....	7
1.5.1 Kitinaser i naturen .....	7
1.5.2 Katalytisk mekanisme hos familie 18 kitinaser.....	8
1.5.3 Inhibering av kitinaser.....	10
1.5.4 Det kitinolytiske maskineriet hos <i>Serratia marcescens</i> .....	11
1.5.5 Struktur hos familie 18.....	13
1.6 Termodynamikk og kinetikk ved protein – ligand interaksjoner .....	17
1.6.1 Assosiasjonskonstanten ( $K_A$ ) og Gibbs fri energi (G).....	17
1.6.2 Bindingsentalpi (H) .....	18
1.6.3 Bindingsentropi (S) .....	19
1.7 Overflateplasmonresonans (SPR) .....	20
1.7.1 Prinsippet med SPR.....	21
1.7.2 Oppbygging av instrumentet .....	22
1.7.3 Protein immobiliseringsmetoder .....	23
1.7.4 Sensorchipen .....	23
1.7.5 Resonanssignalet .....	25
1.7.6 Begrensninger ved SPR.....	26

---

1.8 Isotermisk titreringskalorimetri (ITC).....	27
1.8.1 Oppbygging av ITC-instrumentet .....	27
1.8.2 c-verdien.....	28
1.8.3 Termogram og isoterm .....	29
1.8.4 Begrensninger ved ITC .....	29
1.9 Mål med oppgaven.....	30
2. Materialer .....	31
2.1 Laboratorieutstyr .....	31
2.2 Kjemikalier.....	32
2.3 Proteiner, peptider og enzymer .....	33
2.4 Kit/ system.....	34
3. Metoder .....	35
3.1 Tillaging av His <sub>10</sub> -ChiB-E144Q.....	35
3.1.1 Vekst av bakterier.....	35
3.1.2 Tillaging av periplasmatisk ekstrakt .....	35
3.1.3 Rensing av His <sub>10</sub> -ChiB-E144Q .....	36
3.1.4 SDS- Polyakrylamid Gel Elektroforese (SDS- PAGE).....	37
3.1.5 Oppkonsentrering og proteinkvantifisering .....	39
3.2 Bindingsstudier på Biacore 3000 .....	40
3.2.1 Generell bruk av instrumentet Biacore 3000.....	40
3.2.2 NTA Sensorchip.....	41
3.2.3 Protein – ligand bindingsforsøk på NTA sensorchip .....	42
3.2.4 CM5 Sensorchip.....	42
3.2.5 Protein – ligand bindingsforsøk på CM5 sensorchip .....	44
3.3 Isotermisk titreringskalorimetri (ITC).....	45
4. Resultater.....	46
4.1 Tillaging av His <sub>10</sub> -ChiB-E144Q.....	46
4.1.1 Tillaging av periplasmatisk ekstrakt .....	46
4.1.2 Resultat av rensing av protein på Ni-NTA kolonne.....	46
4.1.3 Resultat av SDS – Polyakrylamid Gel Elektroforese.....	47
4.1.4 Proteinkvantifisering .....	47
4.2 Overflateplasmonresonans .....	48
4.2.1 NTA- Ni .....	48
4.2.2 Protein- ligand bindingsforsøk på NTA sensorchip.....	49

---

4.2.3 CM5.....	62
4.2.4 Protein- ligand bindingsforsøk på CM5 sensorchip.....	63
4.3 Isotermisk titreringskalorimetri.....	66
5. Diskusjon.....	69
5.1 Er Biacore og ITC egnet til å studere substratbinding til ChiB?.....	69
5.2 Bindingsstudie, binding av KOS til ChiB.....	69
5.3 Temperaturavhengigheten til bindingsreaksjonen mellom ChiB og KOS.....	73
5.4 Videre arbeid.....	73
6. Referanser.....	74

## Sammendrag

Hovedmålet i dette studiet var å sammenligne bruk av isotermisk titreringskalorimetri (ITC) og overflateplasmonresonans (SPR) ved bindingsstudier mellom KitinaseB(ChiB) og kitooligosakkarider (KOS) av ulik lengde. Det ble utført forsøk med N-acetyl-D-glukosamin ((GlcNAc)<sub>3</sub>, (GlcNAc)<sub>4</sub> og (GlcNAc)<sub>6</sub>) med ChiB-E144Q på Biacore. Det ble brukt to ulike immobiliseringsmetoder av proteinet. De samme KOS ble også studert på ITC ved 18 °C. Begge immobiliseringsmetodene ga samsvarende resultater med resultatene fra ITC. Det var derfor mulig å kombinere informasjonen fra ITC og SPR til å gi et bilde av interaksjonene mellom protein og ligand.

Resultatene fra SPR tyder på at assosiasjonsraten,  $k_a$ , øker med økende substratlengde. Dette er som forventet, da lengre substrater har flere gunstige interaksjoner med enzymet. Det ser ut til at dissosiasjonsraten,  $k_d$ , er uavhengig av substratlengden. Dette kan skyldes at dissosiasjon av uspaltede oligomere domineres av det som skjer i -2 til +1 subsetene.

Neste mål var å kartlegge bindingsenergiene i de ulike subsetene hos ChiB. Ved å kombinere resultatene fra denne studien med tidligere resultater for (GlcNAc)<sub>5</sub> og ChiB-E144Q (Norberg et al. 2010), var det mulig å beregne de ulike bindingsenergiene. Endringen i Gibbs fri energi ( $\Delta G$ ) ble funnet til å være -0,2 kJ/mol, -22,8 kJ/mol, -8,0 kJ/mol, -3,9 kJ/mol og -0,9 kJ/mol for henholdsvis subsetene -3, (-2, -1 og +1), +2, +3 og "+4". Binding til subsetene -2, -1 og +1 er hovedsakelig entalpisk drevet, mens binding i subsetene +2 og +3 er sterkt entropisk drevet.

## Abstract

The aim of this study was to compare the use of Isothermal Titration Calorimetry (ITC) and Surface Plasmon Resonance (SPR) to do binding studies between Chitinase B (ChiB) and chitooligosaccharides (CHOS) of different length. Experiments were performed with N-acetyl-D-glucosamine ((GlcNAc)<sub>3</sub>, (GlcNAc)<sub>4</sub> and (GlcNAc)<sub>6</sub>) with ChiB-E144Q on Biacore. Two different methods of protein immobilization were used. The same CHOS were also studied on ITC, at 18 °C. Both methods of immobilization gave good correspondence with the results from ITC. This allows a combined interpretation of the data, giving a picture of substrate binding in ChiB.

The results from SPR indicate that the association rate,  $k_a$ , increases with increasing substrate length. This is expected - as longer substrates have more favorable interactions with the protein. It looks like the dissociation rate,  $k_d$ , is independent of the substrate length. The only way to explain this is that dissociation of the non-cleaved oligomers is dominated by what takes place in the -2 to +1 subsites.

The next aim was to describe the binding energies in the individual subsites in ChiB. By combining results from this study with previously observed results for (GlcNAc)<sub>5</sub> (Norberg et al. 2010), it was possible to calculate the binding energies. The change in Gibbs free energy ( $\Delta G$ ) was found to be -0.2 kJ/mol, -22.8 kJ/mol, -8.0 kJ/mol, -3.9 kJ/mol and -0.9 kJ/mol for the subsites -3, (-2, -1 and +1), +2, +3 and "+4", respectively. Binding in the subsites -2, -1 and +1 are driven by enthalpy, whereas the binding in subsites +2 and +3 are driven by entropy.



---

## Forkortelser

<b>AMCase</b>	Acidic mammalian chitinase
<b>ChBD</b>	Kitinbindende domene
<b>ChiA</b>	Kitinase A fra <i>Serratia marcescens</i>
<b>ChiB</b>	Kitinase B fra <i>Serratia marcescens</i>
<b>ChiC</b>	Kitinase C fra <i>Serratia marcescens</i>
<b>Da</b>	Dalton
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Sterilt vann, Milli-Q kvalitet
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Sterilt vann av Milli-Q kvalitet
<b>GlcN</b>	D-glukosamin
<b>GlcNAc</b>	N- acetyl-D-glukosamin
<b>ITC</b>	Isotermisk tireringskalorimetri
<b>K<sub>A</sub></b>	Assosiasjonskonstanten
<b>k<sub>a</sub></b>	Assosiasjonsraten
<b>K<sub>D</sub></b>	Dissosiasjonskonstanten
<b>k<sub>d</sub></b>	Dissosiasjonsraten
<b>KOS</b>	Kitooligosakkarider
<b>NTA</b>	Nitriloeddiksyre
<b>R</b>	Den generelle gasskonstanten, 8,3145 J/(Kmol)
<b>Rpm</b>	Antall omdreininger per minutt
<b>RU</b>	Resonance Unit
<b>SDS-PAGE</b>	Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
<b>SPR</b>	Surface plasmon resonance (overflateplasmonresonans)
<b>Å</b>	Ångstrøm
<b>ΔC<sub>p</sub></b>	Endring i varmekapasitet
<b>ΔG</b>	Endring i Gibbs fri energi
<b>ΔH</b>	Endring i entalpi
<b>ΔS</b>	Endring i entropi

---

# 1. Introduksjon

## 1.1 Karbohydrater

Karbohydrater er en fellesbetegnelse på polyhydroksylerte aldehyder og ketoner, i dagligtale kalt sukker. Den empiriske formelen til de fleste karbohydrater er  $C_n(H_2O)_n$ . Karbohydrater er en viktig energikilde, men de har også en rekke andre biologiske funksjoner.

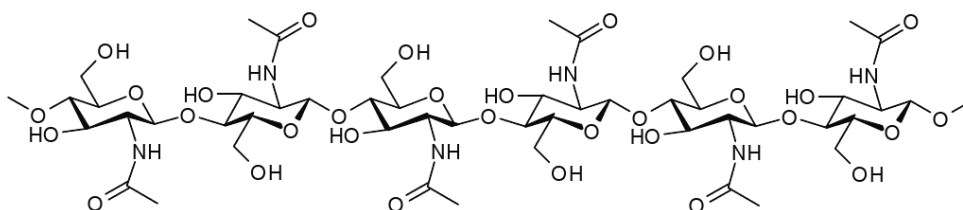
Karbohydrater som består av bare en sukkerenhet kalles monosakkarider. Sukkerenheten bygges opp av 3-7 karbonatomer. Flere monosakkarider kan settes sammen ved hjelp av glykosidbindinger og danne polysakkarider. Polysakkaridene kan være svært lange kjeder med opp mot en million sukkerenheter, og i motsetning til aminosyrekjedene hos proteiner kan disse kjedene ha forgreininger.

## 1.2 Kitin og kitosan

Kitin og kitosan er eksempler på polysakkarider, bygd opp av henholdsvis en eller to ulike monosakkarider. Kitin finnes i det ytre skjelettet hos blant annet skalldyr og en del insekter. Det finnes også i celleveggen hos enkelte sopp og algearter (Vårum & Smidsrød 2004). Kitin er den vanligste biopolymeren i naturen, etter cellulose. Kitosan er et derivat av kitin, og fremstilles industrielt ved syre eller basebehandlet deacetylering av kitin. Kitosan finnes også naturlig i noen Zygomycetes arter (Synowiecki & Al-Khateeb 2003).

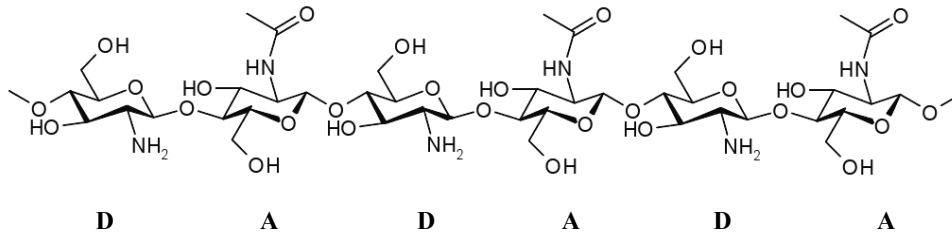
### 1.2.1 Struktur til kitin og kitosan

Kitin og kitosan er bygd opp på samme måte, med en  $\beta$ -(1,4) glykosidbinding mellom hver sukkerenhet. Kitin er en uløselig homopolymer, bestående av N-acetyl-D-glukosamin (GlcNAc). GlcNAc residuene er rotert 180 grader i forhold til hverandre, slik at annenhver acetoamidgruppe peker opp og annenhver peker ned. Lengden på kjedene varierer fra rundt 100-8000 enheter. Figur 1.2.1 viser strukturen til kitin.



**Figur 1.2.1** Kitin: uløselig homopolymer av  $\beta$ -(1,4)-N-acetyl-D-glukosamin (GlcNAc). (Kumar 2000).

I kitosan er noen eller alle acetoamidgruppene N-deacetylerede. Kitosan er derfor en løselig kopolymer av N-acetylglukosamin (GlcNAc) og D-glukosamin (GlcN). Figur 1.2.2 under viser strukturen til kitosan. Det er ikke klart definert hvilken acetyleringsgrad som skiller kitin og kitosan, men en mulig definisjon er basert på løseligheten, der substrater som kan løses i 0,1 M eddiksyre defineres som kitosan (Roberts 1992).



**Figur 1.2.2** Kitosan: løselig kopolymer av  $\beta$ -(1,4)-N-acetyl-D-glukosamin (GlcNAc, A) og D-glukosamin (GlcN, D). (Kumar 2000).

Kitin og kitosan består av en reduserende og en ikke-reduserende ende, som er definert fra venstre til høyre. Karbonatomet som kan kobles til nye enheter ved den reduserende enden, via glykosidbindinger, kalles det *anomere* karbonatomet.

### 1.2.2 Syre-base egenskaper hos kitin og kitosan

Amingruppen i GlcN-gruppen i kitosan har et ledig elektronpar og kan ta opp et proton. Dette gjør at gruppen er hydrofil, som gjør at kitosan er lettere vannløselig enn kitin. GlcNAc gruppen er derimot hydrofob. Dette gjør at kitosan som består av både GlcN og GlcNAc kan sees på som en amfifil polymer. Acetyleringsgraden er derfor svært viktig for egenskapene til kitosan (Vårum & Smidsrød 2004).

### 1.2.3 Anvendelser av kitin og kitosan

Det er de kjemiske, elektrostatiske og de biologiske egenskapene til kitin og kitosan som avgjør hva de kan anvendes til. Kitin og kitosan har syre- base egenskaper, høy viskositet, biokompatibilitet, god evne til å holde på fuktighet, strukturelle egenskaper, er biologisk nedbrytbare og ikke giftig for mennesker (Kumar 2000). Kitosan er spesielt anvendelig på grunn av den reaktive amingruppen.

Blant de biologiske egenskapene hos kitosan, er spesielt den antimikrobielle effekten mot forskjellige grupper mikroorganismer som bakterier, sopp og gjær viktig (Li et al. 2008;

Muzzarelli et al. 1990; Rhoades & Roller 2000; Seyfarth et al. 2008). Dette åpner for flere applikasjoner, blant annet til bruk i emballasje i matvareindustrien (Jeon et al. 2002; Srinivasa et al. 2004). Antibakterielle egenskaper gjør også at kitosan kan være en interessant komponent til mange bioteknologiske formål (Kumar 2000).

### **1.3 Kitoooligosakkarider (KOS)**

Kitoooligosakkarider(KOS) er hydrolytiske produkter av kitin eller kitosan med mellom 2 og ca 12 sukkerenheter. Disse kan fremstilles enten kjemisk eller enzymatisk. Den korte kjedelengden gjør at de har bedre løselighet og lavere viskositet enn kitin og kitosan (Vårum & Smidsrød 2004).

Siden KOS er fragmenter av kitin eller kitosan, har de ganske like egenskaper. KOS har vist seg å ha flere interessante biologiske aktiviteter, for eksempel å stimulere planter til å forsvare seg mot soppinfeksjon (Roby et al. 1987). KOS kan påvirke flere celleprosesser, og direkte enzyminhibering er observert for blant annet familie 18 kitinaser (Cederkvist et al. 2008; Jea et al. 2007; Nam et al. 2007; Rahman et al. 2008). KOS har mange mulige bruksområder som kitinaseinhibitor. Man antar at KOS kan benyttes i astmaterapi (Zhu et al. 2004), til utvikling av pestisider og fungisider (Palli & Retnakaran 1999) og til utvikling av antimalariamiddel (Vinetz et al. 2000).

### **1.4 Glykosylhydrolaser**

Glykosylhydrolaser (glykosidaser) er enzymer som katalyserer hydrolysering av glykosidbindinger. Disse enzymene gjør at organismer kan utnytte karbohydrater som energikilde, og finnes i alle levende organismer.

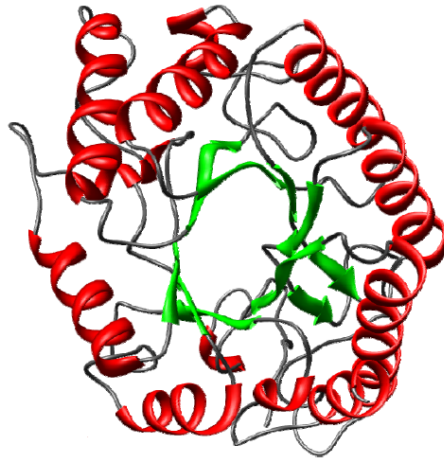
### **Klassifisering**

IUB-MB enzymnomenklaturen til glykosidasene er først og fremst basert på substratspesifisiteten. Henrissat utviklet et eget klassifiseringssystem for glykosidaser der de kategoriseres etter sekvenslikhet. Det er en direkte sammenheng mellom sekvens og foldingsmekanisme, og et slikt klassifiseringssystem vil dermed både avsløre evolusjonære og strukturelle likheter. Dette gir også mulighet til å utlede mekanistisk informasjon (Henrissat

1991). Informasjonen lagres i en database kalt CaZy (CarbohydrateActive Enzymes), og består per dags dato (februar 2010) av 115 familier (Cantarel et al.).

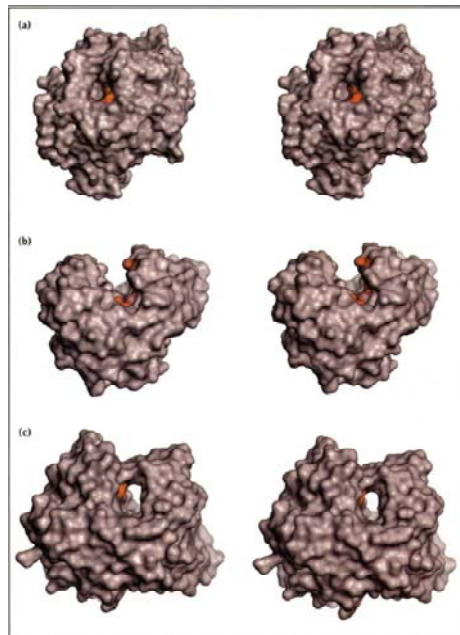
#### 1.4.1 Struktur hos glykosylhydrolaser

Den mest gjennomgående strukturen for glykosidaser er  $(\alpha/\beta)_8$ - tønne, også kalt TIM-barrel. Den utgjør også det katalytiske domenet i de fleste glykosidasene (McCarter & Withers 1994). En TIM-barrel består av åtte parallelle  $\beta$ -strands som er omgitt av åtte  $\alpha$ -helikser. Aktivt sete er lokalisert ved den c-terminale enden av  $\beta$ -strandene (Wierenga 2001). En vanlig TIM-barrel kan sees i figur 1.4.1, TIM-barrel hos Kitinase B kan skimtes i figur 1.5.4.



**Figur 1.4.1** TIM barrel, her vist på d1clxa (Sam 2008)

Den overordnede topologien til det aktive setet i glykosidasene kan deles inn i tre generelle klasser; lomme, kløft og tunnel. Disse er vist i figur 1.4.2.



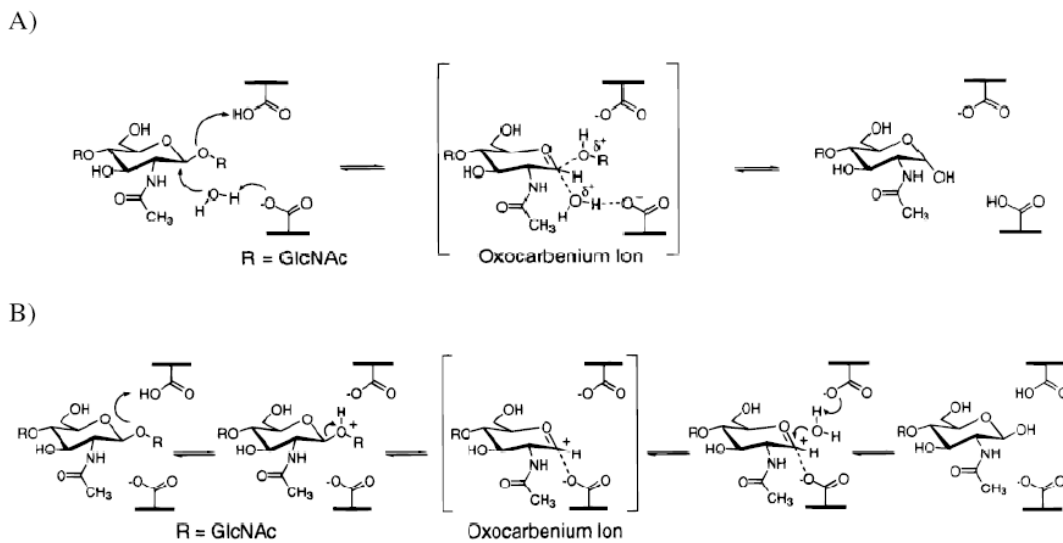
**Figur 1.4.2** Tre typer aktivt sete hos glykosidaser; a) lomme, b) kløft, c) tunnel. (Davies et al. 1997)

De glykosidasene med lometopologi i det aktive setet er ofte best tilpasset substrater med mange ender tilgjengelig på kjedene. Glykosidasene med kløfttopologi har en mer åpen struktur som tillater en mer tilfeldig binding av flere sukkerenheter, og finnes derfor ofte hos glykosidaser som hydrolyserer substratet fra vilkårlige punkt på kjeden – dette kalles endoaktivitet. Tunneltopologien er en avart av kløften, der lange looper dekker deler av kløften over substratet. Dette gir gode betingelser for prosessiv hydrolyse der enzymet forblir bundet til polymerkjeden under og etter hydrolysen (Davies & Henrissat 1995).

Det aktive setet hos glykosidasene som er involvert i substratbindingen er nummerert etter sukkerenhetene det kobles mot, og kalles subseter. Residuen i ett subsete hos glykosidasen reagerer med samme sukkerenhet. Subsetene nummereres fra  $-n$  til  $+n$  der  $n$  er et heltall. Nummereringen defineres ved at hydrolysen utføres mellom subsete  $-1$  og  $+1$ . Deretter representerer subseter som kobles mot sukkerenheten i den ikke-reducerende enden av substratet de negative subsetetallene, mens subsetene som kobler mot den reducerende enden av substratet betegnes med positive tall (Davies et al. 1997).

### 1.4.2 Katalytisk mekanisme

Glykosidaser har to mekanismer, reternerende og inverterende. Hydrolyse av glykosidbindingen hos glykosidaser skjer ved en generell syrekatalyse. Dette er en mekanisme som krever en protondonor og en base/nukleofil (Koshland 1953; Sinnott 1990). Avhengig av plasseringen av disse katalytiske residuene utføres den katalytiske mekanismen på to grunnleggende forskjellige måter. En oversikt over disse er vist i figur 1.4.3.



**Figur 1.4.3:** To mekanismer benyttet ved hydrolyse av glykosidaser; inverterende mekanisme (A) og reternerende mekanisme (B) (Brameld & Goddard 1998).

Hos den inverterende mekanismen skjer hydrolysen i ett trinn: Et katalytisk residue i form av en karboksylgruppe protonerer glykosidoksygenet. På samme tid aktiveres et vannmolekyl av det andre katalytiske residuet, som er basisk. Vannmolekylet utfører deretter et nukleofilt angrep på det anomere karbonatomet der vannmolekylet erstatter det utgående oligosakkaridfragmentet, via dannelse av et oksokarbeniumion. Denne mekanismen gjør at stereokjemien endres fra utgangspunktet, man får en netto inversjon av den anomere konfigurasjonen (Koshland 1953).

Den reternerende mekanismen er en totrinnsmekanisme (McCarter & Withers 1994). Først protoneres oksygenet i glykosidbindingen, og det dannes et oksokarbeniumion intermediat. Dette intermediet stabiliseres av det andre residuet, et karboksylat på motsatt side av

substratet ved hjelp av elektrostatiske interaksjoner eller kovalent binding (Sinnott 1990). Denne stabiliseringen er helt nødvendig, da oksokarbeniumioner har veldig kort levetid i løsning (Sinnott 1990). I trinn to vil den første katalytiske residuen, som nå er positivt ladet aktivere et vannmolekyl som utfører et nukleofilt angrep på det anomere karbonatomet, og erstatter det utgående oligosakkaridfragmentet. Siden det aktiverte vannmolekylet kommer inn fra samme siden som det utgående fragmentet var bundet, vil den opprinnelige konfigurasjonen bevares. Vi får dermed en netto retensjon av den anomere konfigurasjonen (Koshland 1953). Siden det nukleofile residuet ved en reternerende mekanisme angriper direkte, vil dette ligge nærmere det anomere karbonatomet enn ved en inverterende mekanisme, der et vannmolekyl ligger mellom dem. Gjennomsnittsavstanden mellom det nukleofile residuet og glykosidkarbonet er 5,5Å hos reternerende og 10Å hos inverterende mekanismer (McCarter & Withers 1994).

## 1.5 Kitinaser

Kitinaser er en type glykosidaser. Kitinasene hydrolyserer glykosidbindingen hos kitin. Kitinaser inngår i glykosidase familie 18 og 19. Familie 18 kitinasene benytter en reternerende substratassistert mekanisme ved hydrolyse av glykosidbindingene (omtalt i kap. 1.4.2) og dette er den mest utbredte klassen av kitinaser. Familie 19 kitinasene benytter en inverterende mekanisme, og finnes hovedsakelig i planter og i enkelte *Streptomyces* arter (Watanabe et al. 1999). Enzymet kitosanase er spesialisert for å hydrolysere kitosan, og tilhører glykosylhydrolasefamiliene 5, 8, 46, 75 og 80.

### 1.5.1 Kitinaser i naturen

Kitinaser i naturen forekommer først og fremst i organismer som selv produserer kitin, eller i organismer som utnytter kitin som næringskilde. For organismer som benytter kitin som strukturell komponent er kitinasene kritiske for normale funksjoner i livssyklusen, som for eksempel hamskifte (Fukamizo & Kramer 1985) og celledeling (Kuranda & Robbins 1991). Organismene som er i stand til å utnytte kitin som energikilde er enten åtseldyr eller patogene organismer, og er mest utbredt blant sopp og bakterier. Det er disse organismene som sørger for at kitin ikke akkumuleres i naturen.



Et stort antall organismer produserer også kitinaser uten å benytte de strukturelle komponentene i kitin, eller kitin som næringskilde. Det er derfor foreslått flere alternative funksjoner for kitinaser.

Når planter angripes av patogene organismer responderer de ved å uttrykke gener som koder for ulike proteiner. Flere av disse er tenkt til å ha en rolle i plantenes forsvarsmekanisme (Bowles 1990). Det er forsket spesielt på planter og soppinfeksjoner. Hovedkomponentene i celleveggen hos mange typer sopp er kitin og  $\beta$ -1,3-glukan, og det er vist at kitinaser virker synergisk med  $\beta$ -1,3-glukanase mot hemming av soppvekst (Mauch et al. 1988).

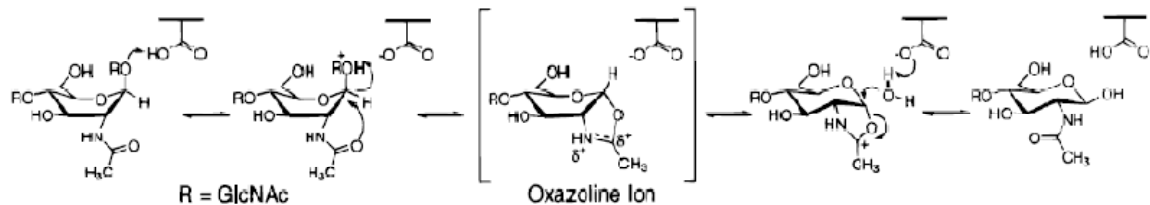
Lignende responser er funnet ved astma og enkelte parasittinfeksjoner (Holt 1996). Astma er en inflammatorisk lungesykdom som er assosiert med økt  $T_H2$  cellulær respons (Mosmann & Coffman 1989). Det er antatt at  $T_H2$  inflammasjonen først ble utviklet som en respons på parasitter, men dersom det er dårlig kontroll over denne responsen, kan en organisme utvikle allergi og astma (Ray & Cohn 1999). Produksjonen av kitinaser ved utsettelse for kitin har vist sammenheng med antiinflammatorisk effekt hos laverestående organismer. Blant annet har en genetisk studie funnet forhøyet uttrykk av kitinasen AMCase hos mus med en astmatisk fenotype (Zimmermann et al. 2004).

Det var lenge tvil om menneskekroppen kunne produsere kitinaser, for det ble antatt at vi mangler substrater for disse. Men selv om det ikke finnes kitin og kitinsyntaser i menneskekroppen, produserer vi forskjellige kitinaser som man tror er en del av vår antiparasitt respons (Elias et al. 2005; Herrera-Estrella & Chet 1999). Nå er kitotriosidase(CHIT1) (Boot et al. 1995) og kitinasen AMCase (acidic mammalian chitinase) (Boot et al. 2001) funnet. Det er vist at AMCase hos mennesker har en forhøyet verdi i astmatisk lungevev, og at den indueres ved  $T_H2$  inflammasjon, som medieres av interleukin 13 (Zhu et al. 2004).

### **1.5.2 Katalytisk mekanisme hos familie 18 kitinaser**

Glykosidaser i familie 18 viser bevaring av den anomere konfigurasjonen (Armand et al. 1994). Men røntgen-kryсталlografi av glykosidaser i denne familien har vist at de mangler det

basiske katalytiske residuet som er nødvendig for stabilisering av det ladede oksokarbeniumionintermediatet (Perrakis et al. 1994; Vanschellinga et al. 1994). Det er derfor foreslått en alternativ substratassistert mekanisme, der N-acetylgruppen som er bundet til C2 på sukkerresiduet i subsete -1, fungerer som base og stabiliserer intermediatet, heretter kalt oksazoliniumionintermediat (Tews et al. 1997). En økende mengde eksperimentelt og teoretisk materiale støtter dette (van Aalten et al. 2000; van Aalten et al. 2001; Vanschellinga et al. 1995). Den substratassisterte mekanismen benyttet av glykosidaser i familie 18 er vist i figur 1.5.1.



**Figur 1.5.1.:** Substratassistert mekanisme benyttet av glykosidaser i familie 18 (Brameld & Goddard 1998).

For at hydrolysen skal kunne gjennomføres, er enzymet avhengig av en N-acetylgruppe på sukkeret, plassert i -1 subsetet. Denne gruppen er tilstede hos GlcNAc-enhetene, men ikke hos GlcN-enhetene. Det er tidligere blitt vist at kjeden ikke nødvendigvis dissosierer av om en deacetyllert enhet befinner seg i subsete -1. Kjeden kan assosieres så sterkt at enzymet blir værende. Et alternativ hos prosessive enzymer er at kjeden flyttes med to sukkerenheter slik at hydrolyse kan skje ved neste produktive binding (Sorbotten et al. 2005). Utfallet er her avhengig av sekvensen til kjeden (Sorbotten et al. 2005). En ideell avstand mellom syrerresiduet og oksygenet i glykosidbindingen som fører til at oksygenet protoneres, vil være når sukkerresiduet skifter fra stol- til båtkonformasjon ved residu -1. Teoretiske studier har vist at dette er en sannsynlig mekanisme (Brameld & Goddard 1998; Brameld et al. 1998). Konformasjonsendringen er i seg selv energetisk ugunstig, energi må derfor hentes fra andre bindinger/interaksjoner for å drive reaksjonen.

### 1.5.3 Inhibering av kitinaser

Siden sopp og flere andre patogene organismer produserer kitin, og er helt avhengige av kitinaser for å fungere normalt, vil inhibering av kitinaser være et potensielt mål for pesticider, fungicider og antipatogene middel (Palli & Retnakaran 1999).

På grunn av at kitinaser antas å være relatert til antiinflammatoriske responser, er hemming av kitinaser sett på som et mål for å kontrollere astma og allergi (Zhu et al. 2004). Hos mus har inhibering av AMCCase ved hjelp av kitinaseinhibitoren allosamidin ført til redusert inflammasjon (Zhu et al. 2004).

Inhibering av kitinaser antas også å være nyttig i produksjon av antimalariamiddel. Malariaparasitten *Plasmodium gallinaceum* er avhengig av kitinaser for å kunne trenge igjennom den kitinholdige peritrofe matriksen hos verten. Allosamidin har vist seg å hindre parasitten i å trenge inn i myggen, da allosamidin inhiberer kitinaser (Vinetz et al. 2000).

Hvorvidt oligomerene blir hydrolysert er avhengig av sekvensen til de acetylerede og deacetylerede enhetene (Cederkvist et al. 2006; Cederkvist et al. 2008). Enzymene hos glykosidaser i familie 18 har vanligvis fire til seks sukkerbindende subsetter, og bindingen til et substrat påvirkes av om det er deacetylerede eller acetylerede enheter i hvert av subsettene. Selv ulike enzymer innen samme familie kan ha ulike preferanser her (Horn et al. 2006b). Det som er felles for alle glykosidasene i familie 18, er at det er en absolutt preferanse for en acetyleret enhet i subsette -1 for at hydrolysen skal gjennomføres. Dette kommer av at den substratassisterte mekanismen benytter en GlcNAc-enhet i hydrolysen (Vanschellinga et al. 1995). Sekvenser som skal inhibere enzymet må derfor ha en deacetyleret GlcN-enhet her.

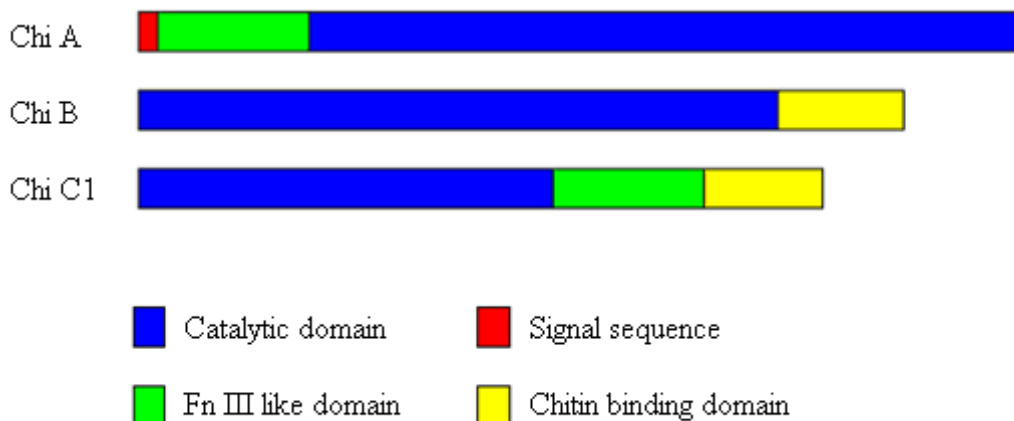
Kitooligosakkarider som inhibitorer vil ha en rekke fordeler, de er spesifikke mot enzymet, de interagerer ikke med andre enzymer, og de er naturlige ikke-toksiske substrater som er lett tilgjengelige.

#### 1.5.4 Det kitinolytiske maskineriet hos *Serratia marcescens*

Jordbakterien *Serratia marcescens* er kjent for effektiv nedbrytning av kitin. Den produserer tre forskjellige kitinaser; kitinase A (ChiA), B (ChiB) og C (ChiC), en heksoaminidase og CBP21, et kitinbindende protein (Fuchs et al. 1986; Suzuki et al. 2002; Watanabe et al. 1997).

Enzymene har en noe ulik mekanisme for nedbrytningen. ChiA, ChiB og ChiC hydrolyserer kitinfragmentene nesten utelukkende til dimere, (GlcNAc)<sub>2</sub> (Suzuki et al. 2002) ved lang nok inkubering. Heksoaminidasen degraderer dimere til monomerer. CBP21 har ikke katalytisk aktivitet, men trengs for å oppnå effektiv degradering av strukturelt kitin (Vaaje-Kolstad et al. 2005). Det er foreslått at CBP21 binder seg til kitinfragmenter hovedsakelig ved hjelp av polare interaksjoner. Dette gir strukturelle endringer hos kitin – noe som igjen gir kitinasene økt tilgjengelighet (Vaaje-Kolstad et al. 2005).

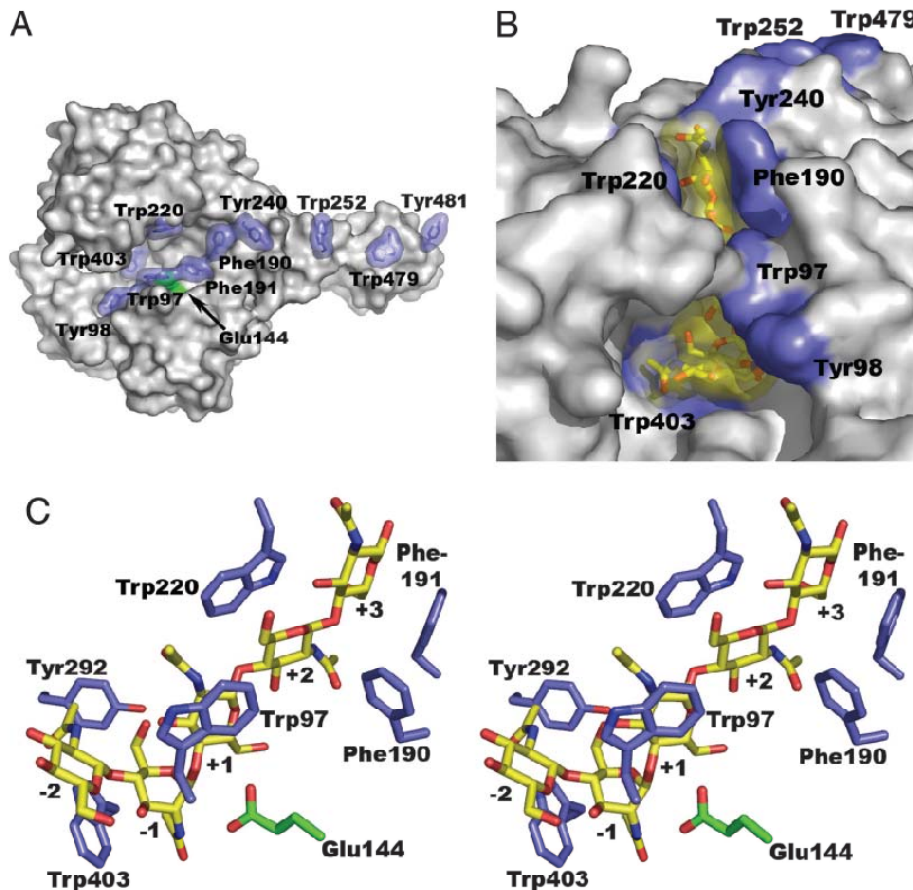
Alle de tre kitinasene tilhører glykosidase familie 18, og har dermed et katalytisk domene med en TIM-barrel fold. En oversikt over domenestrukturen til de tre kitinasene er gitt i figur 1.5.2.



**Figur 1.5.2.:** Domeneorganiseringen hos kitinase A, B og C hos *S. marcescens*. (Horn et al. 2006c)

Langs kløften i det aktive setet strekker det seg en serie med aromatiske residuer hos ChiA og ChiB. Disse bidrar med substratbinding i form av hydrofobe interaksjoner med

sukkerenhetene (Uchiyama et al. 2001; van Aalten et al. 2000) Disse er vist i figur 1.5.3 og funksjonen til disse hos ChiB er nærmere omtalt i kapittel 1.5.5.



**Figur 1.5.3.:** Enzym-substrat interaksjoner i ChiB. A) Overflaterrepresentasjon, som viser aromatiske sidekjerder som interagerer med (GlcNAc)<sub>5</sub>. B) Overflaterrepresentasjon av mutanten E144Q i kompleks med (GlcNAc)<sub>5</sub>. C) (GlcNAc)<sub>5</sub> og aromatiske residuer nær det katalytiske senteret. De aromatiske residuene er farget blå, den katalytiske syren Glu144 er farget grønn og (GlcNAc)<sub>5</sub> er gul. (Horn et al. 2006a).

Det er noen vesentlige forskjeller mellom de tre kitinasene. De substratbindende domenene er plassert ved C-terminalen i proteinet hos ChiB og ChiC. Dette utvider den substratbindende kløften på den siden den reduserende enden av substratet binder. ChiA har et N-terminalt domene, over den ikkereduserende enden av substratet. Dette indikerer at ChiB og ChiC degraderer kitin fra den ikkereduserende enden, mens ChiA degraderer fra den reduserende enden (Hult et al. 2005; van Aalten et al. 2000).

En annen forskjell på de tre kitinasene er topologien i det aktive setet. Både ChiA og ChiB har et  $\alpha+\beta$  domene mellom strand 7 og heliks 7. Dette danner en vegg som former en slags dyp substratbindende kløft (Perrakis et al. 1994; van Aalten et al. 2000). Denne mer lukkede strukturen til bindingssetene har ført til at det er foreslått eksoaktivitet (Perrakis et al. 1994; van Aalten et al. 2000), der enzymet degraderer substratkjedene fra en ende. Flere enzymatiske studier og strukturelle analyser av ChiB har fått resultater som tyder på eksoaktivitet (Horn et al. 2006b; Hult et al. 2005; Uchiyama et al. 2001). Studier av Sikorski et al. derimot, fremviser resultater som foreslår endoaktivitet for ChiA og ChiB mot løselig kitosan, og at den tidligere foreslåtte eksoaktiviteten skyldtes tilgjengeligheten av endene i krystallinsk kitin (Sikorski et al. 2006).

ChiC mangler dette  $\alpha+\beta$  domenet, som gjør at denne har en mer åpen substratbindende kløft enn ChiA og ChiB (Suzuki et al. 1999). Denne åpne strukturen sammenfaller med endoaktivitet, og en lignende struktur er også observert hos den antatte endokitinasen hevamin (Vanschellinga et al. 1994).

Forskjellige mekanismer mellom de tre kitinasene understøttes også av observerte synergieffekter mellom ulike kombinasjoner av enzymer ved nedbrytning av kitin (Brurberg et al. 1996; Horn et al. 2006c; Suzuki et al. 2002).

ChiB er en meget velstudert kitinase som kan benyttes som et modellenzym for bedre å forstå mekanismen for binding til og inhibering av familie 18 kitinaser. Tilgjengelig informasjon er krystallstrukturer (med og uten inhibitor og substrat) for både villtype og mutanter, kinetiske parametere for ulike substrater og bindingsdata for interaksjoner med ulike inhibitorer.

### **1.5.5 Struktur hos familie 18**

Det katalytiske domenet til glykosidaser i familie 18 består av en TIM-barrel fold (Fusetti et al. 2002; Perrakis et al. 1994; van Aalten et al. 2000; Vanschellinga et al. 1994). Den fjerde stranden har et konservert sekvensmotiv, DxxDxDxE (vanSchellinga et al. 1996) bestående av aspartatresiduer (D) og et glutamatresidu(E) som ligger mellom vilkårlige residuer(x). I

tillegg til det katalytiske domenet har de fleste enzymene også et eller flere mindre domener som antas å være involvert i substratbinding (van Aalten et al. 2000).

### **Struktur hos ChiB**

ChiB består av et katalytisk domene, som er fulgt av en linker region og et kitinbindende domene (ChBD) (van Aalten et al. 2000). Det kitinbindende domene finnes ved den C-terminale enden av enzymet og består av tre antiparallele  $\beta$ -strands som er bundet sammen med korte looper. Disse interagerer med den reduserende enden av substratet. Det katalytiske domenet i ChiB har flere insersjoner; en såkalt "support loop" som interagerer med ChBD, en "porch loop" danner en barriere som hindrer at substratet binder bortenfor subseite -3, og et  $\alpha+\beta$  domene som danner en fleksibel loop nær det aktive setet (van Aalten et al. 2000). Figur 1.5.4. viser strukturen til ChiB med de ulike domenene og insersjonene.

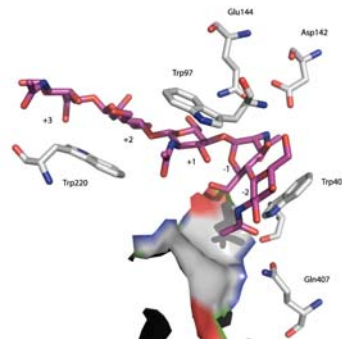


**Figur 1.5.4.:** Representasjon av strukturen til ChiB, med innsyn til den katalytiske kløften. TIM-barrel er her farget grå,  $\alpha+\beta$  domenet er gult, ChBD er grønt, linkerregionen er blå, support loopen er rosa, porch loopen er orange, den katalytiske syren Glu144 er rød og blottstilte aromatiske residuer er sorte (van Aalten et al. 2000).

Når substratet binder, inntreer flere strukturelle endringer som bidrar til bindingen. Trp97 og Trp220 nærmer seg hverandre og danner dermed en hydrofob "sandwich" med sukkerenhetene ved +1 og +2 mellom seg. Trp97 danner i tillegg en hydrogenbinding med Asp316, etter at Asp316 har rotert  $152^\circ$  rundt +1 ved substratbinding. Alle disse bevegelsene gjør at det dannes et slags "tak" over det aktive setet, og det aktive setet får form som en tunnel (van Aalten et al. 2001).

Den substratbindende kløften i ChiB binder substratet mellom -3 og +3 subsetene (van Aalten et al. 2000), men familie 18 kitinaser har en absolutt preferanse for GlcNAc i -1 subsetet. . GlcNAc i -2 subsetet vil binde sterkt, da oksygenatomet i acetamidogruppen danner en delt hydrogenbinding med Trp403 og Gln407, mens metylgruppen pakker tett i et apolart miljø, skapt av sidekjedene til Tyr292 og Ile337.

Fra det kitinbindende området og bort til det aktive setet, ligger det en sti av aromatiske residuer som dekker et område på 55 Å (van Aalten et al. 2000). Disse residuene kan danne hydrofobe interaksjoner med sukkerringene hos substratet, eller de kan danne såkalte ”stacking” interaksjoner dersom de har overlappende  $\pi$ -orbitaler. Dersom sukkerringen og den aromatiske residuen er koplanare kan  $\pi$ -elektronene til den aromatiske residuen danne flere CH-  $\pi$  interaksjoner mot sukkerringen (Nishio et al. 1998). Den gjennomsnittlige avstanden mellom de aromatiske residuene er 11Å, noe som tilsvarer lengden mellom tilsvarende atomer i første og tredje GlcNAc i en trimer. Disse aromatiske residuene er skissert i figur 1.5.3.



**Figur 1.2.9.:** ChiB fra *S. marcescens*, inaktiv mutant E144Q i kompleks med (GlcNAc)<sub>5</sub>. PDB kode 1E6N (van Aalten et al. 2001)

### ***Prosessivitet hos ChiB***

Flere studier har påvist prosessivitet hos ChiB, (Horn et al. 2006a; Horn et al. 2006b; Sorbotten et al. 2005). Innsikt i prosessiviteten er interessant, da det kan lede til mer effektive metoder for industriell enzymatisk nedbrytning av polysakkarider.



For at et enzym skal være prosessivt, så må enzymet holdes nært substratet mellom de hydrolytiske reaksjonene. Prosessiviteten hos ChiB er forsøkt forklart ved ulike mekanismer. Tidligere studier har vist at tunneltopologien i det aktive setet kan bidra til prosessiviteten (Davies & Henrissat 1995). Hos cellulaser (som også har tunnelkarakter) har mutasjoner av residuer som danner bindinger over kløften vist seg å gi reduserte tegn på prosessivitet (von Ossowski et al. 2003; Zhang et al. 2000).

Nyere studier av prosessiviteten hos ChiB har også pekt på de tidligere omtalte aromatiske residuene. Disse er observert både hos prosessive kitinaser og cellulaser. De aromatiske residuene er foreslått å bidra til en prosessiv mekanisme ved at polymerkjeden vekselvis sklir gjennom kløften og binder seg til de aromatiske residuene. Bevegelsen til substratet er et resultat av fleksibilitet i den hydrofobe overflaten – gitt av de aromatiske residuene og interaksjoner mellom substratet og løsemiddelet (Divne et al. 1998; Varrot et al. 2003). Studier av mutasjoner i de aromatiske residuene har vist reduserte tegn til prosessivitet både hos kitinaser og cellulaser (Horn et al. 2006a; Zakariassen et al. 2009; Zhou et al. 2004).

Horn et al. har utført mutasjonsstudier som omfattet residu W97A, og D316A som lukker taket over den substratbindende kløften. Kun mutasjonen W97A viste reduserte tegn på prosessivitet. W97A mutasjonen innebærer også fjerning av et aromatisk residu, og studien konkluderer med at dette er årsaken til reduksjonen av prosessivitet, og ikke tunnelstrukturen.

## 1.6 Termodynamikk og kinetikk ved protein – ligand interaksjoner.

Binding av ligander til proteiner er et universelt fenomen i alle levende organismer. Forståelsen av prosessene mellom små ligander og biologiske makromolekyler krever en komplett karakterisering av bindingsenergiene som er involvert. For en kvantitativ beskrivelse av bindingsenergiene bak de molekylære interaksjonene må de termodynamiske parameterne bestemmes. Dette inkluderer assosiasjonskonstanten ( $K_A$ ), endring i Gibbs fri energi ( $\Delta G$ ), endringen i entalpi ( $\Delta H$ ) og endringen i entropi ( $\Delta S$ ) (Perozzo et al. 2004). Nedenfor er disse parameterne beskrevet.

### 1.6.1 Assosiasjonskonstanten ( $K_A$ ) og Gibbs fri energi (G)

Den enkleste formen for protein-ligand interaksjoner er en reversibel assosiasjon mellom et protein (P) og en ligand (L), dette kan beskrives slik:



$k_a$  og  $k_d$  er hhv. assosiasjon- og dissosiasjonsraten. Benevningen for  $k_a$  er  $M^{-1}s^{-1}$  og benevningen for  $k_d$  er  $s^{-1}$ .

Affiniteten mellom et protein og en ligand kan finnes ved å måle dissosiasjonskonstanten,  $K_D$  for binding ved likevekt. Sammenhengen  $\frac{1}{K_D} = K_A$  gir assosiasjonskonstanten.

Assosiasjonskonstanten kan også uttrykkes ved hjelp av hastighetsratene  $k_a$  og  $k_d$ . En høy  $K_A$  og en lav  $K_D$  indikerer en sterk binding mellom protein og ligand.  $K_A$  uttrykkes slik:

$$K_A = \frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{k_a}{k_d} \quad (1.6.2)$$

$K_A$  har benevningen  $M^{-1}$ .

$\Delta G$ , endring i Gibbs fri energi er et mål på det termodynamiske potensialet til systemet, eller på arbeidet systemet kan utføre. Gibbs fri energi er den viktigste termodynamiske parameteren for en bindingsreaksjon - da den beskriver hvor stabilt et kompleks er.

Parameteren brukes også til å forstå sammenhengen mellom struktur og funksjon (Gomez &

Freire 1995). Forandringen i Gibbs fri energi kan uttrykkes ved hjelp av likevektskonstantene gjennom likningen:

$$\Delta G = - RT \ln K_A = RT \ln K_D \quad (1.6.3)$$

Her er R den generelle gasskonstanten ( $8,31447 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) og T er temperaturen i kelvin. Dersom  $\Delta G$  er negativ, er reaksjonen spontan. Det betyr at positiv assosiasjonskonstant gir spontan reaksjon.

Gibbs fri energi kan også uttrykkes ved hjelp av et entropisk og et entalpisk ledd, Gibbs – Helmholtz likningen:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1.6.4)$$

$\Delta H$  er endringen i entalpi (kap. 1.6.2), og  $\Delta S$  er endringen i entropi (kap. 1.6.3). Dette fører til at betydningen av endringen i entalpi og entropi er viktig for å få økt forståelse av Gibbs fri energi (Perozzo et al. 2004).

### 1.6.2 Bindingsentalpi (H)

Endring i bindingsentalpi ( $\Delta H$ ) ved protein-ligand interaksjoner representerer endringer i de ikke-kovalente interaksjonene, som hydrogenbindinger, dipol-dipol og elektrostatiske interaksjoner mellom ligand og protein relativt til de disse har med løsemiddelet. Den eksperimentelle reaksjonsentalpien er satt sammen av minst tre forskjellige bidrag (Luque & Freire 2002):

$$\Delta H_{\text{observert}} = \Delta H_{\text{intrinsic}} + \Delta H_{\text{konformasjon}} + \Delta H_{\text{protonering}} \quad (1.6.5)$$

$\Delta H_{\text{intrinsic}}$  er assosiert med interaksjonene mellom protein, ligand og løsemiddel, og er oftest det viktigste bidraget til  $\Delta H$ .  $\Delta H_{\text{intrinsic}}$  tilsvarer entalpiforandringen som ville vært observert dersom protein og ligand hadde samme konformasjon i fri og bundet tilstand.

$\Delta H_{\text{konformasjon}}$  kommer fra eventuelle endringer i konformasjonen til proteinet ved binding til ligand.  $\Delta H_{\text{protonering}}$  er eventuelle protoneringer/ deprotoneringer av komplekset ved ligandbinding.

### 1.6.3 Bindingsentropi (S)

Bindingsentropien til en reaksjon uttrykker alle andre krefter som enten virker positivt eller negativt på den frie energien til reaksjonen. Entropiforandringen,  $\Delta S$  for en bindingsreaksjon kan uttrykkes slik (Baker & Murphy 1997):

$$\Delta S_{\text{reaksjon}} = \Delta S_{\text{solivering}} + \Delta S_{\text{konformasjon}} + \Delta S_{\text{blanding}} \quad (1.6.6)$$

$\Delta S_{\text{solivering}}$  er endringen i entropi som kan observeres når vann frigjøres i en reaksjon.  $\Delta S_{\text{konformasjon}}$  tilsvarer endringen i rotasjonsfrihet hos proteinet og liganden, og eventuelt andre strukturforandringer som induseres ved ligandbinding.  $\Delta S_{\text{blanding}}$  representerer endring i entropi når det dannes et kompleks fra to molekyler som er frie i løsning.  $\Delta S_{\text{solivering}}$  er ofte det viktigste bidraget til den totale entropiforandringen.

Begravning av løsemiddeltilgjengelige overflatearealer (ASA) ved bindingen resulterer i frigjøring av løsemiddelmolekyler. Siden entropiforandringen til hydrering/ dehydrering av polare og upolare grupper er stor, medfører dette ofte en stor og positiv  $\Delta S$  (Perozzo et al. 2004). Begravning av vann inne i komplekset kan også forekomme, dette vil resultere i et negativt bidrag til  $\Delta S$  og positivt bidrag til  $\Delta H$  (Holdgate et al. 1997). En negativ  $\Delta S$  kan skyldes ulike bidrag og trenger ikke nødvendigvis skyldes økt eller uendret hydrering av overflaten. En positiv  $\Delta S$  er derimot en sterk indikator på at vannmolekyler har blitt frigjort fra kompleksets overflate (Perozzo et al. 2004).

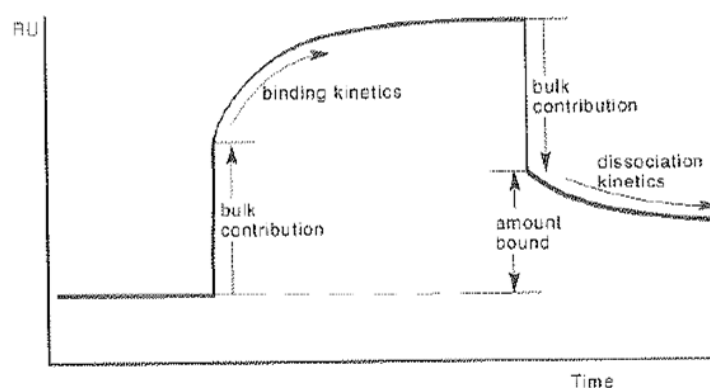
## 1.7 Overflateplasmonresonans (SPR)

Biacore 3000 fra Biacore AB er et instrument som gjør det mulig å gjøre biomolekylære interaksjonsstudier i sanntid. Teknologien som benyttes kalles overflateplasmonresonans, eller SPR (surface plasmon resonance). Proteinkonsentrasjoner ned til et par  $\text{pg}/\text{mm}^2$ , og forandringer i overflatekonsentrasjon på en tidsskala ned til 0,1 s. kan detekteres. Denne teknologien muliggjør bestemmelse av bindingsspesifisitet, kinetikk og konsentrasjon med ligander med størrelse ned til rundt 180Da. Analysemetoden blir brukt til å beskrive interaksjoner mellom små molekyler, proteiner, peptider, nukleotider, oligosakkarider, lipider og andre biomolekyler.

Interaksjonen mellom to molekyler kan studeres direkte. Dette skjer ved at den ene interaksjonsparten (liganden) kobles til overflaten, immobiliseres, på en sensorchip, og over denne injiseres en løsning med den andre interaksjonsparten (analytt).

Kort sagt består systemet av tre deler, en sensordel, et prøveleveringssystem og en sensoroverflate der liganden kan immobiliseres.

Binding av både ligand og analytt genererer en respons, og denne er proporsjonal med massen som er bundet. Den første delen av bindingssyklusen viser bindingskinetikken, og den siste delen av bindingssyklusen viser dissosiasjonskinetikken. Et "bulk-bidrag" som skyldes forskjeller i signalet mellom prøve og runningbuffer trekkes fra sensogrammet til den bindingen som er av interesse. Bindingssyklusen er skjematisert i figur 1.7.1



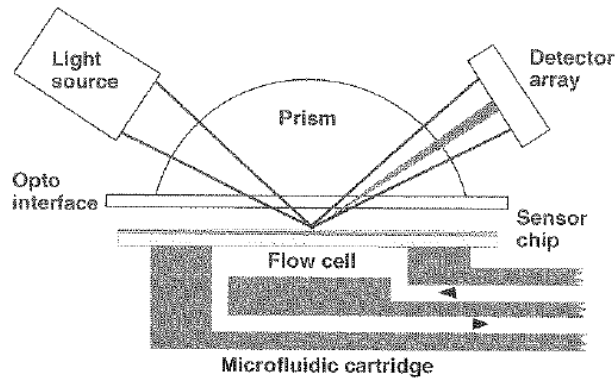
**Figur 1.7.1** Skjematisk sensogram som illustrerer binding til sensorchip (Biacore 1998).

### 1.7.1 Prinsippet med SPR

Det fysiske prinsippet som ligger til grunn for overflateplasmonresonans er brytning av lys. Lyskilden er en høyeffektiv, nær infrarød lysemitterende diode. Mediet som passerer i flowcellen har en ulik refraktiv indeks fra glasset. Refraktiv indeks er et mål på hvor fort lysbølgene går i mediet/materialet. Når lyset går fra et materiale med høy refraktiv indeks til et materiale med lavere - vil noe av lyset reflekteres tilbake. Vinkelen til lyset som reflekteres tilbake vil være lik vinkelen lyset hadde da det kom inn. Når lyset treffer et nytt materiale ved en gitt kritisk vinkel, vil alt lys reflekteres tilbake. Selv om alt lyset reflekteres tilbake, vil det elektromagnetiske feltet ”lekke” inn i det materialet som har lavere refraktiv indeks. Dette skjer i form av en såkalt ”evanescent wave”, og intensiteten til denne avtar eksponensielt med avstanden fra lyskilden. I biosensoren er overflaten mellom de to mediene med forskjellig refraktiv indeks dekket av et tynt lag gull. På overflaten av denne gullfilmen går det elektromagnetiske bølger som beveger seg parallelt med filmen. De elektromagnetiske bølgene er skapt av delokaliserte elektroner, og kalles overflateplasmoner. Når bølgevektoren til det innkommende lyset er lik bølgelengden til overflateplasmonene, vil elektronene gå i resonans – derav navnet overflateplasmonresonans. Denne overflateplasmonresonansen adsorberer energi, og reduserer intensiteten til det reflekterte lyset(Biacore 2003b).

Vinkelen der bølgevektoren til det innkommende lyset er lik bølgelengden til overflateplasmonene, kalles SPR vinkelen,  $\theta_{spr}$ . Flere faktorer påvirker denne vinkelen, blant annet bølgelengden til det innkommende lyset, type og tykkelse av overflatelaget og temperaturen. Den refraktive indeksen påvirker også vinkelen. Dersom alle disse faktorene holdes konstant, vil endringer i konsentrasjon av molekyler i overflatelaget av løsningen i kontakt med sensoroverflaten kunne detekteres.

Biacore 3000 benytter en foto-detektor array for å måle veldig små endringer i  $\theta_{spr}$ . Dette kan sees som ”dips”, og kvantifiseres i resonans-/responsenheter (RU), der 1RU tilsvarer et skift på  $10^{-4}$  grader. RU er proporsjonalt med den molekylære massen som befinner seg på overflaten (Biacore 2003b). Endring i RU kan dermed plottes som en funksjon av tiden. En skjematisk oversikt over prinsippet bak SPR er vist i figur 1.7.2. og figur 1.7.3.

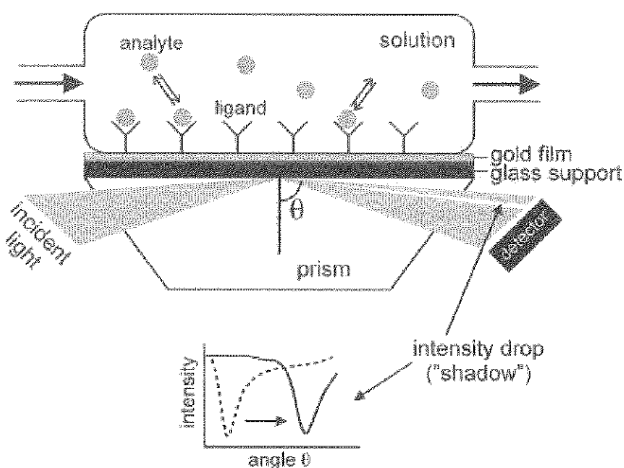


Figur 1.7.2 Det optiske systemet og flowcellen i Biacore. (Biacore 1998).

### 1.7.2 Oppbygging av instrumentet

Biacoren består av en sensordel, et prøveleveringssystem og en sensoroverflate. Sensordelen består av en lyskilde, et glassprisme som er rettet mot sensorchipen og en posisjonssensitiv diode array detektor.

Bindingsreaksjonen fører til en endring i den refraktive indeksen på overflatelaget. Dette detekteres som forandring i SPR-signal. Forandringen i refraktiv indeks for en gitt forandring i massekonsentrasjon på overflaten til sensorchipen vil være omtrent den samme for alle proteiner og peptider (Stenberg et al. 1991), mens den er noe forskjellig for glycoproteiner, lipider og nukleinsyrer.



Figur 1.7.3 Skjematisk oversikt over prinsippet bak overflateplasmonresonans (Hahnfeld et al. 2004)

### **1.7.3 Protein immobiliseringsmetoder**

Immobilisering av protein på sensorchipen kan skje ved direkte kovalent kobling, eller indirekte ved hjelp av affinitetsbinding til et kovalent bundet molekyl.

Ved direkte immobilisering bindes proteinet kovalent til sensorchipoverflaten. CM5 er den mest brukte sensorchipen. På CM5 blir liganden bundet kovalent via karboksylgruppene i overflatematriksen. Ulike funksjonelle grupper på proteinet kan benyttes til denne koblingen; NH<sub>2</sub>, SH, CHO og COOH. Det er dette som gjør det mulig å utføre interaksjonsstudier på de fleste biomolekyler som proteiner, lipider og karbohydrater.

Indirekte immobilisering skjer når proteinet bindes ikke-kovalent til et immobilisert linker-molekyl på sensoroverflaten. For at proteinet skal bindes til dette linker-molekylet, må det inneha en ”tag”. Denne taggen består ofte av seks histidinresiduer etter hverandre. Det finnes ulike linker-molekyler, anti-his antibody og NTA-Ni er to av dem, der det brukes henholdsvis CM5 og NTA sensorchip.

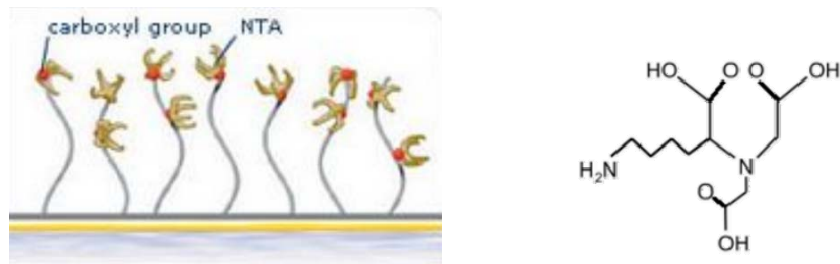
### **1.7.4 Sensorchipen**

Sensorchipen består av en glassoverflate som er dekket med et tynt lag gull. Denne gullfilmen er dekket av en kovalent bundet matriks, som er festet gjennom et forbindelseslag. Til denne matriksen immobiliseres makromolekylene. Den vanligste matriksen er et karboksymetyleret dekstranlag. Matriksen sørger for et hydrofilt miljø, som er passende for de fleste interaksjonene av biologisk interesse, og dette miljøet gir en lav grad av uspesifikk binding til overflaten. Sensorchipen er kjernen i SPR-systemet, da det er her de fysiske betingelsene genereres, og det er her interaksjonen foregår.

#### ***NTA sensorchip***

NTA sensorchipen er dekket med et lag nitrilotrieddiksyre (NTA) som benyttes til immobilisering av histidintaggede ligander via metall chelatering (Biacore 2003b). Overflatematriksen består av et karboksymetyldekstranlag, som NTA er kovalent bundet til. En nikkelløsning aktiverer sensoroverflaten, og danner et chelaterende kompleks som kan binde polyhistidin proteiner.

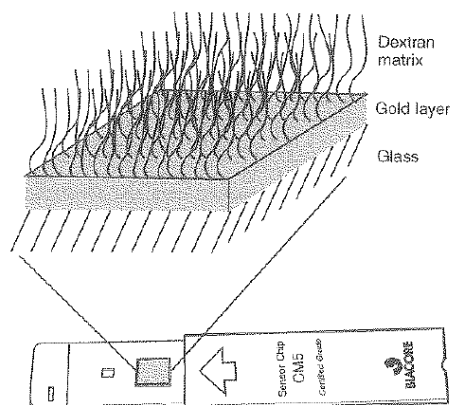




Figur 1.7.4 Skjematisk fremstilling av de reaktive gruppene på NTA sensorchipen, og NTA. (Biacore 2003b)

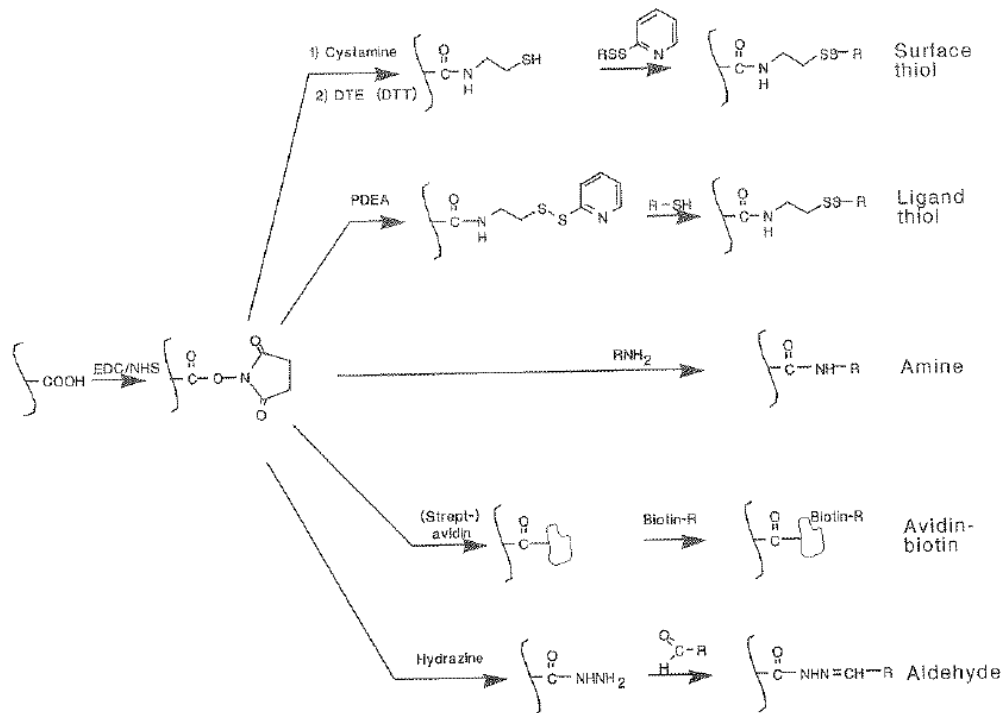
### CM5 sensorchip

Sensorchipene i CM-serien består av en matriks av et karboksymetyleret dekstranlag, med forskjellig grad av karboksymetylering, og forskjellig lengde på polymerene. Sensorchip CM5 er den mest brukte i CM-serien, og også den som ble brukt i arbeidet med denne masteroppgaven.

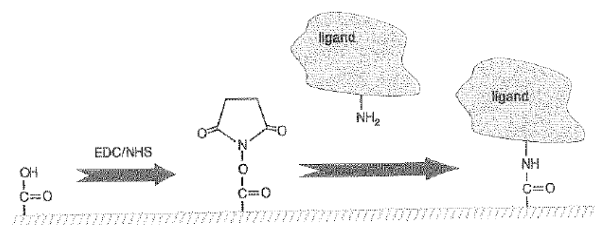


Figur 1.7.5 Skjematisk illustrasjon av strukturen til overflaten på sensorchip CM5 (Biacore 2003a).

Ligander kan immobiliseres kovalent til dekstranlaget ved hjelp av ulike kjemiske metoder, blant annet amin-, aldehyd-, og tiolkobling. Liganden kobles da ved hjelp av hhv. amin, aldehyd og tiolgrupper på molekylet (Biacore 2003b). Skjematisk oversikt over disse metodene er vist i figur 1.7.6, og aminkobling er vist spesifikt i figur 1.7.7.



**Figur 1.7.6** Skjematisk oversikt over godkjente kjemiske metoder for å immobilisere biomolekyler til CM sensorchip (Biacore 1998).



**Figur 1.7.7** Aminkobling av ligand til sensorchipoverflate (Biacore 2003a).

Empiriske målinger har vist at for en standard CM5 sensorchip vil binding av 1ng/mm<sup>2</sup> protein til overflaten gi en respons på omtrent 1000RU (Stenberg et al. 1991).

### 1.7.5 Resonanssignalet

Det er kun mulig å studere systemer som gir et utslag ned mot 10RU, dette betyr at molekyler ned til 200Da ved mindre enn 1nM kan studeres (Biacore 1998). Maksimal teoretisk endring i resonanssignal ved binding av analytt til ligand kan uttrykkes ved følgende ligning:

$$RU_{\max} = \frac{MW_A}{MW_L} \times RU_{\text{apl}} \times S_{\frac{A}{L}} \quad (1.7.1)$$

$MW_A$  og  $MW_L$  er molekylvekten til hhv. analytt og ligand.  $RU_{\text{apl}}$  er mengde applisert ligand, og  $S_{\frac{A}{L}}$  er bindingsstøkiometrien. Denne likningen brukes blant annet til å gi informasjon om hvor mye protein som må immobiliseres for å få maksimal teoretisk endring i resonanssignal.

### 1.7.6 Begrensninger ved SPR

Begrensningen ved bruk av SPR er hovedsaklig at immobilisering av liganden kan føre til at den biologiske funksjonen går tapt. Immobiliseringen kan føre til at liganden endrer egenskaper, og resultatene kan dermed bli annerledes enn om liganden hadde vært i løsning. Det er ikke mulig å studere molekyler med for lav molekylvekt, grensen går ved ca 200Da. Det er heller ikke mulig å studere faste eller fargede stoffer.

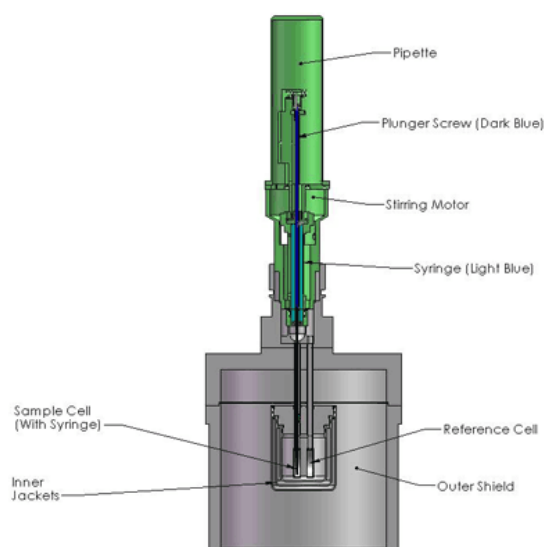
Likevektskonstanten,  $K_d$  bestemmes ut fra et Langmuirplott av spr-data, og ut fra dette kan  $\Delta G$  beregnes direkte ved hjelp av likning 1.3.3.  $\Delta H$ , og dermed også  $\Delta S$  bestemmes ut fra temperaturavhengigheten. Dette gir en større usikkerhet i verdiene i forhold til kalorimetrieforsøk, der  $\Delta H$  måles direkte (Horn et al. 2001). Men dersom forsøkene utføres korrekt vil dataene i stor grad være i overensstemmelse med data fra ITC forsøk (Day et al. 2002).

## 1.8 Isotermisk titreringskalorimetri (ITC)

Ultrasensitiv isotermisk titreringskalorimetri (ITC) benyttes til å detektere svært små varmeendringer assosiert med bindingsreaksjoner. Nærmest alle molekylære interaksjoner absorberer eller genererer varme, og ITC er derfor en av de beste og mest presise instrumentene for å studere slike interaksjoner (Cliff et al. 2004). Fra et enkelt ITC forsøk får man direkte  $\Delta H$  og  $K$ , og dermed også  $\Delta G$  og  $\Delta S$ , i tillegg til bindingsstøkiometrien  $n$ .

### 1.8.1 Oppbygging av ITC-instrumentet

En skjematisk skisse av hvordan instrumentet er bygd opp, er vist i figur 1.8.1. Bindingsprosessene foregår i prøvecellen, og temperaturen her blir kontinuerlig sammenlignet med temperaturen i den identiske referansecellen - som kun inneholder vann. Rundt cellene er det et varmeskjold som holder samme temperatur som cellene, dette for å hindre varmeutveksling mellom cellene. Cellene dekkkes også av et ytre varmeskjold - som skal kompensere for eventuelle temperaturforandringer i romtemperaturen. Under forsøket tilføres en liten mengde energi til en "heater" ved referansecellen. Energien som tilføres prøvecellen justeres kontinuerlig slik at de to cellene hele tiden har identisk temperatur. For eksempel vil varmeutvekslingen ved en eksoterm reaksjon kunne bestemmes nøyaktig, da den er identisk med reduksjonen av tilført energi til prøvecellen.



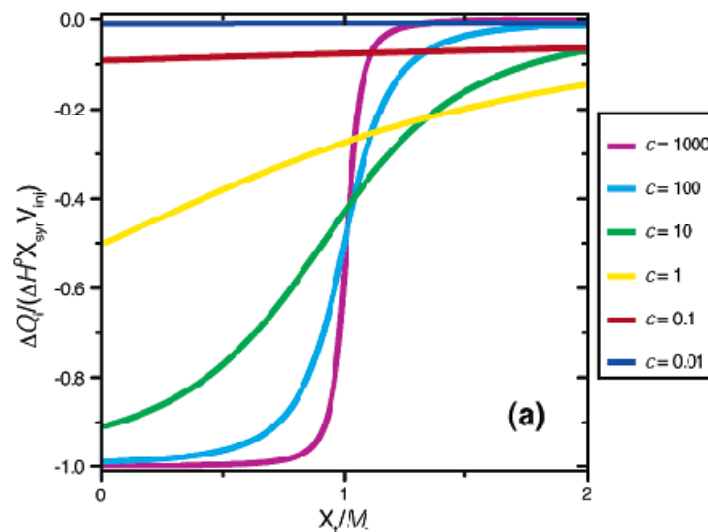
Figur 1.8.1 Skjematisk skisse av et VP-ITC instrument(MicroCal).

### 1.8.2 c-verdien

ITC- instrumentet injiserer titranten (ligand) til prøvecellen, som er fylt med proteinløsning. Injiseringen er datastyrt, og skjer gjennom en sprøyte. Ved hver injeksjon registreres en varmeutveksling i kcal/mol, og denne plottes mot den molare ratioen mellom ligand og protein.  $\Delta G$  og  $K$  kan dermed beregnes ut i fra formen på kurven som dannes. Formen på kurven avhenger av parameteren  $c$ , som er produktet av assosiasjonskonstanten  $K_A$  og proteinkonsentrasjonen  $[P]$ .

$$c = K_A \times [P] \quad (1.8.1)$$

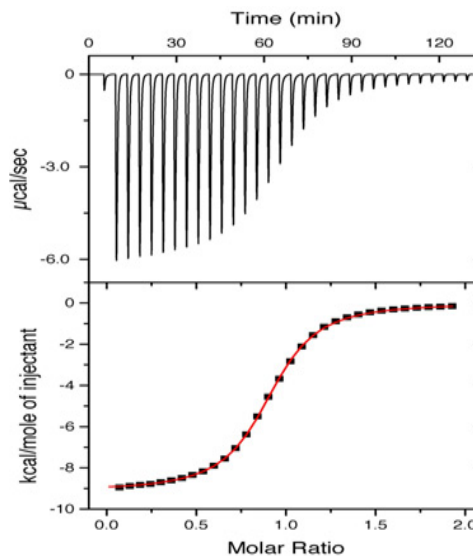
$c$ -verdien bør ligge mellom 10 og 1000 (Wiseman et al. 1989), da vil metning av proteinet oppnås ved bare 2 ekvivalenter av liganden (figur 1.8.2). Lavere  $c$ -verdier vil gi større usikkerhet ved beregning av  $K_A$  dersom det bare tilsettes to til tre ganger overskudd av ligand i forhold til protein. Det kan være mulig å studere lavaffinitetssystemer med  $c$ -verdier ned til 0,001 (Turnbull & Daranas 2003). Da må bindingsstøkiometrien være kjent, og konsentrasjonen til ligand og reseptor må være nøyaktige, og titrering av ligand må skje i 30 til 50 ganger overskudd i forhold til proteinet.



**Figur 1.8.2** Formen på titeringskurven varierer med  $c$ -verdien (Turnbull & Daranas 2003).

### 1.8.3 Termogram og isotherm

Et typisk termogram og isotherm fra et ITC forsøk er vist i figur 1.8.3. Termogrammet gir en oversikt over varmemeforandringene underveis i bindingsreaksjonen. Summen av alle varmemeforandringene gir  $\Delta H$ , og  $\Delta S$  kan da regnes ut ved hjelp av likning 1.6.4.  $\Delta H$  fås fra et enkelt forsøk, i motsetning til van't Hoff's analyse, hvor det må utføres flere forsøk ved ulike temperaturer for å finne entalpiendringen.



Figur 1.8.3 Et typisk ITC-dataplott (Avacta)

### 1.8.4 Begrensninger ved ITC

Hovedproblemet med ITC er at det går med *mye* biologisk materiale. Eksperimenter utført ved arbeid med denne masteroppgaven har krevd proteinkonsentrasjon rundt 20  $\mu\text{M}$ , og et volum på  $\sim 1,8$  mL. Reaksjoner med lav  $\Delta H$  kan være vanskelige å utføre, og kreve ekstra mye biologisk materiale, dette fordi den lave varmeutviklingen gjør at man trenger mer materiale for å få nok varmeutslag til å kunne detektere det. Entalpiendringene som måles ved ITC er globale egenskaper til hele systemet. Det vil si at det er den totale varmen som blir frigjort eller tatt opp i prøvecellen under bindingsreaksjonen som måles, og denne inneholder bidrag fra ikke-spesifikke faktorer. ITC teknikken gir heller ikke mulighet for å bestemme hastighetskonstanter og aktiviseringsparametere for bindingsreaksjoner.

### **1.9 Mål med oppgaven.**

Målet med oppgaven er å sammenligne bruk av overflateplasmonresonans og isotermisk titreringskalorimetri til å studere interaksjoner mellom ChiB og ulike KOS.

Det er ønskelig å kartlegge bindingsenergiene til de ulike subsetene hos ChiB, da dette vil gi nyttig informasjon om hvilke subseter som er viktige ved binding av substrat, som igjen kan utnyttes for eksempel ved design av inhibitorer for kitinaser. Det er tidligere gjort bindingsforsøk med (GlcNAc)<sub>5</sub> og (GlcNAc)<sub>6</sub> (Norberg et al. 2010), slik at ytterligere forsøk med (GlcNAc)<sub>4</sub> og (GlcNAc)<sub>3</sub> vil muliggjøre bestemmelsen av bindingsenergiene for de individuelle subsetene.

Videre er det ønskelig å bestemme hastighetskonstantene for substratassosiasjon ( $k_a$ ) og substratdissosiasjon ( $k_d$ ) for å oppnå en bedre forståelse av ligandbindingsmekanismen til ChiB.

Om mulig skal også aktiveringsenergien til assosiasjons- og dissosiasjonsreaksjonene bestemmes for å kunne kartlegge mest mulig av energioverføringene for reaksjonskoordinaten til katalysen av KOS hydrolyse katalysert av ChiB.

## 2. Materialer

I dette kapittelet blir alt utstyr og kjemikalier som har blitt brukt under arbeid med denne masteroppgaven nevnt.

### 2.1 Laboratorieutstyr

<u>Laboratorieutstyr</u>		<u>Leverandør</u>
<b>Autoklav</b>	A-4050	One-Med
<b>Automatpipetter</b>	Finnpipette	Thermo Labsystems
<b>Avtrekkskap</b>		Waldner
<b>Dialyseutstyr</b>		Spectrum Laboratories
<b>Elektroforeseutstyr</b>	SDS-PAGE	Bio-Rad
<b>Eppendorfrør</b>	1,5 mL standard	Axygen
<b>Falconrør</b>		Nunc™
<b>Fluorometer</b>	Qubit™	Invitrogen
<b>Gelavbildingsutstyr</b>		Bio-Rad
<b>Glassutstyr</b>	Diverse	Scott Duran
<b>Kolonne</b>	Diameter 1 cm	BioRad
<b>Kolonne kontrollenhet; pumpe og UV-måler</b>	Bio Logic	BioRad
<b>Kolonne kontrollenhet; tilhørende software</b>	LP Dataview	BioRad
<b>Magnetrorer</b>	Standard unit	Labworld
<b>NAP-5™ kolonne</b>	Sephadex™ G-25 DNA Grade	Amersham Biosciences
<b>Oppkonsentreringsrør</b>	Amicon Ultra, Porestørrelse 10 kDa MWCO	Sigma-Aldrich
<b>pH-meter</b>	MP 220	Mettler Toledo
<b>Pipettespisser</b>	10 µL – 5 mL	VWR
<b>Risteinkubator</b>		HT Infors
<b>Sentrifuge</b>	Multifuge 3 S-R	Heraeus
<b>Sentrifuge</b>	Avanti J-25	Beckman Coulter
<b>Sonikator</b>	Vibracell	Sonics
<b>Spektrofotometer</b>	CO 8000 Cell Density Meter	WPA biowave



SPR sensorchip	CM5	Biacore
SPR Sensorchip	NTA	Biacore
SPR-deteksjonssystem:	Biacore 3000	Biacore
Sprøyte, plastipak	30 mL	DB
Sterilfilter, til vakuum	0,22 µm, Steritop 250 mL	Millipore
Sterilskap	AV-100	Telstar
Vekt, fin	CP224	Sartorius
Vekt, grov	LC621P	Sartorius
Vekt, mikro	CP2 P	Sartorius
Vortex	Yelowline, TTS 2	IKA
VP-ITC Kalorimeter		Microcal

## 2.2 Kjemikalier

Alt vann som har blitt brukt var av Milli-Q kvalitet, og står betegnet som destillert vann, dH<sub>2</sub>O.

<u>Kjemikalium</u>	<u>Leverandør</u>
Ampicillin, natriumsalt, C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>4</sub> S	Sigma
Bacto™ Tryptone	BD
Bacto™ Yeast Extract	BD
Comassie Brilliant Blue R250	Sigma
di-Kaliumhydrogenfosfat K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Applichem
di-Natriumhydrogenfosfat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck
Eddiksyre, (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> )	Prolabo
Etanol (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	Fluka
Etylendiamintetraeddiksyre, [CH <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> (EDTA)	J. Baker
Glycerol (C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> )	Merck
Glycin (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )	Merck
Heksa-N-Acetylkitohexaose	Seikagaku Corporation
HEPES (C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S)	Sigma
Hydrogenklorid, HCl	Merck
Imidazole (C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> )	Sigma
Isopropyl-1-thio-β-D-thiogalacopyranoside (IPTG), C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub> S	Sigma

<b>Kaliumdihydrogenfosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	Applichem
<b>Magnesiumklorid, MgCl<sub>2</sub></b>	Sigma (-Aldrich)
<b>Metanol (CH<sub>3</sub>OH)</b>	Merck
<b>Natriumdihydrogenfosfat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	Merck
<b>Natriumhydroksid (NaOH)</b>	Merck
<b>Natriumklorid, NaCl</b>	VWR
<b>Nikkelklorid (NiCl<sub>2</sub>)</b>	Sigma
<b>Nikkelsulfat (NiSO<sub>4</sub>)</b>	Sigma
<b>Ni-NTA Superflow pakkemateriale</b>	Qiagen
<b>Penta-N-Acetylkitopentaose</b>	Seikagaku Corporation
<b>Phenylmetylsulfonyl fluorid (PMSF)</b>	Sigma
<b>Saltsyre (HCl)</b>	Riedel-del-Haen
<b>Sitronsyre, (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>)</b>	Sigma
<b>Sukrose, (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>)</b>	VWR
<b>Tetra-N-Acetylkitotetraose</b>	Seikagaku Corporation
<b>Tri-N-Acetylkitotriose</b>	Seikagaku Corporation
<b>Trizma Base</b>	Sigma

### 2.3 Proteiner, peptider og enzymer

<b><u>Protein/Enzym</u></b>	<b><u>Leverandør</u></b>
<b>-80 °C frysestokk</b>	Anne Line Norberg
<b>Anti His Tag Protein</b>	CALBIOCHEM
<b>His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q</b>	Anne Line Norberg
<b>Proteinstandard, Bench Mark Ladder</b>	Invitrogen

## 2.4 Kit/ system

<u>Kit/ System</u>	<u>Komponenter</u>	<u>Leverandør</u>
<b>Amin Coupling Kit</b>	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) N-hydroxysuccinimide (NHS) Etanolamin- HCl	Biacore
<b>BIAmaintenance kit</b>	BIAdesorb solution1 (0,5% (w/v) sodium dodecyl sulfat) BIAdesorb solution2 (50mM glycine pH 9,5) BIAdisinfektant solution (fortynnet natrium hypoklorite)	Biacore
<b>NuPAGE elektroforesesystem</b>	NuPAGE LDS Sample Buffer NuPAGE MOPS SDS Running Buffer NuPAGE Novex Bis-Tris Mini Gels NuPAGE Sample Reducing Agent	Invitrogen
<b>Quant-iT™ Protein Assay Kit</b>	Protein reagent Protein buffer Protein standard (0 ng/μL, 200 ng/μ, 400 ng/μ )	Invitrogen

## 3. Metoder

### 3.1 Tillaging av His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q

#### 3.1.1 Vekst av bakterier

##### Materiale:

Ampicillin, 50 mg/mL

-80 °C frysestokk

LB- medium: 10 g Trypton

5 g Gjærekstrakt

10 g NaCl

1 L dH<sub>2</sub>O

IPTG (Isopropyl-1-thio-β-D-thiogalacopyranoside), 1M

##### Fremgangsmåte

5 mL LB-medium ble tilsatt 50 µg/mL ampicillin. Mediet ble deretter inokulert med bakteriestammen som skulle dyrkes opp (fra -80 °C frysestokk). Bakteriestammen er E-coli bakterier med His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q fra *S. marcescens*. Kulturen ble inkubert ved 37 °C og 225 rpm over natten. Deretter ble forkulturen overført til en erlenmeyerkolbe med 0,5 L LB-medium med 50 µg/mL ampicillin. Dette ble så inkubert videre under samme betingelser til celletettheten nådde 0,6 AU ved 600nm. Deretter ble cellene indusert med 200 µL 1M IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) og så inkubert i ytterligere 4 timer under samme betingelser. Det ble arbeidet i sterilskap, og benyttet autoklavert medium og utstyr.

#### 3.1.2 Tillaging av periplasmatisk ekstrakt

Chitinase B transporteres til periplasmaet i bakteriecellene (Brurberg et al. 1995). Proteiner i periplasmatisk ekstrakt kan utvinnes fra cellen ved hjelp av osmotisk sjokk (Manoil & Beckwith 1986). Dette kan oppnås ved først å tilsette en løsning som øker gjennomtrengeligheten til cellene, og deretter tilsette magnesiumklorid som fører til frigjøring av komponentene i det periplasmatiske rommet.

Materiale:1M MgCl<sub>2</sub>

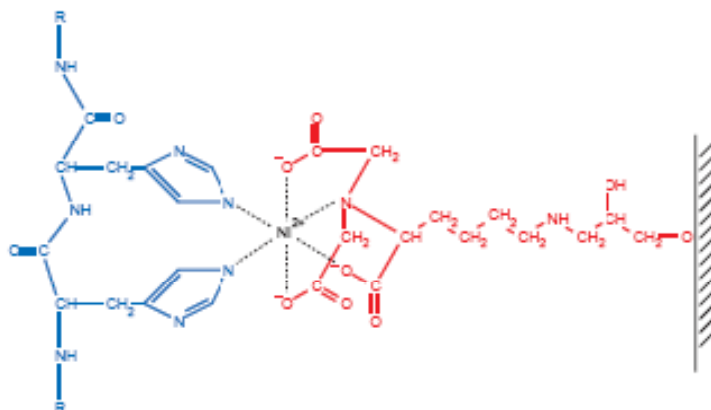
Spheroplastbuffer: 20mL 1M Tris/HCl, pH 8,0  
34,2 g Sukrose  
200 µL 0,5M EDTA, pH 8,0  
400µL PMSF  
Fylles opp til 200 mL med dH<sub>2</sub>O

Fremgangsmåte

Bakteriekulturen fra hver erlenmeyerkolbe ble fordelt på 500 mL sentrifugerør, og sentrifugert i en JA-14 rotor ved 8000 rpm, 4 °C, i 10 minutter. Supernatanten ble dekantert av, og pelleten i hver av sentrifugerørene ble resuspendert ved hjelp av en glasstav og en 30 mL sprøyte i 40 mL iskald spheroplastbuffer. Blandingen ble avkjølt på is i 5 minutter, deretter ble alt helt i ett sentrifugerør og sentrifugert under samme betingelser som tidligere. Supernatanten ble igjen helt av. Pelleten ble spredt utover bunnen av sentrifugeflasken, og varmet til romtemperatur. Deretter ble pelleten resuspendert i iskaldt sterilt vann. Blandingen ble tilsatt 200 µL 1M MgCl<sub>2</sub>, og sentrifugert på ny under samme betingelser som tidligere. Supernatanten ble filtrert med et 0,22 µm sterilfilter.

**3.1.3 Rensing av His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q**

Det periplasmatiske ekstraktet ble rensert ved hjelp av ”immobilisert metallaffinitetskromatografi” (IMAC) med Ni-NTA Superflow pakkemateriale. Ni-NTA består av nitriloeddiksyre (NTA), en chelaterende absorbent, og et nikkellion med seks bindingssteder. Fire av bindingssetene okkuperes av NTA, og to er ledige til interaksjoner med his-taggede proteiner. Det ledige elektronparet i histidingruppen kan binde til nikkellionene, se figur 3.1.1.



**Figur 3.1.1:** Interaksjon mellom histidinresiduer og Ni-NTA-matriks (QIAGEN 2003).

Proteinet ble eluert ut av kolonnen ved tilsats av en buffer med høy imidazole konsentrasjon. Imidazole utkonkurrerer da his-tagget protein.

### Materialer

Ni- NTA Superflow pakkemateriale

Bindingsbuffer        20 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM Imidazole, 0,5 M NaCl

Vaskebuffer            20 mM Tris-HCl pH 8, 60 mM Imidazole, 0,5 M NaCl

Elueringsbuffer        20 mM Tris-HCl pH 8, 1 M Imidazole, 0,5 M NaCl

20 % etanol

Periplasmatisk ekstrakt med His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q

### Fremgangsmåte

Kolonnen ble lagd med 2 mL Ni-NTA Superflow pakkemateriale. Kolonnen ble vasket med bindingsbuffer, 6 ganger kolonnevolumet. Det ble benyttet en gjennomstrømning på 2,5 mL/min. 50 mL av det periplasmatiske ekstraktet ble så påført kolonnen, og deretter ble bindingsbuffer tilført til baselinjen ble stabil. Elueringsbuffer ble tilført, og eluert materiale ble samlet opp. Dette ble gjentatt til alt periplasmatisk ekstrakt var renset. Etter bruk ble systemet vasket med etanol.

### **3.1.4 SDS- Polyakrylamid Gel Elektroforese (SDS- PAGE)**

Etter at proteinene var ferdig renset, ble renheten kontrollert ved hjelp av SDS-PAGE gel elektroforese. Proteinene denatureres og separeres etter molekylvekt. Proteinene blir

denaturert under varmebehandling med den negativt ladede detergenten sodium dodecyl sulfat (SDS) og 2- $\beta$ -mercaptoethanol. 2- $\beta$ -mercaptoethanol reduserer disulfidbroene i proteinet. SDS binder seg til denaturerte polypeptider. Peptidene blir derfor negativt ladet slik at de vil vandre gjennom polyakrylamidgelen mot anoden. Mengden av SDS som binder til peptidkjeden er tilnærmet proporsjonal med polypeptidets molekylvekt, og er uavhengig av sekvensen. SDS-peptidkompleksenes vandring gjennom gelen blir derfor størrelsesavhengig. Ved å bruke markører med kjent molekylvekt kan polypeptidkjedens molekylvekt beregnes.

#### Materialer

NuPAGE LDS Sample Buffer

NuPAGE MOPS SDS Running Buffer

NuPAGE Novex Bis-Tris Mini Gels

NuPAGE Sample Reducing Agent

Bench Mark Ladder

Renset proteinløsning

Protein fargeløsning 0,25 g Coomassie Brilliant Blue R250

125 mL metanol

25 mL eddiksyre

100 mL dH<sub>2</sub>O

Avfargingsløsning 50 mL metanol

50 mL eddiksyre

400 mL dH<sub>2</sub>O

#### Fremgangsmåte

Novex Bis-Tris Mini Gels ble montert i et elektroforesekammer med MOPS running buffer. Prøvene med rensert proteinløsning ble forberedt ved å blande 19,5  $\mu$ L proteinløsning, 7,5  $\mu$ L prøvebuffer og 3  $\mu$ L reduserende agent. Blandingen ble satt på vannbad ved 70 °C i 10 minutter, og deretter ble prøvene applisert i brønnene i gelen. En proteinmolekylvektstandard ble tilsatt en av brønnene. Elektroforesen ble utført ved 200 Volt i 55 minutter. Gelen ble deretter dekt med fargeløsning og satt til risting i 30 minutter. Gelen ble så skylt tre ganger i dH<sub>2</sub>O, og deretter dekt med avfargingsløsning. Denne ble byttet to ganger den første timen, deretter fikk gelen stå i avfargingsløsning over natten. Dagen etter ble det tatt bilde av gelen.





## 3.2 Bindingsstudier på Biacore 3000

### 3.2.1 Generell bruk av instrumentet Biacore 3000

På Biacore 3000 er det fire flowceller. Disse ble brukt to og to, den ene som referansecelle og den andre som prøvecelle. Årsaken til at man benytter referansecelle, er at denne gjør at man kan kompensere for bulkeeffekt, og ikke-spesifikk binding til sensorchipen.

Alle sensorchiper ble oppbevart i kjøleskap ved 4 °C. Før bruk ble de varmet opp til romtemperatur i 30 minutter, for å hindre kondensering av vanndamp på chipen. De brukte sensorchipene ble oppbevart i 50 mL Falconrør - i den aktuelle runningbufferen. Alle buffere som ble brukt ble først filtrert med 0,22 µm sterilfilter, og deretter avgasset før bruk.

For å installere en chip i Biacoresystemet, ble kommandoen "dock" brukt. Deretter valgte man kommandoen "prime", som skyller sensorchipen og flowsystemet med runningbuffer. Denne kommandoen ble også brukt hver gang buffer ble byttet. For å injisere protein og reagenser, ble kommandoen "inject" benyttet. Flowen til prøveløsninger ble satt til 5 - 20 µL/min, med et prøveforbruk på det injiserte volumet + 30 µL. Ved kinetikkmålinger ble programmet "kinject" valgt.

På slutten av hver dag ble instrumentet satt i standbymodus, dette for å opprettholde buffergjennomstrømningen til IFC-enheten og flowcellene.

En gang i måneden ble programmene desorb og sanitize gjennomført. Desorbprogrammet benytter BIAdisinfecant (1 og 2) til å fjerne adsorberte proteiner fra autosampler og IFC-enheten. Sanitizeprogrammet sørger for at pumpene, IFC-enheten og autosampler renses for mikroorgansimer, og her blir Biadesorbløsninger brukt.

### 3.2.2 NTA Sensorchip

NTA sensorchipen har en overflatematriks bestående av et karboksymetyldekstranlag som NTA (nitrilotrilacetic syre) er kovalent bundet til. For å aktivere sensoroverflaten tilsettes en nikkelløsning, som danner et chelaterende kompleks med NTA som kan binde polyhistidin proteiner (interaksjonene mellom histidinresiduene i proteinet og NTA-Ni-matriksen kan sees i figur 3.1.1.). Det er viktig å tilsette nok nikkel slik at NTA gruppene blir mest mulig mettet, og bindingskapasiteten for his-tagget protein kan utnyttes best mulig.

Overflaten kan regenereres med en EDTA løsning, som vil chelatere nikkel og frigjøre proteinet fra sensoroverflaten. De andre bufferne inneholder også EDTA i lave konsentrasjoner, for å nøytralisere eventuelle kontaminerende metallioner som kan være tilstede i bufferløsningene. EDTA konsentrasjonen er ikke høy nok til å frigjøre nikkel fra sensoroverflaten.

#### ***Immobilisering av his-tagget protein til NTA-Ni sensorchip***

##### Materiale

NTA sensorchip

Runningbuffer: 10mM HEPES, 50 $\mu$ M EDTA, pH 7,4

Dispensasjonsbuffer: 10 mM HEPES, 3mM EDTA

Regenereringsbuffer: 10 mM HEPES, 0,35 M EDTA, pH 7,4

500 $\mu$ M NiCl<sub>2</sub> i 10 mM HEPES

His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q

##### Fremgangsmåte

20  $\mu$ L regenereringsbuffer ble tilsatt med en gjennomstrømning på 20  $\mu$ L/min for å fjerne eventuelle kontaminerende metallioner i Biacore systemet. Sensorchipen ble aktivert ved å sette på 20  $\mu$ L nikkelløsning til prøveflowcellen med en gjennomstrømning på 20  $\mu$ L/min. Etter aktiveringen ble proteinet satt til prøve- og referansecellen i temperaturområdet 6-36 °C. Proteinets var løst i runningbuffer, og hadde en konsentrasjon på 0,1 mg/mL. For å regenerere sensorchipen ble 30  $\mu$ L regenereringsbuffer tilsatt med en gjennomstrømning på 10  $\mu$ L/min.

### 3.2.3 Protein – ligand bindingsforsøk på NTA sensorchip

Protein ble immobilisert som beskrevet i kapittel 3.2.2.

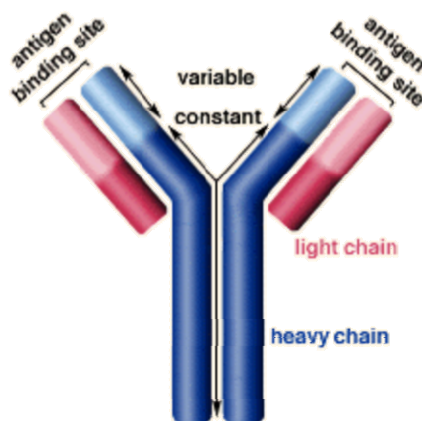
Det ble utført bindingsforsøk mellom His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q (GlcNAc)<sub>3</sub>, (GlcNAc)<sub>4</sub>, (GlcNAc)<sub>5</sub> og (GlcNAc)<sub>6</sub>. Det ble da kjørt konsentrasjonsserier på 0,1 -10 \* K<sub>D</sub> for hvert substrat.

Bindingsforsøkene ble utført i temperaturområdet 6-36 °C, 6 temperaturer ble valgt.

### 3.2.4 CM5 Sensorchip

#### *Anti-his antibody*

Antibody, også kalt immunoglobuliner er proteiner som produseres av plasmaceller og utgjør en del av vårt immunsystem. Antibodiene er bygd opp av enheter bestående av fire polypeptidkjeder, to tunge og to lette. Polypeptidkjedene utgjør et Y-formet molekyl (bilde). Den variable regionen er merket V, det er her antigener binder til antibodyene, og det er også her den store variasjonen finnes. Anti-his antibody binder histidinresiduen i his-taggede proteiner i dette området, med høy affinitet. Antibodiene immobiliseres ved hjelp av aminkobling.

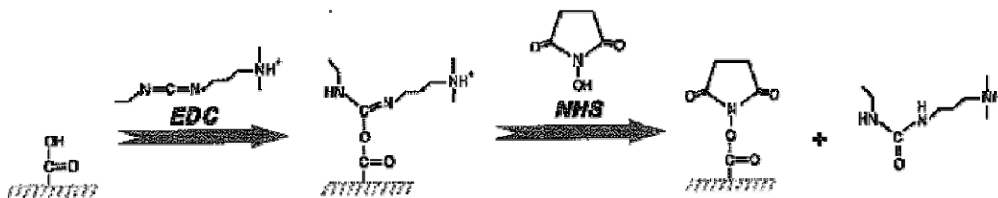


**Figur 3.2.1** Strukturen til et antibodymolekyl. (<http://www.biology.arizona.edu> 2000).

#### *Immobilisering av anti-his antibodyer ved aminkobling*

Amingruppene på overflaten av antibodyen vil kunne danne aminbindinger med karboksylgruppene på overflaten av CM5 sensorchipen. Første trinn i immobiliseringsprosedyren er å aktivere karboksylgruppene. Dette gjøres med en blanding av N-hydroksysuccinimid (NHS) og 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)-karbodiimid (EDC), dette

for å gi reaktive succinimidestere. Succinimidestere reagerer spontant med amingruppene på antibodyen.



Figur 3.2.2 Aktivering av karboksymetyldexstran med EDC/NHS (Biacore 2003b).

### Materialer

CM5 Sensorchip

0,4 M EDC i dH<sub>2</sub>O

0,1 M NHS i dH<sub>2</sub>O

1,0 M etanolamin-HCl, pH 8,5

Anti-his antibody

Runningbuffer: 20mM NaP<sub>i</sub>, 0,15 M NaCl, pH 8,0

Immobiliseringsbuffer: 10mM citratfosfat, pH 5,0

### Fremgangsmåte

40 µL NHS og EDC i 1:1 forhold ble satt til prøveflowcellen med en gjennomstrømning på 5 µL/min. Antibodiene ble avsaltet gjennom dialyse. De ble deretter fortynnet i immobiliseringsbuffer til endelig konsentrasjon på omlag 30 µg/mL. Antibodiene ble tilsatt cellen med en gjennomstrømning på 5 µL/min ved 25 °C til metning ble observert. Etter immobilisering ble 40 µL etanolamin satt til med en gjennomstrømning på 5 µL/min. Dette for å deaktivere et mulig overskudd av reaktive grupper.

### ***Immobilisering av his-tagget protein til anti-his antibody***

#### Materialer

Runningbuffer: 20mM NaP<sub>i</sub>, 0,15 M NaCl, pH 8,0

His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q

### Fremgangsmåte

Proteinet ble fortynnet i runningbuffer til en sluttkonsentrasjon på 0,1 mg/mL. Det ble deretter tilsatt prøvecellen med en gjennomstrømning på 5  $\mu$ L/min. Det ble også forsøkt å regenerere antibodiene for protein. Regenerering av antibodiene, fjerning av bundet protein, ble utført med 100  $\mu$ L, 10mM glycinløsning ved pH 1,5.

### **3.2.5 Protein - ligand bindingsforsøk på CM5 sensorchip**

Protein ble immobilisert som beskrevet i kapittel 3.2.4.

Det ble utført bindingsforsøk mellom His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q og (GlcNAc)<sub>6</sub>. Det ble da kjørt konsentrasjonsserier på 0,1 -10 \* K<sub>D</sub> for (GlcNAc)<sub>6</sub>.

### 3.3 Isotermisk titeringskalorimetri (ITC)

Kalorimetrieforsøkene ble utført på et VP-ITC kalorimeter fra MicroCal, dette instrumentet er beskrevet nærmere av Wiseman et al (Wiseman et al. 1989).

#### Materiale

20 mM Kaliumfosfatbuffer, pH 8	87,09 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 0,5L dH <sub>2</sub> O	47mL
	+ 68,04 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 0,5L dH <sub>2</sub> O	3mL
	+ dH <sub>2</sub> O	450mL
	Fortynnes 1:10, og filtreres 0,22µm	

His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q

(GlcNAc)<sub>3</sub>, 7mM

(GlcNAc)<sub>4</sub>, 400µM

(GlcNAc)<sub>6</sub>, 250µM

#### Fremgangsmåte

Før og etter hvert forsøk ble prøvecellen skyllet 4-5 ganger med dH<sub>2</sub>O, og jevnlig ble også prøvecellen vasket med 0,1M NaOH.

1,8mL proteinløsning ble injisert i prøvecellen. Liganden ble injisert med 8 µL gjennom den roterende injeksjonssprøyta. Proteinkonsentrasjonen var 21 µM for forsøk med (GlcNAc)<sub>3</sub>, og (GlcNAc)<sub>4</sub>, og 15 µM for forsøk med (GlcNAc)<sub>6</sub>. Det ble satt på ligand til proteinet var mettet, omtrent etter 20-25 injeksjoner. Hver forsøksserie bestod av 2-3 paralleller ved 18 °C.

Data fra den første injeksjonen ble fjernet, da det ofte skjer en blanding mellom protein og ligandløsningen under ekvibreringstiden ved første injeksjon. Den endelige analysen av dataene ble utført med ORIGIN 7.0, standard 1:1 bindingsmodell ble brukt til å tilpasse dataene.

## 4. Resultater

### 4.1 Tillaging av His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q

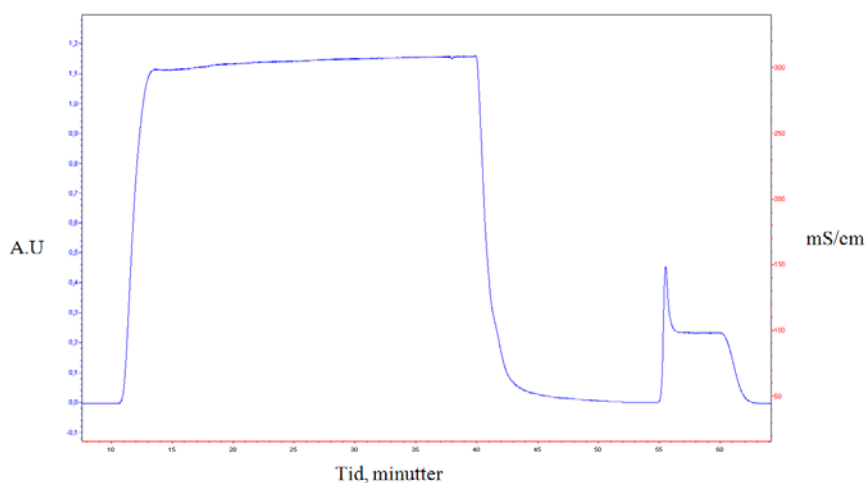
For å gjøre bindingsstudier på ITC kreves det mye protein, det ble derfor brukt mye tid på å dyrke og rense frem His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q.

#### 4.1.1 Tillaging av periplasmatisk ekstrakt

Tillaging av periplasmatisk ekstrakt var vellykket. Men et problem som oppstod underveis var utfelling av protein. Dette skjedde straks periplasmatisk ekstrakt var tillagd, og fortsatte selv etter gjentatt rensing, filtrering, og fortynning. Det ble forsøkt å finne en forklaring på utfellingen. Samtlige kjemikalier som ble brukt underveis ble byttet til nye og alle buffere ble lagd på ny. Det ble også forsøkt å senke konsentrasjonen av protein i periplasmatisk ekstrakt ved å doble mengde spheroplastbuffer, og sterilt vann til resuspending (kapittel 3.1.2), men dette hadde ingen virkning. Ferdig renset protein felte ut ved konsentrasjon ned til 8 µM. Da dette ikke har vært et kjent problem ved tidligere eksperimenter, ble det konkludert med at frysestokken måtte være ”sliten”, og at cellene derfor burde vært transformert. Ny frysestokk ble lagd, men det var ikke tilstrekkelig tid til å teste denne.

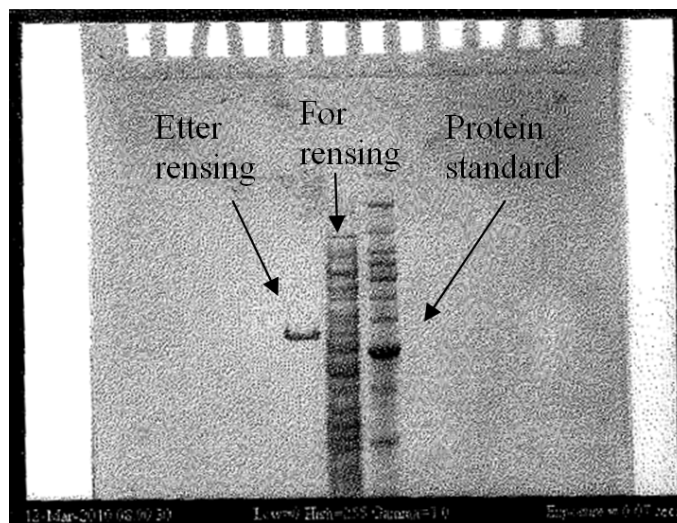
#### 4.1.2 Resultat av rensing av protein på Ni-NTA kolonne

Proteinet ble renset på Ni-NTA kolonne. Et typisk kromatogram er vist i figur 4.1.1. Den første toppen er ”grumstoppen”, mens de his-taggede proteinene kan sees i en skarp topp rundt 55 min.



**Figur 4.1.1:** Kromatogram fra rensing av His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q på Ni-NTA kolonne.

### 4.1.3 Resultat av SDS - Polyakrylamid Gel Elektroforese



**Figur 4.1.2:** Bilde fra SDS- polyakrylamidgelelektroforese for kontroll av renhet etter rensing av His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q. Brønn 5 til 7 viser henholdsvis ChiB etter rensing, ChiB før rensing og proteinstandarden BenchMark ProteinLadder,

Proteinet etter rensing viste bare ett utslag, se figur 4.1.2, brønn 5, dette indikerer vellykket rensing. Båndet faller mellom proteinstandard-båndene med molekylvekt 50- og 60 kDa, som stemmer med kjent størrelse på His-taggede ChiB mutanter med molekylvekt 58,6 kDa.

### 4.1.4 Proteinkvantifisering

Proteinet ble kvantifisert ved hjelp av et Qubit<sup>TM</sup> fluorometer. Utbyttet etter en ”runde” med utgangspunkt 3 liter LB-medie var 6 mg.

Det ble brukt protein fra fem ulike paralleller med rensing ved bindingsstudier på Biacore, og alle produserte samme resultater. Dette indikerer at det ikke er noe galt med proteinet selv om det feller ut.

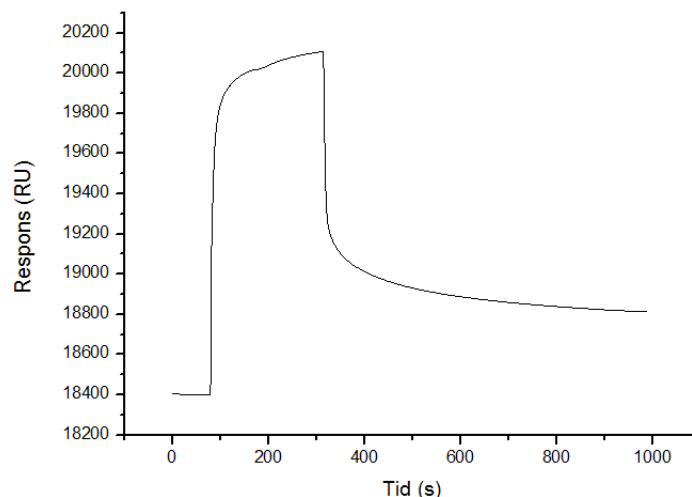


## 4.2 Overflateplasmonresonans

Det ble utført bindingsstudier av His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q mot ulike KOS ved bruk av SPR. Ulike koblingsteknikker til sensorchipen ble benyttet. His-tagget protein ble immobilisert på NTA-chip via chelatering av nikkellioner, eller på CM5-chip med anti-his antibody.

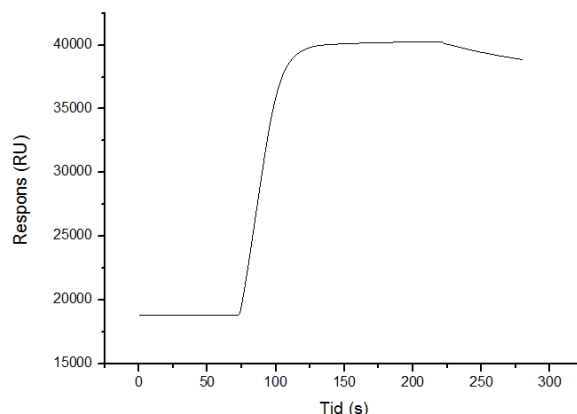
### 4.2.1 NTA- Ni

For å kunne immobilisere his-tagget protein ble NTA sensorchip aktivert med NiCl<sub>2</sub>. Det ble påsatt 30 µL 500µM NiCl<sub>2</sub>-løsning.



**Figur 4.2.1** Aktivering av NTA sensorchip med NiCl<sub>2</sub>.

His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q ble indirekte immobilisert til sensorchipen som ble brukt, i temperaturområdet 6-36 °C. Immobiliseringen var vellykket, med et maks responsutslag på 21 450 RU. Stabiliteten av proteinet til NTA-Ni var nokså lav, og selv ved lave temperaturer var avblødningen fra sensoroverflaten på NTA høy. Avblødningen lå på rundt 18 RU per minutt ved 6 °C på NTA sensorchipen etter endt injeksjon. Det ble kompensert for dette ved stadig å injisere nytt protein mellom hver konsentrasjonsserie, og ved hver temperaturendring.



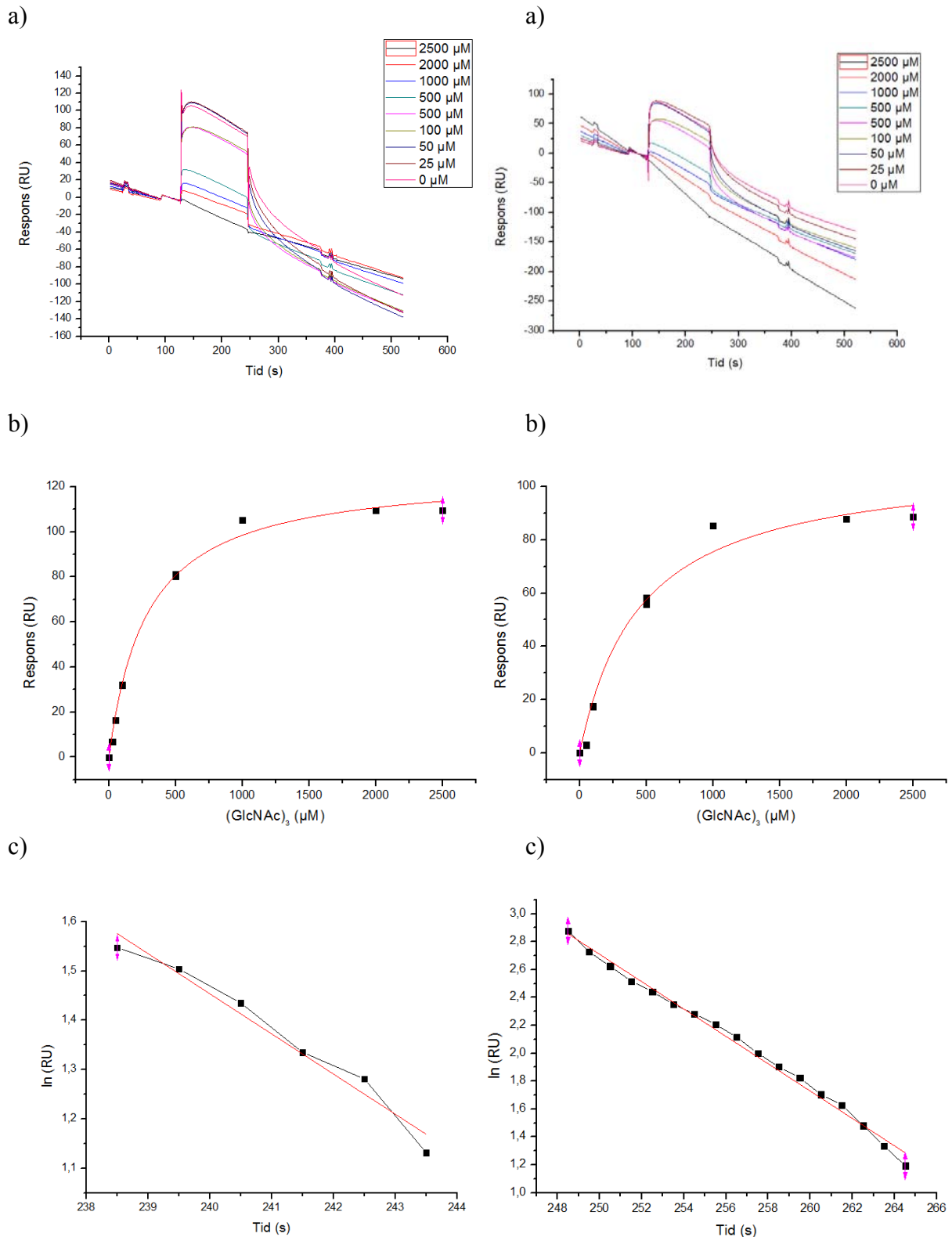
Figur 4.2.2 Immobilisering av His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q til NTA-Ni (6 °C).

#### 4.2.2 Protein- ligand bindingsforsøk på NTA sensorchip.

(GlcNAc)<sub>3</sub>, (GlcNAc)<sub>4</sub> og (GlcNAc)<sub>6</sub> ble injisert til immobilisert ChiB-E144Q i temperaturområdet 6-36 °C for å kunne bestemme temperaturavhengigheten til  $k_d$  og  $k_a$ . Dissosiasjonsraten,  $k_d$  ble beregnet ved at  $\ln(\text{RU})$  ble plottet mot tiden. Dette ble gjort fra slutt punktet for injeksjonen og frem til intensiteten var ca halvparten av maksimal verdi.  $k_d$  er da det negative stigningstallet til dette plottet. Dissosiasjonskonstanten,  $K_D$  ble beregnet ved en ikke-lineær tilpasning for plottet av signal mot konsentrasjon av ligand.  $k_a$  ble beregnet ut som  $k_d/K_D$

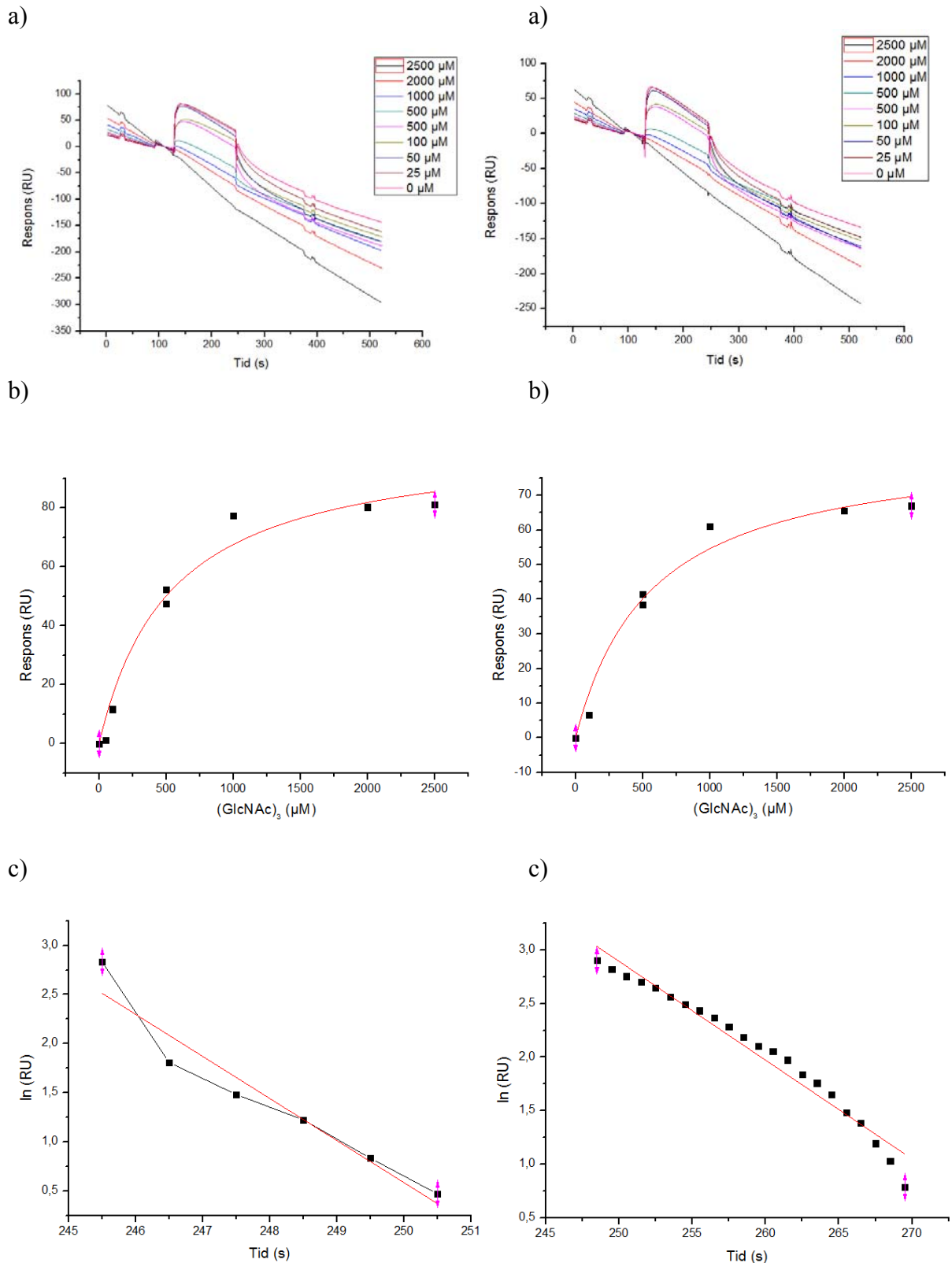
Ved interaksjonsstudier på Biacore er det ønskelig å lage en ”global fit” i BIAevaluation, for å kunne direkte tolke resultatene. Dette viste seg å være vanskelig pga avblødning av His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q, og fungerte kun for CM5 sensorchipen (se kapittel 4.2.4). For resultatene på CM5 sensorchipen ble det derfor testet om det ga store avvik i resultatene om det ble brukt ”global fit” eller om tallmaterialet ble behandlet manuelt. Resultatene var omtrent identiske, dette indikerer at metoden for å behandle data i Origin fungerer tilfredsstillende, og kan benyttes til å estimere  $k_d$  og  $K_d$  for interaksjonsstudiene på NTA sensorchipen.

Under, i figur 4.2.3 til 4.2.26 vises resultatene for de ulike KOS.



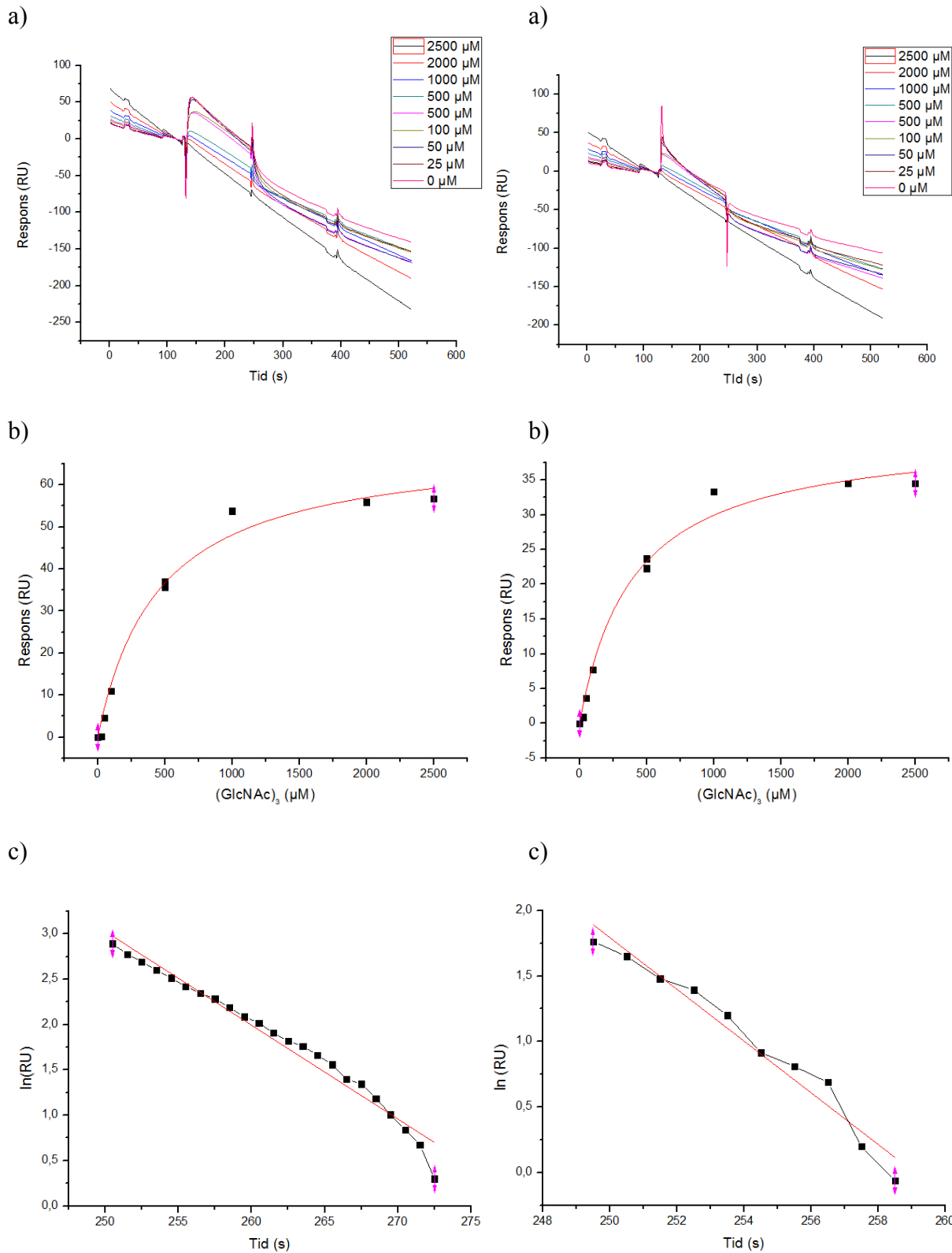
**Figur 4.2.3** 6 grader. a) Sensogram av interaksjoner mellom  $(\text{GlcNAc})_3$  og  $\text{His}_{10}\text{-ChiB-E144Q}$ . b) Respons i RU plottet mot ligandkonsentrasjon for å finne  $K_d$ . c)  $\ln$  til respons plottet mot tiden for å finne  $k_d$ . Her er kun plottet for en representativ konsentrasjon vist ( $100\mu\text{M}$ ).

**Figur 4.2.4** 12 grader. a) Sensogram av interaksjoner mellom  $(\text{GlcNAc})_3$  og  $\text{His}_{10}\text{-ChiB-E144Q}$ . b) Respons i RU plottet mot ligandkonsentrasjon for å finne  $K_d$ . c)  $\ln$  til respons plottet mot tiden for å finne  $k_d$ . Her er kun plottet for en representativ konsentrasjon vist ( $100\mu\text{M}$ ).



**Figur 4.2.5** 18 grader. a) Sensogram av interaksjoner mellom  $(\text{GlcNAc})_3$  og His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q. b) Respons i RU plottet mot ligandkonsentrasjon for å finne  $K_d$ . c)  $\ln$  til respons plottet mot tiden for å finne  $k_d$ . Her er kun plottet for en representativ konsentrasjon vist (100 $\mu\text{M}$ ).

**Figur 4.2.6** 24 grader. a) Sensogram av interaksjoner mellom  $(\text{GlcNAc})_3$  og His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q. b) Respons i RU plottet mot ligandkonsentrasjon for å finne  $K_d$ . c)  $\ln$  til respons plottet mot tiden for å finne  $k_d$ . Her er kun plottet for en representativ konsentrasjon vist (100 $\mu\text{M}$ ).



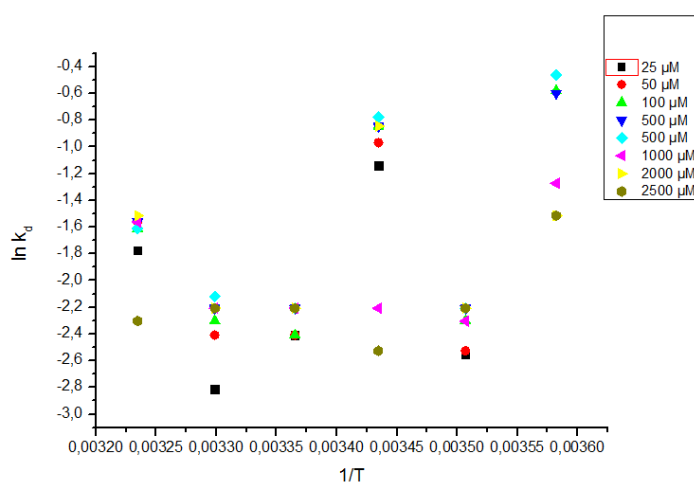
**Figur 4.2.7** 30 grader. a) Sensogram av interaksjoner mellom  $(\text{GlcNAc})_3$  og His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q. b) Respons i RU plottet mot ligandkonsentrasjon for å finne  $K_d$ . c)  $\ln$  til respons plottet mot tiden for å finne  $k_d$ . Her er kun plottet for en representativ konsentrasjon vist (100 $\mu\text{M}$ ).

**Figur 4.2.8** 36 grader. a) Sensogram av interaksjoner mellom  $(\text{GlcNAc})_3$  og His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q. b) Respons i RU plottet mot ligandkonsentrasjon for å finne  $K_d$ . c)  $\ln$  til respons plottet mot tiden for å finne  $k_d$ . Her er kun plottet for en representativ konsentrasjon vist (100 $\mu\text{M}$ ).

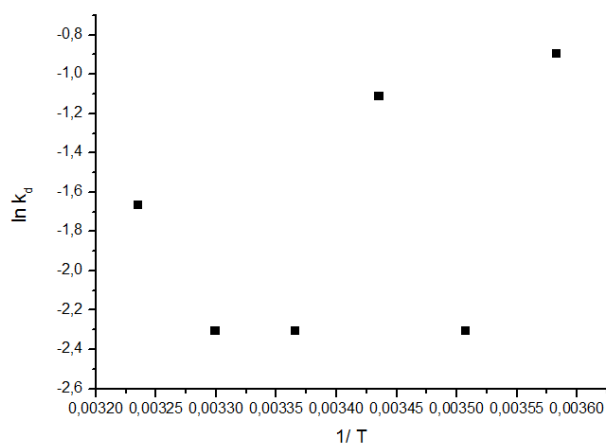
**Tabell 4.1** Kinetiske og termodynamiske parametere for binding av (GlcNAc)<sub>3</sub> til His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q. Tilhørende sensogrammer er vist i figur 4.2.3-4.2.8.

(GlcNAc) <sub>3</sub>	6 °C	12 °C	18 °C	24 °C	30 °C	36 °C
<b>B<sub>max</sub> (RU)</b>	126,5	109,8	103,8	85,3	69,9	41,9
<b>K<sub>d</sub> (μM)</b>	284,7	454,8	535,3	563,2	453,7	400,2
<b>ΔG<sub>r</sub> (kJ/mol)</b>	-18,95	-18,25	-18,23	-18,49	-19,40	-20,11

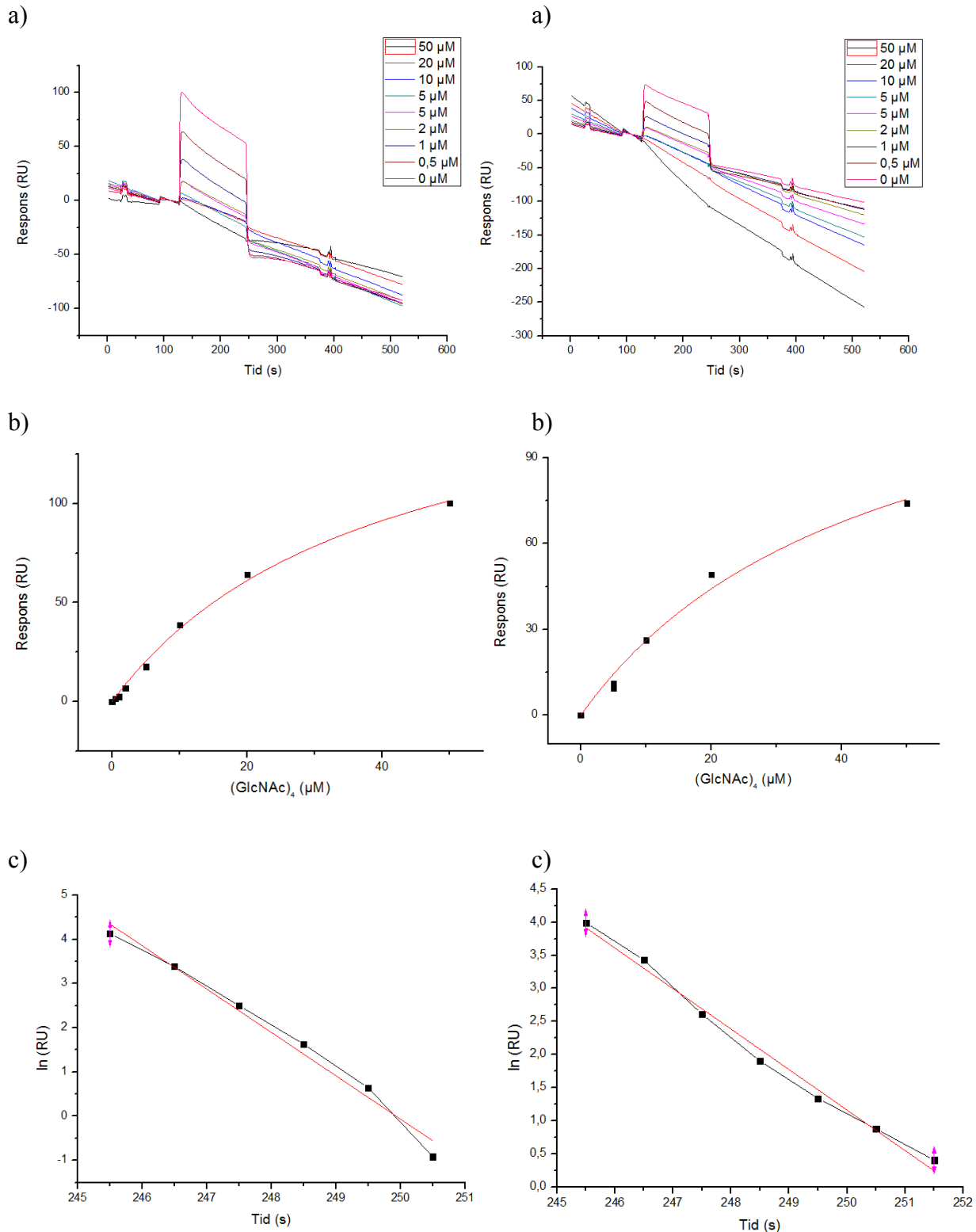
k <sub>d</sub>	25 μM	50 μM	100 μM	500 μM	500 μM	1000 μM	2000 μM	2500 μM	Gjennomsnitt
6 °C	-	-	0,56	0,55	0,63	0,28	0,22	0,22	0,41
12 °C	0,078	0,08	0,10	0,11	0,11	0,10	0,11	0,11	0,10
18 °C	0,32	0,38	0,43	0,43	0,46	0,11	0,43	0,08	0,33
24 °C	0,09	0,09	0,09	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,10
30 °C	0,06	0,09	0,10	0,11	0,12	0,11	0,11	0,11	0,10
36 °C	0,17	0,21	0,20	0,21	0,20	0,21	0,22	0,10	0,19



**Figur 4.2.9**  $\ln k_d$  plottet mot  $1/T$  for alle konsentrasjonene.

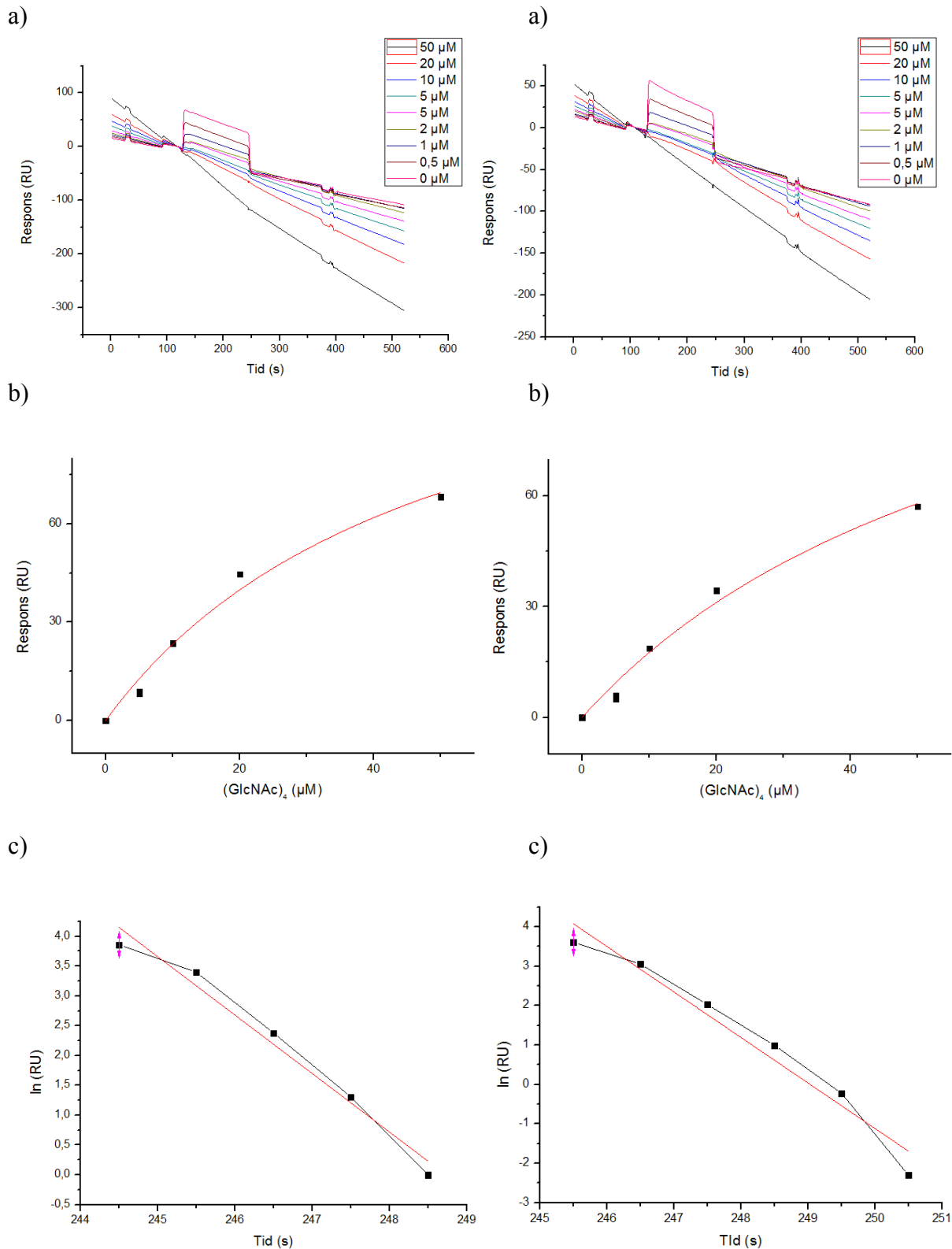


**Figur 4.2.10**  $\ln k_d$  plottet mot  $1/T$  for gjennomsnittet til alle konsentrasjonene.



**Figur 4.2.11** 6 grader. a) Sensogram av interaksjoner mellom  $(\text{GlcNAc})_4$  og  $\text{His}_{10}\text{-ChiB-E144Q}$ . b) Respons i RU plottet mot ligandkonsentrasjon for å finne  $K_d$ . c)  $\ln$  til respons plottet mot tiden for å finne  $k_d$ . Her er kun plottet for en representativ konsentrasjon vist ( $20\mu\text{M}$ ).

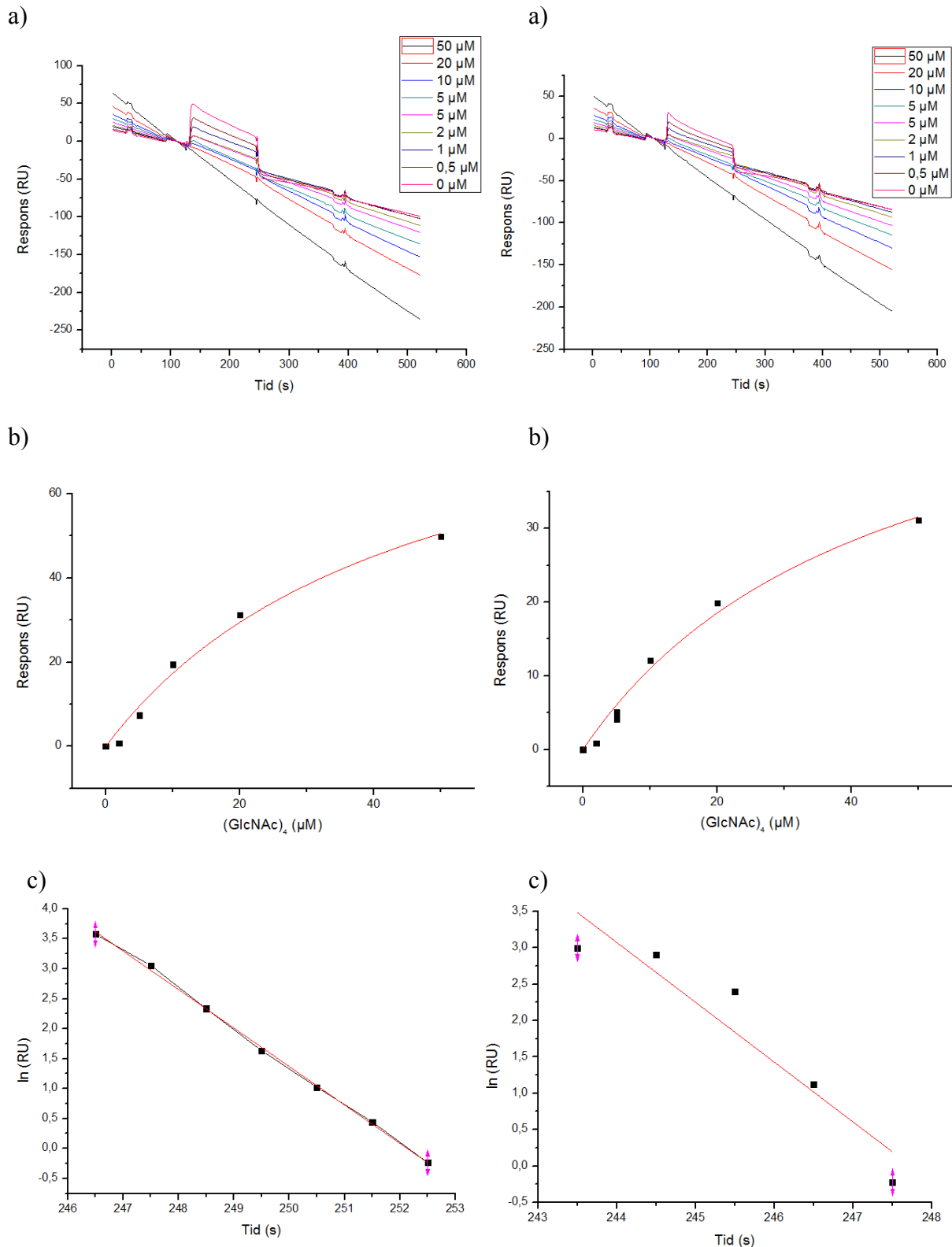
**Figur 4.2.12** 12 grader. a) Sensogram av interaksjoner mellom  $(\text{GlcNAc})_4$  og  $\text{His}_{10}\text{-ChiB-E144Q}$ . b) Respons i RU plottet mot ligandkonsentrasjon for å finne  $K_d$ . c)  $\ln$  til respons plottet mot tiden for å finne  $k_d$ . Her er kun plottet for en representativ konsentrasjon vist ( $20\mu\text{M}$ ).



**Figur 4.2.13** 18 grader. a) Sensogram av interaksjoner mellom (GlcNAc)<sub>4</sub> og His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q. b) Respons i RU plottet mot ligandkonsentrasjon for å finne  $K_d$ . c)  $\ln$  til respons plottet mot tiden for å finne  $k_d$ . Her er kun plottet for en representativ konsentrasjon vist (20 μM).

**Figur 4.2.14** 24 grader. a) Sensogram av interaksjoner mellom (GlcNAc)<sub>4</sub> og His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q. b) Respons i RU plottet mot ligandkonsentrasjon for å finne  $K_d$ . c)  $\ln$  til respons plottet mot tiden for å finne  $k_d$ . Her er kun plottet for en representativ konsentrasjon vist (20 μM).





**Figur 4.2.15** 30 grader. a) Sensogram av interaksjoner mellom  $(\text{GlcNAc})_4$  og His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q. b) Respons i RU plottet mot ligandkonsentrasjon for å finne  $K_d$ . c)  $\ln$  til respons plottet mot tiden for å finne  $k_d$ . Her er kun plottet for en representativ konsentrasjon vist (20  $\mu\text{M}$ ).

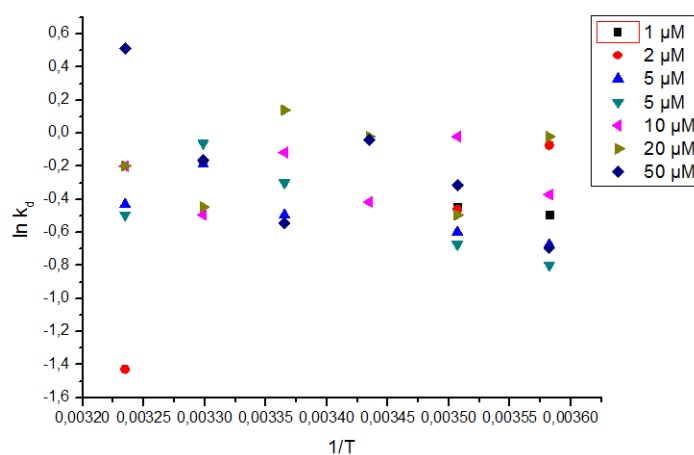
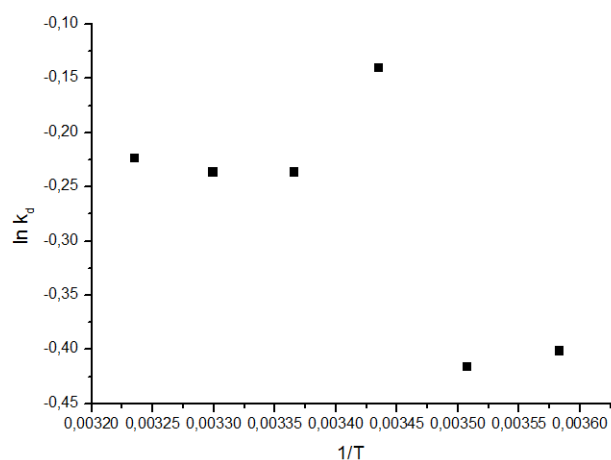
**Figur 4.2.16** 36 grader. a) Sensogram av interaksjoner mellom  $(\text{GlcNAc})_4$  og His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q. b) Respons i RU plottet mot ligandkonsentrasjon for å finne  $K_d$ . c)  $\ln$  til respons plottet mot tiden for å finne  $k_d$ . Her er kun plottet for en representativ konsentrasjon vist (20  $\mu\text{M}$ ).

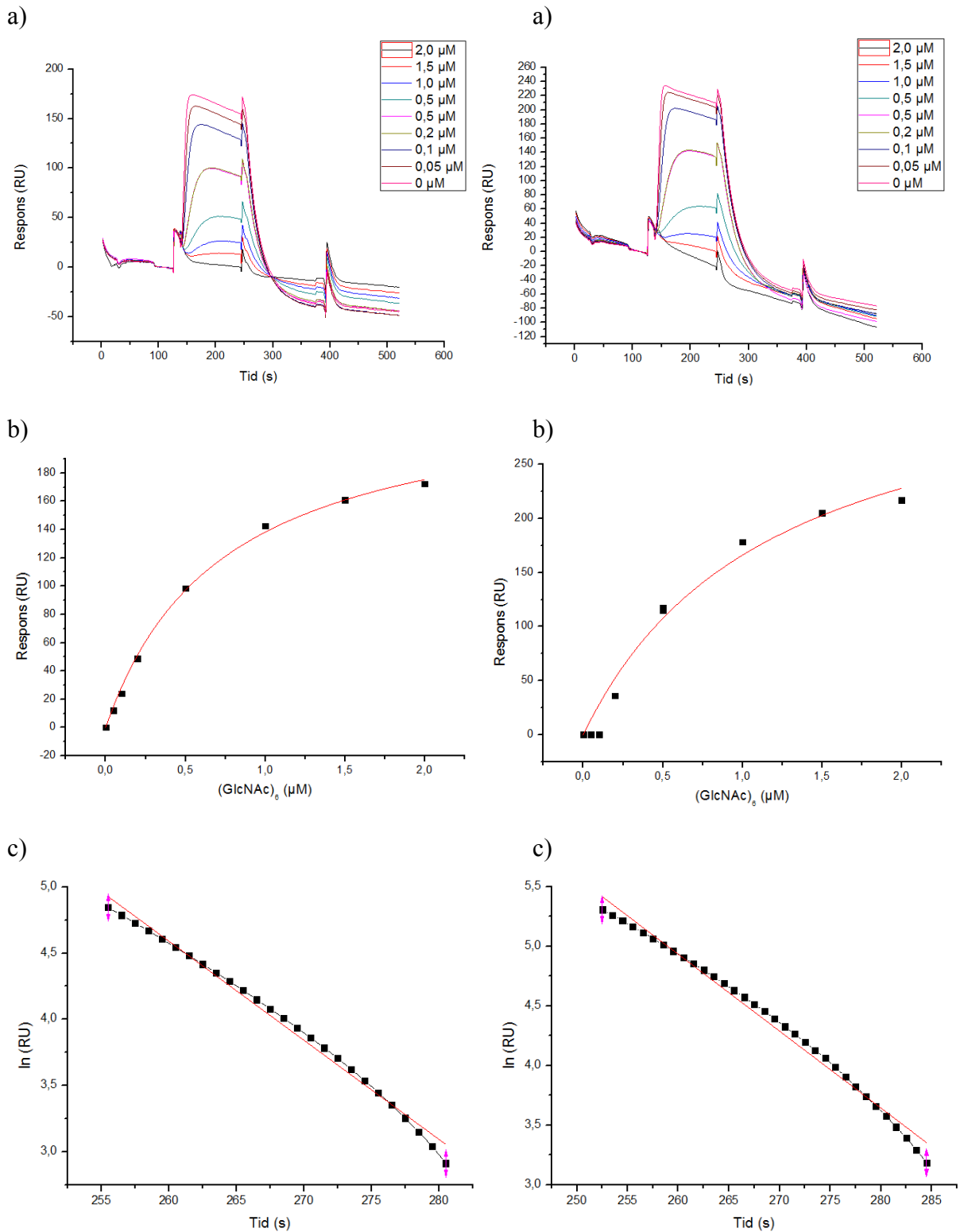
**Tabell 4.2** Kinetiske og termodynamiske parametere for binding av (GlcNAc)<sub>4</sub> til His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q. Tilhørende sensogrammer er vist i figur 4.2.11-4.2.16.

(GlcNAc) <sub>4</sub>	6 °C	12 °C	18 °C	24 °C	30 °C	36 °C
<b>B<sub>max</sub> (RU)</b>	192,80	143,4	138,25	136,72	96,92	59,62
<b>K<sub>d</sub> (μM)</b>	39,25	44,90	49,41	67,84	45,82	44,37
<b>ΔG<sub>r</sub> (kJ/mol)</b>	-23,55	-23,74	-24,00	-23,71	-25,18	-25,76

k <sub>d</sub>	1μM	2μM	5μM	5μM	10μM	20μM	50μM	Gjennomsnitt
6 °C	0,61	0,93	0,51	0,45	0,69	0,98	0,50	0,67
12 °C	0,64	0,63	0,55	0,51	0,98	0,61	0,73	0,66
18 °C	-	-	-	-	0,66	0,98	0,96	0,87
24 °C	-	-	0,61	0,74	0,89	1,15	0,58	0,79
30 °C	-	0,84	0,83	0,94	0,61	0,64	0,85	0,79
36 °C	-	0,24	0,65	0,61	0,82	0,82	1,67	0,80

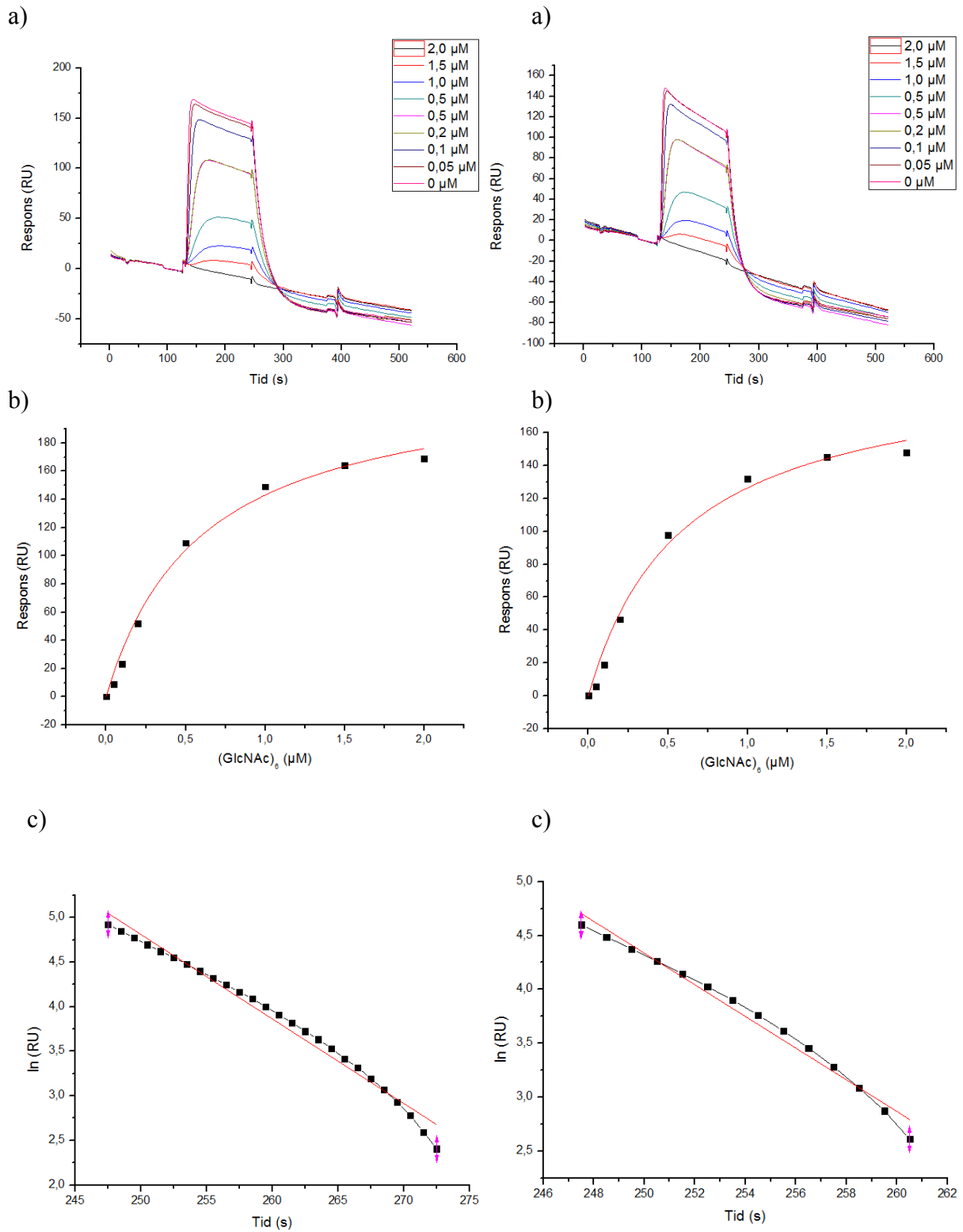
(-) betyr umulig å lese av fornuftige verdier

**Figur 4.2.17** ln k<sub>d</sub> plottet mot 1/T for alle konsentrasjonene.**Figur 4.2.18** ln k<sub>d</sub> plottet mot 1/T for gjennomsnittet av alle konsentrasjonene.



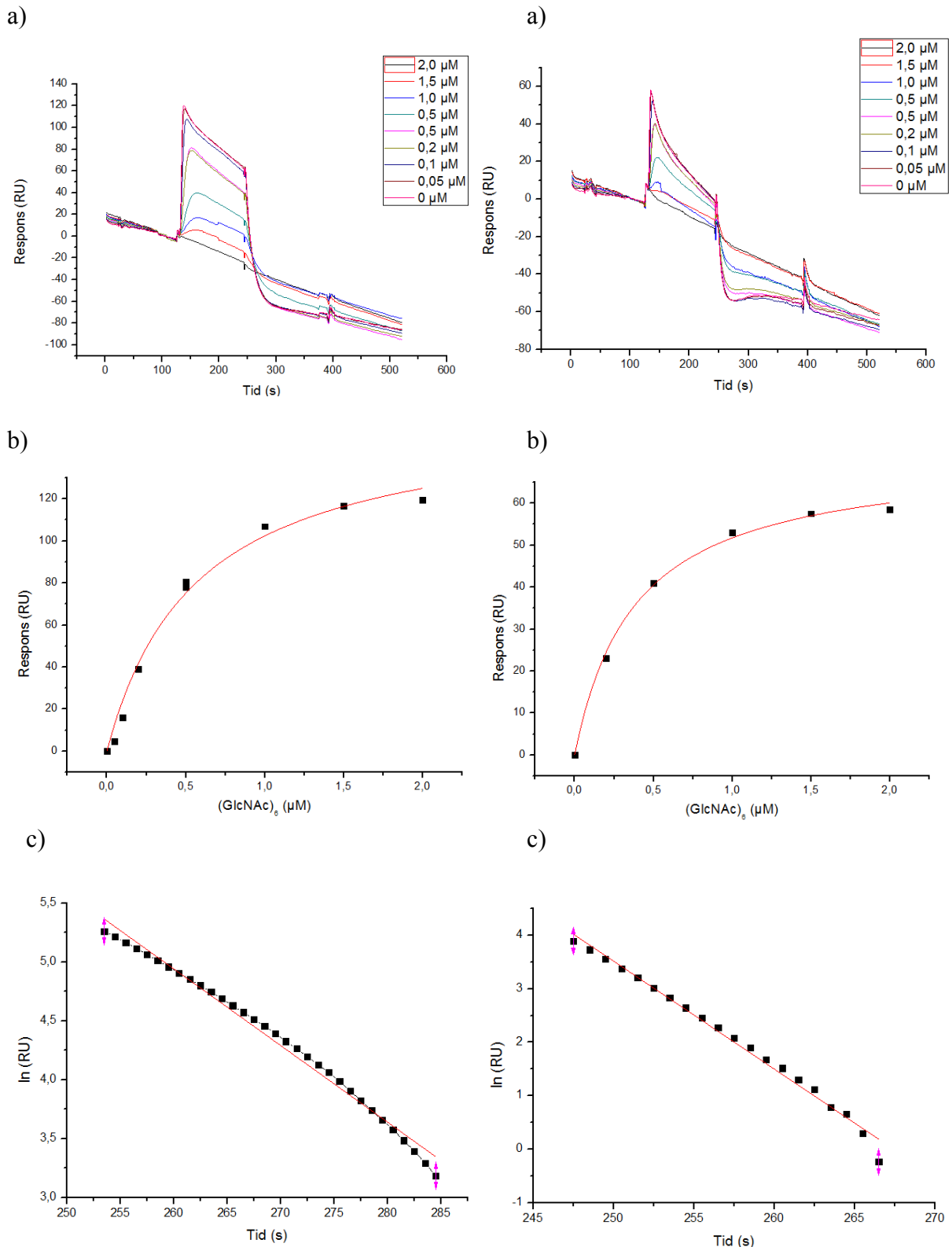
**Figur 4.2.19** 6 grader. a) Sensogram av interaksjoner mellom  $(\text{GlcNAc})_6$  og His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q. b) Respons i RU plottet mot ligandkonsentrasjon for å finne  $K_d$ . c)  $\ln$  til respons plottet mot tiden for å finne  $k_d$ . Her er kun plottet for en representativ konsentrasjon vist (1,5 $\mu\text{M}$ ).

**Figur 4.2.20** 12 grader. a) Sensogram av interaksjoner mellom  $(\text{GlcNAc})_6$  og His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q. b) Respons i RU plottet mot ligandkonsentrasjon for å finne  $K_d$ . c)  $\ln$  til respons plottet mot tiden for å finne  $k_d$ . Her er kun plottet for en representativ konsentrasjon vist (1,5 $\mu\text{M}$ ).



**Figur 4.2.21** 18 grader. a) Sensogram av interaksjoner mellom (GlcNAc)<sub>6</sub> og His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q. b) Respos i RU plottet mot ligandkonsentrasjon for å finne K<sub>d</sub>. c) ln til respos plottet mot tiden for å finne k<sub>d</sub>. Her er kun plottet for en representativ konsentrasjon vist (1,5μM).

**Figur 4.2.22** 24 grader. a) Sensogram av interaksjoner mellom (GlcNAc)<sub>6</sub> og His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q. b) Respos i RU plottet mot ligandkonsentrasjon for å finne K<sub>d</sub>. c) ln til respos plottet mot tiden for å finne k<sub>d</sub>. Her er kun plottet for en representativ konsentrasjon vist (1,5μM).



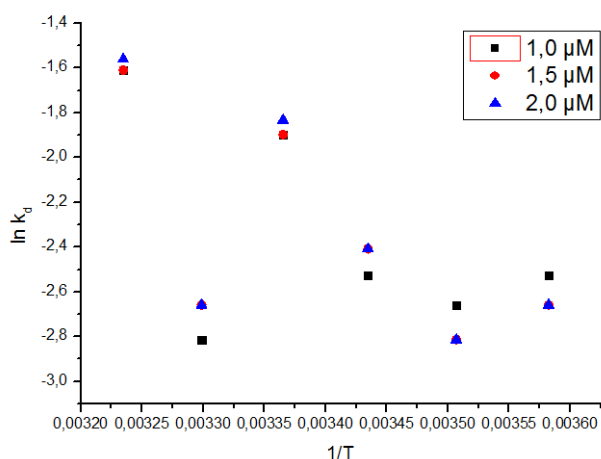
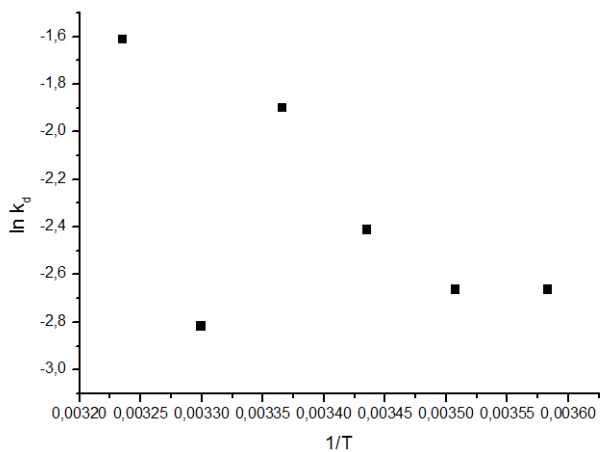
**Figur 4.2.23** 30 grader. a) Sensogram av interaksjoner mellom (GlcNAc)<sub>6</sub> og His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q. b) Respons i RU plottet mot ligandkonsentrasjon for å finne  $K_d$ . c)  $\ln$  til respons plottet mot tiden for å finne  $k_d$ . Her er kun plottet for en representativ konsentrasjon vist (1,5 μM).

**Figur 4.2.24** 36 grader. a) Sensogram av interaksjoner mellom (GlcNAc)<sub>6</sub> og His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q. b) Respons i RU plottet mot ligandkonsentrasjon for å finne  $K_d$ . c)  $\ln$  til respons plottet mot tiden for å finne  $k_d$ . Her er kun plottet for en representativ konsentrasjon vist (1,5 μM).

**Tabell 4.3** Kinetiske og termodynamiske parametere for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q. Tilhørende sensogrammer er vist i figur 4.2.19-4.2.24.

(GlcNAc) <sub>6</sub>	6 °C	12 °C	18 °C	24 °C	30 °C	36 °C
<b>B<sub>max</sub> (RU)</b>	239,8	362,9	228,8	201,1	160,4	71,6
<b>K<sub>d</sub> (μM)</b>	0,74	1,18	0,60	0,59	0,57	0,38
<b>ΔG<sub>r</sub> (kJ/mol)</b>	-32,76	-32,36	-34,68	-35,44	-36,24	-36,96

k <sub>d</sub>	1,0 μM	1,5 μM	2,0 μM	Gjennomsnitt
6 °C	0,08	0,07	0,07	0,07
12 °C	0,07	0,06	0,06	0,07
18 °C	0,08	0,09	0,09	0,09
24 °C	0,15	0,15	0,16	0,15
30 °C	0,06	0,07	0,07	0,06
36 °C	0,20	0,20	0,21	0,20

**Figur 4.2.25** ln k<sub>d</sub> plottet mot 1/T for alle konsentrasjonene**Figur 4.2.26** ln k<sub>d</sub> plottet mot 1/T for gjennomsnittet av alle konsentrasjonene

Temperaturavhengigheten til  $K$  vil kunne gi  $\Delta H$ , jfr. Van't Hoff's ligning:

$$\frac{d \ln K}{d \left(\frac{1}{T}\right)} = -\frac{\Delta H_r}{R} \quad (4.2.1)$$

Dette ble forsøkt, men resultatene ga dårlig korrelasjon, med  $R^2 < 0,5$ . Det ble derfor valgt å ikke gå videre med dette.

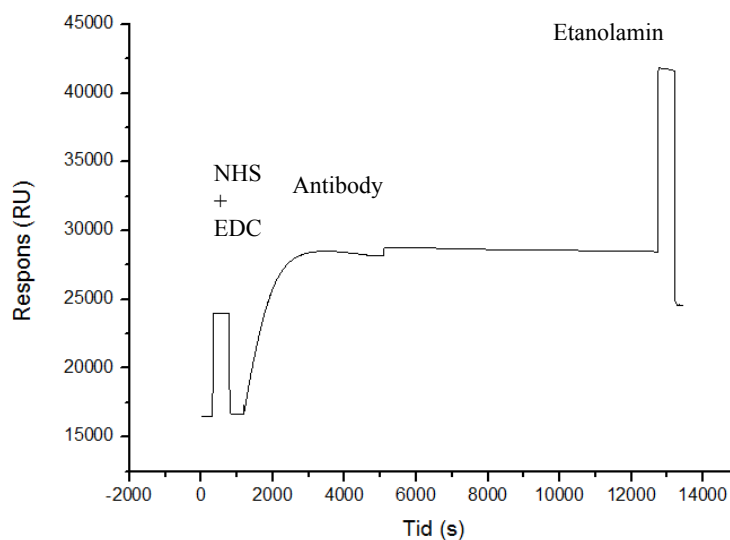
**Tabell 4.4** Kinetiske og termodynamiske parametere for KOS binding til His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q på NTA sensorchip. Tabellen viser en sammenligning av resultatene ved 18 °C for de ulike substratlengdene.

Substrat	$k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	$K_d$ (μM)	$\Delta G_r$ (kJ/mol)
(GlcNAc) <sub>6</sub>	$1,5 \cdot 10^5$	0,09	0,6	-34,68
(GlcNAc) <sub>4</sub>	$1,8 \cdot 10^4$	0,87	49,4	-24,00
(GlcNAc) <sub>3</sub>	$6,2 \cdot 10^2$	0,33	535,3	-18,23

#### 4.2.3 CM5

##### *Immobilisering av anti-his antibody*

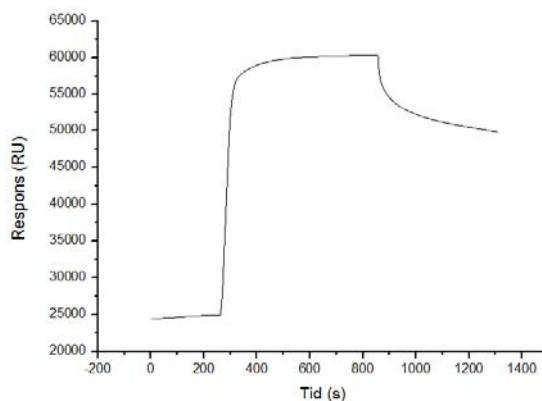
Antibody ble direkte immobilisert til en CM5 Sensorchip for å kunne binde his-tagget protein. Det ble påsatt omlag 11000 RU antibody. Et typisk sensogram for immobiliseringen er vist i figur 4.2.1.



**Figur 4.2.27** Immobilisering av anti-his antibody til CM5 Sensorchip. (30 μg/mL, 10 mM citratfosfat, pH 5,0)

### ***Immobilisering av his-tagget protein til anti-his antibody***

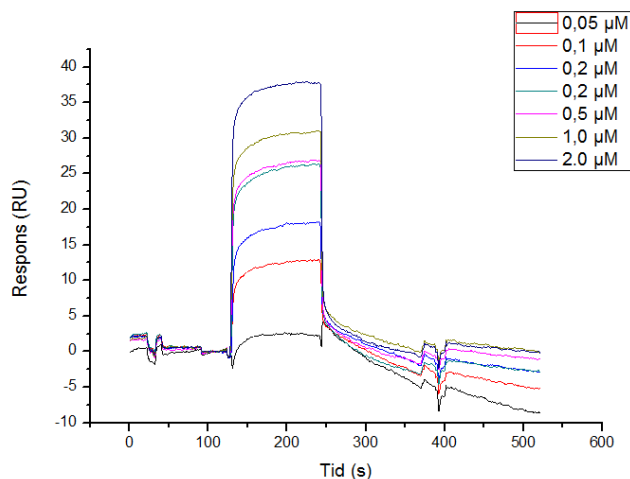
Etter at sensorchipoverflaten var mettet med anti-his antibody, ble His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q tilsatt. Immobiliseringen av proteinet ga endring i RU på rundt 35 000. Avblødningen her var ikke så stor som på NTA sensorchipen, om lag 1 RU per minutt.



**Figur 4.2.28** Immobilisering av His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q. (0,1 mg/mL, 20mM NaP<sub>i</sub>, 0,15 M NaCl, pH 8,0) ved 20 °C.

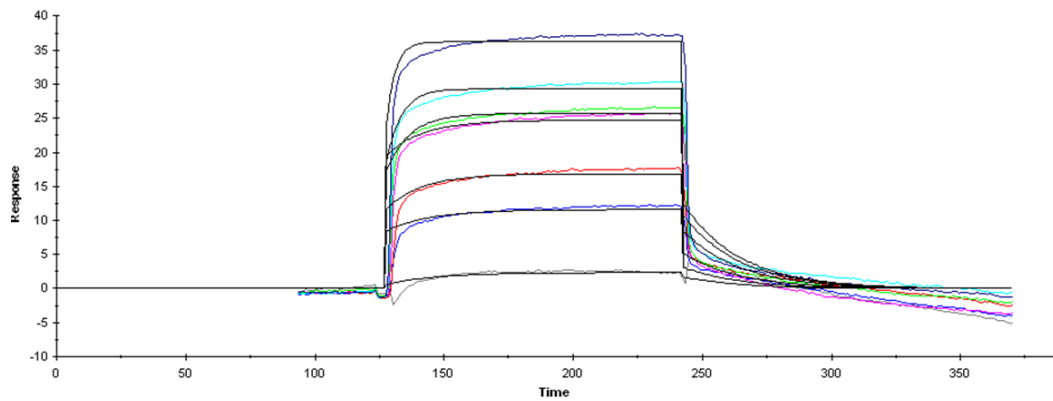
### **4.2.4 Protein- ligand bindingsforsøk på CM5 sensorchip**

Det ble utført interaksjonsstudier mellom (GlcNAc)<sub>6</sub> og His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q på CM5 sensorchip.



**Figur 4.2.29** Sensogram fra konsentrasjonsserie som viser interaksjoner mellom (GlcNAc)<sub>6</sub> og His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q over tid.



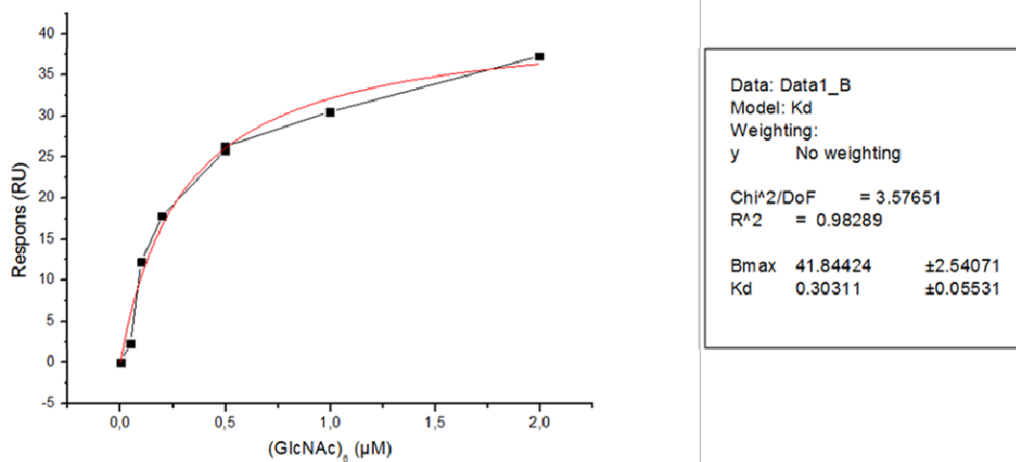


Figur 4.2.30 ”Global fit” for sensogrammet i figur 4.2.29 fra BIAevaluation.

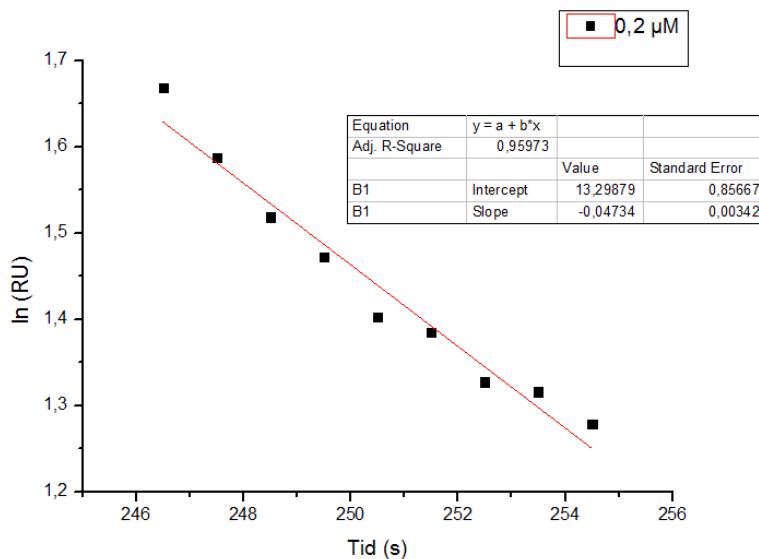
Tabell 4.5 Resultater fra ”global fit”.

Analytt-konsentrasjon	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $M^{-1}$ )	$B_{max}$ (RU)	RI* (RU)	$K_A$ (1/M)	$K_D$ (M)	$\chi^2$	$\Delta G$ (kJ/mol)
(GlcNAc) <sub>6</sub>	$1,22 \cdot 10^5$	0,0458	15		$2,65 \cdot 10^6$	$3,77 \cdot 10^{-7}$	1,83	-36,05
0,05 $\mu M$				0,588				
0,1 $\mu M$				8,45				
0,2 $\mu M$				11,7				
0,2 $\mu M$				19,5				
0,5 $\mu M$				17,2				
1,0 $\mu M$				18,4				
2,0 $\mu M$				23,6				

\*RI viser bulkbidraget.



Figur 4.2.31 Respos i RU plottet manuelt mot ligandkonsentrasjon for å finne  $K_d$ .



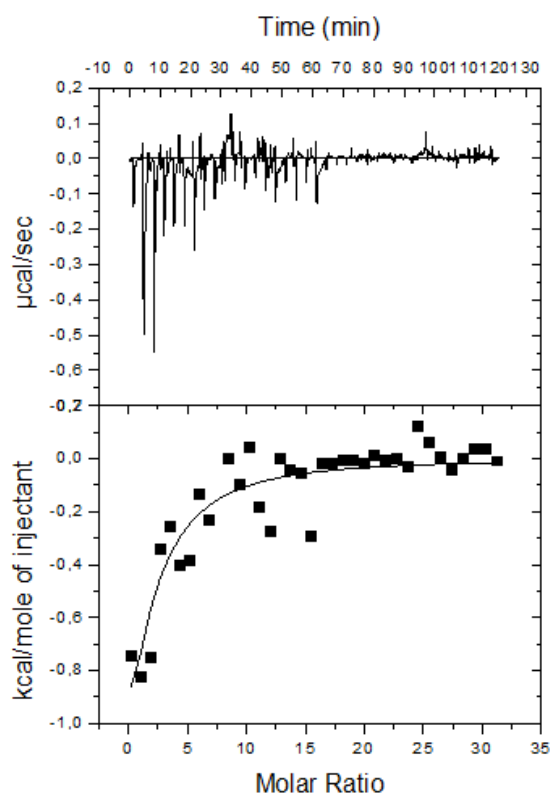
**Figur 4.2.32** ln til respons plottet mot tiden for å finne  $k_d$ . Her er kun plottet for en representativ konsentrasjon vist (0,2 $\mu$ M).

Det viste seg at resultatene fra ”global fit” var samsvarende med resultatene der tallmaterialet var behandlet i Origin. ”Global fit” ga  $K_d = 3,77 \cdot 10^{-7}$  og  $k_d = 0,0458$ . Behandling i origin ga  $K_d = 3,03 \cdot 10^{-7}$  og  $k_d = 0,0473$ . Dette gir nesten identisk  $\Delta G$ , med  $\Delta G = -36,1$  kJ/mol for ”global fit” og  $\Delta G = -36,6$  kJ/mol for manuelt behandlede data.

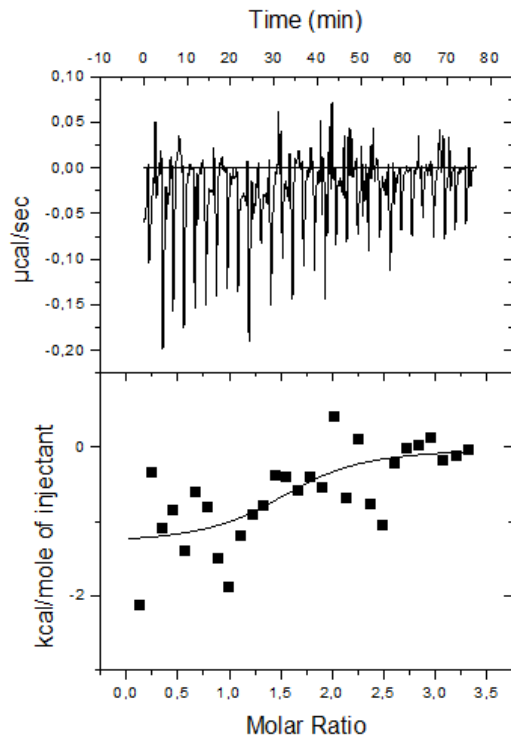
Det ble forsøkt å regenerere antidiobier ved å sette til 10mM glycinløsning, pH 1,5. Dette fungerte ikke, proteinet falt ikke av.

### 4.3 Isotermisk titeringskalorimetri

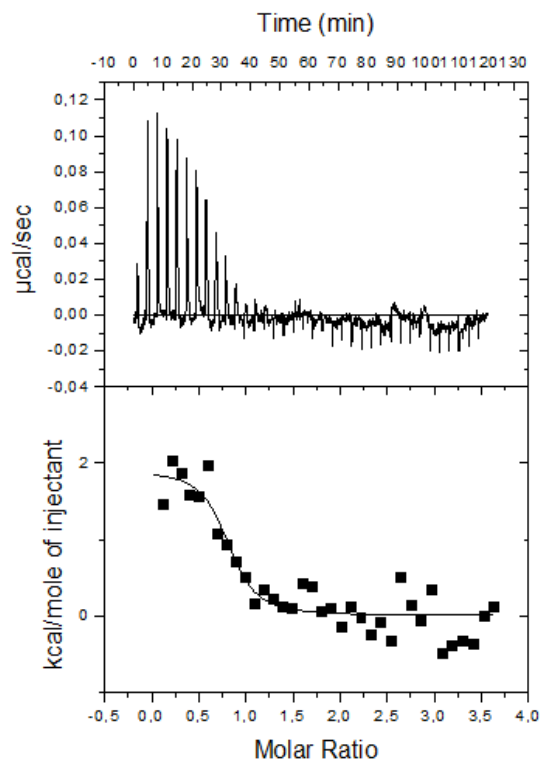
Interaksjonsstudier av His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q ved bruk av ITC krever mye biologisk materiale siden reaksjonen har en liten varmetutvikling. Det var i utgangspunktet ønskelig å studere både pH- og temperaturavhengighet på ITC, men dette var ikke gjennomførbart av ovennevnte grunn. Det ble derfor gjennomført eksperiment på 18 °C, ved pH 8, med de tre KOS som også ble brukt på Biacore.  $K_A$  og  $\Delta H$  ble gitt direkte fra ITC forsøkene, mens  $\Delta G$ ,  $\Delta S$  og  $K_D$  ble beregnet ved hjelp av likningene 1.6.3 og 1.6.4 og fra forholdet  $K_A = 1/K_D$ . Resultatene fra bindingsforsøkene er vist i tabell 4.6.



Figur 4.3.1: Termogram og bindingsisoterm (GlcNAc)<sub>3</sub>



Figur 4.3.2: Termogram og bindingsisoterm (GlcNAc)<sub>4</sub>



Figur 4.3.3: Termogram og bindingsisoterm (GlcNAc)<sub>6</sub>

**Tabell 4.6:** Termodynamiske parametere for binding mellom His<sub>10</sub>-E144Q-ChiB og (GlcNAc)<sub>3</sub>, (GlcNAc)<sub>4</sub> og (GlcNAc)<sub>6</sub>. Tallene er basert på paralleller for hvert forsøk. Forsøkene ble utført ved 18 °C.

Ligand	K <sub>A</sub> (M <sup>-1</sup> )	K <sub>D</sub> (μM)	ΔG (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/(K*mol))	-TΔS (kJ/mol)
(GlcNAc) <sub>3</sub>	(1,24±0,13)*10 <sup>4</sup>	80,65±8,6	-22,8±2,5	-16,7±3,46	20,95±14,67	-6,1±4,27
(GlcNAc) <sub>4</sub>	(3,31±1,68)*10 <sup>5</sup>	3,02±2,07	-30,8±1,4	-5,33±0,24	87,48±4,88	-25,47±1,42
(GlcNAc) <sub>6</sub> *	2,38*10 <sup>6</sup>	0,42	-35,5	7,99	149,2	-43,44

\*For (GlcNAc)<sub>6</sub> ble det kun utført en vellykket måling.

Det ble kun gjennomført én vellykket måling for (GlcNAc)<sub>6</sub>, men resultatene fra denne målingen ligger innenfor standardavviket for tidligere målinger (Norberg et al. 2010).

## 5. Diskusjon

### 5.1 Er Biacore og ITC egnet til å studere substratbinding til ChiB?

Forsøkene som ble gjort med ITC og Biacore ga samsvarende resultater, med omtrent lik  $\Delta G$  for reaksjonene. Dette gir troverdighet til tallene. Dette stemmer også overens med tidligere sammenligninger mellom ITC og Biacore (Day et al. 2002; Norberg et al. 2010). Den gode overensstemmelsen mellom resultatene for de to metodene tillater også en kombinert tolkning av dataene.

Fordelen med å bruke ITC er at man ved hjelp av ett enkelt forsøk kan finne  $\Delta H$  og  $K_A$ , og dermed også  $\Delta G$  og  $\Delta S$ , i tillegg til bindingsstøkiometrien. Ulempen med å bruke ITC er at man trenger høy konsentrasjon både av substrat og ligand, som gjør hele prosessen arbeids- og tidskrevende. På grunn av den lave varmeutviklingen blir også standardavvikene relativt store. Det var i utgangspunktet ønskelig å studere både pH og temperaturavhengighet på ITC, men dette var ikke gjennomførbart av ovennevnte grunn. Det ble derfor gjennomført forsøk ved 18 °C og pH 8, med de tre KOS som også ble studert på Biacore.

Fordelen med å bruke Biacore er at man kan bestemme hastighetskonstantene for assosiasjon og dissosiasjon. Man får også likevektskonstanten, og med det  $\Delta G$ , og temperaturavhengigheten til hastighetskonstanten gjør det mulig å estimere aktiveringsparametre for substratbinding og dissosiasjon. Ulempen med å bruke Biacore generelt, er at protein kan miste sin aktivitet ved dirkete immobilisering og å ha tilgang til en his-tagget variant av enzymet kan være nødvendig. Når man så studerer binding mellom ChiB og ulike KOS, ser det ut til at man må bruke anti-his antibody og CM5 sensorchip for å få til ”global fit”, da dette ikke ser ut til å være mulig med NTA sensorchipen pga sterk avblødning.

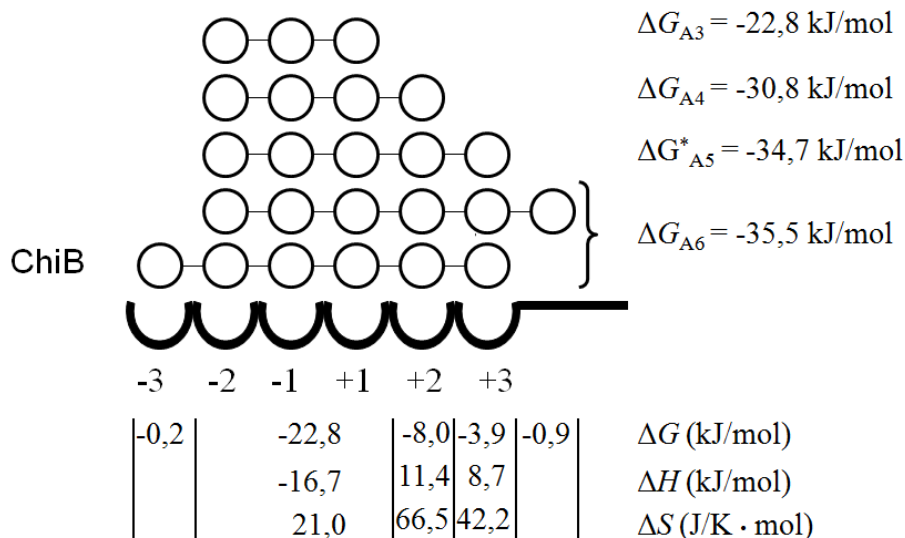
### 5.2 Bindingsstudie, binding av KOS til ChiB

Bruk av overflateplasmonresonans tillater fastslåelse av  $k_d$  og  $k_a$  for binding av KOS til ChiB. Tabell 4.4 viser sammenligning av de kinetiske og termodynamiske parameterne ved 18 °C, og her er det tydelig at  $k_a$  øker med økende substratlengde, mens  $k_d$  later til å være uavhengig av substratlengden. Det er ikke overraskende at lengre substrater binder raskere og bedre enn

kortere substrater, da det vil være flere gunstige interaksjoner med enzymet, og det vil være flere gunstige fjerninger av vann ved binding.

Fra tidligere studier er det kjent hvordan ulike KOS binder i det aktive setet hos ChiB (Horn et al. 2006c). Ved å kombinere denne informasjonen med de oppnådde termodynamiske parameterne er det mulig å finne bindingsenergien for hvert enkelt subsete. De seks subsetene hos ChiB fra -3 til 3 er beskrevet i kapitlene 1.4.1 og 1.5.5. Den substratbindende kløften på det katalytiske domenet er utvidet med et kitinbindende domene som interagerer med den reduserende enden av sukkerkjeden. En viss grad av substrataffinitet vil derfor være forventet i ytterligere aglycon subseter, dette er tidligere blitt observert (Horn et al. 2006c).

Tidligere studier av ChiB-katalysert hydrolysering av kitin har vist at (GlcNAc)<sub>3</sub> binder utelukkende i -2 til +1 subsetene, (GlcNAc)<sub>4</sub> binder utelukkende i -2 til +2 subsetene, og (GlcNAc)<sub>5</sub> binder utelukkende i -2 til +3 subsetene (Horn et al. 2006c). Preferansen (GlcNAc)<sub>5</sub> har til å binde i -2 til +3 subsetene er blitt bekreftet ved hjelp av krystallstrukturen av denne liganden i kompleks med ChiB-E144Q (van Aalten et al. 2001). (GlcNAc)<sub>6</sub> binder omtrent 20 % i -3 til +3 subsetene, og 80 % i -2 til ”+4” subsetene. ”+4” er bindingsposisjonen ved siden av +3 subsetet (Horn et al. 2006c). Kombinering av denne kunnskapen med data fra tabell 4.6 gjør det mulig å kalkulere endringen i fri energi i de individuelle subsetene -3, +2, +3 og ”+4”, samt en kombinert endring i fri energi for subsetene -2, -1 og +1.



**Figur 5.1:** GlcNAc bindingsenergien til de individuelle subsetene. Det er tidligere blitt gjort bindingsstudier med  $(\text{GlcNAc})_6$  og  $(\text{GlcNAc})_5$  til ChiB-E144Q (Norberg et al. 2010). Resultater fra tabell 4.6 er samsvarende med resultatene for  $(\text{GlcNAc})_6$  fra denne studien, det ble derfor brukt  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  og  $\Delta S$  for  $(\text{GlcNAc})_5$  fra denne studien. Bindingsenergien for subsetene -3 og "+4" ble funnet ved hjelp av å løse to ligninger med to ukjente;  $0,2x + 0,8y = \Delta G_{A6} - \Delta G_{A5}$  og  $y = 4x$ , der bindingsenergien for subsete -3 er  $x$ , og subsete "+4" er  $y$ .  $\Delta H$  og  $\Delta S$  for disse subsetene kan ikke beregnes.

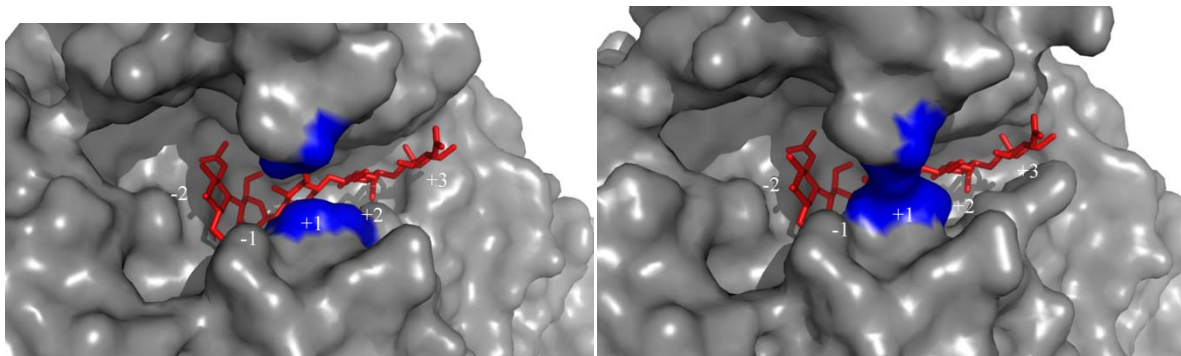
Det er interessant å se at bindingen til subsetene -2, -1 og +1 er drevet av entalpien. De strukturelle dataene viser at det er mange fordelaktige interaksjoner mellom sukkeret og ChiB i disse subsetene (van Aalten et al. 2001). Disse interaksjonene er antagelig ikke bare nødvendige for å overkomme tapet av fri energi forbundet med konformasjonsendringen av sukkeret som er bundet i -1 subsetet, men også til å drive den faktiske bindingen. Binding til subsete +2 og +3 er hovedsakelig drevet av entropi.

Fukamizo et al har i en detaljert studie av subseteaffiniteter hos familie 18 kitinaser estimert fri energien til bindingene, gjennom kinetiske målinger for individuelle sukkerbindende subseter for kitinase-1 fra sopp patogenet *Coccidioides immitis*, basert på teoretisk analyse av kinetiske data (Fukamizo et al. 2001). Det ble funnet endringer i fri energi på -3,8, +3,1, -2,5, -3,0, +0,8, og -1,8 kcal/mol for -2 til "+4" subsetene (Fukamizo et al. 2001). Den positive  $\Delta G$  for binding i -1 subsetet er forventet på grunn av tap av fri energi under konformasjonsendringen hos sukkeret. Det er derfor foreslått at den negative endringen i fri



energi for binding i -2 til +1 subsetene vist i figur 5.1 er resultat at to gunstige interaksjoner (-2 og +1) og en ugunstig interaksjon (-1).

De strukturelle data og affiniteten for binding i subsetene +2 til +4 som er skissert i figur 5.1 antyder at binding av lengre GlcNAc oligomere har flere gunstige interaksjoner med enzymet enn kortere oligomere (van Aalten et al. 2001). Det som kan virke noe ulogisk er at  $k_d$ -verdiene later til å være uavhengige av substratlengde. En måte å forklare dette på, er at dissosiasjon av uspaltede oligomere domineres av det som skjer i -2 til +1 subsetene. Her er det mange interaksjoner mellom substratet og proteinet (van Aalten et al. 2001). I tillegg fører substratbinding til en delvis lukking av et "tak" over substratet ved at Trp97 hydrogenbinder med Asp316 (figur 5.2.)



**Figur 5.2** Krystallstruktur for ChiB (venstre) før substratbinding med et  $(\text{GlcNAc})_5$  molekyl modellert inn i det aktive sete og etter substratbinding (høyre) av  $(\text{GlcNAc})_5$ . Det ses tydelig at Trp<sup>97</sup> (nederste blå aminosyre) hydrogenbinder med Asp<sup>316</sup> (øverste blå aminosyre) (van Aalten et al. 2001).

Tidligere studier har vist at Trp220 er viktig for prosessiviteten til ChiB, da fjerning av denne aminosyren har ført til lavere prosessivitet (Horn et al. 2006a). I +2 subsetet er stacking av Trp220 hovedinteraksjonen, denne interaksjonen er kraftig, med  $\Delta G = -8,0$  kJ/mol. Ved å miste en så sterk interaksjon mot substratet er det rimelig å anta at den er viktig for grad av prosessivitet. Siden dette innebærer å holde enzymet bundet til substratet under og etter hydrolysen.

### 5.3 Temperaturavhengigheten til bindingsreaksjonen mellom ChiB og KOS

Det var ønskelig å finne temperaturavhengigheten til reaksjonen. Dette viste seg å være vanskelig, da reaksjonen går veldig raskt, som gjør at det er få datapunkter tilgjengelig for analysen. Hadde  $k_d$  vært lavere, ville det vært større sannsynlighet for at man kunne bestemt  $k_d$  med større presisjon som kanskje kunne gitt temperaturavhengigheten.

Det er likevel mulig å observere en trend, i alle fall for (GlcNAc)<sub>6</sub>, se figur 4.2.26.  $k_d$  viser god reproduserbarhet, og det kan se ut til å være en lineær sammenheng dersom man ser bort i fra observasjonene ved 30 °C. Det er uansett ikke mulig å finne en lineær modell som passer godt til disse dataene.

### 5.4 Videre arbeid

Det er igangsatt videre arbeid med Biacore, og CM5 sensorchipen. Det er ønskelig å øke datamaterialet for bindingsreaksjonen mellom ChiB og (GlcNAc)<sub>3</sub>, (GlcNAc)<sub>4</sub>, (GlcNAc)<sub>5</sub> og (GlcNAc)<sub>6</sub>. Blant annet er det ønskelig å bestemme temperaturavhengigheten,  $\Delta H$  for bindingsreaksjonene. Dette gir endring i varmekapasiteten ( $\Delta C_p$ ) som igjen er proporsjonal med endring i solvateringsentropien. Med tilgang til denne kan endring i konformasjonsentropien også estimeres.

Videre er det ønskelig å gjøre flere forsøk hvor His<sub>10</sub>-ChiB-E144Q er immobilisert til anti-his antibody for å få til en ”gobal fit”. Dette vil gi mer pålitelige data.

## 6. Referanser

- Armand, S., Tomita, H., Heyraud, A., Gey, C., Watanabe, T. & Henrissat, B. (1994). STEREOCHEMICAL COURSE OF THE HYDROLYSIS REACTION CATALYZED BY CHITINASE-A1 AND CHITINASE-D FROM BACILLUS-CIRCULANS WL-12. *Febs Letters*, 343 (2): 177-180.
- Avacta. Tilgjengelig fra: [www.avacta.com](http://www.avacta.com) (lest 01.03.10).
- Baker, B. M. & Murphy, K. P. (1997). Dissecting the energetics of a protein-protein interaction: The binding of ovomucoid third domain to elastase. *Journal of Molecular Biology*, 268 (2): 557-569.
- Biacore. (1998). *BIAtchnology Handbook*.
- Biacore. (2003a). *Biacore 3000 Getting Started*.
- Biacore. (2003b). *Biacore Sensor Surface Handbook*.
- Boot, R. G., Renkema, G. H., Strijland, A., Vanzonneveld, A. J. & Aerts, J. (1995). CLONING OF A CDNA-ENCODING CHITOTRIOSIDASE, A HUMAN CHITINASE PRODUCED BY MACROPHAGES. *Journal of Biological Chemistry*, 270 (44): 26252-26256.
- Boot, R. G., Blommaart, E. F. C., Swart, E., Ghauharali-van der Vlugt, K., Bijl, N., Moe, C., Place, A. & Aerts, J. (2001). Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (9): 6770-6778.
- Bowles, D. J. (1990). DEFENSE-RELATED PROTEINS IN HIGHER-PLANTS. *Annual Review of Biochemistry*, 59: 873-907.
- Brameld, K. A. & Goddard, W. A. (1998). Substrate distortion to a boat conformation at subsite-1 is critical in the mechanism of family 18 chitinases. *Journal of the American Chemical Society*, 120 (15): 3571-3580.
- Brameld, K. A., Shrader, W. D., Imperiali, B. & Goddard, W. A. (1998). Substrate assistance in the mechanism of family 18 chitinases: Theoretical studies of potential intermediates and inhibitors. *Journal of Molecular Biology*, 280 (5): 913-923.
- Brurberg, M. B., Eijsink, V. G., Haandrikman, A. J., Venema, G. & Nes, I. F. (1995). Chitinase B from *Serratia marcescens* BJL200 is exported to the periplasm without processing. *Microbiology*, 141 ( Pt 1): 123-31.
- Brurberg, M. B., Nes, I. F. & Eijsink, V. G. H. (1996). Comparative studies of chitinases A and B from *Serratia marcescens*. *Microbiology-Uk*, 142: 1581-1589.
- Cantarel, B., Coutinho, P., C, R., T, B., V, L. & B, H. *The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics*. Tilgjengelig fra: [www.cazy.org](http://www.cazy.org).
- Cederkvist, F., Zamfir, A. D., Bahrke, S., Eijsink, V. G. H., Sorlie, M., Peter-Katalinic, J. & Peter, M. G. (2006). Identification of a high-affinity-binding oligosaccharide by (+) nano-electrospray quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry of a noncovalent enzyme-ligand complex. *Angewandte Chemie-International Edition*, 45 (15): 2429-2434.
- Cederkvist, F. H., Parmer, M. P., Varum, K. M., Eijsink, V. G. H. & Sorlie, M. (2008). Inhibition of a family 18 chitinase by chito-oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 74 (1): 41-49.
- Cliff, M. J., Gutierrez, A. & Ladbury, J. E. (2004). A survey of the year 2003 literature on applications of isothermal titration calorimetry. *Journal of Molecular Recognition*, 17 (6): 513-523.
- Davies, G. & Henrissat, B. (1995). STRUCTURES AND MECHANISMS OF GLYCOSYL HYDROLASES. *Structure*, 3 (9): 853-859.
- Davies, G. J., Wilson, K. S. & Henrissat, B. (1997). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal*, 321: 557-559.
- Day, Y. S., Baird, C. L., Rich, R. L. & Myszka, D. G. (2002). Direct comparison of binding equilibrium, thermodynamic, and rate constants determined by surface- and solution-based biophysical methods. *Protein Sci*, 11 (5): 1017-25.

- Divne, C., Stahlberg, J., Teeri, T. T. & Jones, T. A. (1998). High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50 angstrom long tunnel of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Journal of Molecular Biology*, 275 (2): 309-325.
- Elias, J. A., Homer, R. J., Hamid, Q. & Lee, C. G. (2005). Chitinases and chitinase-like proteins in T(H)2 inflammation and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116 (3): 497-500.
- Fuchs, R. L., McPherson, S. A. & Drahos, D. J. (1986). CLONING OF A SERRATIA-MARCESCENS GENE ENCODING CHITINASE. *Applied and Environmental Microbiology*, 51 (3): 504-509.
- Fukamizo, T. & Kramer, K. J. (1985). MECHANISM OF CHITIN HYDROLYSIS BY THE BINARY CHITINASE SYSTEM IN INSECT MOLTING FLUID. *Insect Biochemistry*, 15 (2): 141-145.
- Fukamizo, T., Sasaki, C., Schelp, E., Bortone, K. & Robertus, J. D. (2001). Kinetic properties of chitinase-1 from the fungal pathogen *Coccidioides immitis*. *Biochemistry*, 40 (8): 2448-2454.
- Fusetti, F., von Moeller, H., Houston, D., Rozeboom, H. J., Dijkstra, B. W., Boot, R. G., Aerts, J. & van Aalten, D. M. F. (2002). Structure of human chitotriosidase - Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (28): 25537-25544.
- Gomez, J. & Freire, E. (1995). THERMODYNAMIC MAPPING OF THE INHIBITOR SITE OF THE ASPARTIC PROTEASE ENDOTHAPEPSIN. *Journal of Molecular Biology*, 252 (3): 337-350.
- Hahnefeld, C., Drewianka, S. & Herberg, F. W. (2004). Determination of kinetic data using surface plasmon resonance biosensors. *Methods in Molecular Medicine* (94): 299-320.
- Henrissat, B. (1991). A CLASSIFICATION OF GLYCOSYL HYDROLASES BASED ON AMINO-ACID-SEQUENCE SIMILARITIES. *Biochemical Journal*, 280: 309-316.
- Herrera-Estrella, A. & Chet, I. (1999). Chitinases in biological control. *EXS*, 87: 171-84.
- Holdgate, G. A., Tunnicliffe, A., Ward, W. H. J., Weston, S. A., Rosenbrock, G., Barth, P. T., Taylor, I. W. F., Pauptit, R. A. & Timms, D. (1997). The entropic penalty of ordered water accounts for weaker binding of the antibiotic novobiocin to a resistant mutant of DNA gyrase: A thermodynamic and crystallographic study. *Biochemistry*, 36 (32): 9663-9673.
- Holt, P. G. (1996). Infections and the development of allergy. *Toxicology Letters*, 86 (2-3): 205-210.
- Horn, J. R., Russell, D., Lewis, E. A. & Murphy, K. P. (2001). van't Hoff and calorimetric enthalpies from isothermal titration calorimetry: Are there significant discrepancies? *Biochemistry*, 40 (6): 1774-1778.
- Horn, S. J., Sikorski, P., Cederkvist, J. B., Vaaje-Kolstad, G., Sorlie, M., Synstad, B., Vriend, G., Varum, K. M. & Eijsink, V. G. H. (2006a). Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (48): 18089-18094.
- Horn, S. J., Sorbotten, A., Synstad, B., Sikorski, P., Sorlie, M., Varum, K. M. & Eijsink, V. G. H. (2006b). Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. *Febs Journal*, 273 (3): 491-503.
- Horn, S. J., Sorlie, M., Vaaje-Kolstad, G., Norberg, A. L., Synstad, B., Varum, K. M. & Eijsink, V. G. H. (2006c). Comparative studies of chitinases A, B and C from *Serratia marcescens*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 24 (1-2): 39-53.
- <http://www.biology.arizona.edu>. (2000). *Antibody Structure*: The University of Arizona Tilgengelig fra: <http://www.biology.arizona.edu/IMMUNOLOGY/tutorials/antibody/structure.html> (lest 15.03.10).
- Hult, E. L., Katouno, F., Uchiyama, T., Watanabe, T. & Sugiyama, J. (2005). Molecular directionality in crystalline beta-chitin: hydrolysis by chitinases A and B from *Serratia marcescens* 2170. *Biochemical Journal*, 388: 851-856.

- Jea, J. Y., Kim, E. K., Ahn, C. B., Moon, S. H., Jeon, B. T., Kim, B., Park, T. K. & Park, P. J. (2007). Sulfated chitooligosaccharides as prolyl endopeptidase inhibitor. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41 (5): 529-533.
- Jeon, Y. J., Kamil, J. & Shahidi, F. (2002). Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (18): 5167-5178.
- Koshland, D. E. (1953). STEREOCHEMISTRY AND THE MECHANISM OF ENZYMATIC REACTIONS. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 28 (4): 416-436.
- Kumar, M. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, 46 (1): 1-27.
- Kuranda, M. J. & Robbins, P. W. (1991). CHITINASE IS REQUIRED FOR CELL-SEPARATION DURING GROWTH OF SACCHAROMYCES-CEREVISIAE. *Journal of Biological Chemistry*, 266 (29): 19758-19767.
- Li, B., Wang, X., Chen, R., Huangfu, W. G. & Xie, G. L. (2008). Antibacterial activity of chitosan solution against *Xanthomonas* pathogenic bacteria isolated from *Euphorbia pulcherrima*. *Carbohydrate Polymers*, 72 (2): 287-292.
- Luque, I. & Freire, E. (2002). Structural parameterization of the binding enthalpy of small ligands. *Proteins-Structure Function and Genetics*, 49 (2): 181-190.
- Manoil, C. & Beckwith, J. (1986). A GENETIC APPROACH TO ANALYZING MEMBRANE-PROTEIN TOPOLOGY. *Science*, 233 (4771): 1403-1408.
- Mauch, F., Mauchmani, B. & Boller, T. (1988). ANTIFUNGAL HYDROLASES IN PEA TISSUE .2. INHIBITION OF FUNGAL GROWTH BY COMBINATIONS OF CHITINASE AND BETA-1,3-GLUCANASE. *Plant Physiology*, 88 (3): 936-942.
- McCarter, J. D. & Withers, S. G. (1994). MECHANISMS OF ENZYMATIC GLYCOSIDE HYDROLYSIS. *Current Opinion in Structural Biology*, 4 (6): 885-892.
- MicroCal. Tilgjengelig fra: [www.microcalorimetry.com](http://www.microcalorimetry.com) (lest 01.03.10).
- Mosmann, T. R. & Coffman, R. L. (1989). TH1-CELL AND TH2-CELL - DIFFERENT PATTERNS OF LYMPHOKINE SECRETION LEAD TO DIFFERENT FUNCTIONAL-PROPERTIES. *Annual Review of Immunology*, 7: 145-173.
- Muzzarelli, R., Tarsi, R., Filippini, O., Giovanetti, E., Biagini, G. & Varaldo, P. E. (1990). ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF N-CARBOXYBUTYL CHITOSAN. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34 (10): 2019-2023.
- Nam, K. S., Kim, M. K. & Shon, Y. H. (2007). Inhibition of proinflammatory cytokine-induced invasiveness of HT-29 cells by chitosan oligosaccharide. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17 (12): 2042-2045.
- Nishio, M., Hirota, M. & Umezawa, Y. (1998). *The CH/π interaction: evidence, nature, and consequences*. New York: Wiley-VCH. XIII, 217 s. s.
- Norberg, A. L., Zakariassen, H., Karlsen, V., Hoell, V. K., Bakke, I., Eijsink, V. G. H. & Sørli, M. (2010). *Analysis of Substrate Binding to a Family 18 chitinase by Isothermal Titration Calorimetry and Surface Plasmon Resonance to Mapped Subsite Affinities and the Kinetics that underly Processivity*: The Norwegian University of Life Sciences. 19 s. Upublisert manuskript.
- Palli, S. R. & Retnakaran, A. (1999). Molecular and biochemical aspects of chitin synthesis inhibition. *EXS*, 87: 85-98.
- Perozzo, R., Folkers, G. & Scapozza, L. (2004). Thermodynamics of protein-ligand interactions: History, presence, and future aspects. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 24 (1-2): 1-52.
- Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A. B., Chet, I., Wilson, K. S. & Vorgias, C. E. (1994). CRYSTAL-STRUCTURE OF A BACTERIAL CHITINASE AT 2.3-ANGSTROM RESOLUTION. *Structure*, 2 (12): 1169-1180.

- QIAGEN. (2003). *The QIAexpressionist™ A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins*.
- Rahman, M. A., Kumar, S. G., Kim, S. W., Hwang, H. J., Baek, Y. M., Lee, S. H., Hwang, H. S., Shon, Y. H., Nam, K. S. & Yun, J. W. (2008). Proteomic analysis for inhibitory effect of chitosan oligosaccharides on 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Proteomics*, 8 (3): 569-581.
- Ray, A. & Cohn, L. (1999). Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, 104 (8): 985-993.
- Rhoades, J. & Roller, S. (2000). Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (1): 80-86.
- Roberts, G. A. F. (1992). *Chitin chemistry*. London: Macmillan. xvi, 352 s. s.
- Roby, D., Gadelle, A. & Toppan, A. (1987). CHITIN OLIGOSACCHARIDES AS ELICITORS OF CHITINASE ACTIVITY IN MELON PLANTS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 143 (3): 885-892.
- Sam. (2008). *BMC Bioinformatics*, 9 (74).
- Seyfarth, F., Schliernann, S., Elsner, P. & Hipler, U. C. (2008). Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*. *International Journal of Pharmaceutics*, 353 (1-2): 139-148.
- Sikorski, P., Sorbotten, A., Horn, S. J., Eijsink, V. G. H. & Varum, K. M. (2006). *Serratia marcescens* chitinases with tunnel-shaped substrate-binding grooves show endo activity and different degrees of processivity during enzymatic hydrolysis of chitosan. *Biochemistry*, 45 (31): 9566-9574.
- Sinnott, M. L. (1990). CATALYTIC MECHANISMS OF ENZYMATIC GLYCOSYL TRANSFER. *Chemical Reviews*, 90 (7): 1171-1202.
- Sorbotten, A., Horn, S. J., Eijsink, V. G. H. & Varum, K. M. (2005). Degradation of chitosans with chitinase B from *Serratia marcescens* - Production of chito-oligosaccharides and insight into enzyme processivity. *Febs Journal*, 272 (2): 538-549.
- Srinivasa, P. C., Ramesh, M. N., Kumar, K. R. & Tharanathan, R. N. (2004). Properties of chitosan films prepared under different drying conditions. *Journal of Food Engineering*, 63 (1): 79-85.
- Stenberg, E., Persson, B., Roos, H. & Urbaniczky, C. (1991). QUANTITATIVE-DETERMINATION OF SURFACE CONCENTRATION OF PROTEIN WITH SURFACE-PLASMON RESONANCE USING RADIOLABELED PROTEINS. *Journal of Colloid and Interface Science*, 143 (2): 513-526.
- Suzuki, K., Taiyoji, M., Sugawara, N., Nikaidou, N., Henrissat, B. & Watanabe, T. (1999). The third chitinase gene (chiC) of *Serratia marcescens* 2170 and the relationship of its product to other bacterial chitinases. *Biochemical Journal*, 343: 587-596.
- Suzuki, K., Sugawara, N., Suzuki, M., Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N. & Watanabe, T. (2002). Chitinases A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: Enzymatic properties and synergism on chitin degradation. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 66 (5): 1075-1083.
- Synowiecki, J. & Al-Khateeb, N. A. (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43 (2): 145-171.
- Tews, I., vanScheltinga, A. C. T., Perrakis, A., Wilson, K. S. & Dijkstra, B. W. (1997). Substrate-assisted catalysis unifies two families of chitinolytic enzymes. *Journal of the American Chemical Society*, 119 (34): 7954-7959.
- Turnbull, W. B. & Daranas, A. H. (2003). On the value of c: Can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? *Journal of the American Chemical Society*, 125 (48): 14859-14866.

- Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N., Nonaka, T., Sugiyama, J. & Watanabe, T. (2001). Roles of the exposed aromatic residues in crystalline chitin hydrolysis by chitinase from *Serratia marcescens* 2170. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (44): 41343-41349.
- Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., van Aalten, D. M. F., Synstad, B. & Eijsink, V. G. H. (2005). The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (31): 28492-28497.
- van Aalten, D. M., Synstad, B., Brurberg, M. B., Hough, E., Riise, B. W., Eijsink, V. G. & Wierenga, R. K. (2000). Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1.9-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (11): 5842-7.
- van Aalten, D. M., Komander, D., Synstad, B., Gaseidnes, S., Peter, M. G. & Eijsink, V. G. (2001). Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (16): 8979-84.
- Vanschellinga, A. C. T., Kalk, K. H., Beintema, J. J. & Dijkstra, B. W. (1994). CRYSTAL-STRUCTURES OF HEVAMINE, A PLANT DEFENSE PROTEIN WITH CHITINASE AND LYSOZYME ACTIVITY, AND ITS COMPLEX WITH AN INHIBITOR. *Structure*, 2 (12): 1181-1189.
- Vanschellinga, A. C. T., Armand, S., Kalk, K. H., Isogai, A., Henrissat, B. & Dijkstra, B. W. (1995). STEREOCHEMISTRY OF CHITIN HYDROLYSIS BY A PLANT CHITINASE LYSOZYME AND X-RAY STRUCTURE OF A COMPLEX WITH ALLOSAMIDIN - EVIDENCE FOR SUBSTRATE ASSISTED CATALYSIS. *Biochemistry*, 34 (48): 15619-15623.
- vanScheltinga, A. C. T., Hennig, M. & Dijkstra, B. W. (1996). The 1.8 angstrom resolution structure of hevamine, a plant chitinase/lysozyme, and analysis of the conserved sequence and structure motifs of glycosyl hydrolase family 18. *Journal of Molecular Biology*, 262 (2): 243-257.
- Varrot, A., Frandsen, T. P., von Ossowski, I., Boyer, V., Cottaz, S., Driguez, H., Schulein, M. & Davies, G. J. (2003). Structural basis for ligand binding and processivity in cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens*. *Structure*, 11 (7): 855-864.
- Vinetz, J. M., Valenzuela, J. G., Specht, C. A., Aravind, L., Langer, R. C., Ribeiro, J. M. C. & Kaslow, D. C. (2000). Chitinases of the avian malaria parasite *Plasmodium gallinaceum*, a class of enzymes necessary for parasite invasion of the mosquito midgut. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (14): 10331-10341.
- von Ossowski, I., Stahlberg, J., Koivula, A., Piens, K., Becker, D., Boer, H., Harle, R., Harris, M., Divne, C., Mahdi, S., et al. (2003). Engineering the exo-loop of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase, Cel7A. A comparison with *Phanerochaete chrysosporium* Cel7D. *Journal of Molecular Biology*, 333 (4): 817-829.
- Vårum, S. & Smidsrød, O. (2004). Structure - Property Relationship in Chitosans. I: Dumitriu, S. (red.) *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*, s. XVII, 1204 s. New York: Marcel Dekker.
- Watanabe, T., Kimura, K., Sumiya, T., Nikaidou, N., Suzuki, K., Suzuki, M., Taiyoji, M., Ferrer, S. & Regue, M. (1997). Genetic analysis of the chitinase system of *Serratia marcescens* 2170. *Journal of Bacteriology*, 179 (22): 7111-7117.
- Watanabe, T., Kanai, R., Kawase, T., Tanabe, T., Mitsutomi, M., Sakuda, S. & Miyashita, K. (1999). Family 19 chitinases of *Streptomyces* species: characterization and distribution. *Microbiology-Uk*, 145: 3353-3363.
- Wierenga, R. K. (2001). The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *Febs Letters*, 492 (3): 193-198.
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F. & Lin, L. N. (1989). RAPID MEASUREMENT OF BINDING CONSTANTS AND HEATS OF BINDING USING A NEW TITRATION CALORIMETER. *Analytical Biochemistry*, 179 (1): 131-137.

- Zakariassen, H., Aam, B. B., Horn, S. J., Varum, K. M., Sorlie, M. & Eijsink, V. G. H. (2009). Aromatic Residues in the Catalytic Center of Chitinase A from *Serratia marcescens* Affect Processivity, Enzyme Activity, and Biomass Converting Efficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (16): 10610-10617.
- Zhang, S., Irwin, D. C. & Wilson, D. B. (2000). Site-directed mutation of noncatalytic residues of *Thermobifida fusca* exocellulase Cel6B. *European Journal of Biochemistry*, 267 (11): 3101-3115.
- Zhou, W. L., Irwin, D. C., Escovar-Kousen, J. & Wilson, D. B. (2004). Kinetic studies of *Thermobifida fusca* Cel9A active site mutant enzymes. *Biochemistry*, 43 (30): 9655-9663.
- Zhu, Z., Zheng, T., Homer, R. J., Kim, Y. K., Chen, N. Y., Cohn, L., Hamid, Q. & Elias, J. A. (2004). Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science*, 304 (5677): 1678-1682.
- Zimmermann, N., Mishra, A., King, N. E., Fulkerson, P. C., Doepker, M. P., Nikolaidis, N. M., Kindinger, L. E., Moulton, E. A., Aronow, B. J. & Rothenberg, M. E. (2004). Transcript signatures in experimental asthma: Identification of STAT6-dependent and -independent pathways. *Journal of Immunology*, 172 (3): 1815-1824.