

SUBSTRATBINDING I KITINASE A FRA SERRATIA MARCESCENS

SUBSTRATE BINDING IN CHITINASE A FROM SERRATIA MARCESCENS

SUMAIRA HUSSAIN

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP
INSTITUTT FOR MILJØ, BIOTEKNOLOGI OG MATVITENSKAP
MASTEROPPGAVE 30STP . 2012



Substratbinding i kitinase A fra *Serratia marcescens*

Substrate binding in chitinase A from *Serratia marcescens*

Masteroppgave: Sumaira Hussain

UMB

2011-2012

Forord

Denne master oppgaven har blitt utført ved Institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap ved Universitetet for Miljø og Biovitenskap (UMB). Periode 2011-2012. Det er mange som har bidratt med inspirasjon, og motivasjon til denne oppgaven.

Aller først vil jeg takke min veileder Morten Sørlie for å ha troen på meg, Stor takk for god oppfølging under arbeidet med oppgaven.

Deretter vil jeg takke andre medarbeidere på laboratoriet. Takker Bioorganiske gruppen for et godt miljø på laboratoriet, takker blant annet Salima Fjeld, Anne Line Nordberg, Anne Grethe Hamre og Linn Dybdahl for og alltid vær der når jeg trengte hjelp.

Også vil jeg takke min familie og venner for oppmuntring selv når ting virket vanskelig. Sist men ikke minst setter jeg stor pris på Marina Yusaf som har vært min følgesvenn fram og tilbake fra Oslo by i hele masterperioden.

Ås, 30.04.12

Sumaira Hussain

Innhold

Sammendrag, Norsk	5
Abstract, Engelsk	7
Forkortelser	8
1 Introduksjon	9
1.1 Karbohydrater	9
1.2 Polysakkarider	9
1.3 Kitin og kitosan	10
1.3.1 Struktur	10
1.3.2 Anvendelser.....	11
1.4 Glykosyl hydrolaser (enzymmer som bryter ned polysakkarider).....	12
Klassifisering, struktur, virkemåter, mekanisme.....	12
1.5 Kitinaser	12
1.6 Residuer i +3	13
1.7 Inhibering av kitinaser	14
1.8 Bindingsstyrke (K_d) er viktig parameter.	15
1.9 (GlcNAc) ₆ mot ChiA-E315Q en modell for en inhibitor som binder både i positive og negative sub seter.....	15
1.10 Seterettet mutagenese.....	15
2 Mål med oppgaven.....	16
2.1 Måle bindingsstyrke for (GlcNAc) ₆ mot ChiA som en modell for en inhibitor som dekker både positive og negative sub seter.	17
3 Materialer	17
4 Metoder	21
4.1 Tillaging av plasmid	21
4.1.1 Seterettet mutagenese.....	21
4.1.2 Design av primere.....	22
4.1.3 Transformering og dyrking	22
4.1.4 Transformering: (Seterettet mutagenese).....	22
4.2 Isolering.....	25
4.2.1 Kontroll av rensset plasmid:.....	25
4.2.3 Transformering av PCR produkt.....	26
4.3 Dyrking:	26
4.4 Periplasmatisk ekstrakt:	27
4.5 Rensing av periplasmatisk ekstrakt	27

4.6 Ionebyttekolonne, IEC:	28
4.7 HIC:	29
4.8 Rensing av ChiA WT ved bruk av kitinkolonne	30
4.9 SDS Page	31
4.10 Enzymkonsentrasjon	32
4.11 Enzymaktivitet	33
4.12 Isotermisk titreringskalorimetri (ITC).....	34
5 Resultater og Diskusjon	36
5.1 Mutasjonsanalyse.....	36
5.2 Tillaging av plasmid, transformering og dyrking:	36
5.2.1 Tillaging av plasmid	37
5.3 Produksjon og rensing av ChiA villtype.....	39
5.3.1 Rensing Chi A WT:.....	39
5.3.2 SDS Page:	40
5.3.3 Spesifikke aktivitet:.....	40
5.3.4 Enzymkonsentrasjon ChiA WT:	41
5.4 Produksjon og rensing av ChiA E315Q.....	41
5.4.1 Rensing av proteiner.....	41
5.4.2 Rensing ionebyttekolonne:.....	42
5.4.3 Rensing HIC:.....	43
5.4.4 Proteiner separert på SDS-page	44
5.4.5 Spesifikke aktivitet av mutanten:	45
5.4.6 Enzymkonsentrasjon: ChiA E315Q.....	45
5.5 Bindingsstyrke av (GlcNAc) ₆ til ChiA-E315Q.....	46
5.5.1 Thermogrammer av (GlcNAc) ₆ titrering mot ChiA-E315Q	46
6 Veien videre	47
7 REFERANSER:.....	48

Sammendrag, Norsk

Kitin er et karbohydrat som forekommer mye i naturen, blant annet i skallet på skalldyr. Når dyrene skal bytte skall, kommer kitinase i bilde. Kitinase er enzymer som bryter ned kitin. Kitin finnes i naturen i form av kitosan, da har kitin gitt fra seg en eller flere acetylgrupper. Oppgaven går ut på å se om hva slags effekt mutasjon i det aktive setet til chiA hos *Serratia marcescens* har på kitin og kitooligosakkarider. Det ble brukt en mutant chiA E315Q som allerede var blitt laget av en tidligere student. I denne mutanten hadde det aromatiske residuet glutamat blitt byttet med aminosyren glutamin. Denne mutanten ble videre dyrket og rensset. Det ble målt konsentrasjon og enzymaktivitet på den. Det ble vist at det var en inaktiv mutant, denne mutanten ble da brukt videre for å sjekke hvor fast den binder på GlcNac₆. ChiA E315Q ble først dyrket, deretter sentrifugert, og oppkonsentrert. Buffer ble byttet om til 20mM Tris-HCl. Det ble målt enzymkonsentrasjon og enzymaktivitet.

For sammenligning ble det også dyrket villtypen av enzymet. Chi WT ble dyrket, sentrifugert og oppkonsentrert. Deretter ble det også målt enzymaktivitet og enzymkonsentrasjon av enzymet. Villtypen hadde høy aktivitet, i motsetning til mutanten som ikke var aktiv.

Metoden som ble brukt for dette studie var isotermisk titrering (ITC). Det ble gjort måling på ITC om hvor sterkt mutanten ChiA E315 fra jordbakterien *Serratia marcescens* binder. Det ble gjort kitinaseassay med GlucNac₆. Vi fikk ingen bindingsisoterm. Det ble gjort måling ved temperatur 45, 30 og 20 °C, selv med ulik temperatur var det ingen bindingsisoterm. Det kan skyldes på grunn av at proteinet var ikke riktig foldet.

En liten del av oppgaven gikk ut på å lage mutanter. Her ble det brukt primere med mutasjonen. Mutantene som skulle lages var K320 S og K320A. På mutanten K320S var aminosyren lysin byttet ut med aminosyren serin, mens hos mutanten K320A var lysin byttet ut med aminosyren alanin. Begge disse mutasjonene foregår på residue 320. Plasmid ble laget, og det ble gjort seterettet mutagenese. Brukte PCR maskin for å få til muterte ChiA. ChiA mutanten ble lagt til dyrking på agarskål over natten. Det kom ikke noe vekst. Det ble prøvd med andre primere også, uten å få vellykket vekst. Metoden ble brukt gjentatte ganger

uten å lykkes. Andre masterstudenter skal jobbe videre med det, og finne ut av hva som gikk galt.

Denne studien har gitt mer forståelse for hvordan modifisering av enzymer kan forandre på egenskapene til enzymer.

Abstract, Engelsk

Chitin is a carbohydrate which is often found in nature, for example in shrimps shell. When animals change their shell, the chitinases play an important role. Chitinase is an enzyme which breaks down the chitin. Chitin is found in nature in form of chitosan, it is chitosan when the chitin has given one or more of its acetyl groups. The assignment is about to see which effect modification in the active site in ChiA gives to chitin and other chitooligosaccharides. Chi A is brought from the soil bacterium *Serratia Marcescens*. In this project a mutant ChiA E315Q was used. This mutant was already made by another student, and for knowing this mutant better, this mutant was used for further work. In this mutant the amino acid glutamic acid at 315 residue was replaced with the amino acid glutamine. ChiA E315Q was further adored, centrifuged and refined. The buffer was replaced by 20mM Tris-HCl. Concentration and enzyme activity where measured. It was an inactive mutant, therefor was its bindings skills in focus.

The method used for bindingparameter study was isothermal titration, ITC. The measurement was done at the ITC on the strength of mutant ChiA E315Q binding. It was done with chitinaseassay GlucNAc6. We had no bindingsisotherm. The measurement was done at temperatures 45, 30 and 20 ° C, even with different temperatures, there was no bindingsisoterm. It may be because the protein was not properly folded.

A small part of the task was to create mutants. It was used primers with the mutation. The mutants that were made were K320 S and K320A. In the mutant K320S amino acid Lysine was replaced with the amino acid Serine, while in mutant K320A was Lysine replaced by amino acid Alanine. Both of these mutations take place at residue 320. Mutants were made with PCR. Chia mutants were added on agar plates overnight for growth. The mutation wasn't successful, because it wasn't any growth on the agar plates. The method was used several times without success. Other Master's students will work on it and find out what went wrong.

Forkortelser

ChiA	Kitinase A
4-MU 4	Metylbellifery
GlcN D	Glukosamin
GlcNAc N	Acetylglykosami
Å	Ångström (0,1 nm)
WT	Enzymets villtype
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
EA	EtanolAmin
PCR	Polymerase chain reaction
dH ₂ O	Destillert vann
K _d	Dissosiasjonskonstanten
CHOS	Chitooligosaccharide
Q	Glutamin
E	Glutamat
K	Lysin
A	Alanin
S	Serin
°C	Grader (temperatur)

1 Introduksjon

1.1 Karbohydrater

Karbohydrater er en samlebetegnelse for en stor gruppe biologiske molekyler som kalles for sakkarider. Sakkarider klassifiseres i grupper etter molekylets oppbygning. De minste molekylene er monosakkarider, det er den enkleste formen og består av et karbohydrat.

Monosakkaridene er byggesteinene i de større molekylene,

Karbohydrater er de mest vanligste biomolekylene på jorden. Det er energirike organiske molekyler som fungerer som energireserve for planter og dyr. Karbohydrater inngår i mange biokjemiske prosesser, enten alene eller med andre biomolekyler som for eksempel proteiner. Karbohydrater inngår også som strukturelementer i celleveggen til bakterier, planter og exoskjelettet hos skalldyr. (Tharanathan RN, Kittur FS., 2003)

1.2 Polysakkarider

Hvorfor er disse viktige: Levende organismer bygger opp polysakkarider. Monosakkarider bindes sammen av til større molekyler via glykosidbindinger. Polysakkarider (poly=flere).

Polysakkarider er karbohydrater som er bygd opp stort antall monosakkarider som er bundet til hverandre med glykosidbindinger. For eksempel cellulose og stivelse. Begge er bygd opp av glukoseenheter, men glukosemolekylene er satt sammen på forskjellige måter.

Glykosidbindinger regnes som en av de mest stabile bindinger i naturen. Sukkerkjeder av ulike lengder gir flere ulike biologiske funksjoner og prosesser.

Stivelses funksjon er å samle opp karbohydrat. I løselig stivelse kan det finnes opptil 300 glukoseenheter, og i uløselig stivelse kan bestå av flere tusen glukosemolekyler. Stivelse regnes som karbohydratreserve. Stivelse har forgreinete kjeder, cellulose har i motsetning til stivelse lange utstrakte kjeder av glukoseenheter.

I hvert cellulosemolekyl er det mellom 3000-5000 enheter. Disse fibre er stive på grunn av kjedene ligger inntil hverandre bundet sammen av hydrogenbindinger. Cellulose er det viktigste byggematerialet i plantene, hos mennesker og dyr mangles det enzymet som spalter cellulose.

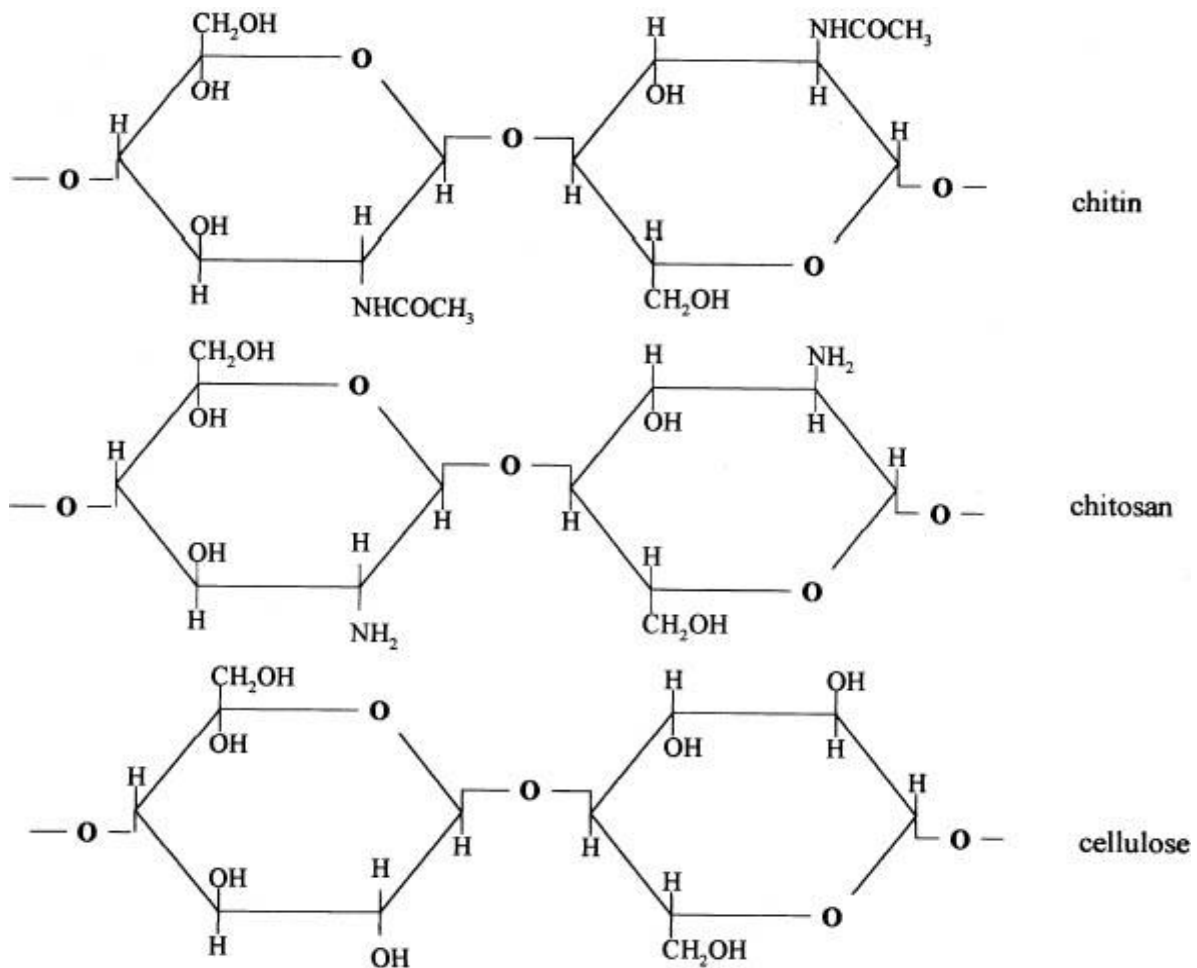
1.3 Kitin og kitosan

1.3.1 Struktur

Etter cellulose er kitin den vanligste biopolymeren i naturen og det produseres mellom 10^{10} og 10^{11} tonn kitin årlig i biosfæren (Gooday, 1990). Kitin, som er bygget opp av β -1,4-linket N-acetyl-D-glukosamin (GlcNAc) residuer, finnes i eksoskjelettet hos krepsdyr og insekter og i celleveggen hos sopp, grønne alger og gjær. (Boot, R. G., Blommaart, E. F., Swart, E., Ghauharali-van der Vlugt, K., Bijl, N., Moe, C., Place, A. & Aerts, J. M. (2001).

Kitosan er en kopolymer av D-glukosamin (GlcN) og (GlcNAc) enheter. Kitosan blir produsert gjennom delvis de-N-acetylering av kitin. (Tharanathan RN, Kittur FS., 2003) Dette kan skje naturlig og ved tilsats av syre eller base. For produksjon av kitosan kan det brukes to metoder, den ene hvor kitin først blir behandlet med sterk natriumhydroksid for å deesterifisere N-acetyl bindingene. Den andre metoden for fremstilling av kitosan er å løse materialene i syre, og deretter filtrere for å fjerne overflødige materialer. Disse blir videre behandlet med lyofilisering for å gi et vannløselig salt. Dette behandles med NaOH og tørkes. (Tharanathan RN, Kittur FS., 2003)

Kitin har store likheter med cellulose, og er kun forskjellig ved at hydroksylgruppen på C2-atomet er byttet ut med en acetamid gruppe. Lengden på polymeren varierer fra 5000 til 8000 residuer i enkelte krabber til kun 100 i noen gjær (Synowiecki, Al-Khateeb 2003). Molekylvekten til kitin kan være opptil 106 Da. (Tharanathan, R. N., and Kittur, F. S., 2003)



Figur 1.1: Forskjellen på kitin, kitosan og cellulose.(Allan, G. G., J. R.Fox, G. D.Crosby, and K. V.Sarkanen. 1977)

1.3.2 Anvendelser

Kitin og dets derivater har flere egenskaper som kan utnyttes industrielt. Kitin isoleres fra rekekall og andre naturlige ressurser og er med dette biologisk reproducerbar. Det kreves hard behandling, for eksempel sterk syre og lut, for å få fjernet uønskede stoffer fra kitinet, fordi kitin er kovalent bundet til andre stoffer. Det er utviklet en rekke metoder for å isolere kitin og kitosan. (Tharanathan, R. N., and Kittur, F. S., 2003)

Kitin og kitosan har en antimikrobiell, antimetastisk og immunologisk effekt som gjør dem godt egnet for forebygging og behandling av en rekke sykdommer.(Muzzarelli,R.A., Jeuniaux,C., and Gooday,G.W. (1986)). Kitosan har lenge blitt brukt til kosmetikk og sårbehandling. Kitosan har vært godt egnet til medisinerings på grunn av dens løslighet, og fordi det har bedre antimikrobiell aktivitet enn kitin. Kitosan er løselig i omtrent alle vandige

syrer, mens kitin kun lar seg løse i relativt lite antall løsemidler. Polariteten til kitosan er høy på grunn kationske setene langs kitosan kjeden. (Tharanathan, R. N., and Kittur, F. S., 2003)

1.4 Glykosyl hydrolaser (enzymmer som bryter ned polysakkarider)

Klassifisering, struktur, virkemåter, mekanisme

Glykosyl hydrolaser er en gruppe enzymer som hydrolyserer glykosidbindinger mellom to eller flere karbohydrater. Det kan også være hydrolyse av glykosidbindinger mellom karbohydrat og et annet molekyl. Disse enzymene kategoriseres i familier, basert på sekvenslikheter til proteinene.

Det er mange setefoldninger som er representert i de ulike glykosylhydrolasene hvor topologier beskrives under tre klasser: lomme, kløft og tunnel. (Terwisscha van Scheltinga, A.C., Hennig, M., and Dijkstra, B. W. (1996)). Lommestrukturen, også kalt for krater, er viktig for optimal gjenkjenning av endene av et sukkerkjede (eksobinding). Kløftstrukturen er en mer åpen struktur som tillater tilfeldig (endo) binding av sukkerenheter til polymeriske subtrater. Tunnelstrukturen derimot har en struktur som tillater enzymet å frigjøre produkter selv om substratet er fortsatt bundet. (Davies and Henrissat, B., (1995))

1.5 Kitinaser

Kitinaser hydrolyserer β -glykosidbindinger i kitin og kitinderivater. De er utbredt i naturen og finnes blant annet hos bakterier, virus, insekter, planter og dyr. Kitinaser og kitinase lignende proteiner har nylig blitt oppdaget i mus og mennesker (Elias, 2005). I klassifisering av glykosylhydrolaser hører kitinasene til familie 18 og 19. Inndeling i to familier skyldes på grunn av forskjell i aminosyresekvensen. Familie 18 representerer kitinaser fra både prokaryote og eukaryote organismer, og kitinaser fra familie 19 er for det meste funnet i høyere planter. Begge familiene har også ulik katalytisk mekanisme.

Serriata marcescens er en gram negativ bakterie som er en av de mest effektive bakteriene for nedbryting av kitin. (Fuchs et.al, 1986) Den hører til familien Enterobacteriaceae. Når S.

marcescens gror på kitin, uttrykkes det spesielt fem proteiner, kitinase A (ChiA), kitinase B (ChiB), kitinase C (ChiC), en kitobiase og et kitinbindende protein, CBP21 (Suzuki et al 1998 Biosci.Biotechnol.Biochem.). Senere har det blitt vist at CBP21 er et enzym som oksiderende kitin og med dette skapes det et bindingsbrudd i kitin (Vaaje-Kolstad et al Science 2010.)

Kitinasene har like katalytiske domener. De har et konservert DxxDxDxE motiv som befinner seg på bånd 4 i TIM-barrelen (β/α)8-tønna. (van Aalten, D.M.F., Komander, D., Synstad, B., Gåseidnes, S., Peter, M.G. and Eijsink, V.G.H. (2001)) Kitinasene inneholder et eller flere karbohydratbindende domener. Tidligere resultater viser at aktive setet er en semilukket tunnel. Ved binding bøyer enzymet seg og roterer substratet. Enzymets stolkonformasjon får båtkonformasjonsendring på sukkerresidue bindingen på -1 subsite. (Papanikolau, Y., Prag, G., Tavlak, G., Vorgias, C.E., Oppenheim, A.B. and Petratos, K. (2001))

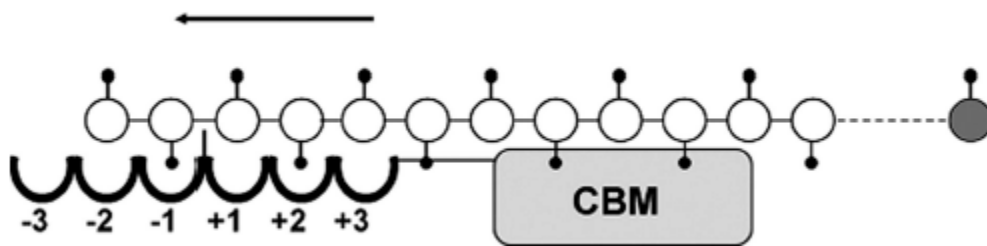
1.6 Residuer i +3

Det aktive setet deles inn i subseter merkes fra -n til +n. -n inneholder den ikke-reduserende enden av substratet og +n den reduserende enden av substratet. Kutting skjer alltid mellom subsetene -1 og +1 (Davies et.al, 1997). Sukkerenheter binder til subsetene ved hjelp av hydrofobe interaksjoner og polare kontakter. De fleste kontaktene mellom sukkeret og proteinet ligger på subsete -1, her finner vi også de fleste konserverte hydrofobe residuene. I dette subsetet endres sukkerets konformasjon, fra stol til båtkonfigurasjon hvilket er viktig for å få gjennomført hydrolysen. (Tews, vanScheltinga, Perrakis, Wilson, and Dijkstra, (1997))

Det katalytiske residuet Glu 144 ligger i +1 subsetet sammen med fem andre ikke konserverte residuer, disse danner til sammen fem bindinger til sukkeret (Van Aalten, Synstad, Brurberg, Hough, Riise, Eijsink, and Wierenga, 2000).

Som nevnt ovenfor kan glykosylhydrolaser bryte ned polysakkarider ved hjelp av en processiv mekanisme. Det har blitt vist at for ChiA er det Trp¹⁶⁷ i subsite som er viktig for processiviteten til ChiA. (Zakariassen, H., Aam, B.B., Horn, S.J., Vårum, K.M., Sørli, M. and Eijsink, V.G.H. (2009))

Stacking interaksjonen mellom Trp167 har vist seg å være sterkt ($\Delta G^{\circ}r = -1.8$ kcal/mol, Babab et al J phys Chem B, 2010). Videre er det også vist at interaksjoner med +3 subseite er like sterke som for de i -3 (Horn et al Biocatal Biotransf 2006) gjennom observasjon av at (GlcNAc)₅ binder like sterk fra -3 til +2 subseite som fra subseite -2 til +3. (Horn, S.J., Sørлие, M., Vaaje-Kolstad, G., Norberg, A.L., Synstad, B., Vårum, K.M. and Eijsink, V.G.H. (2006)).



Figur 1: Subseter fra -3 til subseite +3 hos ChiB fra *Serratia marcescense* (Horn et al. (2006)) En kitinkjede bundet med ChiB.

Enzymatiske studier har vist at heksamer legger på -3 til +3 (Brurberg, Nes, og Eijsink, 1996). Tidligere studier viser at +3 subseite danner interaksjon med Tyr418 i ChiA. En mutasjon på denne tyrosinen vil senke proteinets evne til å binde sukker, mens det fortsatt vil være mulighet for spalting av kortere oligosakkarider.

Studier av (GlcNAc)₄₋₆ binding til ChiA forelår tilstedeværelse av en +3 subseite. (Horn, S.J., Sørлие, M., Vaaje-Kolstad, G., Norberg, A.L., Synstad, B., Vårum, K.M. and Eijsink, V.G.H. (2006)). Tidligere studier har vist at når ChiA W167A inkuberer med (GlcNAc)₅, så binder pentamer hovedsaklig med -2 til +3, og med dette bekreftes tilstedeværelsen av substrat affinitet i positive residuer utover +2. +3 subseite kan også ha en mulig rolle i å forfremme produkt forflytning. (Papanikolau, Y., Prag, G., Tavlas, G., Vorgias, C.E., Oppenheim, A.B. and Petratos, K. (2001))

1.7 Inhibering av kitinaser

Hvorfor er dette viktig

Inhibering av kitinaser er et stort interesse område for biokjemikere fordi den leder til nye veier for å bekjempe patogener. Patogener som insekter, nematoder og sopp, som har

kitinskall og kitinaser lar disse vokse, inhibering av kitinaser hindrer en slik vekst, derfor er det viktig å finne mest mulig informasjonen om interaksjonen mellom kitinaser og kitin. Det har blitt påvist at humane kitinaser kan ha virkning som medisin mot allergi og infeksjoner (Donnelly & Barnes, 2004).

1.8 Bindingsstyrke (K_d) er viktig parameter.

K_d er en parameter som viser hvor sterk en inhibitor inhiberer. Bindingsaffiniteten (K_d) måles typisk for bindingsstrykeri mellom millimolar til nanomolar.

(<http://www.microcal.com/technology/itc.asp>)

1.9 (GlcNAc)₆ mot ChiA-E315Q en modell for en inhibitor som binder både i positive og negative subseter.

Det har blitt påvist at det er mulig med interaksjon av ChiA E315Q med oktamer eller heksamer N-acetyl-glukosamin. Interaskjoner med substratet har blitt karakterisert i tidligere studier. (Yannis Papanikolau, Gali Prag, Giorgos Tavlas, Constantinos E. Vorgias, Amos B. Oppenheim, and Kyriacos Petratos, 2001)

1.10 Seterettet mutagenese

Tidligere seterettet mutagenese av ChiA E315Q har det blitt observert et vannmolekyl i det aktive setet i dette enzymet. Vannmolekylets H er bundet til fenolhydroksylen til Tyr390 og NH gruppen av 2 N-acetyl av -1 sukker subete. Det er konkludert at vannmoleylet er der fordi den deltar i reaksjonen. I ChiA WT har det kommet resultater som indikere at en mekanisme som hydrolyse foregår i det aktive setet ved -1 subsetet. (Yannis Papanikolau, Gali Prag, Giorgos Tavlas, Constantinos E. Vorgias, Amos B. Oppenheim, and Kyriacos Petratos, (2001)

Karakterisering av det katalytiske område har skjedd ved 1,55Å. Sidekjede av residue Asp313 ligger i det aktive setet vedtar to konformasjonsendringer, den ene konformasjonen kommuniserer med katalytiske Glu315, og den andre konformasjonen danner interaskjon med den konserverte Asp311.

I subsete -1 er blir Glu315 protonert på grunn av sin nærhet til Asp313. Nærheten mellom disse to aminosyrene fører til opptak av proton fra vannmolekylet, og opptak av gjenværende hydrooksid anionet ved C1 karbon på -1 sukkeret. Dette fører til hydrolytisk syklus av enzymet. (Yannis Papanikolau, Gali Prag, Giorgos Tavlas, Constantinos E. Vorgias, Amos B. Oppenheim, and Kyriacos Petratos, 2001)

I denne oppgaven har den seterettede mutagenesen foregått i subsete +3. Ene mutanten der aminosyren lysin blir byttet ut med aminosyren serin, mens i andre mutanten blir lysin byttet ut med aminosyren alanin. Begge disse mutasjonene foregår på residue 320.

2 Mål med oppgaven.

Det ene delmålet var å studere hva slags effekt Lys320 i +3 subsetet har på substratbinding gjennom setterettet mutagenese hvor denne skal bli forsøkt byttet ut med et serine og et alaninresidue og resulturende residue inkuberes med substratet (GlcNAc)₅ hvor fordeling av -3 til +2 binding versus -3 til +3 produktiv binding gir indikasjoner vedrørende bindingsstyrken til Lys320.

(GlcNAc)₆ benyttes som en kitoooligosakkarid basert modellinhibitor for familie 18 kiitinaser. Bindingstyrken til denne mot en inaktiv mutant av ChiA, ChiA-E315Q, skal måles ved hjelp av isotermisk titreringskalorimetri.

Hos ChiA-E315Q har endringen skjedd på subsete 315. Aminosyren Glutamat ble byttet med glutaminsyre. Tidligere studier viser at residuer Asp313, Tyr390, Glu315 spiller en sentral rolle i katalysen. (Yannis Papanikolau, Gali Prag, Giorgos Tavlas, Constantinos E. Vorgias, Amos B. Oppenheim, and Kyriacos Petratos, 2001)

2.1 Måle bindingsstyrke for (GlcNAc)₆ mot ChiA som en modell for en inhibitor som dekker både positive og negative sub seter.

Bindingsenergien for kito oligosakkarid (CHOS) baserte inhibitorer er spesielt interessant fordi de er spesifikke mot kitinaser, og forstyrrer ikke andre enzymatiske systemer. Slike inhibitorer holder har blitt mye studert. Bindingsstyrken er avhengig av lengden på oligomer. CHOS derivater fra familie 18 kitinaser binder seg til glykon sub seter fordi konformasjonen av sukker molekylets reduserende ende av oligomer ligner på strukturen av transiton state, og har derfor høy affinitet på -1 delområde.

ChiA har et aktivt sete som kan binde opptil seks GlcNAC enheter. (Perrakis,A., Tews,I., Dauter,Z., Oppenheim,A.B., Chet,I., Wilson,K.S., and Vorgias,C.E., 1994) Substrater med seks sukkerenheter vil festes på alle bindingssetene. På den ikke reduserende enden av substratet vil vi få substratbinding.

3 Materialer

Laboratorieutstyr	Leverandør
Amiconrør (Ultra-15, 10 kDa)	Millipore
Autoklavteip	VWR
Automatpipetter	ThermoLabsystems
Avtrekkskap (AV-100)	Telstar
Begerglass	Fisherbrand
Blåkorkflasker	Scott Duran
BioLogic LP kromatografisystem	Bio-Rad
DyNA Quant™ 200 Fluorometer	Hoefer
Dyrkingskolber	Duran
Dyrkningsrør	Duran
Elektroforeseutstyr • Gelkjøringskammer • Gelspenningskilde • Gelkniv	Invitrogen
Eppendorfrør	Axygen
Inkubator	Infors

<ul style="list-style-type: none"> • Multitron Standard • Multitron Eco 	
Fluorometer: DyNa quant 200 Hoefer	Hoefer
Fotoutstyr: Gel photo system GFS 1000	Techtum Lab AB
ITC	MicroCal
Ionebyttekolonne (HiTrap CM FF 5 ml)	GE Healthcare
Mikrovekt Sartorius	Sartorius
Målekolber Schott	Duran
Målesylinder Schott	Duran
NuPAGE SDS geler og buffere	Invitrogen
Oppkonsentrator (Amicon 8400)	Millipore
PCR-maskin (Mastercycler gradient)	Eppendorf
PCR-rør	Axygen
Petriskåler	Heger
pH-meter (MP 220)	Mettler-Toledo
Pipettespisser	Thermo Scientific
Quick Change Site-directed Mutagenesis Kit <ul style="list-style-type: none"> • Pfu Turbo DNA polymerase (2,5 U/μl) • 10x reaksjons buffer • DpnI restriksjons enzyme (10U/μl) • DNTP miks • E. coli XL1-Blue superkompetente celler 	Stratagene
Rør m/skrukork, 15 og 50 ml	Greiner Bio One
Sentrifugerotor (JA-10)	Beckman Coulter
Sentrifugerør (500 ml)	Nalgene
Sterile tannpirkere	Jordan
Sterilbenk (AV-100)	Telstar
Vannbad	Julabo
Vekt (Extend)	Sartorius
Qubit™ Fluorometer	Invitrogen

Kjemikalier	Leverandør
6x loading buffer New England Biolabs	New England Biolabs
10x loading buffer	TaKaRa
4-methylumbelliferone (4-MU), C ₁₀ H ₈ O ₃	Sigma-Aldrich
Agarose, SeaKem® LE Agarose	Cambrex Bio Science
Ampicilin	Sigma
Bacto™ Agar	Becton Dickinson
Bacto™ Gjærekstrakt	Becton Dickinson
Bacto™ Trypton	Becton Dickinson
Coomassie Brilliant Blue R250, C ₄₇ H ₅₀ N ₃ O ₇ S ₂ +	Bio-Rad
dNTP-mix	TaKaRa
Eddiksyre, C ₂ H ₄ O ₂	Prolab
EDTA, C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	Sigma-Aldrich
Etanol, C ₂ H ₅ OH	Arcus
Glyserol, C ₃ H ₅ (OH) ₃	Riedel-de Haën
Isopropanol, C ₃ H ₇ OH	Arcus
Metanol, CH ₃ OH	Sigma-Aldrich
Natriumklorid, NaCl	Merck
Natriumhydrokid, NaOH	Merck
PMFS, phenyl-methyl sulfonylfluorid	Sigma
Saltsyre, HCl	Merck
SDS, Natrium Dodecyl Sulfat	Saveen
Sukrose, C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	
Yeast Extract	Difco

Kit	Leverandør
<u>E.Z.N.A.® Plasmid</u> <u>Miniprep Kit:</u> HiBind™ Miniprep-kolonner 2 ml oppsamlingsrør	Omega Biotek

<p>Solution I</p> <p>Solution II</p> <p>Solution III</p> <p>Buffer HB</p> <p>Elution Buffer</p> <p>Wash Buffer, konsentrat</p> <p>RNase A, konsentrat</p> <p>Equilibration Buffer</p>	
<p><u>NuPage® Electrophoresis</u></p> <p><u>System:</u></p> <p>NuPAGE® Novex® Bis-Tris Mini Gels</p> <p>20X NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer</p> <p>NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X)</p> <p>NuPAGE® Reducing Agent (10X)</p>	Invitrogen
<p><u>Quant-iT™ Protein Assay</u></p> <p><u>Kit</u></p> <p>Proteinbuffer</p> <p>Proteinreagent</p> <p>Standarder, 0, 200 og 400 ng/μl</p>	Invitrogen
<p><u>QuikChange Site-Directed</u></p> <p><u>Mutagenesis Kit</u></p> <p>Pfu Turbo DNA polymerase (2.5 U/μl)</p> <p>10X reaction buffer</p> <p>Dpn I restriction enzyme (10 U/μl)</p> <p>Oligonucleotide control primer # 1 [34-mer (100 ng/μl)] 5' - CCA TGA TTA CGC CAA GCG CGC AAT TAA CCC TCA C - 3'</p> <p>Oligonucleotide control primer # 2</p>	Stratagene

<p>[34-mer (100 ng/μl)] 5' - GTG AGG GTT AAT TGC GCG CTT GGC GTA ATC ATG G – 3'</p> <p>pWhitescript 4.5-kb control plasmid (5 ng/μl)</p> <p>dNTP mix</p> <p>XL1-Blue supercompetent cells</p> <p>pUC18 control plasmid (0.1 ng/μl i TE buffer)</p>	
--	--

4 Metoder

4.1 *Tillaging av plasmid*

4.1.1 Seterettet mutagenese

For å lage et mutert plasmid må man ha ChiAWT plasmid og primere med ønsket mutasjon. Ved å endre enzymer og deres egenskaper får vi økt forståelse for hvordan enzymer fungerer. Det kalles også for enzym engineering. Brukes blant annet til seterettet mutagenese. Ved bruk av seterettet mutagenese forstår vi mer hvordan enzymer virker, og slik får vi også økt variasjon i muterte enzymer som har de egenskapene vi er ute etter. (Eijsink, Kolstad, Gaseidnes, Synstad, Peter, Nielsen, Komander, Houston, and Van Aalten, 2003)

Ved bruk av seterettet mutagenese er setespesifikt mutasjon hvor man ved hjelp av PCR kan man endre aminosyre sekvensen. Det kan man gjøre ved å bytte aminosyrer, setter inn eller fjerne en eller flere aminosyrer. Vi kan gjøre mutagenese ved bruk av syntetisk oligonukleotid. Oligonukleotid skal være komplementær til den delen av proteingenet som ønskes endret. Det inneholder en sekvens som koder for den ønskede mutasjonen. Ved seterettet mutagenese i kitinaser utføres mutasjonen i det aktive setes subsete. Ved mutagenesen kan man endre substratet og produktspesifiteten til enzymene.

4.1.2 Design av primere

Primere er korte DNA-sekvenser som inneholder 25 til 45 basepar. Den ønskede mutasjonen er akkurat i midten. Det er viktig at begge mutagenese primerne er komplementære til den samme sekvensen på motsatte DNA-tråder i plasmidet. Primeren bør inneholde minst 40% G- og C-baser, og primeren bør ende med minst en G eller C. Smeltetemperaturen (T_m) bør være lik eller over 78°C. Likningen for å finne T_m

$$T_m = 81,5 + 0,41 (\% \text{ GC}) - 675/N - \% \text{ mismatch}$$

N er lengden på primeren i baser. (Stratagene (2005))(www.genomics.agilent.com)

Primere ble bestilt av Invitrogen, og ble laget ved hjelp av programvaren Gentle. Dette programmet lastet ned fra nettet fra siden <http://gentle.magnusmanske.de/>.

Skulle totalt lage 3 mutanter. Til sammen ble det laget seks primere: en forward og en reverse til hver mutant.

4.1.3 Transformering og dyrking

ChiA-plasmid ble dyrket på LB-skåler. En dråpe fra ChiA frysestock ble platet ut på LB-agarskål. Dette ble inkubert ved 37 °C.

Koloni fra agarskålen med dyrket ChiA plasmid ble tilsatt i dyrkningsrør med 4 ml LB-medium og 4µl 50 mg/ml ampicillin. En steril tannpirker ble brukt til å plukke opp kolonien. Rørene ble satt til inkubering ved 37 °C og risting ved 225rpm i 16timer.

4.1.4 Transformering: (Seterettet mutagenese)

Materiale: Benyttet QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit.

Seterettet mutagenese ble indusert av PCR. PCR produkter av villtyper og muterte gener ble ødelagt ved hjelp av EcoRI og HindIII restriksjons endonuclease og klonet plasmider.

Reaksjonene ble laget i PCR rør. Kuldeblokk ble brukt til å holde rørene kalde under prosedyren. Det ble gjort en kontrollreaksjon kontroll primere ble brukt, og en prøvereksjon hvor ønsket mutasjons primer ble brukt.

Prosedyre for PCR-reaksjon:

Kontrollreaksjon:

5 µl 10x reaksjonsbuffer
2 µl pWhitescript 4.5 kb control plasmid
1,25 µl oligonukleotide control primer 1
1,25 µl oligonucleotide control primer 2
1 µl dNTP miks
38,5 µl ddH₂O
Tilsett så
1 µl PfuUltra HF DNA polymerase

Prøvereksjon:

5 µl 10x reaksjonsbuffer
x µl (5-50 ng) dsDNA templat
1,25 µl (125 ng) primer 1
1,25 µl (125 ng) primer 2
1 µl dNTP mix
dH₂O til et sluttvolum lik 50 µl
Tilsett så
1 µl PfuUltra HF DNA polymerase

Kjørte PCR etter å ha laget ferdig kontroll og prøveblanding. Følgende PCR-reaksjon ble benyttet:

Heating lid	1	110°C	
Initiell denaturering	18	95 °C	30 sekunder
Denaturering	18	95 °C	30 sekunder
Annealing	18	55 °C	1,0 minutt
Extension	1	68 °C	5,5 minutter
Nedkjøling	1	10 °C	

Hver PCR-reaksjon ble tilsatt 1µl av Dnp 1 restriksjonsenzym. Reaksjonene ble inkubert ved 37°C i 1 time for å bli kvitt ikke muterte supercoilet dsDNA.

XL1-Blue superkomponente celler ble hentet fra fryseren, -20°C. Disse må tines forsiktig på is, og må ikke stå ute for lenge.

- 50µl celler ble overført til falconrør som var plassert på is.
- 1µl Dpn I behandlet DNA ble tilført til superkomponente cellene og inkubert på is i 30 minutter.
- Reaksjonene ble varmebehandlet i 45 sekunder ved 42°C.
- Deretter ble de plassert på is igjen i 2 minutter
- 0,5 mL forvarmet LB medium (42°C) ble tilsatt i reaksjonene.
- Reaksjonene ble inkubert i riste inkubator ved 37 °C i en time.
- Deretter ble reaksjonene platet ut på LB-ampicillin plater.

Reaksjonstype	Volum
Mutagenekontroll	250µl
Transformasjonskontroll	5µl i 200µl medium
Prøve	250µl på to plater

Tabell 4.1: Agarplater med mutagenekontroll, transformasjonskontroll og prøve.

Agarplatene ble satt i inkubator ved 37°C i 16 timer.

4.2 Isolering

Prosedyre

- Etter 16 timer ble cellene pelletert ved sentrifugering ved 10 000 x g i 1 minutt ved romtemperatur. Supernatanten ble dekantert.
- 250 µl Solution I/RNAase A solution ble tilsatt i pelleten. Pelleten ble resuspendert. Blandet med vortex.
- Løsningen ble overført til et nytt eppendorfrør. 250 µl Solution II ble tilsatt og løsningen ble blandet forsiktig til blandingen ble et klart lysat.
- 350 µl Solution III ble tilsatt og blandet til hvit utfelling.
- Etter utfellingen ble blandingen sentrifugert ved 13000 x g i 10 minutter ved romtemperatur.
- En miniprep-kolonne ble ekvilibrert ved tilsetning av 100 µl ekvilibrasjonsbuffer. Kolonnen ble plassert i et 2ml oppsamlingsrør og sentrifugert i 1 minutt ved 13000 x g. Heller av flow-trough.
- Supernatanten ble helt over i den ekvilibrerte kolonnen og passet på at pelleten ikke fulgte med. Dette ble sentrifugert i 1 minutt ved 13000 x g.
- Flow-through ble helt av og kolonna ble vasket med 500 µl Buffer HB. Sentrifugerte ved 13000 x g i 1 minutt.
- Flow-trough ble helt av, og kolonna ble tilsatt 700 µl DNA vaskebuffer som er fortynnet i etanol. Sentrifugerte det i 1 minutt ved 13000 x g. Oppsamlingrøret tømmes.
- Sentrifugerte den tomme kolonna i 2 minutter til ved 13000 x g. Dette ble gjort for å tørke kolonnematriksen.
- Etter sentrifugeringen ble kolonnen satt i et rent 1,5 ml sentrifugerør. 30 µl Elution buffer ble tilsatt til kolonnen. Dette ble sentrifugert i 1 minutt ved 13000 x g for å eluere DNA.
- Renset plasmid ble oppbevart ved -20°C.

4.2.1 Kontroll av rensed plasmid:

- Rensingen av plasmidet ble kontrollert med DNA-gel.

- Startet med å lage gelen: 50ml 1xTAE og 0,5 g agarose ble varmet opp i mikroovn.
- Løsningen ble tilsatt 2 µl EtBr. Dette ble helt over i et støpekar med kam.
- Gelen brukte ca 45 minutter på å stivne.
- Etter at gelen er stivnet, ble støpekaren overført til en gelkjøringskar. Karen ble fylt med 1 x TAE, fylt opp helt til den dekket gelen.
- Kammen ble tatt ut av gelen og prøvene ble satt inn i brønnene.
- 10µl ladder ble tilsatt i første brønnen
- 1µl 10x loading buffer + 2 µl prøve + 7 µl dH₂O
- Kjørte på 90V i en time.

4.2.3 Transformering av PCR produkt

Materialer:

- XL1 Blue Superkompetente celler
- PCR miks
- LB medium

XL1 Blue superkompetente celler oppbevares ved -80 °C. De tines på is. Det ble overført 50 µl av superkompetente celler til et falconrør. I dette falconrøret ble det tilsatt 1µl Dpn I behandlet PCR miks. Reaksjonsvolumene ble blandet forsiktig og innkubert på is i 30 minutter. Deretter ble rørene satt i et vannbad på 42 °C i 45 sekunder, deretter 2 minutter igjen på is. I falconrøret ble 0,5 ml LB medium tilsatt. Denne reaksjonsblandingen ble innkubert ved 37 °C og risting ved 225-250 i en time. Etter inkubasjon ble 250 µl av reaksjonen strøket ut på agarskåler med LB-medium som inneholdt 50 µg/ml ampicilin.

Skålene ble innkubert i varmeskap med 37 °C i 16 timer.

4.3 Dyrking:

Laget 2L LB medium for dyrking. Autoklaverte den, og satte den i 6 autoklaverte kolber.

Satte ChiA E315Q mutanten til dyrking i 16 timer ved 37 °C og 220 rpm. Brukte frysestock

av ChiA E315Q og tok et dråpe i hver kolbe med 300ml LB, tilsatte 300 µl 50mg/ml ampicillin i hver kolbe.

4.4 Periplasmatisk ekstrakt:

- Etter 16 timer ble dyrkingen sentrifugert. Brukte 6 sentrifugerør. Kjørte i sentrifugen på JA-10 rotor ved 4°C ved 8000rpm i 10minutter.
- Kastet flow throw og tok ca 50ml spheroplastbuffer i hvert rør og resuspenderte spheroplastbufferen.
- Suspensjonen ble inkubert i 5 minutter på is, deretter ble hele suspensjonen samlet i et rør, og et rør med vann som ble brukt som motvekt.
- Dette ble sentrifugert igjen på samme rotor, ved 4°C, 10 minutter og 8000 rpm.. Supernatanten ble dekantert og pelleten spredt over bunnen av røret. Røret ble inkubert ved romtemperatur i 10 minutter.
- Etter 10 minutter ble pelleten resuspendert med 200 iskaldt vann, og ble holdt på is i 45 sekunder, etter det ble det tilsatt 10 mL 20mM MgCl₂.
- Suspensjonen ble sentrifugert igjen på samme rotor, ved 4°C, 8000 rpm i 10 minutter.
- Supernatanten ble sterilfiltrert med 0,2 µm filter.
- Periplasmatiske ekstraktet ble tilsatt 300 µl PMSF.
- Periplasmatiske ekstraktet ble oppbevart i kjøleskap.

4.5 Rensing av periplasmatisk ekstrakt

Rensemene som ble brukt for å rense mutantene var kromatografi. Kromatografi er en metode som blir brukt for å separere ulike kjemiske komponenter i en blanding. Metoden separerer ved hjelp av to forskjellige faser. Ene fasen er mobil mens den andre stasjonærefasen er ikke-mobil. Komponenter har ulik løselighet og vil derfor binde seg forskjellig.

4.6 Ionebyttekolonne, IEC:

Denne kolonna er basert på elektrostatiske interaksjoner mellom et ladet og en ikke ladet protein. Her blir molekyler separert etter deres overflates nettoladning. Det er viktig å ha riktig pH i kolonna siden den styrer ladning på proteinene. Kolonnemateriale har ladet matriks som fester seg til proteinene. Mobilfasen og det periplasmatiske ekstraktet justeres til pH 9. Proteinene med negativ ladning vil feste seg til kolonnen, og proteiner med positiv ladning vil skilles ut. Proteiner som var festet til kolonnen løsner da det ble tilsatt buffer med NaCl, det ble gjort for å øke ionestyrken i kolonnen. Ionene i bufferen vil gi større affinitet til stasjonærfasen, de binder til kolonnen og proteinene ble evaluert.

Materialer:

Buffer A: 40mM Etanolamin (avgasset)

Buffer B: 40mM Etanolamin / 1M NaCl

20% Etanol

Periplasmatisk Ekstrakt

0,5M etanolamin

dH₂O

Prøveløsning: Periplasmatisks ekstrakt, 0,5M etanolamin, H₂O blandes til en løsning som ble applisert på kolonnen.

Startet rensinga med å kjøre buffer A, ca 100mL gjennom kolonnen. Dette ble gjort for å vaske kolonnen, det ble også tilsatt noe buffer B. Alt ble kjørt på en gjennomstrømning på 4,0 ml/min. Deretter ble prøveløsningen tilsatt. Prøveløsningen var justert til pH 9 med EA. Samler opp toppfraksjonene i tilfelle det ikke kommer noe topp for Chi A ved buffer B. Vasket kolonnen med buffer A frem til baselinjen var oppnådd, pluss 15 minutter. Elueringen ble startet med buffer B, conc % B100. Ble kjørt på gradient i 120 minutter. Samlet opp alle fraksjonene, og kjørte gel på de. Renset videre på HIC for å få et mer reinere protein. Kolonnen ble etter Buffer B, vasket og lagret i Etanol 20%.

Prøvene ble applisert på SDS-page for å se om ønsket var tilstede, hvilke det var, før videre opprensing på hydrofobinterakjonskomatografi (HIC).

4.7 HIC:

Fraksjoner som viste ChiA bånd i gelen ble rensset videre på HIC. HIC egner seg godt til rensing av ChiA, fordi ChiA inneholder mange eksponerte hydrofobe residuer. Det er de hydrofobe områdene rundt deres overflate som gjør disse proteinene mindre løselige, og derfor binder disse molekylene binder seg til apolare residuer i kolonnemateriale. I HIC kolonnen ble det brukt Fenylsepharose High Performance. Kolonnen består av 6% agarose som gjør fenylene hydrofobt. Disse fenylligandene får enkelt aromatiske eller hydrofobiske interaksjoner med proteinene. Det brukes en buffer med isopropanol i en gradient for å eluere proteinet. Det ble brukt isopropanol fordi det er mer hydrofobt enn ChiA. Proteiner ble vist som topper gjennom en detektor som er koblet til datamaskinen. Topper som vises på detektoren samles opp i blåkorkrør, og ble analysert videre på SDS-page. Kontrollerte hvilke fraksjon som inneholdt ChiA proteiner.

Materialer:

Buffer A: 20mM Tris-HCl / 0,5M (NH₄)₂

Buffer B: 20mM/ 4% isopropanol

Prøveløsning:

1M Tris-HCl pH 8,0

3M (NH₄)₂SO₄

Fraksjoner fra IEC

Metode:

Starter med å rense kolonnen med buffer A, ca 100mL gjennom kolonnen, pluss noe buffer B. Kjører alt på en gjennomtrengelighet på 4,0 ml/min. Kjørte deretter inn prøveløsningen på en gjennomtrengelighet på 3,0 ml/min. Valgte en saktere gjennomtrengelighet for å hindre at all proteinet elueres på en gang. Toppfraksjoner ble samlet opp i tilfelle chiA ikke festet seg til kolonnen. Følger med på dataen som vises gjennom detektoren. Toppen som kommer ved buffer A og prøveløsningen er waste toppen, som inneholdt proteiner som vi ikke trenger til videre arbeid. Kolonnen vaskes igjen med buffer A. Den ble kjørt frem til baselinjen er helt rett igjen etter prøveløsning tilsetning. Etter det ble buffer B på kjørt på gradient, conc % 100, på 75minutter. Det ble fulgt samme gjennomtrengelighet her også, 3,0ml/min. Samler opp

alle toppene som vises på dataen. Fraksjonene ble deretter kjørt på gel. Rensingen ble avsluttet med å rense og lagre kolonnen med 20% Etanol.

Fraksjoner som viste reint chiA bånd ble tatt vare på for videre arbeid, ble oppbevart ved 4 °C.

4.8 Rensing av ChiA WT ved bruk av kitinkolonne

ChiA villtypen er aktiv, derfor ble den rensset på kitinkolonne.

Materialer:

Kitinkuler

Buffer A: 50mM Tris-HCl pH 8

Buffer B: 20mM eddiksyre

Vaskebuffer: 0,3 M NaOH

Det periplasmatiske ekstraktet ble justert til pH 8 med buffer A.

Metode:

Kitinkulene ble pakket i kolonna med 20% Etanol. Den ble deretter vasket med vaskebuffer NaOH i ca 10minutter. Deretter ble kolonna vasket med buffer A i ca 10 minutter, helt til en rett baselinje. Periplasmatiske ekstrakt injiseres etter buffer A, det kan gå opp til ca 30 ml periplasmatiske ekstrakt til den kolonna som ble brukt.

Mens periplasmatiske ekstrakt injiseres ser man en topp i grafen. Denne toppen er proteiner som vi ikke trenger. Waste toppen samles opp i tilfelle all protein har kommet ut der. Etter prøven, ble buffer A satt på frem til rett stabil baselinje. Lot rett baselinje vedvare i 10 minutter til før buffer B ble satt på. Ved buffer B dukket det opp en topp som ble samlet opp i blåkorkrør. Etter toppen ble buffer A satt på igjen. Lot den renne gjennom kolonnen i ca 10 minutter. Til slutt vaskes kolonnen med 0,3M NaOH til rett grunnlinje i ca 10minutter. Kitinkolonnen kan tas vare på og bli brukt igjen på nytt. Oppbevarer kolonnemateriale ved 4°C.

Fraksjoner som er samlet i blåkorkrør, ble videre analysert på SDS-gel for å kontrollere hvilke fraksjon som inneholdt ChiA.

4.9 SDS Page

Det er en metode som enkelt og raskt gir svar på om vi har det proteinet vi ønsker tilstedet, brukes også ved rensing, for å se om vi kun har det proteinet vi skulle ha.

I SDS GEL Elektroferese blir proteiene separert med hensyn til molekylvekt.

Porestørrelsen i gelen varierer etter hvilken størrelse det ønskede proteinet har. SDS er negativt ladet. Den binder til hydrofobe områder på proteinmolekylet. Det gjør at proteinet foldes ut og bryter binding til andre stoffer som lipider og andre proteiner. Slik blir de løselige i SDS-løsningen. Bindingen av SDS til proteinet gir netto negativ ladning. Når strømmen settes på vandrer proteinet mot den positive elektroden. Proteinstørrelsen er avgjørende for proteinets fart. De med lik størrelse vandrer gjennom gelen med samme fart, små proteiner vil trenge gjennom porene i gelen lettere, mens de store proteinene vil vandre sent gjennom gelen.

Materialer:

NuPAGE LDS Sample Buffer, 4X, (Invitrogen)

NuPAGE 20X MOPS SDS Running Buffer (Invitrogen)

NuPAGE Reducing Agent (10X) (Invitrogen)

Novex Bis-Tris Gels (10%) (Invitrogen)

Protein fargeløsning:

Comassie Brilliant Blue R250

Metanol

Acetic Acid

dH₂O

Avfargingsløsning:

10% Metanol

10% Eddiksyre

dH₂O

Prøvemateriale (protein)

Metode:

10 µl prøve ble blandet med 10µl appliseringsbuffer. Prøvene ble varmet opp i 4 minuttet ved 95°C. Dette ble gjort for å denaturere prøvene. I første brønnen ble 7 µl standard, Benchmark Ladder tilsatt. Deretter ble 20µl av hver prøve tilsatt i brønnene. Seperasjonene av proteinfraskjonene var fullført etter 50 minutt ved 220 volt. Gelen ble vasket med dH₂O tre ganger. Deretter ble gelen farget i 30 minutter med fargeløsning, Bio Safe Commassie. Etter det ble gelen avfarget med avfargingsløsning tre ganger etter hvert kvarter. Når båndene er godt synlige, kan bilde tas.

4.10 Enzymkonsentrasjon

Det rensede proteinet jeg fikk fra kromatografien ble videre oppkonsentrert. Det ble oppkonsentrert ved sentrifugering. Det ble brukt amiconrør(Ultra 15) til denne sentrifugeringen. Disse rørene har filtre som vi benytter for å slippe gjennom forbindelser med molekylvekt mindre enn 10 00Da. Molekyler med høyere vekt blir værende i filteret.

- Fyller amiconrørene med proteineluatet, og hvis det var noe plass igjen, så ble røret fylt opp med 20mM Tris-Hcl
- Rørene veies, kan ikke være mer forskjell enn 1g.
- Sentrifugen settes på 4°C og 4300 rpm. Kjørte sentrifugen frem til ca 12 minutter, når det var ca 1,5ml væske igjen i filteret. Eluatet ble helt ut, og filterglasset ble fylt opp igjen helt til toppen.
- Sentrifugerte ved 4°C og 4300 rpm.
- Dette skal totalt gjøres 4 ganger.
- Proteinløsningen i filteret ble tilslutt overført til cryorrør.
- Oppbevares ved 4°C .

Enzymkonsentrasjonen ble bestemt ved bruk av Quant-IT.

Materialer:

-Quant-iT™ Protein Assay Kit:

Quant-iT protein buffer

Quant-iT protein reagens

-Quant-it flourometer

- Lages en arbeidsløsning: 1µl Quant-it reagent og 199µl Quant it buffer per prøve. Kjørte 3 paralleller per prøve. Laget arbeidsløsning for 3 prøver. Totalt 600µl løsning per prøve.
- 198 µl arbeidsløsning ble tilsatt 2 µl proteinløsning. Ble godt blandet på vortex.
- Løsningen ble inkubert i 15 minutter i romtemperatur.
- Løsningen ble deretter målt på Quant-iT flourometer. Benevningen var µg/mL. Rangen lå på 23 µg/mL, hvis tallet var høyere enn det, så måtte proteinløsningen fortynnes.
- Jeg laget 1 til 100 fortynning. Ganget verdien jeg fikk oppgitt på flourometeret med 100 og fikk den riktige konsentrasjonen av proteinet.

4.11 Enzymaktivitet

Materialer:

Prøve

100x BSA

0,3 M Glycine/NaOH, pH 10,6

Mcllvain buffer pH 5,2

1,0 µM 4-MU

1 mg/ml 4-MU-(GlcNac)₂

Fluorometer

Metode:

- Lager Mcvllain/BSA blanding: 4,95 mL Mcllvain buffer og 50µl 100x BSA ble godt blandet i et 15 ml blåkorkrør.
- Reagensrør merkes. Kjører 3 paralleller av hvert enzym

- Blandet 87µl Mcvllain/BSA blanding og 8µl 1mg/mL 4-MU-(GlcNac)₂ i hvert reagensrør.
- Rørene ble plassert i vannbad ved 37°C og risting.
- Reaksjonen ble startet ved å tilsette 5 µl enzym/ prøvemateriale til hvert rør.
- Reaksjonene ble stoppet etter 10 minutter ved å tilsette 1,9 mL 0,3 M Glycine/NaOH.
- Aktiviteten måles i fluorometeret.
- Den spesifikke enzymaktiviteten ble beregnet etter følgende formel:

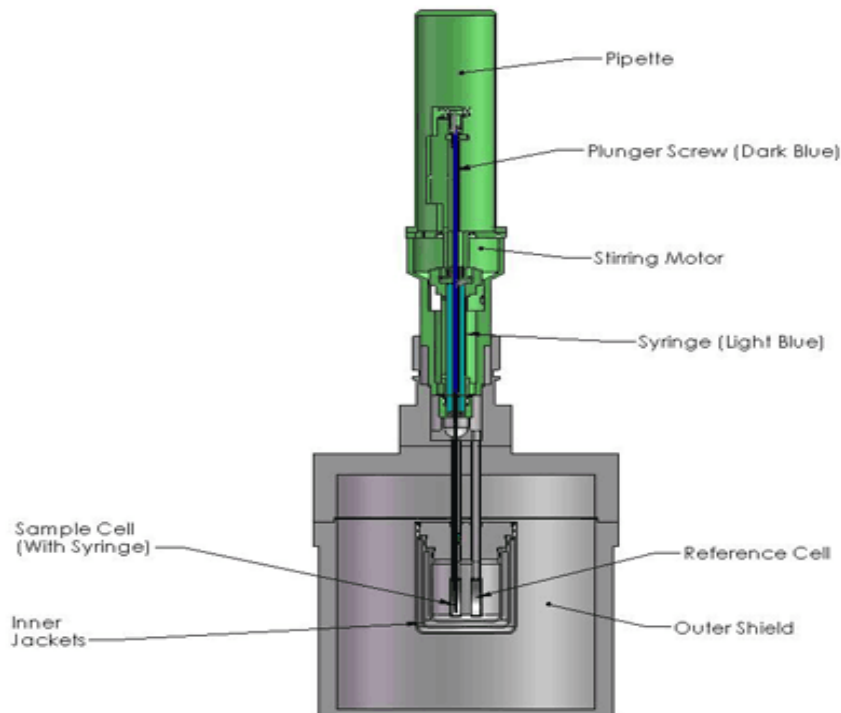
$$(\text{vol (l)} \times \text{gj.snitt abs./10}) / \text{Tid (min)} / \text{enzym volum} \times \text{mg/ml}$$

4.12 Isotermisk titeringskalorimetri (ITC)

ITC er en metode for å bestemme affiniteten for ligand-protein interaskjoner forskjellige protein-protein interaskjoner, eller interaksjoner mellom ligand-ligand og nukleinsyre-lipid eller antigen-antibody interaksjoner. (<http://www.microcal.com/technology/itc.asp>)

Bindingsaffiniteten (K_d) måles typisk for bindingsstrykeri mellom millimolar til nanomolar. <http://www.microcal.com/technology/itc.asp>. I denne oppgaven ble en VP-ITC fra Microcal Inc. (Northampton,MA) (Wiseman, Williston, Brandts, & Lin, 1989). Et singel forsøk tilgang til bindingsparameterne n , K , ΔH og ΔS (<http://www.microcal.com/technology/itc.asp>).

Metoden er relativt proteinmengdekrevenende.



ITC er en metode som måler temperaturforskjeller mellom to celler, en prøvecelle og en referanse. Dette foregår i adiatiske omgivelser. Når substratet binder blir varme enten dannet eller absorbert. Målingen av varme mot reaksjonsstøkiometrien gir oss bindings konstanten (K_B), bindingsstøkiometrien og endring i bindingsentalpi (ΔH). Gibbs frienergiending (ΔG) og entroping (ΔS) kan regnes ut ved å benytte likning 1.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT\ln K_B = RT\ln K_d$$

Metode:

Aller først ble proteinløsningen satt til avgassing. For å unngå luftbobler i løsninger som gir ustødig baselinje på grafen.

- Starter med å vaske med 0,1M NaOH
- Deretter med reaksjonsbuffer 4 ganger, 20mM Kaliumfosfatbuffer ved pH 6.0.
- Fyller reaksjonscellen med 1.6 mL ChiA-E315Q som har en konsentrasjon på 10 μM .
- Fyller sprøyta med med 300 μL (GlcNAc)₆ som har en konsentrasjon på 250 μM .
- 30 injeksjoner à 5 μL av (GlcNAc)₆ ble injisert.

5 Resultater og Diskusjon

5.1 Mutasjonsanalyse

Fikk ikke muligheten til å ta denne analysen fordi mutasjonene var ikke vellykket.

Det er forventet at i substratbindene kløften hos kitinasene befinner det seg aromatiske residuer. Disse står langs det kitinbindende domenet inn mot det katalytiske setet. Dette gir substratbinding ved å danne interaksjoner med substratet. De aromatiske residuene bidrar med å skyve polymeren gjennom den aktive kløften. Skyvemekanismen utgjør enzymets prosessive egenskaper. Ved mutering i residuer i substratbindende kløften, er det mulig å studere deres effekt på prosessiviteten. Den prosessive mekanismen kan ha påvirkning på substratets tilgjengelighet for hydrolyse.

På mutanten K320S skulle aminosyren lysin bli byttet ut med aminosyren serin, mens hos mutanten K320A skulle lysin bli byttet ut med aminosyren alanin. Disse skulle bli inkubert med substratet (GlcNAc)₅ hvor fordeling av -3 til +2 binding versus -3 til +3 produktiv binding skulle gi informasjon om bindingsstyrken til Lys320. Lysin på residue 320 ble valgt fordi tidligere studier har vist at K320 har tre Glycin aminosyrer rundt seg, og tre Glycin sammen vil gi stor fleksibilitet og konformasjonsforandring. Ved å mutere bort lysine skulle fått tre Glycin rett etter hverandre. (Yannis Papanikolau, Gali Prag, Giorgos Tavlas, Constantinos E. Vorgias, Amos B. Oppenheim, and Kyriacos Petratos,(2001)).

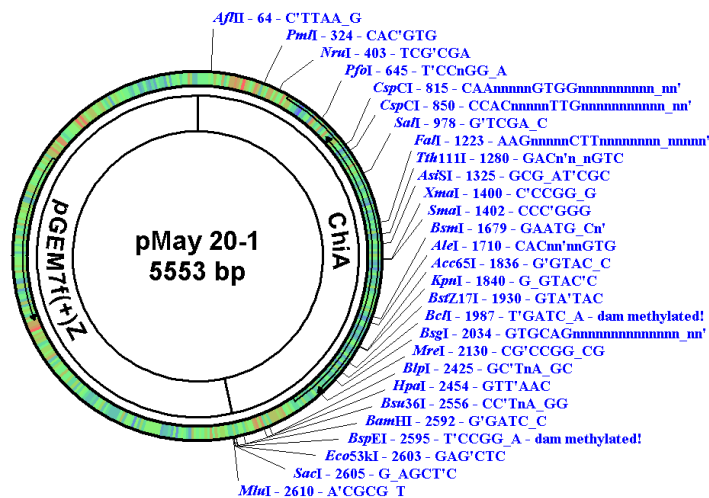
Det kan være flere årsaker til at mutantene ikke ble vellykket. En av årsakene kan være På grunn av mangel på tid var det ikke mulig å følge noen av disse forslagene.

5.2 Tillaging av plasmid, transformering og dyrking:

Resultatet var null vekst på agarplatene. Fikk ikke noe protein. Transformasjonsreaksjonene ble sådd ut, men det var ikke noe vekst på disse skålene. På kontrollskålene var det heller ikke noe vekst. Siden det ikke var noen kolonier, ble det ikke noe resultat for dette forsøket.

5.2.1 Tillaging av plasmid

pMay20-1-vektoren (Figur 5.1) med ChiA-genet innsatt ble transformert inn i E.coli-celler. For å undersøke om genet ble korrekt ligert inn i vektoren, ble plasmidet isolert og sekvensert. Dette ble utført av Anne Grethe Hamre.



Figur 5.1 Restriksjonskart som viser kuttsteder i pMay 20-1.

Mutasjonene i ChiA ble laget ved å bruke spesialdesignede primere i en PCR-reaksjon. I denne reaksjonen ble ChiA-genet i pMay20-1-vektoren brukt som templat. Det ble laget to primere til hver mutasjon: En forward og en reverse.

Plasmidene ble transformert inn i E.coli-celler. Disse ble sådd ut på agar-skåler (Tabell 4.1), for at kolonier skulle bli dyrket. Resultat i tabell 5.1, prøvereaksjon (K320S) og prøvereaksjon (K320A) fikk null kolonier.

En transformasjonskontroll ble også sådd ut på plater, i denne ble plasmidet pUC-18 brukt. Denne fikk også 0 kolonier (Tabell 5.1).

Prøve	Antall kolonier
Transformasjonskontroll (pUC-18)	0
Prøvereaksjon (K320S)	0
Prøvereaksjon (K320A)	0
Mutagenesekontroll (pWhitescript)	0

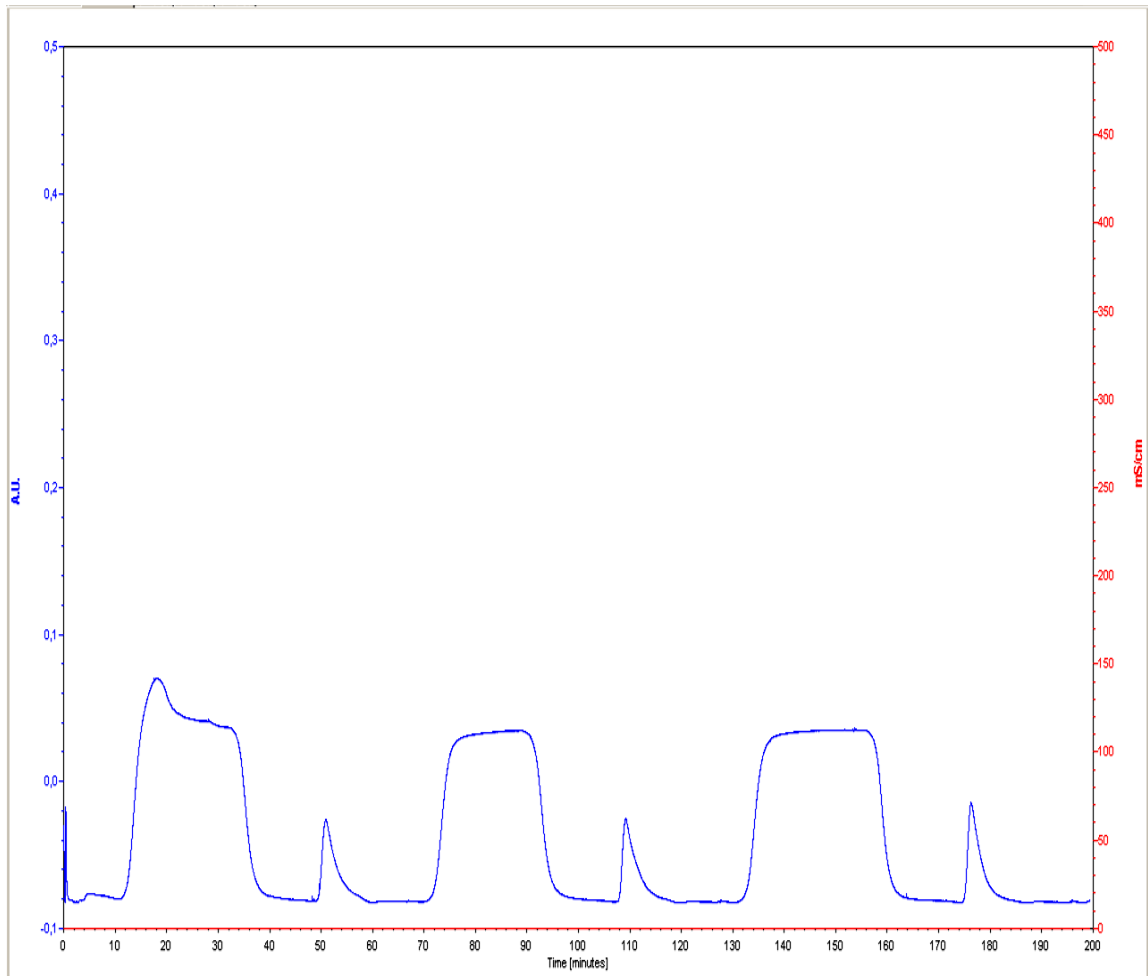
Tabell 5.1: Resultater etter seterettet mutagenese. Tabellen viser at resultatet ble ikke som forventet.

Flere studenter på laboratoriet prøvde å lage ulike mutanter uten å lykkes. Det kan være flere årsaker til at vi ikke fikk til mutantene. Prøvde å bytte QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit, også ble det brukt nye agarskåler, men likevel ble det ikke vellykkede forsøk. I mutagenese manualen er det forslått noen endringer ved få kolonier, det er anbefalt å bruke 4 µl Dnp I behandlet DNA istedenfor 1µl. Det er viktig å holde de superkomponente cellene nedfrost -80°C, og skal kun tines på is. Også er det viktig å unngå flere fryse og tine sykluser for dNTP mix. Den kan tines engang, og deretter forberede engangsprodukter, og lagre disse ved -20°C. En annen feilkilde kan være at mutagenese reaksjonen ble hemmet av dannelse av sekundære strukturer, ved å øke annealing temperaturen opp til 68°C kan bidra til å lindre videredanning av struktur og kan forberede mutagenese effektiviteten. (Stratege, (2005)) Pga mangel på tid ble ikke noen av forslagene prøvd.

5.3 Produksjon og rensing av ChiA villtype

- Kromatogrammer, SDS-PAGE, og spesifikk aktivitet

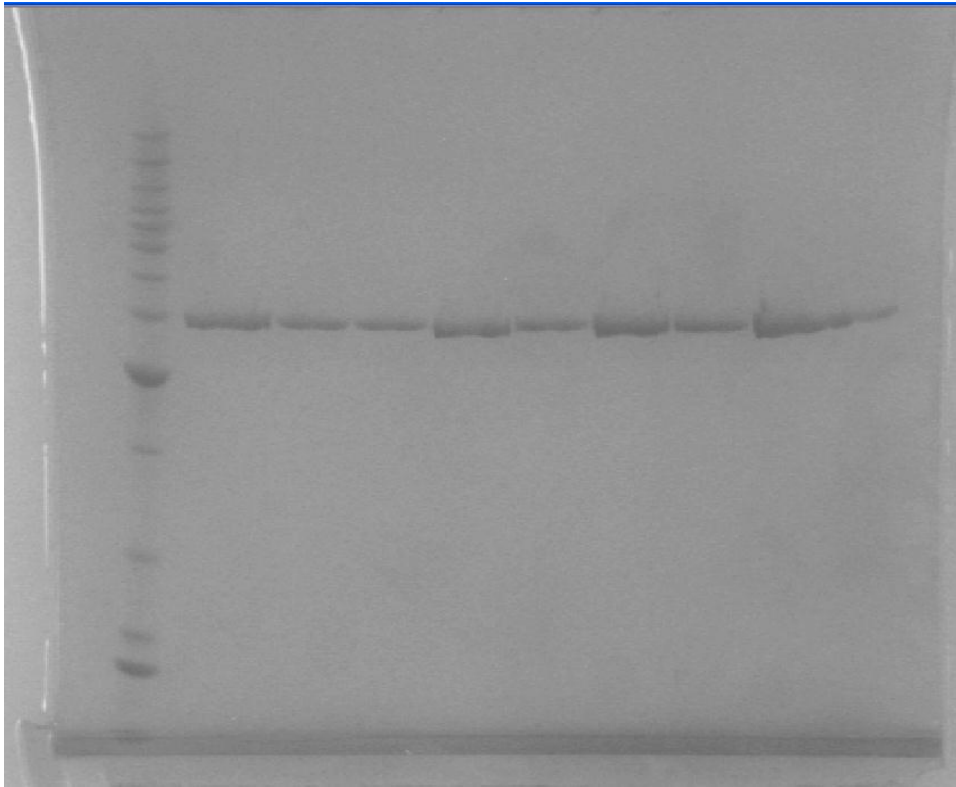
5.3.1 Rensing Chi A WT:



Figur 5.2: Kromatogram for rensing av Chi A WT på kitinkolonne, de store brede toppene er proteiner som ikke trengs, men de lave toppene som er ChiA ble eluert med buffer B, ble samlet opp i blåkorkrør.

Fraksjonene fra rensingen brukes videre til analysere om proteinet er reint på SDS-gel. Ved kvalitativ på SDS gel, ble det bekreftet at de toppene som dukket opp ved buffer B gjennomkjøring var ChiA. Se bilde nedenfor:

5.3.2 SDS Page:



Figur 5.3: ChiA WT, 1. rad er standaren, resten er fraksjoner fra toppen ved buffer B tilsetning.

Gelbildet viser tydelige ChiA bånd i alle disse 9 brønnene. Ser at alle fraksjonene inneholder kun ChiA bånd, dette indikerer at proteinet er reint og ikke trenger å bli rensset på nytt.

5.3.3 Spesifikke aktivitet:

ChiA WT: Prøve:	Aktivitet (nM/min/mg)
P:1	136150
P:2	52900
P:3	48550
P:4	53200
P:5	64000
P:6	23000
Periplasmatisk ekstrakt:	3017

Tabell 5.3: Den spesifikke enzymaktiviteten til ChiA WT.

Den spesifikke aktiviteten til ChiA er veldig høyt, det forteller at enzymet er aktivt og kutter bra.

5.3.4 Enzymkonsentrasjon ChiA WT:

ChiA WT	Utbytte: mg/mL
P:1	1,03
P:2	0,45
P:3	0,49
P:4	0,41
P:5	0,69
P:6	0,88
P:7	0,44
P:8	0,51
P:9	0,46

Tabell 5.4: Enzymkonsentrasjonen ChiA WT

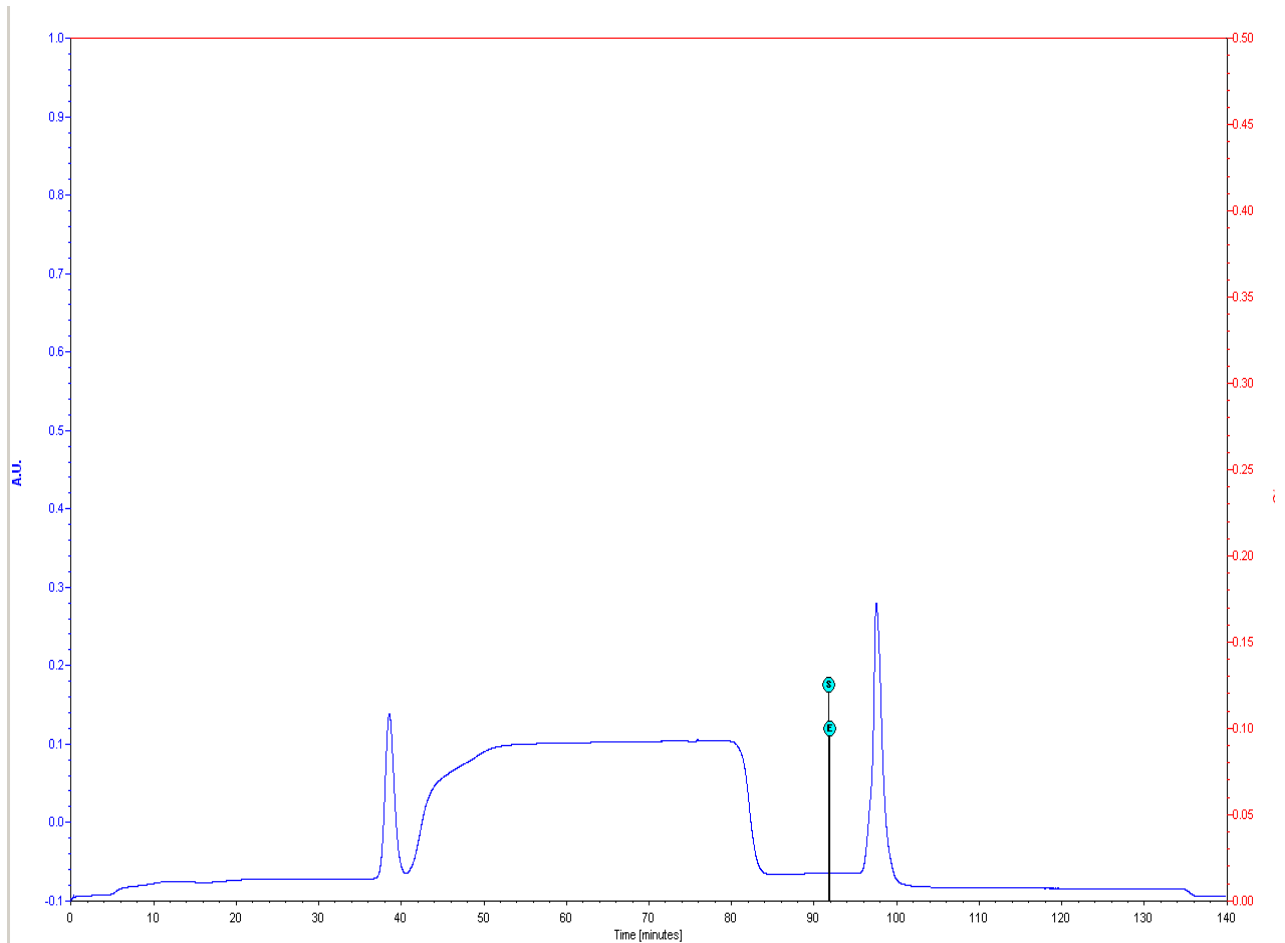
ChiA villtype ble dyrket mange ganger, og dermed jobbet videre med helt til proteinet ble helt reint og godt oppkonsentrert. Alt er oppbevart i kjøleskap ved 4°C. Dette skal det jobbes videre med av andre studenter på laboratoriet.

5.4 Produksjon og rensing av ChiA E315Q

5.4.1 Rensing av proteiner

Chi A WT og mutanten ble produsert av E. coli som inneholdt det klonede kitinasegenet. Proteinene ble rensert etter en prosedyre utviklet av Brurberg et. al (1996). Proteinene ble eluert fra Ionebyttekolonnen og HIC-kolonnen. Det periplasmatiske ekstraktet ble først rensert på ionebyttekolonnen, deretter på HIC-kolonnen. Ved HIC rensing ble det proteinet vi var ute etter eluert. Flere dyrkinger og rensinger ble foretatt for å få den mengden som var nødvendig for kjøre ITC.

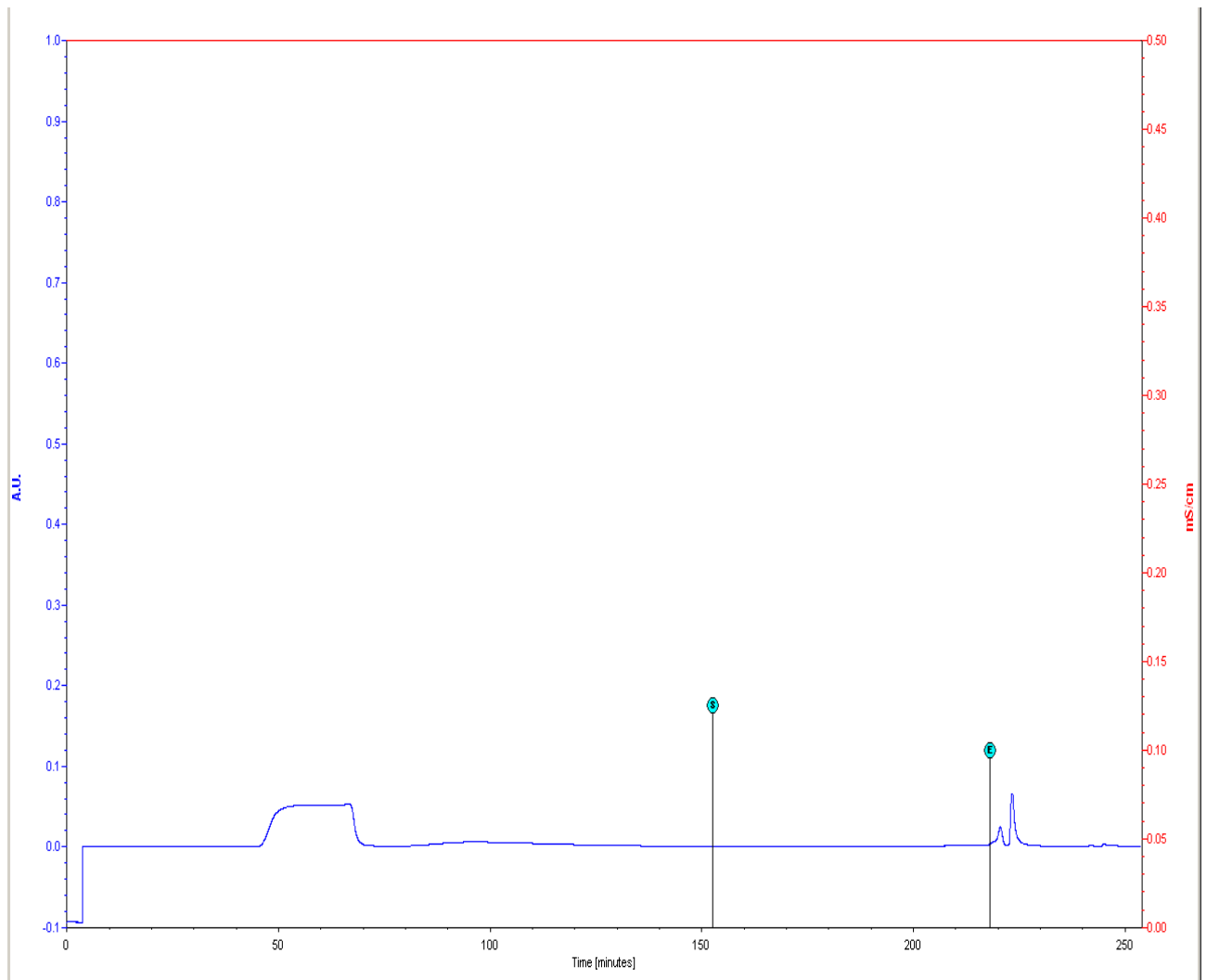
5.4.2 Rensing ionebyttekolonne:



Figur 5.4. Rensing fra ionebyttekolonna. To waste topper ved buffer A og periplasmatisk ekstrakt påføring, ved 93min ble Buffer B tilsatt. ChiAE315Q ble eluert i den siste toppen.

Fraksjoner fra rensingen ble samlet opp og det ble gjort kvalitativt analyse på SDS-page. Det viste seg at proteinet ikke var helt reint, og derfor ble den videre rensset på HIC.

5.4.3 Rensing HIC:

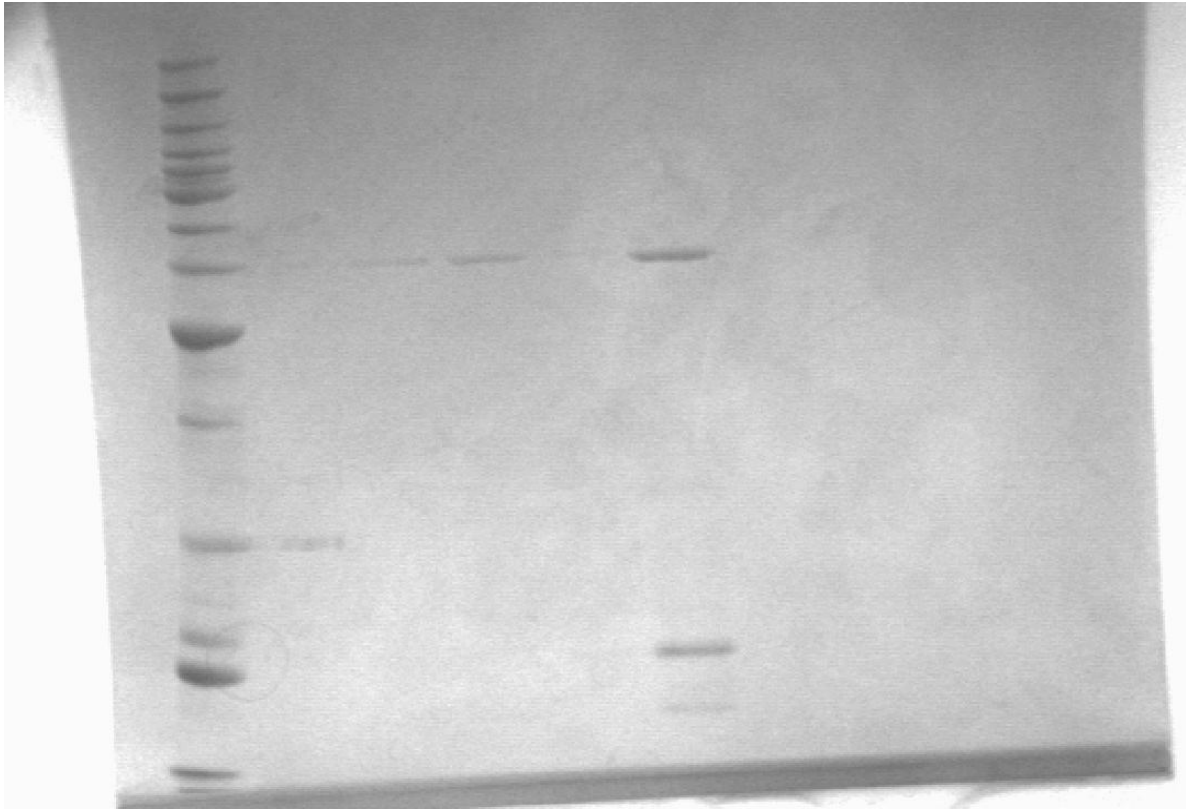


Figur 5.5: En wastetopp ved periplasmatisk ekstrakt påføring. To topper etter buffer B påføring.

Lokalisering av ChiA-E315Q proteiner analyseres videre på SDS Gel.

ChiA E315Q ble eluert i de to siste toppene (Figur 5.4.3). Disse fraksjonene ble analysert på SDS-page i brønn 3, 4 og 5, se figur 5.4.4.

5.4.4 Proteiner separert på SDS-page



Figur 5.6: Brønn 1: Standaren, Brønn 2: Periplasmatisk ekstrakt, svak bånd, kan skyldes pga lite konsentrert, brønn 3, 4, 5 er fraksjoner fra buffer B topp 1 fra HIC(se figur 5.4). Brønn 6 er fraksjonen fra ionebytterkolonna, fra den siste toppen som inneholdt ChiA(se figur 5.3).

Figur 5.6 inneholder bånd fra periplasmatisk ekstrakt, proteinbånd fra ionebytterkolonna og fra HIC. Dette bilde ble tatt for sammenligning mellom rensingen på ionebytterkolonna og HIC. Ser klart at proteinet ble helt reint til slutt da den ble rensset på HIC (Figur 5.6, se brønn 3,4,5). Flere bånd er svake på gel bildet, det kan skyldes pga lite konsentrert.

5.4.5 Spesifikke aktivitet av mutanten:

ChiA E315Q: Prøve:	Aktivitet (nM/min/mg)
P:1	230
P:2	580
P:3	218
Periplasmatiskekstrakt:	88

Tabell 5.3: Enzymaktiviteten til ChiA E315Q. Ut i fra aktivitetn ser vi at det er en inaktiv mutant.

Som forventet har det lav aktivitet.

Ut i fra resultatene ser vi at mutanten har veldig lite aktivitet, mutanten er ikke aktiv, dermed kutter ikke. ChiA WT derimot hadde mye aktivitet.

5.4.6 Enzymkonsentrasjon: ChiA E315Q

Konsentrasjonen på prøvene var lite, derfor ble de oppkonsentrert flere ganger til at de var klare til å kjøres på ITC. Den endelige konsentrasjonen før de ble kjørt på ITC var:

Prøve ChiA E315Q	Utbytte (mg/mL)
Prøve 1:	0,45
Prøve 2:	0,78
Prøve 3:	0,54
Prøve 4:	0,47

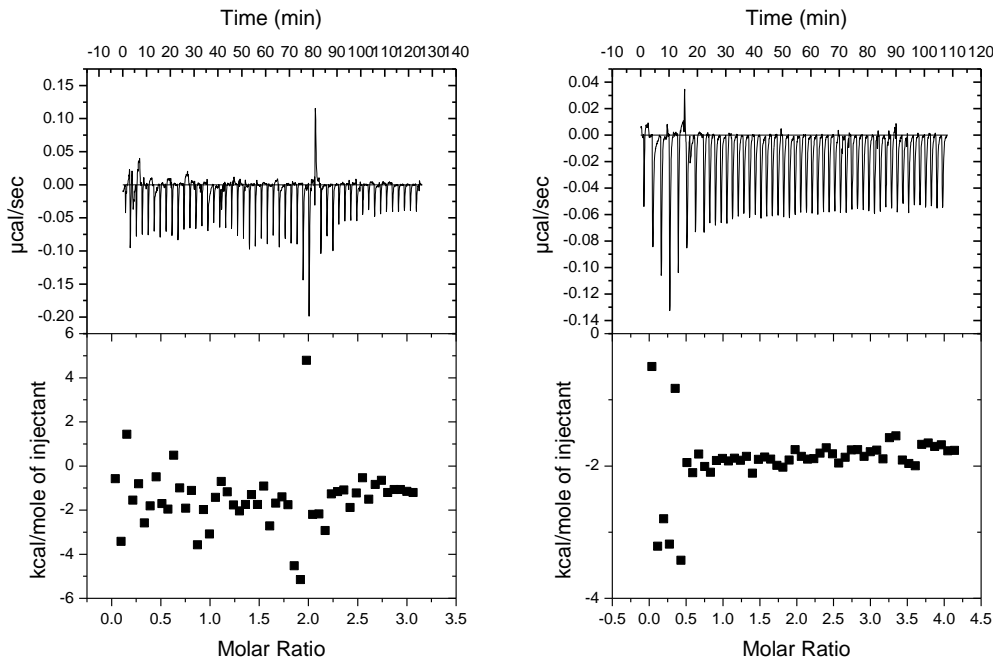
Tabell 5.5: Utbytte av proteinrensingen i milligram enzym per milliliter cellekulturmedium.

Prøven var til sammen på ca 7mL, det var nok til at vi kunne analysere ChiA E315Q bindingen til (GlcNAc)₆ ved 4 forskjellige temperaturer ved bruk av isotermisk titeringskalometri.

5.5 Bindingsstyrke av (GlcNAc)₆ til ChiA-E315Q

Binding til (GlcNAc)₆ til ChiA-E315Q ble studert ved pH 6.0 og temperaturene 30 og 40 °C ved isotermisk titreringskalometri.

5.5.1 Thermogrammer av (GlcNAc)₆ titrering mot ChiA-E315Q



Figur 5.7. Thermogrammer av (GlcNAc)₆ titrering mot ChiA-E315Q ved 45 grader (venstre) og 30 grader (høyere). Binding observeres i ingen av tilfellene.

Vi observerte ingen bindingsisoterm ved noen av temperaturene (Figur 5.7). Det ble testet 4 ganger totalt, uten å lykkes. Enten så foregår binding uten at det er noe varmeendring, eller så er rensset protein ikke korrekt foldet. Siden proteinet er naturlig inaktivt, er det ikke mulig å bruke et aktivitetsassay for å sikre at proteinet er den i formen den skal være. Vi vet fra litteraturen at ChiA-E315Q binder til kitooligosakkarider (GlcNAc)₈ er blitt observert bundet til ChiA-E315Q i en krystallstruktur. (Yannis Papanikolaou, Gali Prag, Giorgos Tavlas, Constantinos E. Vorgias, Amos B. Oppenheim, and Kyriacos Petratos,(2001)).

6 Veien videre

Forsøket med å lage mutanter ble og det hadde vært naturlig å forsøke dette en gang til. I tillegg er det flere potensielle residuer i +3 subsete som antas å interagere med substratet som er aktuelle å mutere.

Siden det ikke ble observert binding av $(\text{GlcNAc})_6$ til ChiA-E315Q, kan det tyde på at proteinet ikke uttrykkes riktig. Et første forsøk kan være å lage mutanten på nytt igjen og bruke denne i opprenset form i nye ITC forsøk.

7 REFERANSER:

Allan, G. G., J. R. Fox, G. D. Crosby, and K. V. Sarkanen. (1977). *Chitosan, a mediator for fiber-water interactions in paper*. Seattle: College of Forest Resources, University of Washington Press.

Anne Line Norberg a, Anette I. Dybvik b, Henrik Zakariassen a, Michael Mormann c, Jasna Peter-Katalinic' c, Vincent G.H. Eijsink a, Morten Sørli a, (2011). *Substrate positioning in chitinase A, a processive chito-biohydrolase from Serratia marcescens*. FEBS Letters 585: 2339–2344.

Boot, R. G., Blommaart, E. F., Swart, E., Ghauharali-van der Vlugt, K., Bijl, N., Moe, C., Place, A. & Aerts, J. M. (2001). *Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase*. J Biol Chem, 276 (9): 6770-8.

Brameld, K.A. and 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: 3571-3580.

Brurberg, M. B., B. Synstad, S.S. Klemsdal, D.M. Van Aalten, L. Sundheim, and, and Eijsink, V. G. H., (2000), *Chitinases from Serratia marcescens*, Recent Research Development in Microbiology.

Davies and Henrissat, (1995) *Structure and Mechanisms of Glycosyl Hydrolases*. Structure, 3 (9): 853-859

Donnelly & Barnes, (2004) *Mammalian chitinase - a potential target for asthma therapy*. Trends in Pharmacological Sciences, 25 (10): 509-511.

Eijsink, Kolstad, Gaseidnes, Synstad, Peter, Nielsen, Komander, Houston, and Van Aalten, 2003

Elias JA, Homer, RJ, Hamid, Q Lee, CG, (2005) *Chitinases an chitinase-like proteins in T (H)2 inflammation and asthma.*

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.

Gooday,G.W. (1990) *Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. Biodegradation*, 177-190.

Horn, SJ, Sikorski, P., Cedekvist, JB, Vaaje-Kolstad, G., Sørлие, M., Synstad, B., Vårum, KM, og Eijsink, VGH (2006) *Comparative studies of chitinases A, B and C from Serratia marcescens.* Proc. Natl. Acad. Sci. **103** USA, 18 089 -18 094

Horn, S.J., Sørлие, M., Vaaje-Kolstad, G., Norberg, A.L., Synstad, B., Vårum, K.M. and Eijsink, V.G.H. (2006) *Comparative studies of chitinases A, B and C from Serratia marcescens.* Biocatal. Biotrans. 24, 39–53.

http://pep.umb.no/research/kitin_popvit.htm

<http://www.microcal.co,m/technology/itc.asp>

<http://www.stratagene.com/manuals/200518.pdf>

<http://www.genomics.agilent.com>

Muzzarelli,R.A., Jeuniaux,C., and Gooday,G.W. (1986) *Chitin in Nature and technology.*

Papanikolau, Y., Prag, G., Tavlas, G., Vorgias, C.E., Oppenheim, A.B. and Petratos, K. (2001) *High resolution structural analyses of mutant chitinase A complexes with substrates provide new insight into the mechanism of catalysis.* Biochemistry 40, 11338–11343.

Perrakis,A., Tews,I., Dauter,Z., Oppenheim,A.B., Chet,I., Wilson,K.S., and Vorgias,C.E., 1994, *Crystal-Structure of A Bacterial Chitinase at 2.3-Angstrom Resolution*. *Structure*, 2:1169-1180.

Stratagene. (2005). *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual*.

Suzuki, K., Suzuki, M., Taiyoji, M., Nikaidou, N. & Watanabe, T. (1998). *Chitin binding protein (CBP21) in the culture supernatant of Serratia marcescens 2170*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 62 (1): 128-135.

Synowiecki,J. and Al-Khateeb,N.A. 2003. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43:145-171.

Terwisscha van Scheltinga,A.C., Hennig,M., and Dijkstra,B.W. (1996) *The 1.8 Å resolution structure of hevamine, a plant chitinase/lysozyme, and analysis of the conserved sequence and structure motifs of glycosyl hydrolase family 18*. *J.Mol.Biol.*, 20;262:243-257.

Tews, vanScheltinga, Perrakis, Wilson, and Dijkstra, (1997) *Substrate-assisted catalysis unifies two families of chitinolytic enzymes*. *Journal of the American Chemical Society*, 119:7954-7959.

Tharanathan, R. N., and Kittur, F. S., (2003), *Chitin--the undisputed biomolecule of great potential*, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43: 61-87.

van Aalten, D.M.F., Komander, D., Synstad, B., Gåseidnes, S., Peter, M.G. and Eijsink, V.G.H. (2001) *Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 8979–8984.

Yannis Papanikolau, Gali Prag, Giorgos Tavlak, Constantinos E. Vorgias, Amos B. Oppenheim, and Kyriacos Petratos, *Biochemistry* (2001). *High Resolution Structural Analyses of Mutant Chitinase A Complexes with Substrates Provide New Insight into the Mechanism of Catalysis*. 40, 11338-11343.

Zakariassen, H., Aam, B.B., Horn, S.J., Vårum, K.M., Sørli, M. and 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.* J. Biol. Chem. 284, 10610–10617.