

Mastergradsoppg. 2012

TILLAGING AV SETERETTEDE MUTANTER I HUMAN
CHITOTRIOSIDASE

PREPARATION OF SITE-DIRECTED MUTANTS IN HUMAN
CHITOTRIOSIDASE



ANE MARIE BECK

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



FORORD

Denne oppgaven ble utført i Ås ved Universitetet for miljø- og biovitenskap ved Instituttet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap våren 2012.

Jeg vil først og fremst takke veilederen min, Morten Sørli, for god støtte og hjelp til utforming av masteroppgaven og for at han alltid hadde en stressdempende kommentar på lur.

Tusen takk til Anne Grethe Hamre og Linn Wilhelmsen for god veiledning på laboratoriet og for at kontordøren deres alltid stod åpen. Takk for at dere alltid tok dere tid til å komme med en hjelpende hånd eller en oppmuntrende kommentar når det trengtes.

Takk til PEP-gruppa i 3. etasje for at vi fikk lov til å styre på arbeidsplassen deres. I tillegg tusen takk for all hjelp med småting som håndtering av instrumenter og leting i hyller.

Jeg vil rette en spesiell takk til min medsamsvorne masterstudent Kjersti Grongstad Lundquist for det gode samarbeidet, men mest av alt for å være en god venn og for å ha bidratt til at jeg gledet meg til å møte opp laboratoriet hver dag.

Jeg vil også gjerne takke familien min for å ha vært ekstra støttende under masterperioden min. Tusen takk til alle mine grønne og blå foreningsvenner i Noe Ganske Annet og andre medstudenter på Ås som har bidratt til alle de gode minnene jeg kommer til å sette stor pris på i fremtiden.

Ås, 15. mai 2012

Ane Marie Beck

INNHALDSFORTEGNELSE

FORORD	1
SAMMENDRAG	6
1 INTRODUKSJON	10
1.1 HUMANT IMMUNFORSVAR MOT KITININNEHOLDENDE PATOGENER.....	10
1.1.1 <i>Kitin</i>	10
1.1.2 <i>Kitosan</i>	10
1.1.3 <i>Kitinaser og humant immunforsvar</i>	11
1.1.4 <i>Sykdommer forbundet med kitinaser</i>	12
1.2 GLYKOSYL HYDROLASER.....	13
1.2.1 <i>Klassifisering og struktur</i>	13
1.2.2 <i>Mekanisme</i>	13
1.2.3 <i>Biomassekonvertering</i>	14
1.3 HUMANE KITINASER.....	15
1.3.1 <i>Klassifisering av kitinaser</i>	15
1.3.2 <i>Acidic mammilian chitinase</i>	16
1.3.3 <i>Human chitotriosidase</i>	16
1.3.4 <i>Chi-lektiner</i>	16
1.4 PROSESSIVITET.....	17
1.5 TRANSGLYKOSYLERING.....	18
1.5.1 <i>Katalytisk mekanisme for transglykosylering ved familie 18 kitinaser</i>	18
1.6 SIDEGRUPPENES EGENSKAPER.....	20
1.6.1 <i>Sammenligning av bindesetene til HCHT og AMCase</i>	20
1.6.2 <i>Enzymatiske egenskaper hos HCHT ved sammenligning med ChiA, ChiB og ChiC</i>	21
1.7 SETERETTET MUTAGENESE.....	23
1.7.1 <i>Design av primere</i>	23
1.8 MÅL MED OPPGAVEN.....	24
2 MATERIALER	26
2.1 KJEMIKALIER.....	26
2.2 INSTRUMENTER.....	27
2.3 LABORATORIEUTSTYR.....	28
2.4 PROGRAMVARER.....	28

2.5	KIT	29
2.6	VEKTORER, GENER OG PRIMERE.....	30
2.7	ENZYMER	30
2.8	CELLER.....	30
2.9	MEDIER.....	31
2.10	LØSNINGER	32
3	METODER	34
3.1	TILLAGING AV PLASMID.....	34
3.1.1	<i>Oppkonsentrering og rensing av villtype Human Chitotriosidase-plasmid.....</i>	<i>34</i>
3.2	IN VITRO SETERETTET MUTAGENESE.....	36
3.2.1	<i>Design av primere.....</i>	<i>36</i>
3.2.2	<i>PCR-syntese av mutant.....</i>	<i>37</i>
3.2.3	<i>Transformasjon til E. coli.....</i>	<i>38</i>
3.2.4	<i>Isolering av plasmid.....</i>	<i>39</i>
3.2.5	<i>Test av transformanter.....</i>	<i>39</i>
3.2.6	<i>Sekvensering av plasmid.....</i>	<i>41</i>
3.3	TRANSFORMASJON INN I KOMPETENTE <i>PICHIA PASTORIS</i> -CELLER	42
3.3.1	<i>Tillaging av kompetente celler.....</i>	<i>42</i>
3.3.2	<i>Linearisering av plasmid</i>	<i>43</i>
3.3.3	<i>Transformasjonen inn i kompetente Pichia pastoris-celler</i>	<i>44</i>
3.4	OVEREKSPRESJON AV HUMAN CHITOTRIOSIDASE-MUTANTER I <i>PICHIA PASTORIS</i>	45
3.4.1	<i>Dyrking av Pichia pastoris med mutert Human Chitotriosidase.....</i>	<i>45</i>
3.4.2	<i>Aktivitetstest</i>	<i>46</i>
3.4.3	<i>SDS-PAGE.....</i>	<i>47</i>
3.5	TILLAGING AV FRYSESTOCK.....	48
3.6	OVEREKSPRESJON OG ISOLERING AV AMCASE VILLTYPE	49
3.6.1	<i>Overekspresjon av AMCase villtype i Pichia pastoris.....</i>	<i>49</i>
3.6.2	<i>Isolering av AMCase ved ionebytterkromatografi.....</i>	<i>50</i>
3.6.3	<i>Måling av proteinkonsentrasjon</i>	<i>51</i>
3.6.4	<i>Aktivitetstest</i>	<i>52</i>
3.6.5	<i>Test av transformanter.....</i>	<i>52</i>
4	RESULTATER	53
4.1	MUTASJONSANALYSE.....	53
4.2	SETERETTET MUTAGENESE AV HUMAN CHITOTRIOSIDASE OG ISOLERING AV PLASMID	55
4.2.1	<i>Isolering av plasmid.....</i>	<i>55</i>

4.2.2	<i>Sekvensering av plasmid</i>	56
4.3	TRANSFORMASJON INN I KOMPETENTE <i>PICHIA PASTORIS</i> -CELLER	57
4.4	OVEREKSPRESJON AV HUMAN CHITOTRIOSIDASE-MUTANTER I <i>PICHIA PASTORIS</i>	58
4.4.1	<i>Dyrking av Pichia pastoris med mutert Human Chitotriosidase</i>	58
4.4.2	<i>Aktivitetstester ved overekspresjon av Human Chitotriosidase-mutanter</i>	58
4.4.3	<i>SDS-PAGE</i>	62
4.5	TILLAGING AV FRYSESTOCK.....	63
4.6	OVEREKSPRESJON OG ISOLERING AV AMCASE	64
4.6.1	<i>Overekspresjon av Acidic Mammalian Chitinase-villtype i Pichia pastoris</i>	64
4.6.2	<i>Isolering av AMCase ved ionebytterkromatografi</i>	65
5	DISKUSJON	66
5.1	<i>IN VITRO</i> SETERETTET MUTAGENESE.....	66
5.2	TRANSFORMASJON INN I <i>PICHIA PASTORIS</i> -CELLER.....	66
5.3	OVEREKSPRESJON AV HCHT-MUTANTER I <i>PICHIA PASTORIS</i>	67
5.3.1	<i>SDS-PAGE</i>	67
5.4	TILLAGING AV FRYSESTOCKER.....	68
5.5	OVEREKSPRESJON OG ISOLERING AV AMCASE	69
5.5.1	<i>Overekspresjon av AMCase villtype i Pichia pastoris</i>	69
5.5.2	<i>Isolering av AMCase ved ionebytterkromatografi</i>	69
6	KILDER	70
	APPENDIKS	73

SAMMENDRAG

Kitin er et uløselig og lineært polysakkarid som består av N-acetylglukosaminenheter bundet sammen med β -1,4-bindinger. Kitin finnes ikke naturlig i kroppen, men mennesker kan likevel produsere humane kitinaser som degraderer kitin. De to humane kitinasene vi kjenner til i dag er Acidic Mammalian Chitinase (AMCase) og Human Chitotriosidase (HCHT). Både AMCase og HCHT er klassifisert som familie 18 kitinaser. De to humane kitinasene er en del av vårt medfødte immunsystem. HCHT er vist blant annet å motvirke soppinfeksjoner og kan være kilde til nyttige kitoooligosakkarider ved transglykosylering. Det er blitt observert produksjon av AMCase og HCHT i sammenheng med mange ulike sykdommer som for eksempel henholdsvis astma og Gauchers sykdom.

Inhibering av AMCase har blitt forslått som behandlingsmetode for astma. Dersom HCHT har en positiv effekt på immunforsvaret kan det være ugunstig å inhibere denne kitinasen. For å finne selektive inhibitorer for AMCase og HCHT er det interessant å studere ulikheter mellom bindesetene til disse to enzymene.

Målet med denne oppgaven er å utføre seterettet mutagenes på ulike aminosyrer i bindesetet til HCHT. Det skal utføres mutasjoner som endrer aminosyrer i HCHT til aminosyren ved tilsvarende posisjon i AMCase. Mutasjonene som ble utført til dette formålet var Q145R, Y190N, Q188I og S240Y i subsetene +2 og +3. Det ble også utført seterettet mutagenese på to aminosyrer som forventes å være gunstig ved transglykosylering; disse mutasjonene var W218F ved subsete +2 og D138N i TIM-barrel ved subsete -1. Det ble gjennomført vellykkede fremstilling av alle de seks seterrettede mutantene. Alle mutantene viste kitinaseaktivitet ved overekspresjon i *Pichia pastoris*.

I tillegg ble AMCase-villtype forsøkt isolert ved ionebyttekromatografi. Ved isolering av AMCase ble det benyttet samme betingelser som for tidligere isolering av HCHT. Det viste seg at ionebytterkromatografi under disse betingelsene ikke ga vellykket isolering av AMCase. Dette kan for eksempel være på grunn av at AMCase har lavere pH optimum enn HCHT.

ABSTRACT

Chitin is an insoluble and linear polysaccharide consisting of N-acetylglucosamine units connected by β -1,4-bonds. Chitin is not produced in the human body, but humans can still produce chitinases that degrade chitin. The two human chitinases known today are Acidic Mammalian Chitinase (AMCase) and Human Chitotriosidase (HCHT). Both AMCase and HCHT are classified as family 18 chitinases. These two human chitinases are a part of our innate immune system. HCHT has been shown to have an anti-fungal effect and can be a source of chito-oligosaccharides by transglycosylation. It has been observed that AMCase and HCHT are produced in the presence of many different diseases such as asthma and Gaucher's disease, respectively.

Inhibition of AMCase has been suggested as treatment for asthma. If HCHT has a positive effect on the immune system it can be unfavorable to inhibit this chitinase. In order to find selective inhibitors of AMCase and HCHT it is interesting to study the differences between the active sites of the two enzymes.

The aim of this thesis is to perform site-directed mutagenesis of various amino acids in the active site of HCHT. Amino acids in HCHT are going to be altered to the amino acids at the corresponding position in AMCase. The mutants made for this purpose were Q145R, Y190N, Q188I and S240Y, located by subsites +2 and +3. It was also performed site-directed mutagenesis on two amino acids that are expected to be beneficial for transglycosylation; these mutations were W218F close to subsite +2 and D138N in the TIM-barrel by subsite -1. All the six mutants were successfully produced and all mutants showed chitinase activity by overexpression in *Pichia pastoris*.

In addition, it was attempted to isolate AMCase-wild-type by ion exchange chromatography. The conditions used for the isolation of AMCase were the same conditions used for previous isolation of HCHT. It turned out that ion exchange chromatography with these conditions did not give successful isolation of AMCase. This may be because AMCase has a lower pH-optimum than HCHT.

FORKORTELSER

10xD	20 % dekstrose
10xGY	10 % glyserol
10xM	5 % metanol
10xYNB	13 % Yeast Nitrogen Base
4-MU	4-metylumbelliferon
4-MU-(GlcNac) ₂	4-metylumbelliferyl- β -D-N,N'-diacetylkitobiose
500xB	0,02 % biotin
A	Adenin
A (Ala)	Alanin
AMCase	Acidic mammalian chitinase
AOX	Alkohol oksidase
BMGY	Buffered glycerol-complex medie
BMMY	Buffered methanol-complex medie
BSA	Bovine serum albumin
C	Cytosin
C (Cys)	Cystein
CBM	Carbohydrate Binding Motif
ChiA	ChitinaseA
ChiB	ChitinaseB
ChiC	ChitinaseC
CIAP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
D (Asp)	Asparginsyre
DMSO	Dimetyl sulfoxid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
E (Glu)	Glutaminsyre/glutamat
F (Phe)	Fenylalanin
FPLC	Fast Polynucleotide Liquid Chromatography
G	Guanin
G (Gly)	Glycin
GlcNAc	N-acetylglukosamin

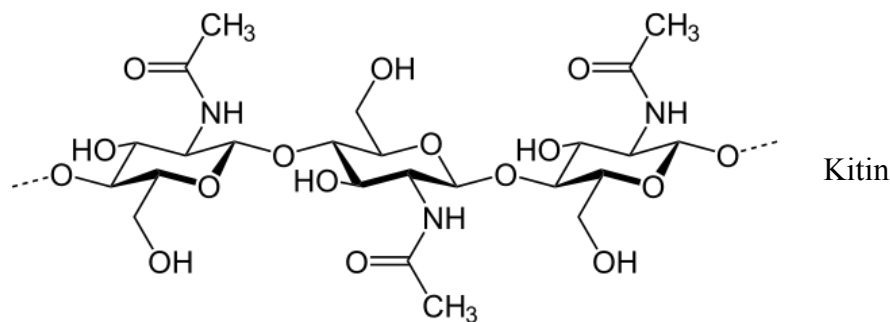
H (His)	Histidin
HCHT	Human chitotriosidase
I (Ile)	Isoleucin
IUB	International Union of Biochemistry
K (Lys)	Lysin
L (Leu)	Leucin
LB	Luria-Bertani
M (Met)	Metionin
MD	Minimal Dextrose
MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonic acid
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
N (Asn)	Asparagin
NEB1-buffer	New England Biolabs buffer #1
OD	Absorbansenheter for celletetthet
P (Pro)	Prolin
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluoride
Q (Gln)	Glutamin
R (Arg)	Arginin
RNA	Ribonukleinsyre
S (Ser)	Serin
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
T	Tymin
T (Thr)	Treonin
TAE-buffer	Tris-Acetat-EDTA-buffer
V (Val)	Valin
W (Trp)	Tryptofan
Y (Tyr)	Tyrosin
YPD	Yeast Peptone Dextrose

1 INTRODUKSJON

1.1 Humant immunforsvar mot kitininneholdende patogener.

1.1.1 Kitin

Kitin er et uløselig og lineært polysakkarid som består av N-acetylglukosaminenheter (GlcNAc-enheter) bundet sammen med β -1,4-bindinger. Hver nabo-sukkerenhet er rotert 180° i forhold til hverandre, slik at annenhver acetoamidgruppe peker motsatt vei.¹ Kitin er det nest mest vanlige polysakkaridet i naturen etter cellulose, og finnes blant annet i eksoskjelettet hos krepsdyr og insekter og i celleveggen til ulike patogener som parasitter, sopp og nematoder (rundormer). Kitin beskytter patogener fra tøffe forhold i vertsorganismen.^{2,3} Strukturen til kitin er vist i figur 1.

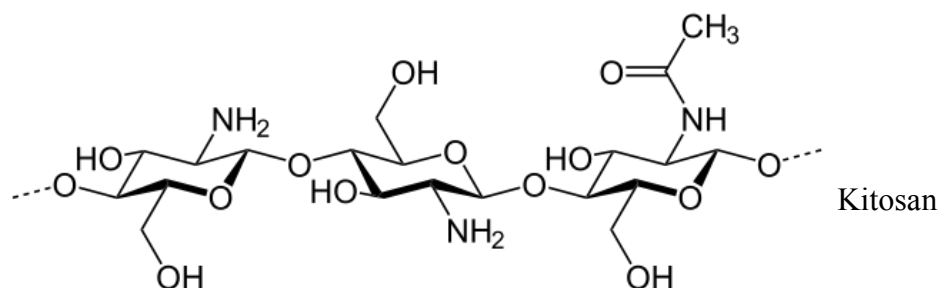


Figur 1: Viser strukturen til kitin som består av N-acetylglukosaminenheter bundet sammen av β (1-4)-bindinger.

1.1.2 Kitosan

Kitosan er en kopolymer som består delvis av GlcNAc-enheter og delvis av D-glukosaminenheter bundet sammen av β -1,4-bindinger.⁴ Strukturen av kitosan er vist i figur 2. Delvis deacetylering av kitin gir kitosan og fremstillingen skjer som oftest ved syrebehandling av kitin.^{1,5} Kitosan blir ofte brukt til å studere de enzymatiske egenskapene til kitinaser fordi det, i motsetning til kitin, er vannløselig og dermed enklere å gjøre undersøkelser på.⁶ Den gode vannløseligheten skyldes hydrogenbindingene som oppstår på grunn av amin- og hydroksylgrupper i D-glukosaminenheter. Selv om kitosan og kitin har mange strukturelle likheter kan det ikke trekkes konklusjoner om kitin ut ifra undersøkelser på kitosan.⁴ Zakariassen et al. utførte i 2009 undersøkelser av prosessivitet til kitinasene ChitinaseA (ChiA) og ChitinaseB (ChiB) fra *Serratia marcescens* ved å endre aminosyrer i

det aktive setet. Det viste lavere prosessivitet og enzymaktivitet ved nedbrytning av kitin, men høyere prosessivitet ved nedbrytning av kitosan. Studier på cellulaser av Li et al. i 2007 og Zhou et al. i 2004 viste den samme negative korrelasjonen mellom det uløselige polysakkaridet cellulose og det mer løselige polysakkaridet karboksylmetylcellulose.⁷



Figur 2: Viser strukturen til kitosan som består delvis av GlcNAc-enheter og delvis av D-glukosaminenheter bundet sammen med β -1,4-bindinger.

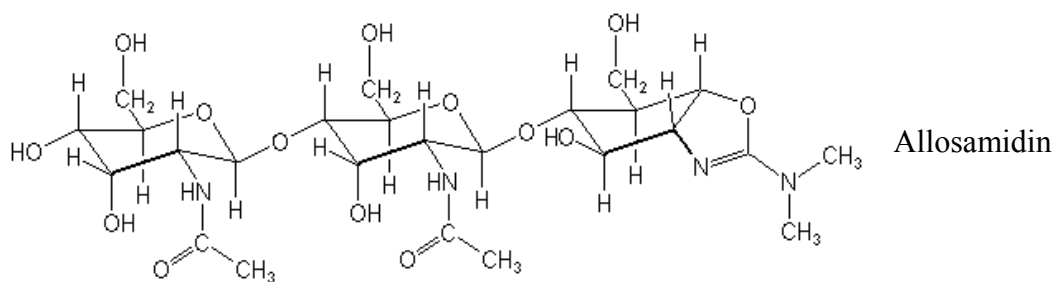
1.1.3 Kitinaser og humant immunforsvar

Enzymene som bryter ned kitin kalles kitinaser. Selv om kitin ikke finnes naturlig i kroppen kan mennesker produsere humane kitinaser som degraderer kitin. Mekanismen for hvordan kitinaser degraderer kitin er beskrevet i avsnitt 1.2.2.⁸ Kitin finnes blant annet i celleveggen til sopp. Kitinaser er derfor en viktig bestanddel ved medfødt respons mot soppinfeksjon.⁹ De to humane kitinasene vi kjenner til er Acidic Mammalian Chitinase (AMCase) og Human Chitotriosidase (HCHT). Disse to er en del av vårt medfødte immunsystem. AMCase finnes i magen, i tårer, i nesens (sinus mucosa) og i lungene, mens HCHT blir uttrykt i humane makrofager.⁸ HCHT har potensiale for høy transglykosyleringsaktivitet og kan derfor gi opphav til flere kitooligosakkarider med ulik biologisk aktivitet.¹⁰ Eksempler på biologisk aktivitet til kitooligosakkarider som er kjent i dag er antifungal aktivitet, antibakteriell aktivitet, at de kan motvirke kreft og at de kan ha en positiv effekt på immunforsvaret.¹¹ HCHT bidrar blant annet til produksjon av kitooligosakkaridet kitotetraose. Studier har vist at kitotetraose kan være et viktig signalmolekyl for viktige reguleringer i planter og har blant annet vist å påvirke embryogenesen i sebrafisk. Det er interessant å se om kitininneholdende organismer i mennesker kan føre til lokal kitotetraosedannelse som kan gi respons til lokale celler og til immunforsvaret.¹⁰

1.1.4 Sykdommer forbundet med kitinaser

Både HCHT og AMCCase er funnet oppregulert ved ulike sykdommer. HCHT ble første gang oppdaget i plasmaet til pasienter med Gauchers sykdom ved at aktiviteten mot det kunstige substratet 4-metyllumbelliferyl-kitotriose økte flere hundre ganger i forhold til i plasmaet hos friske personer. Gauchers sykdom oppstår på grunn av en arvelig mangel på enzymet glukocerebrosidase.^{3,12} HCHT er i tillegg oppregulert ved blant annet prostatakreft, Niemann-Picks sykdom og malaria.¹³ Det blitt observert mangel av HCHT ved infeksjon av *Wuchereria bancrofti*, som fører til filariasis.³ Filariasis er en infeksjonssykdom som ofte oppstår i tropiske land. HCHT-genet er ikke essensielt for mennesker, men omtrent 35 % er heterozygote og 6 % er homozygote for en inaktivert form av genet.¹⁴ Denne inaktive formen har 24 basepar insersjon i exon 10 av kitotriosidasegenet som hindrer produksjon av et aktivt enzym. Et studie har vist at mennesker med den inaktive formen av HCHT-genet er mer utsatt for nematodale infeksjoner. Parasittiske nematoder syntetiserer kitin i løpet av sin livssyklus og kitinaser kan forstyrre disse prosessene.

Det kommer stadig mer beviser som styrker at soppinfeksjon og produksjon av AMCCase i lungene spiller en rolle ved utvikling av astma. Et studie av Goldman et. al. i 2011 har vist at produksjonen av AMCCase blir aktivert i luftveiene hos barn med alvorlig astma. Ulike sopptyper kan være involvert, men *Aspergillus fumigates* ser ut til å være den mest utbredte.⁹ En inhibitor til enzymet har blitt foreslått som behandling, men dette må undersøkes nærmere for å ikke forstyrre de anti-patogene egenskapene til kitinasene.³ Flere inhibitorer har blitt identifisert for de humane kitinasene, blant annet allosamidin, styloguanidiner, argifin og argadin.¹⁵ Pseudosakkaridet allosamidin er den viktigste inhibitoren for familie 18 kitinaser i dag. Strukturen til allosamidin vises i figur 3.⁸ Familie 18 inhibitorer kan blant annet brukes ved å detektere familie 19 kitinaser som forblir aktive ved introduksjon av disse inhibitorene.¹⁶



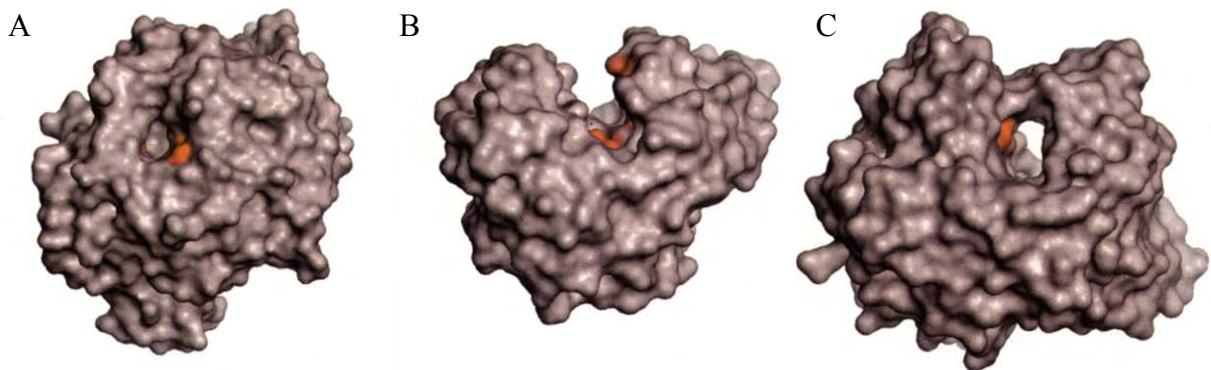
Figur 3: Viser strukturen til allosamidin, som i dag er den vanligste inhibitoren for familie 18 kitinaser.

1.2 Glykosyl hydrolaser

Glykosyl hydrolaser er enzymer som bryter ned polysakkarider. Det er utrolig høy diversitet innen polysakkarider blant annet fordi karbohydrater har høy evne til stereokjemisk variasjon. På grunn av dette har polysakkarider ofte mange biologiske roller i levende organismer, blant annet lagring av energi, oppbygging av cellevegger og som spesifikke signalmolekyler. En konsekvens av denne diversiteten er at det må et stort antall ulike glykosyl hydrolaser til for å kunne hydrolysere de ulike glykosidbindingene. Mangel på disse enzymene er ofte arvelige og kan være årsak til mange ulike sykdommer, for eksempel laktose intoleranse.¹⁷

1.2.1 Klassifisering og struktur

Glykosyl hydrolaser klassifiseres etter likhet i aminosyresekvens og det fins nå over 100 forskjellige familier.^{17,18} Klassifisering i familier skal gi informasjon om de ulike strukturene og funksjonene til enzymene. Enzymer med ulik substratspesifisitet kan høre til i samme familie og enzymer som hydrolyserer samme substrat kan høre til i ulike familier. Denne typen klassifisering er altså ulik fra IUBs (International Union of Biochemistry) nomenklatur, som hovedsakelig baserer seg på substratspesifisitet. Bindesetene til glykosyl hydrolaser deles inn i tre typer hovedstrukturer som kalles lomme-, kløft- og tunnelstruktur. Disse tre strukturene vises i figur 4.¹⁷

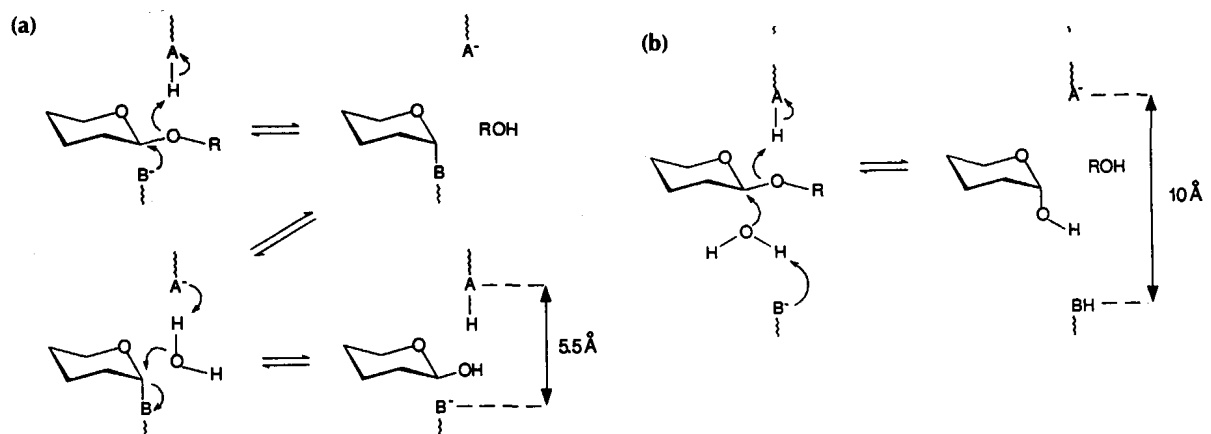


Figur 4: Viser tre hovedstrukturer ved glykosyl hydrolaser. (A) Lommestruktur. (B) Kløftstruktur. (C) Tunnelstruktur.¹⁷

1.2.2 Mekanisme

Hydrolyse av glykosidbinding ved glykosyl hydrolaser skjer ved syrekatalyse og det finnes to hovedmekanismer som kalles bevarende og inverterende. Mekanismene er vist i figur 5. Den

bevarende mekanismen skjer ved at oksygenet i den glykosidiske bindingen blir protonert av en syre og at en base på enzymet angriper sukkerresten. Glykosyl-enzymbindingen blir hydrolysert av et vannmolekyl, og det anomere karbonet på sukkeret vil til slutt ha samme stereokjemi som substratet. Ved denne mekanismen er basen posisjonert så den lett kan danne hydrogenbinding med glykosidoksygenet. Ved inverterende mekanisme er denne avstanden større og det trengs derfor et vannmolekyl mellom basen og sukkeret for å få reaksjonen til å skje. Basen aktiverer vannmolekylet til å angripe det anomerske senteret, og det dannes motsatt stereokjemi av substratet. Ved bevarende mekanisme og inverterende mekanisme er avstanden mellom syren og basen på enzymet henholdsvis 5,5 og 10 Å.¹⁷



Figur 5: Viser hovedmekanismene for hydrolyse av glykosidbindinger ved glykosyl hydrolaser. (a) Bevarende mekanisme fører til samme stereokjemi i produkt og substrat. (b) Inverterende mekanisme fører til motsatt stereokjemi i produkt og substrat.¹⁷

1.2.3 Biomassekonvertering

Det er interessant å studere glykosyl hydrolaser for å finne gode måter å konvertere biomasse til bioenergi.⁶ Biomassekonvertering er av stor biologisk og økonomisk interesse og det blir produsert biopolymere av cellulose og kitin på henholdsvis en trillion og 100 billioner tonn i året. Cellulose er en polymer av β -1,4-glukose-enheter og har stor strukturell likhet med kitin.⁷ Studier av enzymatisk degradering av disse to polysakkaridene er problematisk fordi de er uløselige. På grunn av dette er det vanskelig å arbeide med blant annet intermediater og oligosakkaridprodukter. Bruk av det løselige polysakkaridet kitosan gir en unik mulighet til enklere å kunne studere mekanismen til kitinaser.¹ Kunnskap om effektiv degradering av kitin og kitosan kan gi tilgang til bioaktive kito oligosakkarider som har potensiale for bruk i blant annet jordbruk og medisin.⁷ Fordi kitin og cellulose har lignende struktur kan kitosan brukes i modellsystemer for å studere visse enzymatiske aspekter hos både kitinaser og cellulaser.¹

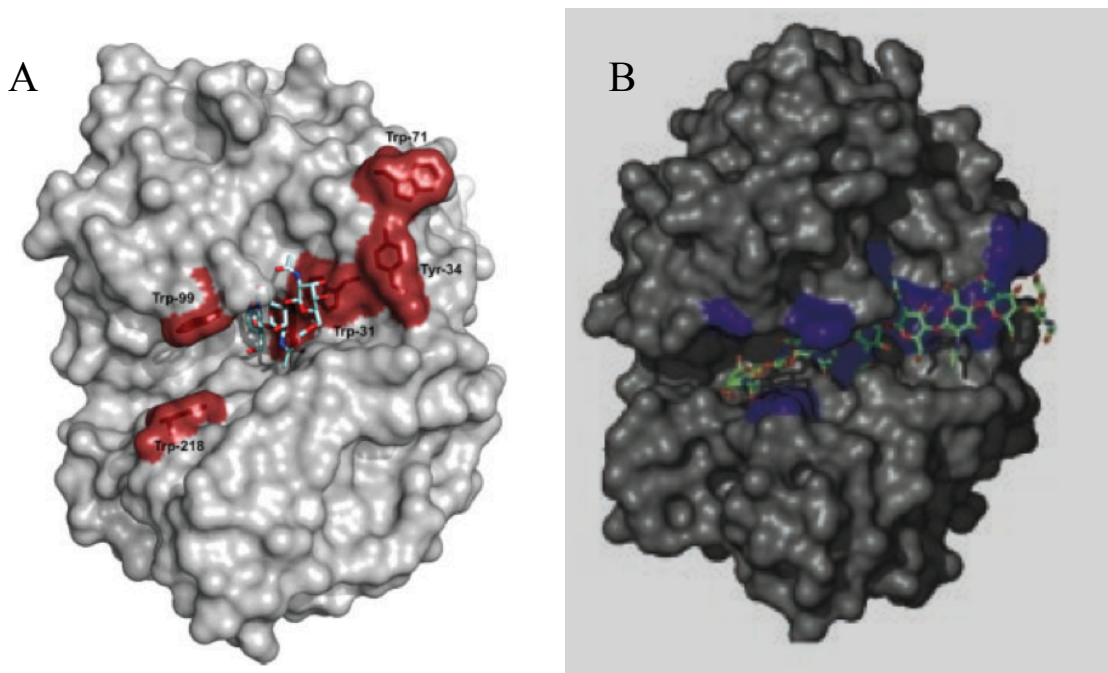
1.3 Humane kitinaser

1.3.1 Klassifisering av kitinaser

Kitinaser, eller kitin hydrolaser, er enzymer som hydrolyserer kitin.¹⁹ Enzymene er delt inn i familie 18 og 19 glykosyl hydrolaser. De to familiene har ulikheter ved både aminosyresekvens og tredimensjonal struktur, og de antas å ha ulik evolusjonær opprinnelse.¹⁶

Familie 18 kitinaser kommer fra bakterier, sopp, virus, dyr og noen planter. Familie 18 kitinaser fra planter er delt inn i klasse III og V på grunn av små strukturelle ulikheter. Det katalytiske domenet til familie 18 kitinaser har en TIM-barrel-struktur, og kitin hydrolyseres ved bevarende mekanisme, beskrevet i avsnitt 1.2.2. I motsetning til familie 19 har familie 18 kitinaser vist seg å bli inhibert av allosamidin. Familie 19 kitinaser finnes i bakterier og i planter som klasse I, II og IV kitinaser. Det katalytiske domenet har blant annet høyt innhold av α -helikser, og hydrolyseringen skjer ved inverterende mekanisme, beskrevet i avsnitt 1.2.2.¹⁶

De to humane kitinasene vi kjenner til i dag, AMCcase og HCHT, er begge kategorisert som familie 18 glykosyl hydrolaser. AMCcase og HCHT deler stor likhet ved struktur, men mye tyder på at de to kitinasene har flere funksjonelle ulikheter.¹³



Figur 6: (A) Krystallstruktur av AMCcase med metylallosamidin i bindesetet. Katalytiske baser er merket med rødt.²⁰ (B) Krystallstruktur HCHT med substrat i det aktive setet. Katalytiske baser er merket med blått.¹⁹

1.3.2 *Acidic mammalian chitinase*

AMCase har en størrelse på 50 kDa og består av et 35 kDa N-terminalt katalytisk domene og et C-terminalt kitinbindende domene. Disse to domenene blir holdt sammen av et hengsel.²¹ AMCase er et eksoenzym og kutter kitin fra den ikke-reduserende enden av kitinkjeden.^{7,8} I mus har AMCase to pH-optimum, ett på 2 og ett mellom 3 og 6. Hos mennesker ligger pH-optimumet mellom 4 og 5. AMCase har vist seg å ha lav transglykosyleringsaktivitet. Se figur 6 for illustrasjon av AMCase.⁷

1.3.3 *Human chitotriosidase*

HCHT er i stor grad homolog med kitinasene i lavere organismer.¹⁰ Selv om enzymet blir transkribert fra et enkelt gen finnes det to versjoner av det, en på 39 kDa og en på 50 kDa. HCHT blir syntetisert som et 50-kDa protein som består av et C-terminal-kitinbindende domene med et hengsel til den 39 kDa N-terminale delen. Det er kun fullengdeproteinet som blir sekretet ut i blodet, mens 39 kDa-proteinet kun finnes i makrofagens lysozymer.³ En stor andel av 50 kDa versjonen konverteres til 39 kDa ved post-translasjon eller RNA-prosessering. Enzymet på 39 kDa kan også degradere kitin, men C-terminaldomenet er et kitinbindende domene og kan ha noe å si for prosessiviteten.¹⁰ HCHT er vist i figur 6.

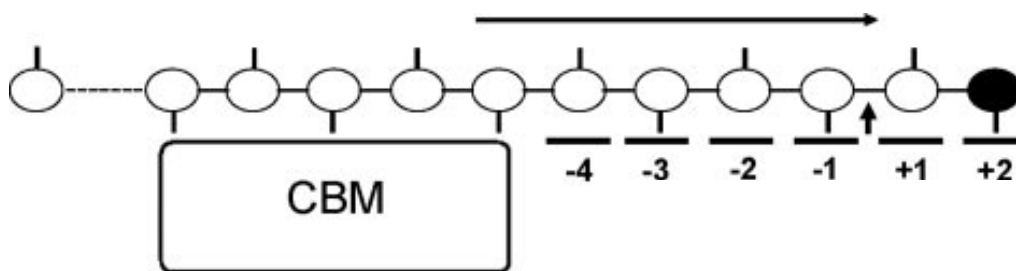
1.3.4 *Chi-lektiner*

I tillegg til AMCase og HCHT har det blitt oppdaget flere humane og i stor grad homologe proteiner. Disse proteinene mangler aktivitet fordi katalytiske sidegrupper er blitt substituert. Dette er sannsynligvis på grunn av spontane mutasjoner i det aktive setet gjennom evolusjonen. Disse proteinene blir kalt chi-lektiner. Selv om proteinene ikke har aktivitet kan de binde seg til karbohydrater. Chi-lektinene hører også til under familie 18 glykosyl hydrolaser og består av et 39 kDa-domene med en TIM-barrel-struktur. I motsetning til andre humane kitinaser mangler disse proteinene det konserverte kitinbindende domenet. Selv om det finnes mye informasjon om strukturen til chi-lektinene er det lite kunnskap om funksjonene.¹² Chi-lektiner blir, i likhet med AMCase og HCHT, oppregulert ved ulike sykdommer. Et studie av Chupp et al. i 2007 viser at nivået av chi-lektinet YKL-40, også kalt human cartilage glycoprotein 39, er økt i både blodsirkulasjonen og i luftveiene til pasienter med alvorlig astma.²²

1.4 Prosessivitet

Et enzym er prosessivt dersom det kan utføre flere bindingsbrudd hver gang det fester seg til substratet. Prosessiv degradering antas å være viktig for enzymeffektiviteten fordi det reduserer antall ganger enzymet må feste seg på nytt, noe som er en energikrevende prosess. Prosessive enzymer har ofte lange og dype aktive seter.⁷

I kitin og cellulose er nabo-sukkerenhetene rotert motsatt vei i forhold til hverandre. Det gjør at det minste produktet ved prosessiv aktivitet er et disakkarid fordi substratet flytter seg to subseter over kuttstedet etter hver hydrolyse, vist i figur 7. På grunn av manglende N-acetyl-sidekjeder i forhold til kitin vil det ved prosessiv nedbryting av kitosan kunne dannes partallenheter som er større enn dimere. Prosessiviteten til kitinaser kan blant annet måles ved å hydrolysere kitosan og studere forholdet mellom produkter med partallenheter og oddetallsenheter.¹



Figur 7: Illustrasjon av det aktive setet hos kitinasen ChiA fra *S. marcescens* som viser subsetene fra -4 til +2. Den svarte sukkerenheten illustrerer den reduserende enden av en substratet, som her er en kitinkjede. CBM er et karbohydratbindende domene som antas å være involvert i bindingen av substratet kitin. Den øverste pilen viser retningen til substratet gjennom det aktive setet. Glykosidbindingen blir brutt mellom subsete -1 og +1. Figuren viser hvordan plasseringen av N-acetyl-sidekjeden gjør at prosessivitet resulterer i dimere.¹

1.5 Transglykosylering

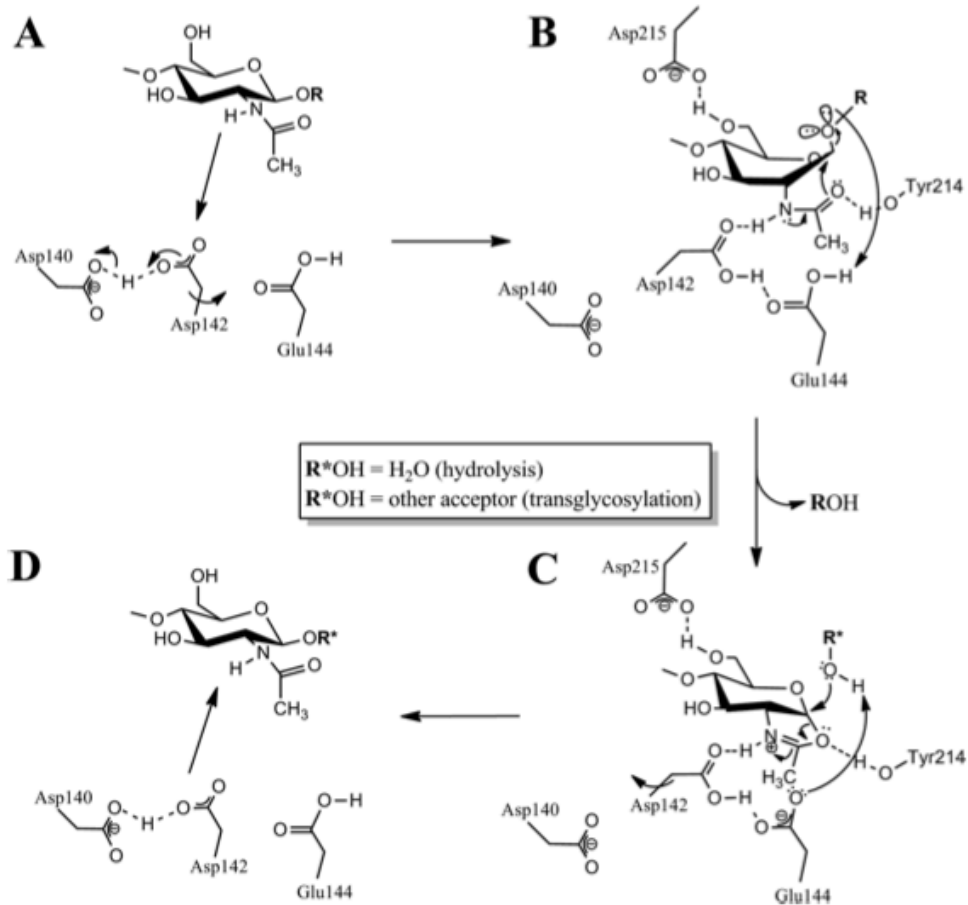
Glykosyl hydrolaser utfører hovedsakelig hydrolyse av glykosidbindinger. Noen glykosyl hydrolaser katalyserer i tillegg transglykosyleringsreaksjoner. Transglykosyleringene skjer ved at det oppstår nye glykosidbindinger mellom donor- og akseptorsakkarider.

Transglykosylerende kitinaser kan gi opphav til kitooligosakkarider med ny eller forbedret aktivitet. Disse kitooligosakkaridene kan dannes ved at mindre kitooligosakkarider blir koblet til hverandre eller til andre funksjonelle grupper.¹¹

1.5.1 Katalytisk mekanisme for transglykosylering ved familie 18 kitinaser

Transglykosylerende enzymer gir som oftest et kovalent glykosyl-enzymintermediat. Noen familie 18 kitinaser gir derimot opphav til et intermediat som er et ikke-kovalent oksazoliniumion, vist i figur 8 ved trinn C. Figur 8 viser mekanismen til transglykosylering av familie 18 kitinasen ChiB fra *S. marcescens*. (A + B): Substratet bindes til enzymet og Asp¹⁴² roterer mot Glu¹⁴⁴. Substratbindingen fører til konformasjonsendring ved sukkerets subse -1 til båtformasjon. (B + C): Glu¹⁴⁴ gir fra seg sitt hydrogen og protonerer glykosidoksygenet. Et nukleofilt angrep fra acetamidgruppen (R-NH-CO-CH₃) til det anomeriske senteret på sukkerenheten fører til at den ugående gruppen (-ROH) faller av og et oksazoliniumion-intermediat dannes. (C + D): Glu¹⁴⁴ opptrer nå som en base og aktiverer et akseptormolekyl (-R'OH) som angriper oksazoliniumionet. (D): Dersom den nye sidegruppen er vann har det skjedd en hydrolyse. Dersom den nye sidegruppen er et karbohydrat har det skjedd en transglykosylering. For at et enzym skal ha høy transglykosyleringsaktivitet må det favorisere binding av karbohydratmolekyler til intermediatet.¹¹

Hos ChiB fra *S. marcescens* antas Asp¹⁴² å være viktig for transglykosylering fordi den har egenskapen at den kan befinne seg ved to posisjoner; opp og interagere med Glu¹⁴⁴ eller ned å interagere med Asp¹⁴⁰. I et studie ved Zakariassen et al. i 2011 ble det observert lavere stabilitet av oksazoliniumintermediatet ved mutasjon av Asp¹⁴² til Asn¹⁴².¹¹



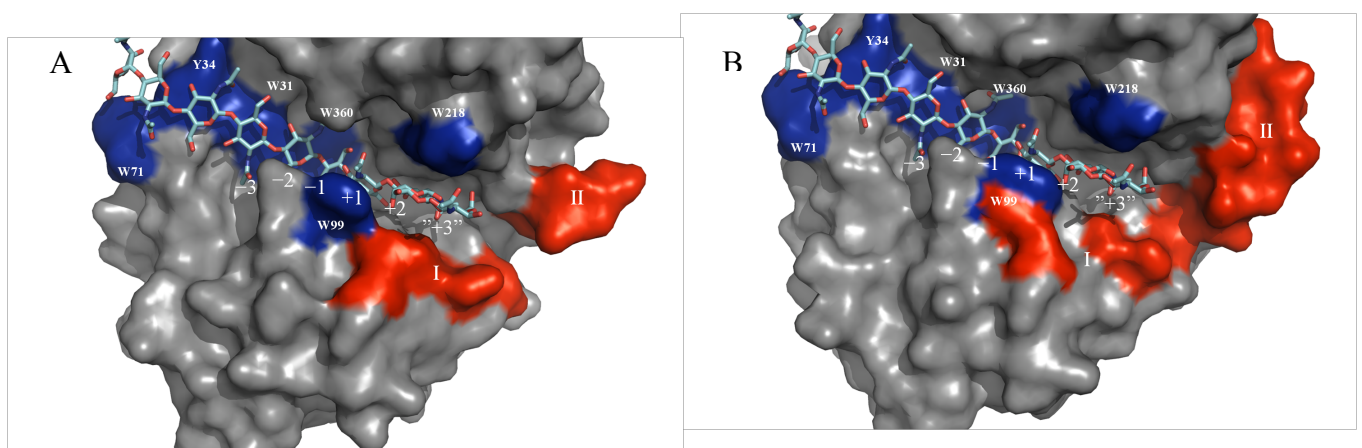
Figur 8: Viser mekanismen for transglykosylering av familie 18 kitinasen ChiB fra *S. marcescens*. Figuren viser -1 subsete sukkerenheten og utvalgte sidegrupper i enzymets aktive sete. (C) Viser strukturen til et oksazoliniumion.¹¹

1.6 Sidegruppene egenskaper

1.6.1 Sammenligning av bindesetene til HCHT og AMCase

AMCase og HCHT er enzymer som bidrar ved vårt humane immunforsvar og de blir begge oppregulert ved ulike sykdommer. Det er viktig å studere begge disse enzymene blant annet for å ha mulighet til å designe selektive inhibitorer. Figur 9 viser struktur av (A) HCHT og (B) AMCase med en nonamer modellert inn i bindesetet.

Aromatmotivene ved subsetene -6 til +2 er like hos HCHT og AMCase. Subsetene inneholder strekk med et konservert Trp-Tyr-Trp-Trp-motiv. Subsetene +1 og +2 er sannsynligvis en utvidet bindende kløft hos begge enzymene. Fra subsete +2 er strukturen til HCHT og AMCase ulike; dette område er trangere hos HCHT. Det er to områder på HCHT som er ulike fra AMCase, som begge ser ut til å kunne interagere med +3 og/eller +4 sukker, enten direkte eller via et vannmolekyl. Disse to områdene er merket med I og II på bilde og er farget røde. I regionen merket med I på HCHT sitter de tre ikke-konserverte aminosyrene Glu¹⁸⁸, Thr¹⁸⁹, og Tyr¹⁹⁰ på α -heliks 5 i en TIM-barrel og aminosyren Gln¹⁴⁵ på en loop. På samme område i AMCase sitter henholdsvis Ile¹⁸⁸, Ser¹⁸⁹, Asn¹⁹⁰ og Arg¹⁴⁵. Den røde regionen merket med II inneholder starten på α -heliks 6 i en TIM-barrel. Hos HCHT er denne aminosyresekvensen RQEEGAAAS fra residu 232 til 239 og i AMCase er sekvensen YPTDTGSNAY fra residu 232 til 240. I motsetning til HCHT har AMCase høy toleranse for syrer. Dette er på grunn av aminosyrene His²⁰⁸, His²⁶⁹ og Arg¹⁴⁵ nær det aktive setet, som hos HCHT er Asn²⁰⁸, Arg²⁶⁹ og Gln¹⁴⁵.⁸



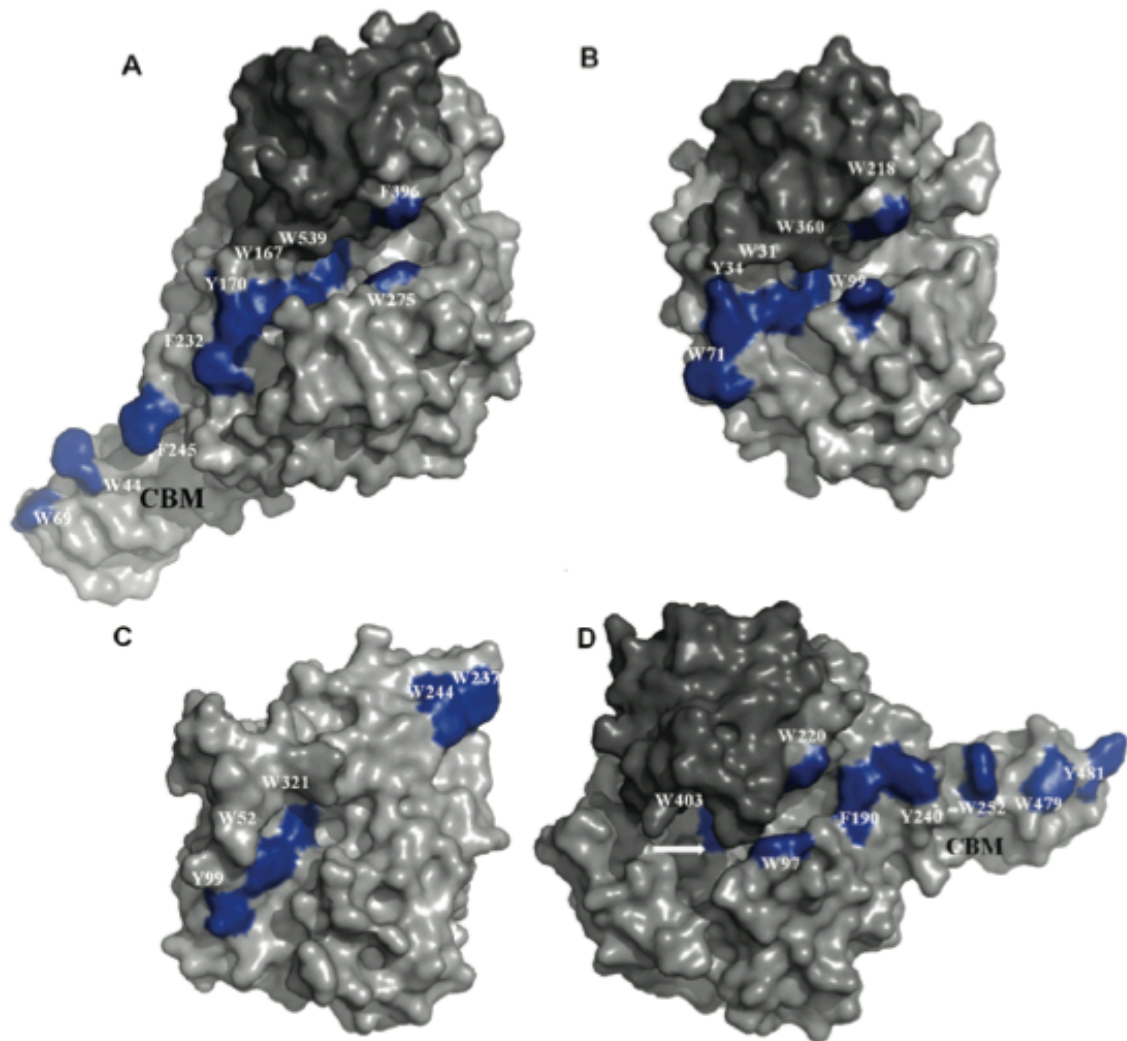
Figur 9: (A) Krystallstruktur av HCHT. (B) Krystallstruktur av AMCase. Bildene illustrerer en nonamer modellert inn i bindesetet. Område farget med blått er aminosyrer som har vist seg å være viktige for binding av kitinkjeden og for enzymegenskapene. Områdene farget i rødt og nummerert I og II er områder som er ulike i HCHT og AMCase og som kan tenkes å interagere med ligand.⁸

1.6.2 Enzymatiske egenskaper hos HCHT ved sammenligning med ChiA, ChiB og ChiC

Tidligere forsøk indikerer at HCHT har høy bindingsaffinitet i både subsete +2 og +3 og formodentlig også i +4. Dette betyr at HCHT sannsynligvis har en utvidet substratbindingskløft. Dette funnet styrker også påstanden om at HCHT har høy transglykosyleringsaktivitet fordi sterk binding er kjent for å forbedre transglykosyleringsaktivitet i familie 18 kitinaser.⁸ Mutasjonsanalyser på kitinasen ChiA fra *S. marcescens* har vist at introduksjon av Trp i subsete +2, som hos HCHT, øker transglykosyleringsaktiviteten betraktelig.¹³ Eliminering av aromatiske sidegrupper hos HCHT har vist seg å redusere transglykosyleringsaktivitet.¹¹

HCHT, ChiA og ChiB har alle dype bindeseter, noe som ofte indikerer eksoaktivitet. Alle disse enzymene har vist dominerende endoaktivitet ved hydrolyse av kitosan. Det er mulig at HCHT har eksoaktivitet ved hydrolysering av kitin. Kitosan er mer løselig enn kitosan og dermed mer tilgjengelig for enzymene. ChitinaseC (ChiC) er ansett som et endoenzym og har et mye mer åpent bindesete enn HCHT, ChiA og ChiB, se figur 10.¹³

ChiA og ChiB er begge prosessive enzymer som kutter kitin i motsatt retning og etterlater seg GlcNAc-dimere. HCHT har et aromatisk motiv fra subsete -6 til -3 som ligner motivet i ChiA (W⁷¹, Y³⁴ og W³¹ i HCHT og F²³², Y¹⁷⁰ og W¹⁶⁷ i Chi A). HCHT har også samme Trp-Trp motiv i subsetene +1 og +2 som ChiB (W⁹⁹ og W²¹⁸ i HCHT og W⁹⁷ og W²²⁰ i ChiB). For ChiB har W⁹⁷ og W²²⁰ ved henholdsvis subsete +1 og +2 vist seg å være viktig for prosessiviteten. Mutasjoner ved tilsvarende posisjoner hos ChiA ga kun en liten reduksjon av prosessivitet. Alle familie 18 glykosyl hydrolaser har Trp ved subsete -1 (W⁵³⁹ i ChiA, W⁴⁰³ i ChiB og W³²¹ i ChiC og W³⁶⁰ i HCHT). Aromatiske residuer i bindesetet antas å være viktig for substratbinding og prosessivitet. Det har også blitt observert kitinbindende domener hos ChiA og ChiB, som ikke finnes hos HCHT. HCHT har vist høy andel av partallsenheter ved nedbryting av kitosan, noe som tyder på prosessivitet, men muligens i lavere grad enn hos ChiA og ChiB. Høy transglykosyleringsaktivitet hos HCHT kan tenkes å bidra til å redusere prosessiviteten. Figur 10 viser strukturene til bindesetene for ChiA, ChiB, ChiC og HCHT merket med sidegruppene som er nevnt over.¹³



Figur 10: Krystallstrukturer av (A) ChiA fra *S. marcescens*, (B) 39 kDa-formen av HCHT, (C) det katalytiske domenet til ChiC fra *Lactobacillus lactis* og (D) ChiB fra *S. marcescens*. Strukturene viser bindesetene til enzymene hvor utvalgte sidegrupper er markert i blått.¹³

1.7 Seterettet mutagenese

Seterettet mutagenese gjør det mulig å utføre spesifikke endringer i en gensekvens for et enzym for å studere sammenheng mellom dets struktur og funksjon. For kitinaser er det interessant å studere egenskaper som transglykosyleringsaktivitet, ekso-/endoaktivitet, prosessivitet eller om endring av struktur kan gjøre enzymet inaktivt.²³ Seterettet mutagenese kan utføres ved bruk av en dobbeltrådet DNA-vektor med innsatt gen av interesse. I tillegg trengs det DNA-oligonukleotidprimer som inneholder den ønskede mutasjonen. For at primeren skal feste seg til riktig sted på gensekvensen må det være nok matchende nukleotider på begge sider av basen(e) som skal endres. Primerene kan forlenges ved PCR-reaksjon (Polymerase Chain Reaction-reaksjon) ved bruk av DNApolymerase. Oligonukleotidet vil da basepare med nukleotider på utvalgt sted i gensekvensen, bortsett fra ved den korte delen med mis-match. Inkorporering av primerene gir mutert plasmid med nicks. Umutert DNA kan fjernes ved å bruke et restriksjonsenzym som denaturerer metylert DNA. Omtrent alt DNA isolert fra dam+ *Escherichia coli* er dam metylert og vil derfor bli brutt ned av blant annet endonulkeasen *DpnI*. Til slutt settes nukleotidsekvensen inn i en passende vektor. Vektoren transformeres inn i en vertscelle som reparerer nicksene i de muterte plasmidene.²⁴

1.7.1 Design av primere

For å utføre punktmutasjonene benyttes det forward - og reverse primere med mellom 25 og 45 basepar som inneholder den ønskede mutasjonen i midten. Begge mutageneseprimerne må være komplementære til sekvensen ved den ønskede mutasjonen. Minst 40 % av basene bør være guanin (G) og cytosin (C) og primeren bør ende med minst en G eller C. Primerne må renses enten ved Fast Polynucleotide Liquid Chromatography (FPLC) eller ved Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) for å ikke få nedsatt mutasjonseffektivitet. 5'-fosforyllering av primerne er ikke nødvendig. Smeltetemperaturen bør være over eller lik 78 °C, se ligning 1 for beregning av smeltetemperatur.²⁴

$$T_m = 81,5 + 0,41 (\% GC) - \frac{675}{N} - (\% mismatch) \quad (1)$$

der,

T_m : smeltetemperatur (°C)

N: totalt antall nukleotider

Verdiene for % GC og % mismatch er i heltall

1.8 Mål med oppgaven.

Målet med denne oppgaven er å mutere aminosyrer i det bindesetet til HCHT som er ulike i forhold til AMCase. Disse aminosyrene i HCHT skal muteres til aminosyren i samme posisjon hos AMCase. Det skal også gjøres mutasjoner på aminosyrer i HCHT som kan tenkes å være assosiert med transglykosylering.

HCHT kan isoleres ved ionebytterkromatografi med buffere med pH på mellom 4,2 og 6,8. I denne oppgaven skal det undersøkes om AMCase kan isoleres på samme måte som for HCHT ved ionebytterkromatografi.

2 MATERIALER

2.1 Kjemikalier

Kjemikalie	Leverandør
10xLoadingbuffer	TaKaRa
10xNEB1-buffer, New England Biolabs buffer #1	New England Biolabs
100xBSA purified (10 mg/mL)	New England Biolabs
4-MU, 4-metyllumbelliferon ((1,0 µM)	Sigma-Aldrich
4-MU-(GlcNac) ₂ , 4-metyllumbelliferyl-N-acetyl-β-D-glukosaminid	Sigma-Aldrich
6xLoadingbuffer	New England Biolabs
Agar, Bacto™ Agar	Merck
Agarose, SeaKem® LE Agarose	Cambrex Bio Science
Ampicillin sodium salt	Sigma
Biotin, C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue (0,1 %)	Bio-Rad
D(+)-glukose, C ₆ H ₁₂ O ₆	Merck
Eddiksyre purex analytical grade (99,8 %), C ₂ H ₄ O ₂	SDS
EDTA, C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	Sigma
Etidiumbromid, H ₂₀ BrN ₃	Sigma-Aldrich
Geneticin Active GIBCO (50 mg/mL)	Invitrogen
Gjærekstrakt, Technical, Bacto™	BD
Glyserol (87 %), C ₃ H ₈ O ₃	Sigma-Aldrich
Glysin, C ₂ H ₅ NO ₃	Merck
Kaliumsulfat, K ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich
1 kb DNA Ladder	New England Biolabs
Bench Mark™ Protein Ladder	Invitrogen
Metanol (100 %), CH ₄ O	Sigma-Aldrich
MOPS SDS Running Buffer, 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid, NuPage (20x)	Invitrogen

Natriumacetat, $C_2H_3NaO_2$	Sigma-Aldrich
Natriumfosfat, HNa_2O_4P	Fluka
Natriumhydroksid, $HNaO$	Sigma-Aldrich
Natriumklorid, $NaCl$	Merck
Pepton, Bacto TM	BD
PMSF Protease inhibitor, Phenylmethanesulfonylfluoride (5mM)	Sigma
Trizma [®] base	Sigma
Sitronsyre, $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	VWR International
Trypton, Bacto TM	BD
YNB, Yeast Nitrogen Base med ammoniumsulfat uten aminosyrer	Invitrogen

2.2 Instrumenter

Instrument	Leverandør
Fluorometer, DyNA Quant200	Hoefler
Fluorometer, Qubit TM	Invitrogen
Gel-kamera, Chemi Doc XRS	Bio-Rad
Kromatografisystem, Biologic LP	Bio-Rad
NanoDrop, ND 1000	Thermo Scientific
PCR-maskin, Thermal Cycler DOPPIO	VWR
pH-meter, MP 200	Mettler-Toledo
Spektrofotometer, Bio Photometer	Eppendorf
Spenningskilde til DNA-gelelektroforese, Power Pack TM Basic	Bio-Rad
Spenningskilde til SDS-PAGE, PowerSource 250 V	VWR

2.3 Labororientert utstyr

Labororientert utstyr	Leverandør
Amicon [®] -rør Ultra Centrifugal Filters, 10000 MWCO	Millipore
Analysevekt, Extend ED2245	Sartorius
Assayrør, Qubit [™]	Invitrogen
Dialyseslanger, Snake Skin [®] Pleated Dialysis Tubing, 10 000 MWCO	Thermo Scientific
Ionebytterkolonne, HiTrap [™] CMFF	GE Healthcare
Kyvetter QS	
Millipore Vivaflow 200 PES, 10 000 MWCO	Millipore Amicon
OD-måler, CO8000 Cell Density Meter	WPA Biowave
Ristebad, OLS200	Grant
Risteinkubator, Multitron Standard	Infors HT
Sentrifuge, Avanti [™] J-25	Beckman Coulter [™]
Sentrifuge, Heraeus Pico 21	Thermo Scientific
Sentrifugerotor, JA-10	Beckman Coulter [™]
Sentrifugerør (500 mL)	Nalgene
Sterile strykepinner	Sarstedt
Sterilfiltreringsutstyr, GP Millepore Express [®] PLUS Membrane, 0,22 µL	Millipore
UVette kyvetter	Eppendorf
Vannbad, EcoTemp TW12	Julabo
Vortex, MS2 Minishaker	IKA

2.4 Programvarer

Programvare	Leverandør
CLC DNA Workbench, versjon 6	CLC bio
LP dataview	Bio Rad
ND-1000, versjon 3.3.0	Thermo Scientific
Quantity One, versjon 4.4.1	Bio-Rad

2.5 Kit

Kit	Innhold	Leverandør
E.N.Z.A. Plasmid Miniprep Kit I V-Spin Control	Solution I Solution II Solution III Buffer HB DNA Wash Buffer Elution Buffer RNase A HiBind [®] DNA Column I 2 ml Collection Tubes	Omega Biotek
Novex [®] NuPAGE [®] SDS-PAGE Gel System	NuPAGE [®] Novex [®] Bis-Tris Mini Gels NuPAGE [®] LDS Sample buffer (4x) NuPAGE [®] Sample Reducing Agent (10x) Systemet XCell <i>SureLock</i> [®] Mini-Cell	Life Technologies
<i>Pichia</i> EasyComp [™] - kit	Solution I Solution II Solution III	Invitrogen
QuikChange II XL Site- Directed Mutagenesis Kit	10x reaksjonsbuffer pWhitescrips 4,5 kb kontrollplasmid (5 ng/μL) oligonukleotid kontrollprimer #1 (100 ng/μL) - 5' CCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCCTCAC 3' oligonukleotid kontrollprimer #2 (100 ng/μL) - 5' GTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGCGTAATCATGG 3' dNTP-mix <i>PfuUltra</i> High Fidelity DNA polymerase (2,5 U/μL) <i>DpnI</i> restriksjonsenzym (10 U/μL) pUC18 kontrollplasmid (0,1 ng/μL i TE-buffer) XL1-Blue superkompetente celler	Agilent Technologies

Quant-iT™ Protein Assay Kit	Proteinbuffer Proteinreagent Standarder, 0, 200 og 400 ng/μL	Invitrogen
-----------------------------------	--	------------

2.6 Vektorer, gener og primere

Primer	Leverandør
HCHT-gen i pPIC9K vektor, kodonoptimalisert, se appendiks A for nukleotidsekvens og aminosyresekvens til HCHT og nukleotidsekvens for pPIC9K-vektoren	GenScript og Invitrogen, se avsnitt 3.1.1.
Primere for tillaging av seterrettede mutanter Y190N, Q145R, Q188I, S240Y, W218F og D138N, se tabell 1 for sekvensene	Invitrogen
Primere for sekvensering av HCHT <ul style="list-style-type: none"> - AOX fwd (5') - GACTGGTTCCAATTGACAAGC - AOX rev (3') - GCAAATGGCATTCTGACATCC - Fwd Seq HCHT - GCAAATGGCATTCTGACATCC - Rew Seq HCHT - CCAACCCACTGGTTGTCTCT 	Invitrogen

2.7 Enzymer

Enzym	Leverandør
CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)	New England Biolabs
<i>SacI</i> , restriksjonsenzym	New England Biolabs

2.8 Celler

Celler	Leverandør
<i>P. pastoris</i> fra stamme KM71, frysestock	Invitrogen
<i>P. pastoris</i> med innsatt kodonoptimalisert AMCcase-gen i pPIC9K-vektor, se appendiks A for nukleotidsekvens og aminosyresekvens til AMCcase	GenScript og Invitrogen, se avsnitt 3.1.1.

2.9 Medier

Medie	Innhold
BMGY (Buffered glycerol-complex medie)	10 g gjærekstrakt 20 g pepton 700 mL dH ₂ O Autoklaveres og kjøles til romtemperatur. 100 mL 1 M kaliumfosfatbuffer, pH 6,0 (K ₂ HPO ₄) 100 mL 10xYNB 2 mL 500xB 100 mL 10xGY
BMMY (Buffered methanol-complex medie)	10 g gjærekstrakt 20 g pepton 700 mL dH ₂ O Autoklaveres og kjøles til romtemperatur. 100 mL 1 M kaliumfosfatbuffer pH 6,0 (K ₂ HPO ₄) 100 mL 10xYNB 2 mL 500xB 100 mL 10xM
LB (Luria-Bertani)	10 g trypton 5 g gjærekstrakt 10 g natriumklorid 1 L dH ₂ O pH justeres til 7 med natriumhydroksid
MD-plater (Minimal Dextrose) med 50 mg/mL geneticin	800 mL dH ₂ O 15 g agar Autoklaveres og avkjøles til 60 °C . 100 mL 10xYNB 2 mL 500x biotin 100 mL 10x dektrose 5,00 mL 50 mg/mL geneticin
YPD (Yeast Peptone Dextrose)	10 g gjærekstrakt 20 g pepton Løses i 900 mL dH ₂ O og autoklaveres. 100 mL 10xD

2.10 Løsninger

Løsning	Innhold
1xSDS Running Buffer	100 mL MOPS SDS Running Buffer 1900 mL dH ₂ O
10xD (20 % dekstrose)	200 g D-glukose 1 L dH ₂ O Sterilfiltreres og oppbevares ved romtemperatur.
10xGY (10 % glyserol)	23 mL 87 % glyserol 177 mL dH ₂ O Autoklaveres og oppbevares ved romtemperatur.
10xM (5 % metanol)	5 mL 100 % metanol 95 mL dH ₂ O Sterilfiltreres og oppbevares ved 4 °C.
10xYNB (13 % Yeast Nitrogen Base)	134 g YNB 1 L dH ₂ O Sterilfiltreres og oppbevares ved 4 °C.
500xB (0,02 % biotin)	20 mg biotin 100 mL dH ₂ O Sterilfiltreres og oppbevares ved 4 °C.
Avfargingsløsning	50 mL 10 % metanol 50 mL 10 % eddiksyre 400 mL dH ₂ O
Citrat-fosfat-buffer pH 5,2	23,3 mL 0,1 M sitronsyre 26,7 mL 0,2 M natriumfosfat 50 mL dH ₂ O
Fargeløsning med Coomassie Brilliant Blue	0,25 g 0,1 % Coomassie Brilliant Blue 125 mL 50 % metanol 25 mL 100 % eddiksyre 100 mL dH ₂ O

MATERIALER

Glysin/NaOH pH 10,6 (0,3 M)	50 mL 0,3 M Glysin 45,5 mL 0,3 M NaOH 104,5 mL dH ₂ O
Kaliumfosfatbuffer (1 M K ₂ HPO ₄)	87,1 g K ₂ HPO ₄ 500 mL dH ₂ O Autoklaveres og oppbevares ved romtemperatur
TAE-buffer (Tris-Acetat-EDTA-buffer)	242 g Tris-base 57,1 mL eddiksyre (konsentrasjon) 100 mL EDTA, pH 8,0 Fortynnes til 1 L med dH ₂ O

3 METODER

3.1 Tillaging av plasmid

3.1.1 Oppkonsentrering og rensing av villtype Human Chitotriosidase-plasmid

For å lage de ulike mutantene trengs det først et villtypeplasmid. Plasmidet som ble brukt var HCHT-gen innsatt i *P. pastoris*-vektoren pPIC9K. HCHT-gen ble levert fra GenScript i en pUK57-vektor. HCHT-genet ble kuttet ut av pUK57-vektoren og ligert inn i pPIC9K-vektoren fra Invitrogen ved hjelp av restriksjonsenzymet EcoRI. pPIC9K-vektoren har stoppkodon for HCHT og restriksjonssteder for *SacI* og *SacII* til bruk ved linearisering. Vektoren er resistent mot kanamycin i bakterieceller og mot geneticin i *P. pastoris*-celler. HCHT-genet som ble brukt var kodonoptimalisert. Kodonoptimalisering blir gjort for å maksimere ekspressjonsnivået og for å tilpasse genet til vertscellen.²⁵

Rensingen av plasmidet ble utført ved bruk av E.N.Z.A. Plasmid Miniprep Kit I V-Spin Control. Det blir benyttet en HiBind[®] DNA kolonne som binder DNA og RNA ved gitte forhold, noe som gjør at proteiner, cellerester og andre forurensinger vaskes bort. DNA og RNA kan elueres ut med destillert vann eller saltbuffer.²⁶

Materialer

- *P. pastoris* vektoren pPIC9K med innsatt HCHT-gen
- LB-medie
- Ampicillin sodium salt
- E.N.Z.A. Plasmid Miniprep Kit I V-Spin Control
- Sentrifuge, Avanti[™] J-25

Prosedyre

- *P. pastoris*-vektoren pPIC9K med HCHT-gen innsatt ble pirket fra frysestock og overført til dyrkningsrør med ca. 4 mL LB-medie med 50 µL/mL ampicillin. Røret ble satt på risteinkubator ved 32 °C.
- 1,5 mL cellekultur ble overført til eppendorfrør.
- Cellene ble pelletert ved å sentrifugere ved 10 000 x g i ett minutt ved romtemperatur. Mediet ble helt av.

- Pelleten ble resuspendert i 250 μ L Solution I/Rnase A. Deretter ble det tilsatt 250 μ L Solution II. Løsningen ble blandet forsiktig ved å vende røret forsiktig flere ganger til det ble et klart lysat. Inkubasjon i noen minutter kunne være nødvendig, men inkubasjonen skulle ikke overstige fem minutter.
- Det ble tilsatt 350 μ L Solution III. Løsningen ble blandet umiddelbart ved å vende forsiktig på røret flere ganger til det ble dannet en hvit utfelling.
- Løsningen ble sentrifugert ved 13 000 x g i ti minutter.
- Miniprepkolonnen ble tilsatt 100 μ L ekvibrasjonsbuffer og plassert i et 2 mL oppsamlingsrør. Kolonnen ble sentrifugert ved 13 000 x g i ett minutt og flow-through ble helt av.
- Den klare supernatanten fra eppendorfrøret ble overført til kolonnen og deretter ble kolonnen sentrifugert ved 13 000 x g i ett minutt. Flow-through ble helt av.
- 500 μ L buffer HB ble tilsatt for å vaske kolonnen som deretter ble sentrifugert ved 13 000 x g i ett minutt. Flow-through ble helt av.
- Den tomme kolonnen ble sentrifugert ved 13 000 xg i to minutter for å tørke kolonnematriksen.
- Kolonnen ble tilsatt 30 μ L elueringsbuffer og satt i et rent 1,5 ml eppendorfrør. Disse ble sentrifugert ved 13 000 x g i ett minutt for å eluere DNA.
- Renset plasmid ble oppbevart ved ca. -20 °C.

3.2 *In vitro* seterettet mutagenese

In vitro seterettet mutagenese brukes for å utføre punktmutasjoner, delesjoner eller insersjoner i en DNA-sekvens. Her ble metoden brukt for å endre en aminosyre i HCHT for å se om egenskapene til enzymet forandret seg. Dette gir oss mulighet til å se sammenheng mellom enzymets struktur og funksjon. Mutasjonene som ble undersøkt i denne oppgaven var Y190N, Q145R, Q188I, S240Y, D138N og W218F.²⁴

3.2.1 Design av primere

Det ble brukt to primere per mutasjon, en forward og en reverse. Tabell 1 viser sekvensene til alle primerene. Kodon og nukleotider som forandres ved de ulike mutasjonene er også oppgitt i tabell 1.

Tabell 1: Oversikt over primerne som ble brukt for de ulike mutasjonene. For forwardprimerne er kodonene som ble endre understreket og basen(e) som ble forandret ved mutagenesen er uthevet. For de kodonene som ble endret er villtypekodon også oppgitt.

Mutasjon- navn	Primere	Villtype- kodon
Y190N	Forward: 5'CGGTCAA <u>ACT</u> <u>A</u> ACGTTGATGCAG3' Reverse: 5'CTGCATCAACGTTAGTTTGACCG3'	TAC
Q145R	Forward: 5'GAATATCCAGGTTCC <u>CG</u> AGGATCACCT3' Reverse: 5'AGGTGATCCTCGGGAACCTGGATATTC3'	CAA
Q188I	Forward: 5'GTTCCAGCCGGT <u>ATA</u> ACTTACGTTGATG3' Reverse: 5'CATCAACGTAAGTGATACCGGCTGGAAC3'	CAA
S240Y	Forward: 5'GTGCAGCTGCCT <u>ACT</u> TGAATGTTGATG3' Reverse: 5'CATCAACATTCAAGTAGGCAGCTGCAC3'	TCT
D138N	Forward: 5'GACGGTCTTGATTTG <u>AACT</u> GGGAATATCCAG3' Reverse: 5'CTGGATATTCCAGTTCAAATCAAGACCGTC3'	GAC
W218F	Forward: 5'CCATGGTAGTT <u>TC</u> GAGAAGGTCAC3' Reverse: 5'GTGACCTTCTCGAAACTACCATGG3'	TGG

3.2.2 PCR-syntese av mutant

Den seterrettede mutagenesen ble utført ved bruk av QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit fra Agilent Technologies. For å kunne selektere ut mutert DNA ble restriksjonsenzymet *DpnI* brukt. *DpnI* kutter i metylert og hemimetylert DNA. Kuttasetet for *DpnI* vises i appendiks B. Omtrent alt DNA isolert fra dam+ *E. coli* er dam metylert og vil derfor bli brutt ned av *DpnI*.²⁴

Materialer

- QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit fra Agilent Technologies:
- En forward- og en reverseprimere per mutasjon, se tabell 1
- PCR-maskin, Thermal Cycler

Prosedyre

- Det ble laget en kontrollreaksjon ved å tilsette følgende reagenser i PCR-rør:
 - 5 µL 10xreaction buffer
 - 10 ng pWhitescript 4,5 kb control plasmid (5 ng/ µL)
 - 130 ng oligonucleotide control primer # 1 (100 ng/µL)
 - 130 ng oligonucleotide control primer # 2 (100 ng/µL)
 - 1 µL dNTP mix
 - Tilsatte ddH₂O til totalt 50 µL
 - Til slutt ble det tilsatt 1 µL *PFU Ultra* HF DNA polymerase (2,5 U/ µL)
- Prøvereaksjonene for ønskede mutanter ble laget ved å tilsette følgende i PCR-rør:
 - 5 µL 10xreaction buffer
 - 10 ng dsDNA-templat, pPIC9K-plasimid med innsatt HCHT-gen (10 ng/ µL)
 - 130 ng forwardprimer med ønsket mutasjon, se tabell 1 (130 ng/µL)
 - 130 ng reverseprimer med ønsket mutasjon, se tabell 1 (100 ng/µL)
 - 1 µL dNTP mix
 - Tilsatte ddH₂O til totalt 50 µL
 - Til slutt ble det tilsatt 1 µL *PFU Ultra* HF DNA polymerase (2,5 U/ µL)
- Prøvene ble amplifisert ved PCR og programmet som ble benyttet er oppgitt i tabell 2.
- Etter amplifisering ble det tilsatt 1 µL *DpnI* til hvert rør. Rørene ble satt på vannbad ved 37 °C i en time.

Tabell 2: PCR-programmet som ble benyttet ved seterettet mutagenese av HCHT-gen i pPIK9K-vektor.

Trinn nummer	Antall sykluser	Temperatur (°C)	Tid (sekunder)
1	1	95	60
2	18	95	50
		60	50
		68	600 ^a
3	1	68	420

^a)60 sekunder per kb plasmidlengde

3.2.3 Transformasjon til *E. coli*

Ved transformasjon inn i XL1-Blue superkompetente celler ble pUC18-plasmid brukt som kontroll.

Materialer

- QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit fra Agilent Technologies
- LB-medie
- Ampicillin sodium salt

Prosedyre

- XL1-Blue superkompetente celler ble tint på is og 50 µL av celledøsningen ble overført til hver prøve. pUC18-vektor ble brukt som kontroll.
- Prøvene ble inkubert på is i 30 minutter.
- Det ble utført varmesjokk på cellene ved å sette de på vannbad ved 42°C i 45 sekunder og deretter rett på is i to minutter.
- 500 µL LB-medie ble tilsatt til hvert rør og inkubert på risteinkubator i en time ved ca. 37 °C og ca. 250 rpm.
- 250 µL av reaksjonene ble spredd ut på hver sin plate med LB-medie med 50 mg/mL ampicillin. Platene ble inkubert ved 37 °C i 16 timer.

3.2.4 Isolering av plasmid

Materialer

- LB-medie
- Ampicillin sodium salt
- E.N.Z.A. Plasmid Miniprep Kit I V-Spin Control
- Sentrifuge, Avanti™ J-25

Prosedyre

- For å kunne rense plasmidet ble kolonier fra platene med prøvereksjoner etter seterettet mutagenese valgt ut og pirket til reagensrør med 5 mL LB-medie med 50 µL/mL ampicillin.
- Rørene ble satt på risteinkubator ved 37 °C og 250 rpm over natt.
- Plasmidene ble deretter rensset ved hjelp av E.N.Z.A. Plasmid Miniprep Kit I V-Spin Control som forklart i avsnitt 3.1.1.

3.2.5 Test av transformanter

DNA-gelelektroforese

Etter isoleringen ble plasmidet undersøkt ved DNA-gelelektroforese. Dette ble gjort for å kontrollere at prøven inneholdt DNA på rett størrelse. Det ble også ved noen tilfeller laget gel før og/eller etter kutting med *DpnI*. *P. pastoris*-vektoren pPIC9K med HCHT-gen innsatt har en størrelse på ca. 10 000 kb. Hvis gelelektroforesen ikke ga et klart svar på om at rensingen av plasmid var vellykket, ble DNA konsentrasjon målt ved spektrometri eller NanoDrop.

Materialer

- Agarose
- TAE-buffer
- Etidiumbromid
- 10xLoadingbuffer
- 1 kb DNA Ladder
- Spenningskilde til SDS-PAGE, PowerSource 250 V
- Gel-kamera, Chemi Doc XRS med programvaren LP dataview

Prosedyre

- Det ble brukt 1 % agarosegel løst i 50 mL 1xTAE ved DNA-gelelektroforesen. 2 µL etidiumbromid ble tilsatt til 50 mL agarosegel.
- Prøveløsningene inneholdt 9 µL prøve og 1 µL 10x Loadingbuffer. For å spare på prøvematerialet ble det i visse tilfeller brukt 2 µL plasmidløsning fortynnet i destillert vann.
- I brønnene ble det tilsatt 5 µL ladder eller 10 µL prøveløsning som inneholdt 1 µL 10 x loadingbuffer.
- Gelelektroforesen ble utført ved 90 V i ca. en time.
- Gelen ble fotografert med TransUV som lyskilde.

Måling av DNA-konsentrasjon ved spektrofotometer og NanoDrop

Materialer

- Kyvetter, Eppendorf UVette
- Spektrofotometer, Bio Photometer

- NanoDrop med programvare ND-1000 v3.3.0
- Elueringsbuffer fra E.N.Z.A. Plasmid Miniprep Kit I V-Spin Control-kit

Prosedyrer

- Spektrofotometeret ble nullstilt med destillert vann.
- Prøvene ble fortynnet 1:100 i destillert vann før de ble målt.

- NanoDrop-apparatet ble nullstilt med elueringsbuffer E.N.Z.A. Plasmid Miniprep Kit I V-Spin Control og prøvestørrelsene var på 2 µL.

3.2.6 *Sekvensering av plasmid*

Plasmidene ble sekvensert av GATC Biotech.

Materialer

- Primere for sekvensering av HCHT-gen. Sekvensene er oppgitt i avsnitt 2.6.
- Elueringsbuffer fra E.N.Z.A. Plasmid Miniprep Kit I V-Spin Control-kit
- Programvaren CLC DNA Workbench

Prosedyre

- Hvert eppendorfrør inneholdt 5 μ L 80-100 ng/ μ L plasmidløsning fortynnet i elueringsbuffer og 5 μ L av en 5 pmol/ μ L primer fortynnet i destillert vann.
- For *P. pastoris*-vektoren pPIC9K med HCHT-gen innsatt ble det benyttet fire primere, altså fire rør som ble sendt inn for hvert plasmid.
- Programmet CLC DNA Workbench ble brukt for å lese sekvensene og sammenligne de muterte sekvensene med HCHT villtype.

3.3 Transformasjon inn i kompetente *Pichia pastoris*-celler

Dersom sekvenseringen viste at en mutasjon var vellykket ble plasmidet transformert inn i kompetente *P. pastoris*-celler. Dette ble gjort for å senere kunne dyrke utvalgte kolonier for å se om cellene produserte ønsket kitinase. Tillaging av kompetente celler og transformering ble utført ved hjelp av Pichia EasyCompTM-kit. Kittet inneholder tre løsninger kalt Solution I, II og III. Solution I er en sorbitolløsning som inneholder etylenglykol og DMSO (dimethyl sulfoxide) og er for tillaging av kompetente celler. Solution II er en polyetylenglykolløsning til transformasjonen og Solution III er en saltløsning til vasking og utplating av de transformerte cellene.²⁷

3.3.1 Tillaging av kompetente celler

Materialer

- *P. pastoris*-celler fra stamme KM71
- YPD-medie
- Sentrifuge, AvantiTM J-25
- Solution I fra Pichia EasyCompTM-kit

Prosedyre

- Det ble laget en forkultur av *P. pastoris*-celler fra stammen KM71 som ble dyrket i 10 mL YPD-medie ved 30 °C og 250 rpm over natt.
- 1 mL av forkulturen ble tilsatt i 9 mL nytt YPD-medie. Dette ble inkubert ved 28 °C og 230 rpm til OD lå mellom 0,6 - 1,0.
- Kulturen ble sentrifugert i fem minutter ved 1700 rpm og supernatanten ble helt av.
- Cellene ble klargjort ved å resuspendere pelleten i 10 mL Solution I fra Pichia EasyCompTM-kittet. Suspensjonen ble sentrifugert i fem minutter ved 1700 rpm før supernatanten ble helt av.
- Pelleten ble resuspendert i 1 mL Solution I.
- Det ble tatt ut aliquots på 50 µL som ble overført til 1,5 mL sterile cryorør.

3.3.2 *Linearisering av plasmid*

For å kunne transformere inn i de kompetente cellene måtte plasmidet lineariseres.

Lineariseringen ble gjort med restriksjonsenzymet *SacI* som kutter ved restriksjonssetet vist i appendiks B. Underveis i prosessen ble *SacI* oppbevart i kjøleblokk da det er et varmesensitivt enzym. *SacI* var den siste komponenten som ble tilsatt før blandingen ble satt i vannbad.

Enzymet Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP) katalyserer hydrolyse av 5'-fosfatgruppen på DNA-kjeden.²⁸

Materialer

- 10xBSA
- 10xNEB1-buffer
- *Sac I*, restriksjonsenzym
- CIAP

Prosedyre

- Følgende ble blandet sammen i et eppendorfrør:
 - 30 µL plasmid
 - 5 µL 10xBSA
 - 5 µL 10xNEB1-buffer
 - 3 µL *SacI* restriksjonsenzym ble tilsatt til slutt
- Reaksjonen ble satt på vannbad ved 37 °C i en time.
- 1 µL CIAP ble tilsatt og løsningen ble inkubert ved 37 °C i 30 minutter.
- Ytterligere 1 µL CIAP ble tilsatt og løsningen ble inkubert ved 56 °C i 15 minutter.
- Det ble tatt ut 2 µL lineært plasmid til DNA-gelelektroforese for å kontrollere om lineariseringen var vellykket. Se avsnitt 3.2.5 for prosedyre for DNA-gelelektroforese.

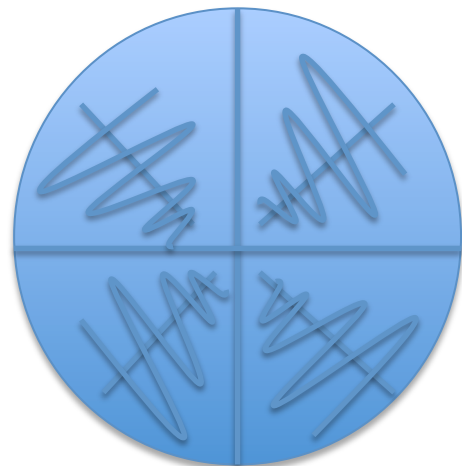
3.3.3 Transformasjonen inn i kompetente *Pichia pastoris*-celler

Materialer

- Solution II og III fra Pichia EasyComp™-kit
- Sentrifuge, Avanti™ J-25
- MD-plater med 50 mg/mL geneticin

Prosedyre

- Ett cryorør med 50 µL kompetente *P. Pastoris*-celler ble tint og tilsatt 3 µg linearisert plasmid, maksimalt 5 µL.
- 1 mL Solution II ble tilsatt og løsningen ble vortexet godt.
- Løsningen ble inkubert i en time i et vannbad ved 30 °C og vortexet hvert 15. minutt.
- Cellene ble påført et varmesjokk i et vannbad ved 42 °C i ti minutter.
- Etter varmesjokket ble cellene spunnet ned ved 3000 rpm i fem minutter og supernatanten ble helt av.
- Cellene ble resuspendert i 1 mL Solution III.
- Løsningen ble sentrifugert ved 3000 rpm i fem minutter og supernatanten ble helt av.
- Cellene ble resuspendert i 100 µL Solution III.
- Transformantene ble sådd ut på MD-plater med 0,25 mg/mL geneticin som ble inkubert ved 30 °C til det hadde vokst frem transformanter. Dette tok ca. tre døgn.
- Kolonier fra MD-platen ble renstrøket på en ny MD-plate med 0,25 mg/mL geneticin. Renstrykingen ble utført ved å stryke en koloni fra ”hjørnet” og inn mot midten på den nye platen med en steril strykepinne. Deretter ble ført en ny steril strykepinne i sikk-sakk over utstrykingen, som vist i figur 11.
- Etter at kolonier hadde vokst fram på den nye MD-platen ble kolonier på denne renstrøket ut på nytt på enda en ny MD-plate. Dette ble gjort for å sikre at arbeidet videre skjer med transformanter fra kun en ren koloni.



Figur 11: Illustrasjonen viser hvordan renstryking av *P. pastoris*-transformantene ble utført.

3.4 Overekspresjon av Human Chitotriosidase-mutanter i *Pichia pastoris*

3.4.1 Dyrking av *Pichia pastoris* med mutert Human Chitotriosidase

Dyrking av *P. pastoris* med innsatt pPIC9K-plasmid med muterte HCHT-gener ble utført for å se om de muterte enzymene ble uttrykt og om de hadde aktivitet. *P. pastoris* med pPIC9K-vektor er godt egnet for å dyrke frem kitinaser fordi enzymene skilles ut direkte ut i kulturen. Det ble ikke brukt antibiotika under forsøket, så det var derfor viktig å jobbe sterilt. Det ble brukt sterilt avtrekkskap, autoklavert utstyr og autoklaverte løsninger.²⁹

Materialer

- BMGY-medie
- Sentrifuge, Avanti™ J-25
- BMMY-medie
- Metanol (100 %)

Prosedyre

- Kolonier med transformanter fra de renstrøkte MD-platene ble dyrket i 1 L dyrkningskolber med 100 mL BMGY-medie. Det også ble forsøkt å dyrke i 2 L dyrkningskolber tilsatt 200 mL BMGY.
- Kulturene ble inkubert ved 30 °C og 200 rpm til OD lå mellom 2,0 - 6,0.
- Cellene ble spunnet ned ved 3000 rpm i fem minutter og supernatanten ble helt av.
- Cellene ble resuspendert i 40 mL BMMY-medie og overført til 250 mL dyrkningskolber.
- Kolbene stod ved 30 °C og 200 rpm over natt.
- Etter ett døgn ble det tilsatt 100 % metanol til en sluttkonsentrasjonen lik 0,5 % for å opprettholde ekspresjonen av HCHT. Det ble også tatt ut prøver på 500 µL til aktivitetstest og SDS-PAGE. Dette trinnet ble gjentatt hvert døgn, totalt fem ganger,. Prøvene ble oppbevart ved -80 °C.

3.4.2 Aktivitetstest

For å kontrollere at HCHT var tilstede og aktivt ble det utført aktivitetstester på prøver som ble tatt ut hvert døgn under overekspresjonen. Selve aktiviteten ble målt ved at supernatant fra cellekulturene ble tilsatt 4-metylbulliferyl-N-acetyl- β -D-glukosaminid (4-MU-(GlcNac)₂) som fikk reagere i ti minutter. Når glykosidaser degraderer sukker bundet til 4-metylbulliferyl (4-MU) blir 4-MU frigjort. 4-MU er fluoriserende, noe som betyr at det sender ut synlig lys når det blir utsatt for av UV-lys. Det ble utført fire paralleller for hver prøve.³⁰

Materialer

- Citrat-fosfat-buffer pH 5,2
- 100xBSA
- 4-MU-(GlcNac)₂
- Glysin/NaOH pH 10,6 (0,3 M)
- Fluorometer, DyNA Quant200
- 4-MU (1,0 μ M)

Prosedyre

- 4,95 mL Citrat-fosfat-buffer og 50 μ L 100xBSA ble blandet i et reagensrør.
- 8 μ L 1 mg/mL 4-MU-(GlcNac)₂ ble tilsatt i nye reagensrør sammen med 87 μ L av Citrat-fosfat-buffer/100xBSA-blandingen. Disse ble satt på vannbad med risting ved 37 °C.
- Det ble tilsatt 5 μ L prøvemateriale i hvert rør. Blindprøve ble tilsatt 5 μ L Citrat-fosfat-buffer/100xBSA-blanding. Etter nøyaktig ti minutter ble reaksjonen stoppet ved å tilsette 1,9 mL 0,3 M glysin/NaOH.

Aktiviteten ble målt ved bruk av DyNA Quant200 fluorometer:

- Fluorometeret ble nullstilt ved å tilsette 1,9 mL 0,3 M glysin/NaOH. Deretter ble instrumentet kalibrert til 500 ved å tilsette 100 μ L 1,0 μ M 4-MU. Dette punktet ble utført to ganger.
- Prøven ble tilsatt i kyvetten og aktiviteten ble lest av. Ved behov ble prøvene fortynnet 1:10 eller 1:100.

3.4.3 SDS-PAGE

Det ble utført SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) på prøvene som ble tatt ut hvert døgn ved overekspresjon av HCHT-mutanter. Dette var for å kontrollere at det var HCHT tilstede i løsningene. HCHT har en størrelse på 50 kDa. Kittet som ble brukt var Novex[®] NuPAGE[®] SDS-PAGE Gel System. Gelene som ble brukt var NuPAGE[®] Novex[®] Bis-Tris Mini Gels. Dette er ferdigstøpte polyakrylamidgeler som er designet for å separere proteiner med medium størrelse. NuPAGE[®] LDS Sample buffer denaturerer og reduserer disulfidbindinger i proteinene og NuPAGE[®] Sample Reducing Agent brukes for å holde proteinene ved redusert tilstand under elektroforesen.³¹

Materialer

- Novex[®] NuPAGE[®] SDS-PAGE Gel System
- 1:20 MOPS SDS Running Buffer
- Bench Mark[™] Protein Ladder
- Gelspenningskilde, PowerSource 250 V
- Fargeløsning med Coomassie Brilliant Blue
- Avfargingsløsning
- Gel-kamera, Chemi Doc XRS med programvaren LP dataview

Prosedyre

- Følgende ble tilsatt i eppendorfrør:
 - 10 µL prøve
 - 5 µL NuPAGE[®] LDS Sample buffer (4x)
 - 2 µL NuPAGE[®] Sample Reducing Agent (10x)
 - 3 µL destillert vann
- Prøvene ble denaturert i vannbad ved 70 °C i ti minutter.
- Systemet XCell *SureLock*[®] Mini-Cell ble satt opp med NuPAGE[®] Novex[®] Bis-Tris Mini Gels. Det ble tilsatt 1:20 MOPS SDS Running Buffer mellom gelene.
- 10 µL ladder eller 20 µL prøve ble applisert i brønnene.
- Gelelektroforesen ble utført ved 200 V, 0,25 A og 50 W i 50 minutter.
- Gelen ble deretter tatt ut og tilsatt fargeløsning med Coomassie Brilliant Blue og satt på risting i 30 minutter.

- Fargeløsningen ble helt av og det ble tilsatt avfargingsløsning. Gelen stod ved behov i ett til to døgn og avfargingsløsningen ble skiftet ut med jevne mellomrom fordi avfargingsløsningen blir mett.
- Gelen ble fotografert med EpiWhite som lyskilde på hvitt underlag.

3.5 Tillaging av frysestock

Dersom en koloni etter transformering i *P. pastoris* viste kitinaseaktivitet ved overekspresjonen ble det laget frysestock av den.

Materialer

- BMGY-medie
- Autoklavert glyserol (87%)

Prosedyre

- Koloni som det skulle lages frysestock av ble dyrket i en 250 mL dyrkningskolbe med 40 mL BMGY-medie og satt til inkubering ved 28 °C og 200 rpm til OD lå på mellom 0,2 og 0,6.
- 1050 µL kultur ble tilsatt sammen med 450 µL 87 % autoklavert glyserol til et cryorør. Frysestocker ble oppbevart ved -80 °C .

For å forenkle metoden ved stort antall kolonier ble også forsøkt å dyrke opp kulturene i 5 mL BMGY i dyrkningsrør.

3.6 Overekspresjon og isolering av AMCase villtype

3.6.1 Overekspresjon av AMCase villtype i *Pichia pastoris*

AMCase ble uttrykt ved *P. pastoris* på samme måte som tidligere beskrevet for HCHT. Som for HCHT var AMCase-genet satt inn i en pPIC9K-plasmidvektor som hadde blitt transformert inn i *P. pastoris*.

Materialer

- Koloni av *P. pastoris* med pPIC9K-vektor med innsatt AMCase-gen fra plate eller frysestock
- BMGY-medie
- Sentrifugerør (500 mL)
- Sentrifuge, Heraeus Pico 21
- Sentrifugerotor, JA-10
- BMMY-medie
- Metanol (100 %)
- Sterilfiltreringsutstyr, GP Millepore Express[®] PLUS Membrane, 0,22 µL
- PMSF Protease inhibitor (5mM)
- Millipore Vivaflow 200 PES, 10 000 MWCO
- Dialyseslanger, Snake Skin[™]
- Natriumacetat

Prosedyre

- Koloni av *P. pastoris*, med AMCase-villtypegen, fra plate eller frysestock ble dyrket i 100 mL BMGY-medie og inkubert på risteinkubator ved 23 ° C og 230 rpm til OD lå mellom 0,2 og 0,6 i 1 L dyrkningskolbe.
- 5 mL av denne kulturen ble tilsatt i 500 mL BMGY-medie og satt tilbake på risteinkubator til OD ble målt til mellom 2 og 6 i 2 L dyrkningskolbe.
- Kulturen ble overført til sentrifugerør og ble spunnet ned med JA10-rotor i 50 minutter ved 3000 rpm.
- Supernatant ble helt av og pelleten ble resuspendert i 100 mL BMMY. Kulturen ble satt tilbake på risteinkubator i 1 L kolbe.

- Hver 24. time ble det tilsatt 100 % metanol til metanolkonsentrasjonen var 0,5 %. Metanol ble tilsatt med ett døgn mellomrom for å opprettholde ekspresjonen av AMCase.
- 24 timer etter siste mating med metanol ble kulturene sentrifugert i NUNC-rør i 30 minutter ved 20 °C og 3500 rpm.
- Supernatanten ble sterilfiltrert gjennom 0,22 µL filter og tilsatt 200 µL proteasehemmer, 5 mM PMSF, per 100 mL løsning.
- Supernatanten ble oppkonsentrert til ca. 50 mL ved bruk av Millipore Vivaflow 200 PES med 10 000 MWCO. Membranen ble oppbevart i etanol i kjøleskap.
- Den oppkonsentrerte løsningen ble overført til Snake Skin™ dialyseslanger som ble lagt i 5 L 50 mM natriumacetat med pH 4,2 og satt på magnetrører ved 4 °C. Dialyseslangene lå i bufferen i tre døgn. Bufferen ble skiftet hvert døgn.
- Den dialyserte løsningen ble sentrifugert i to til tre minutter ved ca. 6000 rpm og supernatanten ble overført til nye rør.

3.6.2 Isolering av AMCase ved ionebytterkromatografi

P. pastoris-cellene skiller ut mange ulike stoffer i kulturen ved dyrking. Supernatanten av *P. pastoris*-kulturen inneholder dermed flere komponenter enn AMCase, som bør fjernes før videre arbeid med enzymet.

Materialer

- Kromatografisystem, Biologic LP
- Ionebytterkolonne, HiTrap™ CMFF
- Natriumacetat pH 4,2 (50 mM) Buffer A
- Natriumacetat pH 6,8 (50 mM) Buffer B
- Amicon®-rør Ultra Centrifugal Filters, 10000 MWCO

Prosedyre

- Buffer A ble satt på med flow på 2,5 mL/min og ble kjørt til baseline ble oppnådd. UV-detektoren ble nullstilt med buffer A.
- Mellom 10 og 30 µL prøve ble kjørt inn i systemet med flow på 1,00 mL/min sammen med buffer A til baseline ble oppnådd.

- *Med gradient:* Buffer B ble påsatt med gradient på 0 – 100 % på 120 minutter med flow på 2,5 mL/min. Oppsamlingsrør ble byttet ved hver 10 % og ved eventuelle topper.

Uten gradient: 100 % Buffer B ble påsatt etter at baseline med Buffer A var oppnådd.

- Buffer B ble kjørt i noen minutter og deretter ble systemet vasket med buffer A i fem til ti minutter og med 20 % etanol i fem minutter.
- Tilsutt ble proteinløsningen oppkonsentrert ønsket volum ved sentrifugering i Amiconrør.

3.6.3 Måling av proteinkonsentrasjon

Proteinkonsentrasjon ble målt ved Quant-iT™ Protein Assay Kit hvor det benyttes fargereagenser som gir fluorescens ved binding til proteiner. Quant-iT™ Protein Assay Kit har deteksjonsgrense på 0,25 til 5 µL.³²

Materialer

- Quant-iT™ Protein Assay Kit
- Qubit™ assayrør
- Qubit™ Fluorometer

Prosedyre

- Det ble laget en arbeidsløsning bestående av 1x n µL proteinreagent og 199 x n µL. n er antall prøver og standarder som skal måles.
- 10 µL av de tre standardene med BSA-konsentrasjoner på 0, 200 og 400 ng/µL ble blandet med 190 µL arbeidsløsning og overført til hvert sitt Qubit™ assayrør.
- 1 µL prøvemateriale ble tilsatt til 199 µL arbeidsløsning i et assayrør.
- Alle rørene ble vortexet før de ble inkubert ved romtemperatur i 15 minutter.
- Prøvene ble målt på Qubit™ fluorometeret, med innstillingen Quant-iT Protein. Standardene målt før prøvene.

3.6.4 Aktivitetstest

For å kontrollere at AMCase var tilstede under overekspresjon og etter isolering ble utført aktivitetstester jevnlig ved å ta ut prøver underveis, se avsnitt 3.4.2 for prosedyre. Det ble gjort to paralleller for hver prøve.

3.6.5 Test av transformanter

SDS-PAGE

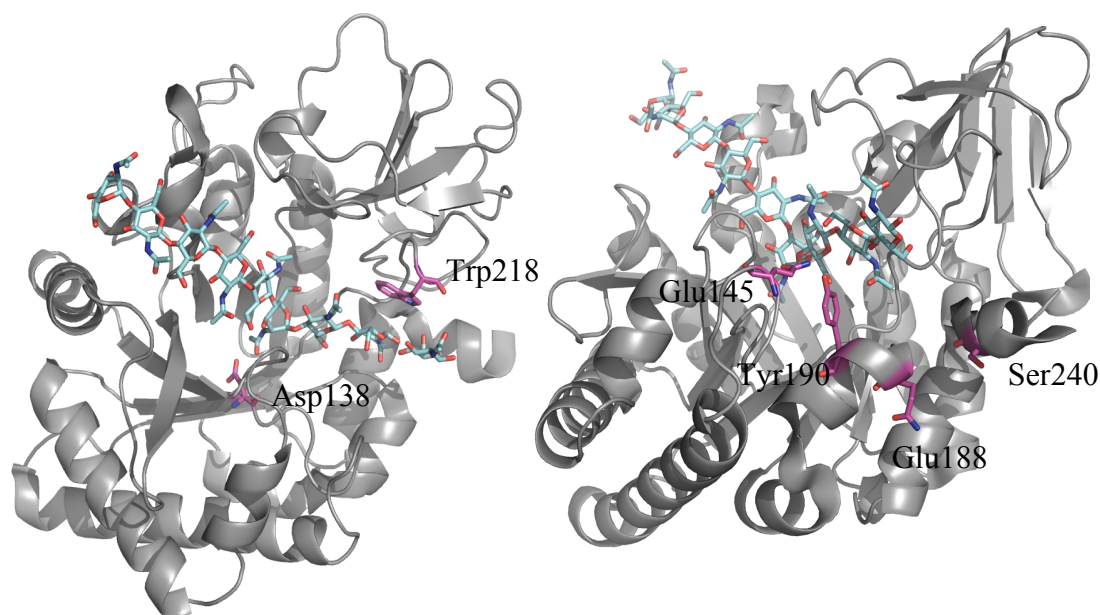
Det ble utført SDS-PAGE for å kontrollere at det var AMCase tilstede i prøvene, avsnitt 3.4.3 for prosedyre. AMCase har en størrelse på 50 kDa.

4 RESULTATER

4.1 Mutasjonsanalyse

I denne oppgaven ble det utført det seterettet mutagenese på HCHT ved seks ulike residuer, D138N, W218F, Q145R, Y190N, Q188I og S240Y. Plasseringen til disse aminosyrene i HCHT vises i figur 12.

Q145R, Y190N, Q188I og S240Y er mutasjoner som gjør om aminosyrene i HCHT til de aminosyrene som sitter ved tilsvarende posisjon i AMCase. Disse aminosyrene befinner seg i subsetene +2 og +3. Ved disse subsetene er det aktive setet til HCHT trangere enn for AMCase. Studier av ChiA, ChiB og ChiC har vist at et trangere bindesete kan være gunstig for endoaktivitet ved nedbrytning av kitin. Som nevnt ved avsnitt 1.3.2 er Arg¹⁴⁵ med på å gjøre AMCase mer tolerant for syrer.



Figur 12: Illustrerer HCHT sett fra to ulike perspektiver og viser struktur og plassering til aminosyrene som ble skulle muteres i denne oppgaven. (A) Viser plassering for mutasjonene D138N og W218F som antas å påvirke transglykosyleringen. (B) Viser plassering for mutasjonene Q145R, Y190N, Q188I og S240Y hvor aminosyrene endres til de ved samme posisjon i AMCase.

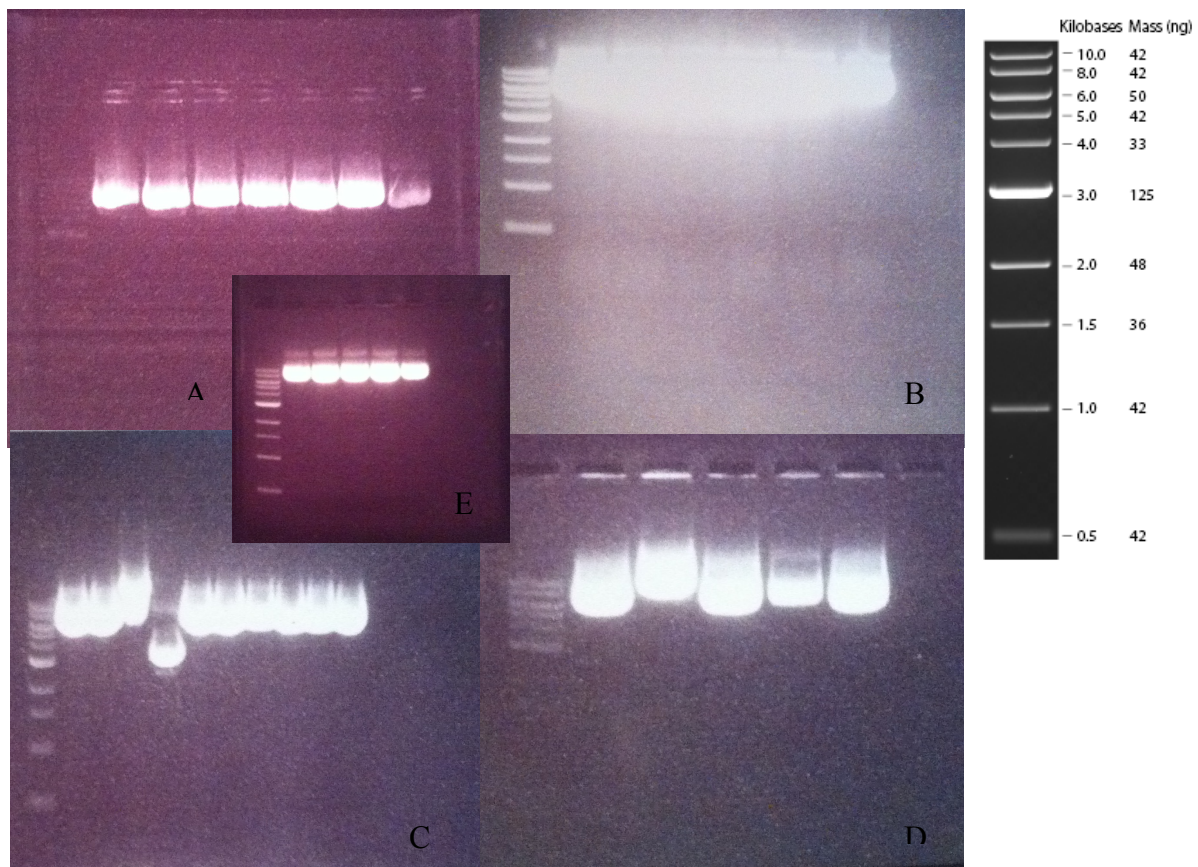
W²¹⁸ og D¹³⁸ ligger henholdsvis ved subsete +2 og i TIM-barrel ved subsete -1 hos HCHT. Mutagenese utføres på disse to aminosyrene hovedsakelig for å undersøke om det påvirker transglykosyleringen. Sterk binding har vist seg å være en fordel for transglykosylering hos familie 18 kitinaser. Trp (W) har vist å gi høy transglykosylering i forhold til Phe (F), se avsnitt 1.6.2. Mutanten W218F forventes derfor å gi lavere transglykosylering enn villtypen. Mutanten D138N vil også forventes derimot å gi høyere transglykosyleringsaktivitet enn villtypen fordi vann kan hindres å komme inn til oksazolinintermediatet, se avsnitt 1.5.1.

4.2 Seterettet mutagenese av Human Chitotriosidase og isolering av plasmid

Mutasjonene som ble utført ved seterettet mutagenese er beskrevet i avsnitt 4.1. Mutagenesen ble utført på et HCHT-villtypegen satt inn i pPIC9K-plasmidvektor.

4.2.1 Isolering av plasmid

Etter seterettet mutagenese ble isolert plasmid undersøkt ved DNA-gelelektroforese for å kontrollere at løsningene inneholdt DNA på riktig størrelse, se figur 13. Dette ble gjort ved å sammenligne vandringslengden på prøven med kjent ladder. pPIC9K-plasmidvektor med innsatt HCHT-gen har en størrelse på 10 000 kb.



Figur 13: Innholdet i de ulike brønnene fra venstre til høyre: (A) Ladder og rensset plasmid med Y190N koloni 1-6. (B) Ladder og rensset plasmid med Q145R 1, 3, 4, 2, 5 og 6. (C) Ladder og rensset plasmid med D138N koloni 1-4 og W218F koloni 1-6. (D) Ladder og rensset plasmid med S240Y koloni 1-2 og 4-6. (E) Ladder og plasmid med Q188I koloni 1-3 og 5-6. Ladder som ble brukt var 1 kb DNA Ladder og DNA-størrelsene vises i oversikten til høyre.

4.2.2 Sekvensering av plasmid

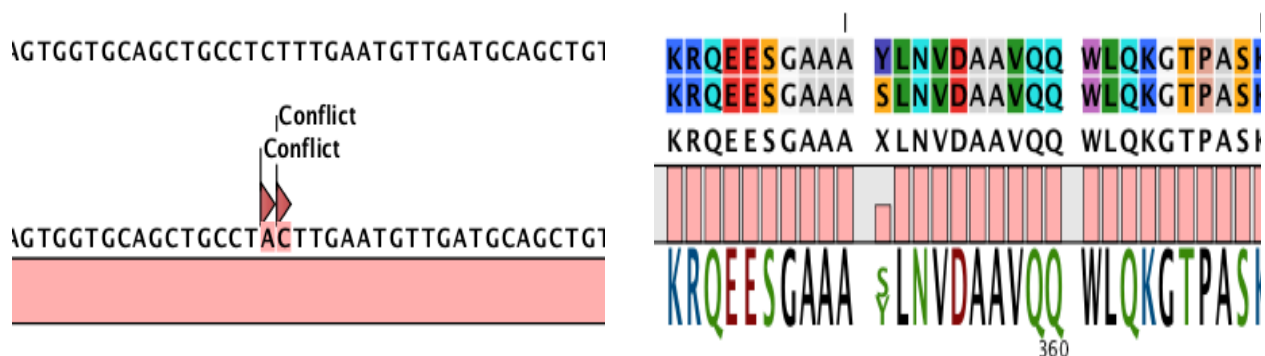
Plasmidkonsentrasjonene ble målt ved bruk av NanoDrop før hver prøve ble sendt til sekvensering. DNA-konsentrasjonene lå gjennomsnittlig på 398 ng/ μ L med standardavvik på 61 ng/ μ L. Se appendiks C for alle konsentrasjonene som ble målt før sekvensering.

Tabell 3 viser hvor mange kolonier av hver mutasjon som ble plukket ut, hvilke kolonier som ble sekvensert og hvilke av disse som gav positivt resultat ved sekvenseringen.

Tabell 3: Hvilke kolonier av hver mutasjon som det ble utført rensing av plasmid fra, hvilke kolonier som ble sendt inn til sekvensering og hvilke som gav positivt resultat ved sekvenseringen.

Mutasjon	Kolonier	Kolonier sendt til sekvensering	Kolonier med vellykket mutasjon
Y190N	1, 2, 3, 4, 5 og 6	3	3
Q188I	1, 2, 3, 5 og 6	1, 2 og 3	2 og 3
Q145R	1, 2, 3, 4, 5 og 6	1, 2, 3 og 6	1 og 2
D138N	1, 2, 3 og 4	2	2
W218F	1, 2, 3, 4, 5 og 6	3	3
S240Y	1, 2, 4, 5 og 6	4	4

D138N koloni 3 og 4 og S240Y koloni 2 og 5 ble ikke sekvensert på bakgrunn av DNA-gelelektroforesen, se figur 13. Bortsett fra denne vurderingen ble valget av hvilke kolonier som ble sekvensert gjort tilfeldig. Programmet som ble brukt til å lese av og analysere DNA-sekvensene var CLC DNA Workbench. Figur 14 viser utsnitt fra programmet for å vise fremstilling av vellykket mutasjon i henholdsvis DNA- og aminosyresekvens.



Figur 15: Viser utsnitt fra programmet CLC DNA Workbench. Disse bildene viser vellykket mutasjon S240Y hvor cytosin (C) og tymin (T) i HCHT kodonoptimalisert DNA er endret til henholdsvis adenin (A) og C i mutanten. (Venstre) Den nederste DNA-sekvensen er konsensussekvens av de fire sekvenseringene fra primerne som ble brukt for sekvensering av mutant, se avsnitt 2.6. Den øverste DNA-sekvensen viser utsnitt av kodonoptimalisert HCHT-villtypegen. (Høyre) Den øverste linjen er konsensussekvens oversatt til aminosyresekvens. Den nederste linjen viser konsensus mellom mutantprotein og villtypeprotein.

4.3 Transformasjon inn i kompetente *Pichia pastoris*-celler

Ved vellykket mutasjon av HCHT-gen i pPIC9K-vektor ble mutantplasmid transformert inn i *P. pastoris*. For å kunne transformere inn plasmidet måtte det først lineariseres. Dette ble utført med restriksjonsenzymet *SacI*. Transformanten ble sådd ut på MB-plater med 50 µg/mL geneticin. Etter første utplating ble det gjort to renstrykinger som vist for mutant Q145R i figur 15. Det ble gjennomført vellykket transformasjonen for alle mutantene, bortsett fra Q188I som ikke viste vekst på første utplating. Transformasjon for Q188I ble ikke gjentatt på grunn av tidsmangel.



Figur 15: Bildet viser renstryking av koloni 5-8 for *P. pastoris*-transformant med HCHT-mutasjon Q145R.

4.4 Overekspresjon av Human Chitotriosidase-mutanter i *Pichia pastoris*

4.4.1 Dyrking av *Pichia pastoris* med mutert Human Chitotriosidase

P. pastoris med innsatt pPIC9K-vektor med HCHT-mutantgen ble dyrket for å se om de muterte enzymene ble uttrykt og om de hadde kitinaseaktivitet. Koloniene ble hentet fra MD-platene med renstryking nummer to. Det tok i underkant av 24 timer før OD lå på mellom 2,0 og 6,0. Tabell 4 viser inkubasjonstid og OD som ble målt for alle koloniene rett før dyrking i BMMY. Kulturene med Q145R og S240Y hadde OD på mellom 6,6 og 8,7 før nedspinning av cellene selv om OD optimalt skulle ligge mellom 2,0 og 6,0. Det var ingen tydelig forskjell ved OD i kulturene som ble dyrket i 1 L dyrkningskolber og 2 L dyrkningskolber.

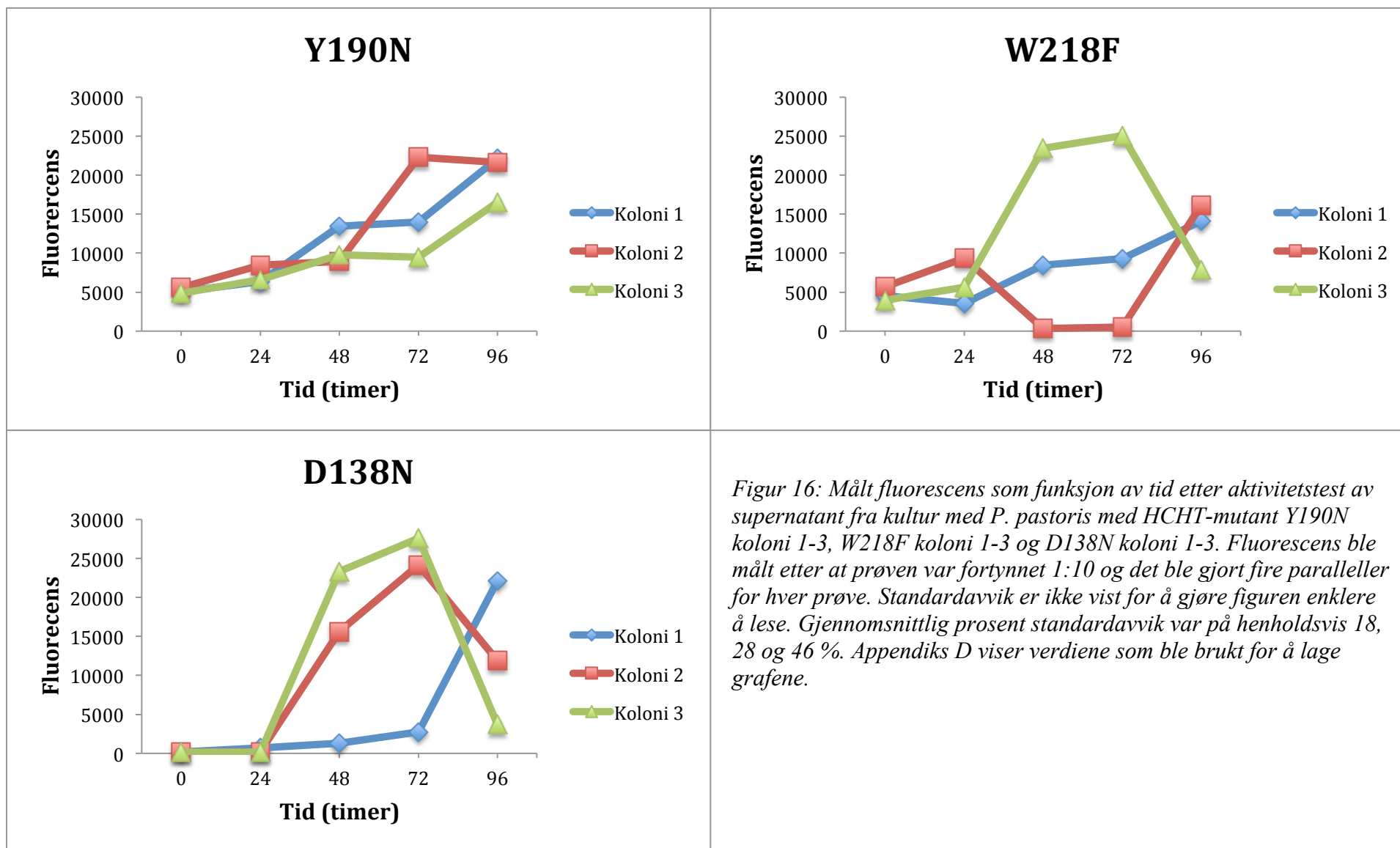
4.4.2 Aktivitetstester ved overekspresjon av Human Chitotriosidase-mutanter

Etter dyrkingen ble det utført overekspresjon av HCHT-mutanter ved å dyrke cellene videre i BMMY. For å opprettholde ekspresjonen ble det tilsatt metanol til sluttkonsentrasjon på 0,5 % metanol en gang i døgnet. Ved tilsetning av metanol ble det i tillegg tatt ut prøver som det ble utført aktivitetstest på for å se om kulturen inneholdt aktiv kitinase. Aktivitetstesten ble utført ved at supernatant fra kulturene fikk reagere med 4-MU-(GlcNac)₂ i ti minutter. Når 4-MU-(GlcNac)₂ blir hydrolysert frigis 4-MU som er fluoriserende.

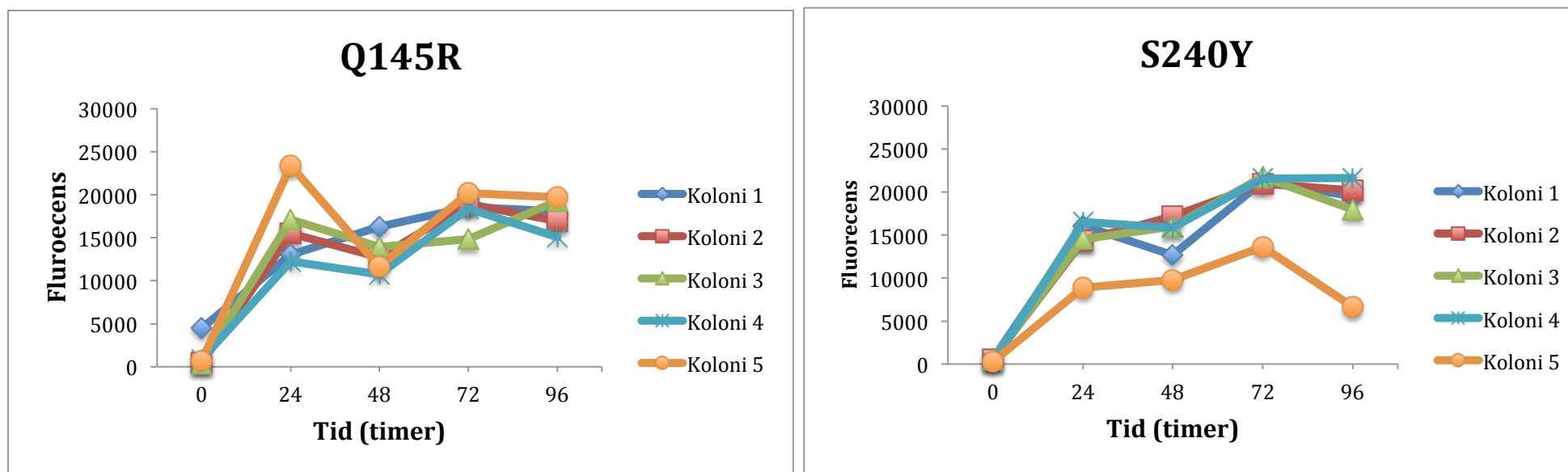
Figur 16 og 17 viser målt fluorescens som funksjon av tiden for henholdsvis Y190N koloni 1-3, D138N koloni 1-3, W218F koloni 1-3 og for Q145R koloni 1-5 og S240Y koloni 1-5. Det ble gjort fire paralleller for hver koloni til hvert tidspunkt. Prøvene ble fortynnet 1:10 før fluorescens ble målt. Se appendiks D for alle verdiene som ble brukt for fremstilling av grafene.

Tabell 4: OD målt etter dyrking av *P. pastoris* med innsatt pPIC9K-vektor med HCHT-mutantgen i BMGY-medie pirket fra MD-plater med 50 mg/mL geneticin. 1 L dyrkningskolber ble tilsatt 100 mL BMGY og 2 L flasker ble tilsatt 200 mL BMGY. Y190N, D138N og W218F stod til inkubering i ca. to timer etter fortykning. Q145R og S240Y ble spunnet ned direkte etter fortykning.

Mutasjon- navn	Koloni nr.	Type dyrkningskolbe (L)	Fortynning før måling av OD	Total inkubasjonstid (timer)	OD
Y190N	1	2	1:20	45	1,27
	2	2	1:20	45	1,63
	3	1	1:10	45	1,69
D138N	1	2	1:20	45	1,34
	2	2	1:20	45	1,49
	3	1	1:10	45	1,64
W218F	1	2	1:20	45	1,56
	2	2	1:20	45	1,56
	3	1	1:10	45	1,57
Q145R	1	1	-	24	1,43
	2	1	1:2	24	8,1
	3	1	1:2	24	8,0
	4	1	1:2	24	8,0
	5	1	1:2	24	8,7
S240Y	1	1	1:2	24	-
	2	1	1:2	24	6,6
	3	1	1:2	24	6,6
	4	1	1:2	24	7,6
	5	1	1:2	24	7,3



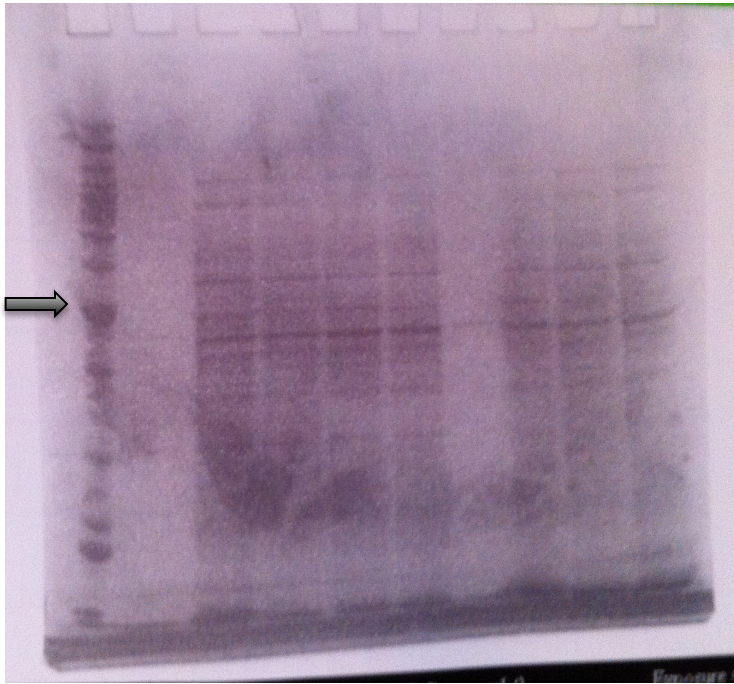
Figur 16: Målt fluorescens som funksjon av tid etter aktivitetstest av supernatant fra kultur med *P. pastoris* med HCHT-mutant Y190N koloni 1-3, W218F koloni 1-3 og D138N koloni 1-3. Fluorescens ble målt etter at prøven var fortynnet 1:10 og det ble gjort fire paralleller for hver prøve. Standardavvik er ikke vist for å gjøre figuren enklere å lese. Gjennomsnittlig prosent standardavvik var på henholdsvis 18, 28 og 46 %. Appendiks D viser verdiene som ble brukt for å lage grafene.



Figur 17: Målt fluorescens som funksjon av tid etter aktivitetstest av supernatant fra kultur med *P. pastoris* med HCHT-mutant Q145R koloni 1-5 og S240Y koloni 1-5. Fluorescens ble målt etter at prøven var fortynnet 1:10 og det ble gjort fire paralleller for hver prøve. Standardavvik er ikke vist for å gjøre figuren enklere å lese. Gjennomsnittlig prosent standardavvik var på henholdsvis 43 og 25 %. Se appendiks D for verdiene som ble brukt for å lage grafene.

3.4.3 SDS-PAGE

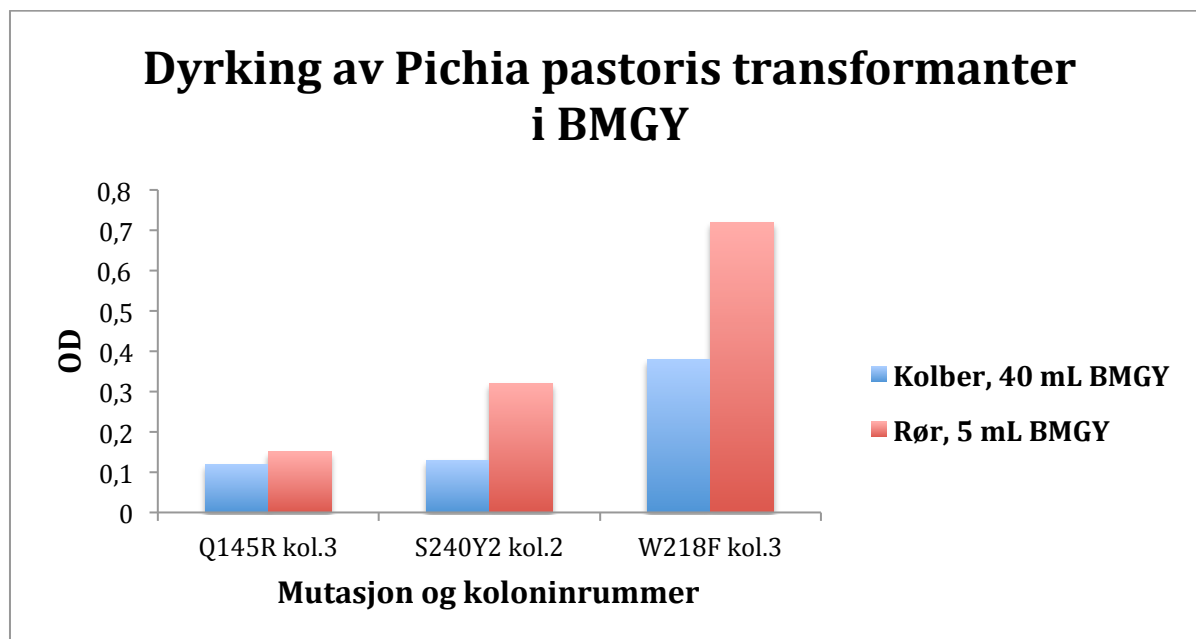
Det ble også utført SDS-PAGE på alle prøvene for å kontrollere at protein på størrelse med HCHT, 50 kDa, var tilstede. Det var ofte mulig å se svakt bånd ved 50 kDa. Gel som ble laget av Q145R koloni 1-5 og S240Y koloni 1-4 som ble tatt ut etter 24 timer viste de tydeligste båndene. Figur 18 viser bilde av denne gelen.



Figur 18: Bilde av SDS-PAGE-gel hvor bønnene inneholder (fra venstre) ladder, Q145R koloni 1-5 og S240Y koloni 1-4. Pilen viser båndet på laddereren som representerer 50 kDa.

4.5 Tillaging av frysestock

Dyrkingen av kolonier til frysestock skulle skje i 250 mL dyrkningskolbe med 40 mL BMGY. For å forenkle metoden betraktelig ved stort antall kolonier ble det også forsøkt å dyrke kulturene i 5 mL BMGY i dyrkningsrør. For å sammenligne de to metodene ble det dyrket kulturer for tre mutasjoner for hver metode samtidig. De tre koloniene som ble valgt ut var W218F koloni 3, Q145R koloni 3 og S240Y koloni 2. Figur 19 viser målt OD etter 24 timer for alle kulturene.



Figur 19: Målt OD etter inkubasjon ved 30 °C og 20 rpm i 24 timer for *P. pastoris* med mutasjon Q145R, S240Y og W218F dyrket i 40 mL BMGY i dyrkningskolber eller 5 mL BMGY i dyrkningsrør.

Dyrking i både rør og kolber ga ønsket OD på mellom 0,2 og 0,6 i løpet av ca. 24 timer. Fordi dyrking i rør er en enklere metode ble denne metoden brukt for å lage frysestock av kolonier til følgende mutanter:

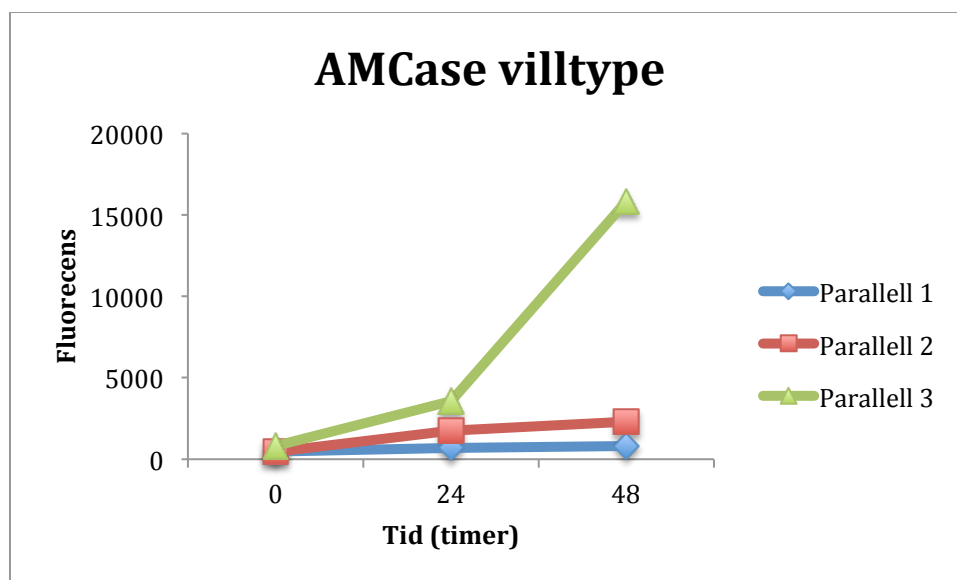
- Q145R: Koloni 1-5
- S240Y: Koloni 1-5
- Y190N: Koloni 1-3
- W218F: Koloni 1-3
- D138N: Koloni 1-3

For inkuberingsstid og målt OD for hver koloni før tillaging av frysestock, se appendiks E.

4.6 Overekspresjon og isolering av AMCCase

4.6.1 Overekspresjon av Acidic Mammalian Chitinase-villtype i *Pichia pastoris*

Det ble dyrket opp AMCCase-villtype i *P. pastoris* på samme måte som for HCHT-mutantene. Ved inkubering ble det tilsatt metanol hvert døgn for å sette i gang ekspresjonen. Det ble også tatt ut prøver av cellekulturen hvert døgn for å undersøke aktiviteten til kitinasen. Ved disse aktivitetstestene ble det utført to paralleller for hver prøve. Figur 20 viser fluorescens som ble målt ved aktivitetstest for tre ulike paralleller av AMCCase-villtypekoloni fra frysestock 4 over 48 timer. Merk at fluorescensen her ble målt av ufortynnede prøver, mens for HCHT var prøvene fortynnet 1:10. Verdiene som ble brukt for å lage grafene er oppgitt i appendiks F.



Figur 20: Målt fluorescens som funksjon av tid etter aktivitetstest av supernatant av kultur med *P. pastoris* med AMCCase-villtypekoloni fra frysestock 4. Prøvene ble målt ufortynnet. Se appendiks F for verdiene som ble brukt for å lage grafene.

4.6.2 Isolering av AMCase ved ionebytterkromatografi

Etter overekspresjonen ble det forsøkt å isolere AMCase-villtype ved ionebytterkromatografi. Kolonnen som ble brukt var HiTrapTM CMFF fra GE Healthcare. Buffer A og B var 5mM natriumacetat med pH på henholdsvis 4,2 og 6,8. Det ble forsøkt å rense AMCase både med og uten gradient.

Betingelsene, som i utgangspunktet er for isolering av HCHT, viste seg å være dårlig egnet for isolering av AMCase. Rensing med gradient resulterte i ingen eller kun en liten topp på kromatogrammet. AMCase kunne ved noen tilfeller observeres på SDS-PAGE-gel og aktivitetstest av fraksjoner ved disse små toppene etter store oppkonsentreringer. Ved å gjøre prosedyren ved samme betingelser, men uten gradient, viste det seg en stor topp etter buffer B ble påsatt kolonnen. Eluat fra denne toppen viste lav kitinaseaktivitet. Etter oppkonsentrering og undersøkelse med SDS-PAGE viste at innholdet ikke var rent.

Både med og uten gradient ble det observert relativt høy kitinaseaktivitet fra uttak av wastetopp, altså før baseline ble oppnådd med Buffer A.

5 DISKUSJON

Det er interessant å studere mekanismer og funksjoner til HCHT fordi enzymet er en del av vårt medfødte immunsystem og fordi enzymet er blitt knyttet til flere sykdommer. Inhibering av AMCase har blitt forslått som behandlingsmetode for astma. HCHT er vist å blant annet motvirke soppinfeksjoner og kan være kilde til dannelsen av kitooligosakkarider ved transglykosylering. Kitooligosakkaridene kan fungere som signalmolekyler. Dersom det er ønskelig å kun fjerne effekten av den ene kitinasen er det viktig å studere ulikheter mellom bindesetene til AMCase og HCHT slik at det skal bli mulig å finne selektive inhibitorer.¹³

5.1 *In vitro* seterettet mutagenese

I denne oppgaven ble det brukt *in vitro* seterettet mutagenese for å utføre punktmutasjoner på HCHT i det aktive setet. Det hadde på forhånd blitt designet primere for å lage mutasjonene Y190N, Q145R, Q188I, S240Y, D138M og W218F. Amplifisering med PCR gav godt brukbare plasmidkonsentrasjoner på gjennomsnittlig 398 ng/μL med standardavvik på 61 ng/μL. DNA-gelelektroforese av løsningsene viste nesten utelukkende bånd ved 10 000 kb, som er størrelsen til pPIC9K-plasmidet med innsatt HCHT-gen. DNA-gelene viser også at prøven ikke inneholder annet DNA, altså har rensingen av plasmidene vært vellykket. Selv om DNA-molekylene var på riktig størrelse var det ikke gitt av de ønskede mutasjonene var blitt gjennomført. For å kontrollere at primerene hadde festet seg på riktig sted på HCHT-genet og at de riktige basene hadde blitt byttet ut ble genene sekvensert. Etter sekvenseringen ble det funnet vellykket fremstilling av alle seks mutantene i kolonier som ble benyttet videre. Sekvenseringen viste også at ikke alle koloniene inneholdt riktige mutasjoner. Dette kan skyldes at plasmidene som ble brukt festet seg dårligere på grunn av dannelsen av hårnålstruktur eller lignende. Sannsynligvis er utfallet av hvilke kolonier som hadde vellykkede mutasjoner tilfeldig.

5.2 Transformasjon inn i *Pichia pastoris*-celler

For å kunne dyrke opp celler som produserte HCHT-mutantene, ble plasmid med mutant-gen transformert inn i *P. pastoris*. Utplating av transformantene på MD-plater med 50 μg/mL geneticin var vellykket for alle mutantene, bortsett fra for Q188I. Dette utfallet er sannsynligvis en tilfeldighet og det ble ikke gjort nytt forsøk på transformasjon av Q188I på grunn av tidsmangel.

5.3 Overekspresjon av HCHT-mutanter i *Pichia pastoris*

HCHT skilles direkte ut i kulturen ved overekspresjon i *P. pastoris*. Kitinaseaktiviteten i kulturene for de ulike mutantene ble målt hver 24. time fram til 96 timer. Alle vekstkurvene er vist i figur 16 og 17 og viser noenlunde jevnt økende fluorescens, altså jevnt økende aktivitet. Noen av kurvene flater også ut eller synker mot slutten. Det var stor usikkerhet ved metoden og standardavvikene lå på mellom ca. 20 og 50 % for hver prøve. Fremstillingen gir likevel et inntrykk av hvordan kitinase aktiviteten hos mutantene forandre seg med tiden.

Ved dyrking i BMGY-medium, før nedspinning og tilsetning av metanol, hadde noen av koloniene for høy OD. For disse lå OD mellom 6,6 og 8,7 selv om de optimalt skulle være mellom 2,0 og 6,0, se tabell 4. I disse kulturene var sannsynligvis cellene sent i logfasen, noe som ikke er optimalt for dyrkingen av enzymene. I løpet av de første 96 timene kunne det ikke observeres noen tydelige forskjell på aktiviteten i disse kulturene og aktiviteten til de som hadde OD på riktig nivå. Det var heller ingen tydelig forskjell i OD for dyrking i 1 L- og 2 L-dyrkningskolber.

5.3.1 SDS-PAGE

Det ble også utført SDS-PAGE på alle prøvene som ble tatt ut til aktivitetstest. De fleste gelene viste protein ved 50 kDa, som er størrelsen på HCHT. Båndene var som oftest for svake for å synes på utskrift. Man kan imidlertid se at prøvene inneholder en del andre proteiner og at rensing av kulturen er nødvendig.

5.4 Tillaging av frysestocker

Det ble laget frysestocker av HCHT-mutantkoloniene fra *P. pastoris*-transformanter dersom det ble påvist kitinaseaktivitet ved overekspresjonen. Dette ble gjort ved å dyrke koloniene i BMGY-medie til OD var mellom 0,2 og 0,6 og deretter tilsette glyserol. Det ble forsøkt å dyrke i 250 mL dyrkningskolber med 40 mL BMGY-medie og i dyrkningsrør med 5 mL BMGY-medie.

For de tre koloniene W218F koloni 3, Q145R koloni 3 og S240Y koloni 2 ble det forsøkt å dyrke i dyrkningskolber og i dyrkningsrør parallelt for å kunne sammenligne veksthastighet mellom de to metodene. Etter 24 timer viste alle koloniene i rør høyere OD enn samme koloni i kolber. Alle kulturene, både i dyrkningskolber og rør, hadde OD mellom 0,2 og 0,6 etter ca. 24 timer. Disse resultatene viser at ved tillaging av frysestocker er både dyrkningskolber og dyrkningsrør godt egnet for inkubering av *P. pastoris* i BMGY-mediene. Resultatene kan også tyde på at *P. pastoris* vokser litt hurtigere i dyrkningsrør enn i dyrkningskolber.

5.5 Overekspresjon og isolering av AMCase

5.5.1 Overekspresjon av AMCase villtype i *Pichia pastoris*

Aktiviteten til ulike kolonier av AMCase villtype ble undersøkt ved å dyrke opp *P. pastoris* som inneholdt villtypegenet. Det ble tatt ut prøver fra kulturene hvert døgn ved overekspresjon som ble testet for kitinaseaktivitet. Figur 20 viser tre prøver fra samme koloni. To av prøvene hadde veldig lav aktivitet. En prøve hadde aktivitet som økte mot ca. 16 000 fluorescensenheter i løpet av 48 timer. De aller fleste koloniene, også de som ikke ble fremstilt i denne oppgaven, viste økt kitinaseaktivitet med tid. AMCase-villtype viste generelt mindre aktivitet enn HCHT-mutantene, derfor ble ikke AMCase-prøvene fortynnet 1:10 ved måling av fluoriserende som gjort for HCHT. Fortynning var nødvendig ved høy aktivitet fordi da mettes fluorescenssignalet og er ikke lenger lineært.

5.5.2 Isolering av AMCase ved ionebytterkromatografi

Ved overekspresjon av AMCase i *P. pastoris* skiller det seg i tillegg ut andre komponenter i kulturen. Det er viktig å finne gode rensemetoder for AMCase for å kunne studere enzymet nærmere. I denne oppgaven ble det forsøkt å rense med en HiTrapTM CMFF ionbytterkolonne fra GE Healthcare med buffer A og B som 5mM natriumacetat med pH på henholdsvis 4,2 og 6,8. Isolering med gradient resulterte i ingen eller små fraksjoner. AMCase ble observert i noen av disse fraksjonene ved aktivitetstest og ved SDS-PAGE, men kun etter kraftige oppkonsentreringer. Selv om AMCase ble observert var det mindre mengder enn det som burde forventes hvis all AMCasen hadde blitt eluert ut ved disse fraksjonene. Ved å gjøre prosedyren ved samme betingelser, men uten gradient, kom det ut én stor fraksjon som viste lav kitinaseaktivitet. Etter oppkonsentrering og undersøkelse med SDS-PAGE viste det deg at fraksjonen ikke var ren.

Aktivitetstest på fraksjoner som ble tatt ut av waste-topp viste relativt stor kitinaseaktivitet. Det ser ut til at AMCase kanskje forsvinner med waste før baseline er oppnådd og det er derfor grunn til å tro at problemet ligger ved buffer A. Isolering ved ionebytterkromatografi under de samme betingelsene har tidligere vist seg å være effektivt for isolering av HCHT. AMCase har et lavere pH optimum enn HCHT. For å få til effektiv rensing bør det prøves ut buffere med annen pH. Det kan også være aktuelt å prøve andre kolonner som for eksempel HIC (Hydrophobic Interaction Chromatography) eller med kitinkuler.

6 KILDER

1. E: Horn, S. J., Sikorski, P., CCederkvist, J.B., Vaaje-Kolstad, G., Sørлие, M., Synstad, B., Vriend, G., Vårum, K. M., Eijsink.. (2006) Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 18089-18094.
2. F: Zhu, Z., *et al.* (2004) Acidic Mammalian Chitinase in Asthmatic Th2 Inflammation and IL-13 Pathway Activation. **304**: 1678-1682.
3. M: van Eijk, M., van Roomen, C. P. A. A., Renkema, G. H., Bussink, A. P., Andrews, L., Blommaart, E. F. C., Sugar, A., Verhoeven, A. J., Boot, R. G., Aerts, J. M. G.. (2005) Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity. *The Japanese Society for Immunology*. **17**: 1505-1512.
4. AE: Prajapati, B. G., Patel, M. M.. (2010) Crosslinked chitosan gel for local drug delivery of clotrimazole. *e-Journal of Science and Technology*. **(6), 5**: 43-52.
5. AH: Novikov, V. Y.. (2002) Acid Hydrolysis of Chitin and Chitosan. *Russian Journal of Applied Chemistry*. **77(3)**: 484-487.
6. V: Taylor II, L. E., Dai, Z., Decker, S. R., Brunecky, R., Adney, W. S., Ding., S. Y., Himmel, M. E.. (2008) Heterologous expression of glykosyl hydrolases in planta: a new departure for biofuels. *Trends in Biotechnology*. **26(8)**: 413-424.
7. Y: Zakariassen, H., Aam, B. B., Horn, S. J., Vårum, K. M., Sørлие, 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. *The Journal of Biological Chemistry*. **284(16)**: 10610-10617.
8. C: Norberg, A. L., Eide, K.B., E. B., Lindbom, A. R., Eijsink, V. G. H., Sørлие, M.. (Ikke publisert) Analysis of productive binding models reveals differences between human chitinases.
9. D: Goldman, D. L., Li, X., Tsirilakis, K., Andrade, C., Casadevall, A., Vicencio, A. G.. (2011) Increased chitinase expression and fungal-specific antibodies in the bronchoalveolar lavage fluid of asthmatic children. *Original Article, Clinical & Experimental Allergy* 1-8.
10. H: Aguilera, B., Ghauharali-van der Vlugt, K., Helmond, M. T. J., Out, J. M. M., Donker-Koopman, W. E., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., Overkleeft, H. S.,

- Aerts, J. M. F. G.. (2003) Transglycosidase Activity of Chitotriosidase. *The Journal of Biological Chemistry*. **278(42)**: 40911-40916.
11. A: Zakariassen, H., Hansen, M. C., Jørani M., Eijsink, V. G. H., Sørli, M.. (2011) Mutational Effects on Transglycosylating Activity of Family 18 Chitinases and Construction of a Hypertransglycosylation Mutant. *Biochemistry* **50**: 5693-5703.
 12. N: Bussink, A. P., Speijer, D., Aerts, J. M. F. G., Boot, R. G.. (2007) Evolution of Mammalian Chitinase(-Like) Members of Family 18 Glycosyl Hydrolases. *The Genetics Society of America*. **177**: 959-970.
 13. B: Eide, K.B., Norberg, A. L., Heggset, E. B., Lindbom, A. R., Vårum, K. M., Eijsink, V. G. H., Sørli, M.. (2011) Human Chitotriosidase-Catalyzed Hydrolysis of Chitosan. *Biochemistry*. **51**: 487-495.
 14. AI: Anosike, J. C., Onwuliri, C. O. E., Onwuliri, V. A.. (2003) Human filariasis in Dass local government area of Bauchi, Nigeria. *Tropical Ecology*. **44(2)**: 217-227.
 15. L: Rao, F. V., Houston, D. R., Boot, R. G., Aerts, J. M., Sakuda, S., van Aalten D. M.. (2003) Crystal structures of allosamidin derivatives in complex with human marcophange chitinase. *The Journal of Biological Chemistry*. **278**: 20110-20116.
 16. X: 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*. **145**: 3353-3363.
 17. T: Davies., G., Henrissat, B.. (1995) Structures and mechanisms of glykosyl hydrolases. *Structure*. **3(9)**: 853-859.
 18. U: Henrissat, B.. (2012) Glykosyl hydrolase families: classification and list of entries. *UniProt Consortium*.
 19. K: Fusetti, F., von Moeller, H., Houston, D., Rozeboom, H. J., Dijkstra, B. W., Boot, R. G., Aerts, J. M. F. G., van Aalten, D. M. F.. (2002) Structure of Human Chitotriosidase. *The Journal og Biological Chemistry*. **277**: 25537-25544.
 20. AL: Olland, A. M., Strand, J., Presman, E., Czerwinski, R., Joseph-McCarthy, D.,Krykbaev, R., Schlingmann, G., Somers, W., Fitz, L., Mosyak.. (2008) Triad of polar residues implicated in pH specificity of acidic mammalian chitinase. *Protein Science*. **18**: 569-578.
 21. S: Boot, G. R., Blommaart, E. F. C., Swart, E., Ghauharali-van der Vlugt, K., Bijl, N., Moe, C., Palce, A., Aerts, J. M. F. G.. (2001) Identification of a Novel Acidic

- Mammalian Chitinase Distinct from Chitotriosidase. *The Journal of Biological Chemistry*. **276(9)**: 6770-6778.
22. AD: Chupp, G. L., Lee, C. G., Jarjour, N., Shim, Y. M., Holm, C. T., He, S., Dziura, J. D., Reed, J., Coyle, A. J., Kiener, P., Cullen, M., Grandsaigne, M., Dombret, M. C., Aubier, M., Pretolani, M., Elias, J. A.. (2007) A Chitinase-like Protein in the Lung and Circulation of Patients with Severe Asthma. *New England Journal of Medicine*. **357(20)**: 2016-2027.
 23. G: Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P.V., Clark, D.P.. *Biology og Microorganisms*. 12th edition. 289, 328-329.
 24. R: Agilent Technologies, Inc. (2010). QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit, Instruction Manual. *Agilent Technologies*. Catalog #200523 og #200524, revision C.
 25. AJ: Gupta, S., Joshi, L.. (2003) Codon Optimization. *Arizona Bioscience*.
 26. AG: Omega Biotek. (2007) E.Z.N.A.® HP Plasmid Mini Kit I Handbook <http://www.omegabiotek.com/files/resource/Handbook/09324200.pdf>
 27. AF: Invitrogen life technologies. (1997-2001) Pichia EasyComp™ Kit, For the preparation and transformation of competent Pichia cells. Version E. http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/easycomppp_man.pdf
 28. P: New England BioLabs Inc. Sacl. <http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0156.asp>
 29. AK: Cereghino, J. L., Cregg, J. M.. (1999) Heterologous protein expression in the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*. **24(2000)**: 45-66.
 30. O: Toratani, T., Shoji, T., Ikehara, T., Suzuki, K., Watanabe, T.. (2007) The importance of chitobiase and N-acetylglucosamine (GlcNAc) uptake in N,N'-diacetylchitobiose[(GlcNAc)₂] utilization by *Serratia marcescens* 2170. *Microbiology*. **154**: 1326-1332.
 31. AA: Life Technologies™. (2012) Novex® NuPAGE® SDS-PAGE Gel System. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Protein-Expression-and-Analysis/Protein-Gel-Electrophoresis/Protein-Gels/Novex-NuPAGE-SDS-PAGE-Gels.html>
 32. AM: Invitrogen. (2007). Quant-iT™ Protein Assay Kit.
 33. Q: New England BioLabs Inc. DpnI. <http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0176.asp>

APPENDIKS

Appendiks A	s. 74
Appendiks B	s. 80
Appendiks C	s. 81
Appendiks D	s. 82
Appendiks E	s. 84
Appendiks F	s. 85

Appendiks A

Nukleotidsekvensen til AMCase-villtypegen:

ATGGCTACTAAATTGATTTTACTTACTGGTTTGGTACTGATCCTTAATTTGCAACTAGGTTACAGCCT
 ATCAATTAACATGTTATTTTACTAACTGGGCTCAATACAGACCAGGATTGGGTAGATTCATGCCTG
 ACAATATAGATCCATGCTTGTGTACCCACTTGATCTATGCTTTTGGCTGGTAGACAAAATAATGAAAT
 CACTACAATTGAGTGAATGATGTAACCTCTGTACCAGGCTTCAATGGACTGAAAAACAAGAACTC
 ACAACTAAAGACATTGCTTGAATTGGAGGTTGGAACCTTGGAACTGCTCCTTTTACAGCTATGGTT
 AGTACACCAGAAAATAGACAACTTTTATTACTTTCAGTTATTAAGTTCCTTAGACAATATGAATTTG
 ATGGCCTAGACTTTGACTGGGAATATCCAGGCTCTAGAGGTTACCCCCCTCAAGACAAGCATTGT
 TCACTGTATTAGTACAAGAGATGAGAGAAGCTTTTGAACAGGAGGCAAAGCAAATTAACAAACCA
 AGATTGATGGTTACTGCTGCAGTAGCAGCAGGTATATCTAATATTCAATCTGGTTATGAAATCCCC
 AATTGAGTCAATACTTGGATTACATCCATGTGATGACCTATGACCTACATGGTAGCTGGGAGGGAT
 AACTGGAGAAAATAGTCCATTATACAAGTATCCTACTGATACAGGTTCAAATGCCTACTTAAATG
 TAGATTATGTTATGAATTATTGGAAAGATAATGGTGCTCCAGCTGAAAAGCTGATTGTTGGTTTTCC
 CACTTATGGTCACAATTTTATTCTGAGTAATCCTTCCAACACAGGTATTGGTGCCCTACCTCTGGA
 GCAGGACCAGCAGGTCCATATGCCAAGGAATCTGGAATATGGGCTTACTATGAAATCTGTACTTTC
 TTGAAGAATGGTGCTACCCAGGGTTGGGATGCTCCTCAGGAAGTGCCTTATGCCTATCAAGGTAAT
 GTTTGGGTTGGTTATGACAACATTAATCTTTTGATATTAAGGCCAATGGTTGAAGCACATAAG
 TTTGGTGGAGCAATGGTTTGGGCTATTGATCTTGATGATTTTACAGGTACATTCTGCAATCAAGGAA
 AATCCCTCTAATATCTACTTTGAAGAAGGCACTTGGTTTACAGTCTGCTAGTTGCACAGCTCCTGC
 TCAGCCTATTGAACCTATCACTGCAGCACCCCTCAGGATCAGGTAATGGATCAGGTTTCATCATCCTCT
 GGTGGTTCTTCTGGTGGATCTGGTTTCTGTGCTGTTAGAGCCAATGGTTTATACCCAGTTGCTAATA
 ATAGGAATGCTTTTTGGCACTGTGTCAATGGAGTTACTTACCAACAAAATTGCCAGGCTGGTTTGGT
 ATTTGATACCTCATGTGATTGTTGTAACCTGGGCTTAATGACGAATTCTGCA

*Aminosyresekvensen til HCHT-villtypeprotein. Lederpeptid er markert med rød farge og
 kitinbindende domene type II er markert med grønn farge:*

MVRSVAWAGFMVLLMIPWGSAAKLVCYFTNWAQYRQGEARFLPKDLDPSTHLYAFAGMTNHQL
 STTEWNETLYQEFNGLKKNPKLKTLLAIGGWNFGTQKFTDMVATANNRQTFVNSAIRFLRKYSFD
 GLDLWEYPGSQGSPAVDKERFTTLVQDLANAFQQAQTSQKERLLLSAAVPAGQTYVDAGYEVDKI
 AQNLDFVNLMAVDFHGSWEKVTGHNSPLYKRQEEGAAASLVNDAAVQQWLQKQTPASKLILGMPT
 YGRSFTLASSDTRVGAPATGSGTGPFTKEGGMLAYYEVCSWKGATKQRIQDQKVPYIFRDNQWVGF
 DDVESFKTKVSYLKQKGLGGAMVWALDLDFAFSCNQGRYPLIQTLRQELSLPYLPSGTPELEVPKP
 GQPSEPEHGSPGQDFTFCQKADGLYPNPRERSSFYSCAAGRLLFQQSCPTGLVFSNSCKCCTWN

Nukleotidsekvensen til kodonoptimalisert HCHT-villtypegen. Basene som endres ved seterettet mutagenese er uthevet. Endringen og mutasjonsnavnet er oppgitt i parentes:

TAGAATTCGCTAAACTTGTTTGCTACTTCACTAACTGGGCTCAATATAGACAGGGAGAGGCTAGAT
 TCCTTCCTAAAGATTGGACCCATCACTTTGTACTCATTGTGATCTACGCTTTTGCCGGTATGACCAA
 CCACCAATTGTCTACTACCGAATGGAATGATGAGACTCTTTATCAGGAGTTAACGGTTTGAAGAA
 AATGAACCCAAAGCTTAAGACCTTGCTTGCTATTGGTGGATGGAACCTTGGAACCCAAAAATTAC
 AGATATGGTTGCAACAGCTAACAATAGACAGACTTTTGTCAATTCCGCTATCAGATTTTTGAGAAA
 GTACTCATTGACGGTCTTGATTTGG (A i D138N) ACTGGGAATATCCAGGTTCC CA (G i Q145R) A
 GGATCACCTGCCGTTGATAAAGAGAGATTCACTACTCTTGTCCAAGACTTGCCAACGCATTCCAA
 CAGGAAGCTCAGACAAGTGGTAAAGAGAGATTGCTTTTGTCTGCTGCCGTTCCAGCCGGTCAA
 ACT T (A i Y140N) ACGTTGATGCAGGATATGAAGTTGATAAGATTGCTCAGAACCTTGATTTTGT
 TTAATT TGATGGCCTACGACTTCCATGGTAGTTGG (T C i W218F) GAGAAGGTCACTGGACACA
 ACTCTCCT TTGTATAAAAGACAAGAAGAGAGTGGTGCAGCTGCCTCT(AC i S240N) TTGAATGTT
 GATGCAGCT GTCCAACAGTGGTTGCAGAAGGGAACCTCAGCCTC CA (AT i Q188I) AACTTATCTT
 GGGTATGCCT ACCTACGGAAGATCTTTTACTTTGGCATCTTCCTCAGACACCAGAGTTGGTGTCCAG
 CCACTGGTA GTGGAACCCAGGACCTTTCACAAAAGAAGGTGGAATGTTGGCATACTATGAGGTTTGT
 TCTTGGAAAGGTGCTACCAAACAAGAATCCAAGATCAGAAGGTTCTTACATCTTTAGAGACAACCAGT
 GG GTTGGTTTTGATGACGTCGAATCCTTCAAGACTAAAGTTTCATATCTTAAGCAAAGGGATTGGG
 TGGAGCAATGGTCTGGGCTCTTGATTTGGATGACTTTGCTGGTTTCTCCTGCAATCAAGGAAGATA
 ACC CACTTATCCAAACATTGAGACAGGAGCTTAGTTTGCCATATTTGCCTTCTGGTACTCCTGAACTTGA
 GGTTCCAAAGCCTGGACAACCATCCGAACCTGAGCATGGTCCATCACCTGGACAAGATACTTTCTG
 TCAGGGTAAAGCTGACGGATTGTACCCAAACCCTAGAGAAAGAAGTTCTTTCTACTCTTGCGCCGC
 AGGTAGATTGTTCCAGCAGTCTTGCCCTACTGGTCTTGTCTTTTCTAACTCCTGTAATGTTGCACTT
 GGAACCTGAGAATTCTA

Aminosyresekvensen til AMCase-villtypeprotein:

MATKLILLTGLVLILNLQLGSAYQLTCYFTNWAQYRPLGRFMPDNIDPCLCTHLYAFAGRQNEITTI
 EWNDVTLYQAFNGLKNKNSQLKTLLAIGGWNFGTAPFTAMVSTPENRQTFITSVIKFLRQYEFDGLDFD
 WEYPGSRGSPQDKHLFTVLVQEMREAFEQEAKQINKPRLMVTAAVAAGISNIQSGYEIPQLSQYLDYI
 HVMTYDLHGSWEGYTGENSPLYKYPTDTGSNAYLNVDYVMNYWKDNGAPAEKLIVGFPTYGHNFILS
 NPSNTGIGAPTSAGPAGPYAKESGIWAYYEICTFLKNGATQGDAPQEVPIAYQGNVWVGYDNIKSF
 DIKAQWLKHNKFGGAMVWAIDLDDFTGTFCNQGKFLISTLKKALGLQSASCTAPAQPIEPITAAPSGS
 GNGSGSSSSGGSSGGSGFC AVRANGLYPVANNRNFVHCVNGVTYQQNCQAGLVFDTSCDCCNWA—
 RIL

*Nukleotidsekvensen til pPIC9K-vektoren. Posisjon hvor HCHT- og AMCase har blitt inkorporert i vektoren ved hjelp av EcoRI er merket med **KITINASE**:*

AGATCTAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTTTTTGCCATCCGACATCCACAGGTCCAT
TCTCACACATAAGTGCCAAACGCAACAGGAGGGGATACACTAGCAGCAGACCGTTGCAAACGCAG
GACCTCCACTCCTCTTCTCCTCAACACCCACTTTTTGCCATCGAAAAACCAGCCCAGTTATTGGGCTT
GATTGGAGCTCGCTCATTCCAATTCCTTCTATTAGGCTACTAACACCATGACTTTATTAGCCTGTCT
ATCCTGGCCCCCTGGCGAGGTTTCATGTTTGTATTTCCGAATGCAACAAGCTCCGCATTACACCC
GAACATCACTCCAGATGAGGGCTTTCTGAGTGTGGGGTCAAATAGTTTCATGTTCCCAAATGGCC
CAAACTGACAGTTTAAACGCTGTCTTGGAACCTAATATGACAAAAGCGTGATCTCATCAAGATG
AACTAAGTTTGGTTCGTTGAAATGCTAACGGCCAGTTGGTCAAAAAGAACTTCCAAAAGTCGCCA
TACCGTTTGTCTTGTGGTATTGATTGACGAATGCTCAAAAATAATCTCATTAAATGCTTAGCGCAG
TCTCTCTATCGCTTCTGAACCCCGGTGCACCTGTGCCGAAACGCAAATGGGGAAACACCCGCTTTTT
GGATGATTATGCATTGTCTCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAATACTGCTGATAGCCT
AACGTTTCATGATCAAAATTTAACTGTTCTAACCCTACTTGACAGCAATATATAAACAGAAGGAAG
CTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTTACTTTCATAATTGCGACTGGTTCCA
ATTGACAAGCTTTTGATTTTAAACGACTTTTAAACGACAACCTTGAGAAGATCAAAAAACAACATAA
TTCGAAGGATCCAAACGATGAGATTCCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGC
ATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATCCGGCTGAAGCTGTAT
CGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAAC
GGGTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAG
AAAAGAGAGGCTGAAGCTTACGTAGAATTCTAGCGCCGCCACCATGGCTACTAAATTGATTTTACT
TACTGGTTTGGTACTGATCCTTAATTT **KITINASE** AAGACCGGTCTTGCTAGATTCTAATCAAGA
GGATGTCAGAATGCCATTTGCCTGAGAGATGCAGGCTTCATTTTTGATACTTTTTTATTTGTAACCT
ATATAGTATAGGATTTTTTTTTGTCATTTTGTCTTCTCGTACGAGCTTGCTCCTGATCAGCCTATCT
CGCAGCTGATGAATATCTTGTGGTAGGGGTTTTGGGAAAATCATTTCGAGTTTGATGTTTTTCTTGGTA
TTTCCACTCCTCTTCAGAGTACAGAAGATTAAGTGAGAAGTTCGTTTGTGCAAGCTTATCGATAAG
CTTTAATGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATTGCTAACGCAGTCAGGCACCGTGTATGAAATCTAAC
AATGCGCTCATCGTCATCCTCGGCACCGTCACCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGGTTATGCCG
GTACTGCCGGGCCTCTTGCGGGATATCGTCCATTCCGACAGCATCGCCAGTCACTATGGCGTGCTG
CTAGCGCTATATGCGTTGATGCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTCGGAGCACTGTCCGACCGCTTTG
GCCGCCGCCAGTCCTGCTCGCTTCCGCTACTTGGAGCCACTATCGACTACGCGATCATGGCGACCA
CACCCGTCTGTGGATCTATCGAATCTAAATGTAAGTTAAAATCTCTAAATAAATAAATAAGTCCC
AGTTTCTCCATACGAACCTTAACAGCATTGCGGTGAGCATCTAGACCTTCAACAGCAGCCAGATCC
ATCACTGCTTGGCCAATATGTTTCAGTCCCTCAGGAGTTACGTCTTGTGAAGTGATGAACTTCTGGA
AGGTTGCAGTGTTAACTCCGCTGTATTGACGGGCATATCCGTACGTTGGCAAAGTGTTGGTTGGTAC
CGGAGGAGTAATCTCCACAACCTCTCTGGAGAGTAGGCACCAACAAACACAGATCCAGCGTGTGT
ACTTGATCAACATAAGAAGAAGCATTCTCGATTTGCAGGATCAAGTGTTTCAGGAGCGTACTGATTG
GACATTTCCAAAGCCTGCTCGTAGGTTGCAACCGATAGGGTTGTAGAGTGTGCAATACACTTGCCT
ACAATTTCAACCCTTGGCAACTGCACAGCTTGGTTGTGAACAGCATCTTCAATTCTGGCAAGCTCCT

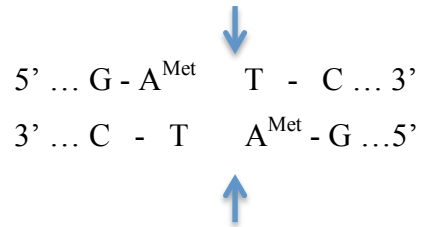
TGTCTGTCATATCGACAGCCAACAGAATCACCTGGGAATCAATACCATGTTTCAGCTTGAGACAGAA
GGTCTGAGGCAACGAAATCTGGATCAGCGTATTTATCAGCAATAACTAGAACTTCAGAAGGCCAG
CAGGCATGTCAATACTACACAGGGCTGATGTGTCATTTTGAACCATCATCTTGGCAGCAGTAACGA
ACTGGTTTCCTGGACCAAATATTTTGTACACTTAGGAACAGTTTCTGTTCCGTAAGCCATAGCAGC
TACTGCCTGGGCGCCTCTGCTAGCACGATACACTTAGCACCAACCTTGTGGGCAACGTAGATGAC
TTCTGGGGTAAGGGTACCATCCTTCTTAGGTGGAGATGCAAAAACAATTTCTTTGCAACCAGCAAC
TTTGGCAGGAACACCCAGCATCAGGGAAGTGGAAGGCAGAATTGCGGTTCCACCAGGAATATAGA
GGCCAACTTTCTCAATAGGTCTTGCAAAACGAGAGCAGACTACACCAGGGCAAGTCTCAACTTGCA
ACGTCTCCGTTAGTTGAGCTTCATGGAATTTCTGACGTTATCTATAGAGAGATCAATGGCTCTCTT
AACGTTATCTGGCAATTGCATAAGTTCCTCTGGGAAAGGAGCTTCTAACACAGGTGTCTTCAAAGC
GACTCCATCAAACCTGGCAGTTAGTTCTAAAAGGGCTTTGTCACCATTTTGACGAACATTGTGACGA
ATTGGTTTGACTAATTCATAATCTGTTCCGTTTTCTGGATAGGACGACGAAGGGCATCTTCAATTT
CTTGTGAGGAGGCCTTAGAAACGTCAATTTTGCACAATTCAATACGACCTTCAGAAGGGACTTCTT
TAGGTTTGGATTCTTCTTTAGGTTGTTCCCTTGGTGTATCCTGGCTTGGCATCTCCTTTCTTCTAGTG
ACCTTTAGGGACTTCATATCCAGGTTTCTCTCCACCTCGTCCAACGTACACCGTACTTGGCACATC
TAACTAATGCAAAATAAAATAAGTCAGCACATTCCCAGGCTATATCTTCCTTGGATTTAGCTTCTGC
AAGTTCATCAGCTTCCCTCCCTAATTTTAGCGTTCAACAAAACCTTCGTCTGCAATAACCGTTTGGTA
TAAGAACCTTCTGGAGCATTGCTCTTACGATCCCACAAGGTGGCTTCCATGGCTCTAAGACCCTTTG
ATTGGCCAAAACAGGAAGTGCGTTCCAAGTGACAGAAACCAACACCTGTTTGTTC AACCCACAAATT
TCAAGCAGTCTCCATCACAATCCAATTCGATACCCAGCAACTTTTGAGTTGCTCCAGATGTAGCACC
TTTATACCACAAACCGTGACGACGAGATTGGTAGACTCCAGTTTGTGTCCTTATAGCCTCCGGAAT
AGACTTTTTGGACGAGTACACCAGGCCCAACGAGTAATTAGAAGAGTCAGCCACCAAAGTAGTGA
ATAGACCATCGGGGCGGT CAGTAGTCAAAGACGCCAACAATAATTTCACTGACAGGGAACTTTTGA
CATCTTCAGAAAGTTCGTATTCAGTAGTCAATTGCCGAGCATCAATAATGGGGATTATAACCAGAAG
CAACAGTGGAAAGTCACATCTACCAACTTTGCGGTCTCAGAAAAAGCATAAACAGTTCTACTACCGC
CATTAGTGAAACTTTTTCAAATCGCCAGTGGAGAAGAAAAAGGCACAGCGATACTAGCATTAGCG
GGCAAGGATGCAACTTTATCAACCAGGGTCTATAGATAACCCTAGCGCCTGGGATCATCCTTTGG
ACAACTCTTTCTGCCAAATCTAGGTCCAAAATCACTTCATTGATACCATTATTGTACAACCTTGAGCA
AGTTGTGATCAGCTCCTCAAATTGGTCTCTGTAACGGATGACTCAACTTGCACATTAACCTGAAG
CTCAGTCGATTGAGTGAACCTTGATCAGGTTGTGCAGCTGGTCAGCAGCATAGGGAAACACGGCTTT
TCCTACCAAACCTCAAGGAATTATCAAACCTCTGCAACACTTGCATATGCAGGTAGCAAGGGAAATGT
CATACTGAAGTCGGACAGTGAGTGTAGTCTTGAGAAATTCTGAAGCCGTATTTTTATTATCAGTGA
GTCAGTCATCAGGAGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGGCCGACCTGCAGGGGGGGGGGGGGCG
CTGAGGTCTGCCTCGTGAAGAAGGTGTTGCTGACTCATACCAGGCCCTGAATCGCCCCATCATCCAG
CCAGAAAGTGAGGGAGCCACGGTTGATGAGAGCTTTGTTGTAGGTGGACCAGTTGGTGATTTTGAA
CTTTTGCTTTGCCACGGAACGGTCTGCGTTGTGCGGAAGATGCGTGATCTGATCCTTCAACTCAGCA
AAAGTTCGATTTATTCAACAAAGCCGCCGTCCCGTCAAGTCAGCGTAATGCTCTGCCAGTGTTACA
ACCAATTAACCAATTCTGATTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATAT
CAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACCTCACCGAGGC
AGTTCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATAACAAC

CTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAAT
CCGGTGAGAATGGCAAAAGCTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCT
CGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAA
ATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACT
GCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCC
CGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGA
AGAGGCATAAATTCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTA
CCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAATCGATAGATTGTTCGCAC
CTGATTGCCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATAACCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAA
TCGCGGCCTCGAGCAAGACGTTTTCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTATTACTGTTTTATG
TAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGATGATATATTTTTATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTT
GAGACACAACGTGGCTTTCCCCCCCCCTGCAGGTCGGCATCACCGGCGCCACAGGTGCGGTTG
CTGGCGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCG
CTTGTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCGTGGCCGGGGACTGTTGGGCGCCATCTCCTTGC
ATGCACCATTCTTGCGGCGGCGGTGCTCAACGGCCTCAACCTACTACTGGGCTGCTTCCTAATGCA
GGAGTCGCATAAGGGAGAGCGTCGAGTATCTATGATTGGAAGTATGGGAATGGTGATACCCGCAT
TCTTCAGTGTCTTGAGGTCTCCTATCAGATTATGCCCAACTAAAGCAACCGGAGGAGGAGATTTCA
TGGTAAATTTCTCTGACTTTTTGGTCATCAGTAGACTCGAACTGTGAGACTATCTCGGTTATGACAGC
AGAAATGTCCTTCTTGAGACAGTAAATGAAGTCCCACCAATAAAGAAATCCTTGTTATCAGGAAC
AAACTTCTTGTTCGAACTTTTTCGGTGCCTTGAAGTATAAAATGTAGAGTGGATATGTCGGGTAGG
AATGGAGCGGGCAAATGCTTACCTTCTGGACCTTCAAGAGGTATGTAGGGTTTGTAGATACTGATG
CCAACCTCAGTGACAACGTTGCTATTTCTGTTCAAACCATTCGAATCCAGAGAAATCAAAGTTGTTT
GTCTACTATTGATCCAAGCCAGTGCGGTCTTGAAACTGACAATAGTGTGCTCGTGTTTTGAGGTCAT
CTTTGTATGAATAAATCTAGTCTTTGATCTAAATAATCTTGACGAGCCAAGGCGATAAATACCCAA
ATCTAAAACCTTTTTAAAACGTTAAAAGGACAAGTATGTCTGCCTGTATTAACCCCAAATCAGCT
CGTAGTCTGATCCTCATCAACTTGAGGGGCACTATCTTGTTTTAGAGAAATTTGCGGAGATGCGAT
ATCGAGAAAAAGGTACGCTGATTTTAAACGTGAAATTTATCTCAAGATCTCTGCCTCGCGGTTTTC
GGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCG
GATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGGCGCAGC
CATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATT
GTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCAT
CAGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGCTGCGGCGAGCGGTA
TCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACAT
GTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATA
GGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACA
GGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTTCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCTGTTCCGACCTCGC
CGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTG
TAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTACG
CCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCG
CCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTT

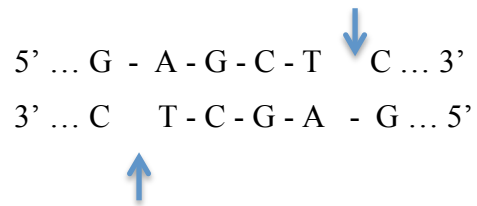
CTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAA
GCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGG
TGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGAT
CTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATT
ATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTAT
ATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTG
TCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTA
CCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCA
ATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAG
TCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTG
CCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCA
ACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCC
GATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCT
CTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAG
AATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATA
GCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTAC
CGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTTACTTT
CACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCG
ACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATT
GTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACAT
TTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATA
GGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAG
CTGACTCATGTTGGTATTGTGAAATAGACGCAGATCGGGAACACTGAAAAATAACAGTTATTATTC
G

Appendiks B

Kuttasetene til restriksjonsenzymene som er blitt brukt i denne oppgaven:



Figur B.1: Restriksjonssetet som DpnI kjenner igjen og kutter i.³³



Figur B.2: Restriksjonssetet som SacI kjenner igjen og kutter i.²⁴

Appendiks C

Tabell C.1: Plasmidkonsentrasjon for prøver som ble sekvensert etter seterettet mutagenese og isolering av plasmid. Konsentrasjonene ble målt med NanoDrop.

Plasmidnavn	Koloni	Konsentrasjon (ng/ μ L)
Y190N	3	475,2
Q145R	1	428,1
Q145R	2	406,2
Q145R	3	346,7
Q145R	6	360,1
D138N	2	431,6
W218F	3	279,5
S240Y	4	328,6
Q188I	1	451,6
Q188I	2	438,5
Q188I	3	432,7

Appendiks D

Tabell D.1: Målt fluorescens ved aktivitetstest av supernatant fra kultur med *Pichia pastoris* med Y190N koloni 1-3, W218F koloni 1-3 og D138N koloni 1-3. Prøver ble tatt ut etter 0, 24, 48, 72 og 96 timer etter tilsetning av metanol. Fluorescensen ble målt etter at prøven var fortynnet 1:10. Verdiene i denne tabellen er vist grafisk i figur 16.

Tid (timer)	Prøve	Y190N			W218F			D138N		
	Koloni	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	Parallell									
0	1	5293	-	5335	-	5037	3140	121 ^a	112 ^a	147 ^a
	2	-	5722	4969	-	-	-	107 ^a	108 ^a	70 ^a
	3	5989	5634	4654	4893	6023	4512	334	177	259
	4	3863	5279	4450	4244	6015	4226	150	182	158
24	1	6356	8459	7297	3901	6366	4432	1042 ^a	141 ^a	121 ^a
	2	5869	7614	5105	4164	6056	4820	388 ^a	128 ^a	116 ^a
	3	6845	8464	7509	5852	9466	7968	772	274	236
	4	6354	9292	6499	269	15464	5408	630	259	226
48	1	11301	7248	7231	6653	456 ^a	21808	1443 ^a	27698	28874
	2	11196	6881	7984	5804	186 ^a	22839	1386 ^a	23578	17628
	3	15647	10845	13460	11809	398	24940	1907	10334	23193
	4	15782	10793	10469	9658	264	24241	438	896	23558
72	1	12671	19730	8162	7770	702 ^a	25552	1446 ^a	23849	24854
	2	12000	18688	8698	7900	317 ^a	-	3030 ^a	22666	27577
	3	16185	27013	10962	11250	741	28420	3294	21474	28217
	4	15101	23672	10074	10288	409	21174	3252	28705	29646
92	1	12034	31283	18997	17389	28965	8577	34776 ^b	24164	1585
	2	28003	8395	15672	17937	14973	8026	30745	22006	796
	3	23842	21912	15600	12014	11087	7430	11398	608	6135
	4	24493	25006	15885	9093	9584	7395	11493	712	6422

^a)Verdien oppgitt her ble beregnet fra målt verdi av uforynnet prøve med forholdstall 7,0. Dette forholdstallet ble beregnet ved å ta gjennomsnitt av forhold mellom verdier fra prøver som ble målt både fortynnet og uforynnet. De uforynnede prøvene brukt i denne beregningen var på omtrent samme størrelse som de forholdstallet skulle brukes på.

^b)Verdien oppgitt her ble beregnet fra målt verdi for prøve fortynnet 1:100 fortynning med forholdstall 7,0, se punkt ^a) for begrunnelse av forholdstallet.

Tabell D.2: Målt fluorescens ved aktivitetstest av supernatant fra kultur med *Pichia pastoris* med Q145R koloni 1-5 og S240Y koloni 1-5. Prøver ble tatt ut etter 0, 24, 48, 72 og 96 timer etter tilsetning av metanol. Fluorescensen ble målt etter at prøven var fortynnet 1:10. Verdiene i denne tabellen er vist grafisk i figur 17.

Tid (timer)	Prøve	Q145R					S240Y				
		Koloni	1	2	3	4	5	1	2	3	4
	Parallell										
0	1	-	657	715	1128	884	795	745	870	142	242
	2	-	645	607	1295	974	797	688	601	287	411
	3	3815	322	191	467	384	388	477	314	164	213
	4	5104	243	152	585	533	401	344	542	147	196
24	1	16286	20913	19072	12924	22084	21463	19603	13557	19426	10523
	2	20655	21644	21342	19092	22353	20133	14825	- ^c	22238	11593
	3	6871	14756	12626	14714	26664	14885	15706	15609	10840	8057
	4	8213	4668	15440	2330	22437	7824	7264	14475	13515	5285
48	1	19929	20454	18442	19250	19033	21608	20632	13841	15725	10570
	2	21939	17378	21607	17333	20108	15348	19057	20131	20011	10304
	3	15907	1511	13693	2607	7229	4093	13444	14249	13335	9516
	4	1977	11521	1971	3887	283	9648	15621	15590	14338	8762
72	1	14119	23082	814	22666	16442	21486	22143	23826	18715	10589
	2	22809	19687	22640	14179	23400	22572	23627	23455	23661	11209
	3	19367	18357	20669	20765	20039	21811	19049	16623	20210	14268
	4	17971	14683	15295	16026	20969	19011	19106	23076	23708	18542
92	1	17528	20883	14586	19361	21641	18747	17246	14628	22260	610
	2	21379	1237	18416	17533	16577	18160	21434	19738	- ^c	9799
	3	17778	23617	21851	1388	21565	-	-	17611	20498	6923
	4	15613	22052	22324	22101	19116	21691	21950	19834	22123	9403

^cVerdien ble vurdert som uteligger ved Dixons test.

Appendiks E

Tabell E.1: Målt OD og inkuberingstid ved tillaging av frysestocker.

Inkubasjonstid		22 timer	23 timer	25 timer
Prøve	Koloninummer	OD	OD	OD
Q145R	1			0,26
	2		0,22	
	3			0,25
	4		0,28	
	5			0,24
S240Y	1		0,36	
	2	0,34		
	3		0,24	
	4		0,50	
	5			0,21
Y190N	1	0,71		
	2	0,29		
	3	0,50		
W218F	1	0,45		
	2	0,61		
	3	0,34		
D138N	1	0,70		
	2	0,73		
	3	0,95		

Appendiks F

Tabell F.1: Gjennomsnittlig målt fluorescens fra to paralleller ved aktivitetstest av supernatant fra kultur med Pichia pastoris med AMCase villtype. Prøver ble ved 0, 24 og 48 timer etter første tilsetning av metanol. Fluorescens ble målt av ufortynnede prøver. Disse verdiene er vist grafisk i figur 20.

Prøve	Prøvenummer	0 timer	24 timer	48 timer
AMCase villtype	1	471	684	820
	2	453	1772	3579
	3	389	2324	15851