

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP





## FORORD

Denne masteroppgaven er utført ved Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap ved Universitetet for miljø- og biovitenskap. Studien har vært en del av et større forskningsprosjekt ved Bioorganisk gruppe i samarbeid med Protein Engineering and Proteomics (PEP) gruppa og NTNU.

Jeg vil gjerne takke min entusiastiske veileder Morten Sørlie for gode tips og kloke ord, samt god støtte og oppfølging. I tillegg fortjener mine medveiledere Anne Grethe Hamre og Kristine Bistrup Eide en enorm takk for kyndig assistanse og god støtte. Anne Line Norberg og Linn Wilhelmsen fortjener også å bli nevnt.

Tilslutt må jeg takke min fantastiske familie og mine gode venner for utmerket støtte gjennom mange og lange studieår. Uten dere hadde jeg ikke vært der jeg er i dag. Og til Geir, takk for at du holder ut med en til tider grinete og stresset samboer, du betyr alt.

Universitetet for miljø- og biovitenskap,  
Ås 15.08.12

---

Kjersti Grongstad Lundquist

# Innholdsfortegnelse

<i>Sammendrag</i> .....	I
<i>Abstract</i> .....	III
<i>Forkortelser</i> .....	V
1. INTRODUKSJON .....	1
1.1 Karbohydrater .....	1
1.2 Kitin.....	3
1.2.1 Humant immunforsvar mot kitininneholdende patogener .....	5
1.2.2 Kitosan .....	6
1.3 Glykosyl hydrolaser .....	8
1.3.1 Hydrolyse hos kitinaser .....	9
1.3.2 Endo- og eksoglykosidaser.....	11
1.3.3 Prosessivitet.....	12
1.3.4 Transglykosylering.....	14
1.4 GH18 kitinaser .....	15
1.4.1 Kitinase A (ChiA) og kitinase B (ChiB) .....	16
1.4.2 Human Chitotriosidase (HCHT) .....	18
1.4.3 Acidic Mammalian Chitinase (AMCase).....	20
1.4.3.1 AMCase og astma .....	22
1.4.4 Humane kitinaser og immunforsvaret .....	23
1.5 Seterettet mutagenese .....	26
1.6 Kjernemagnetisk resonans (NMR).....	28
1.6.1 <sup>1</sup> H-NMR .....	29
1.7 Størrelseseksklusjonskromatografi (SEC).....	30
1.8 Mål med oppgaven .....	31
2. MATERIALER .....	32
2.1 Laborarieutstyr .....	32
2.2 Kjemikalier.....	35

2.3 Enzymer, substrater og proteiner .....	37
2.4 Medier .....	37
2.4.1 Selvlagde medier .....	37
2.4.2 Ferdiglagde medier.....	39
2.5 Celler .....	39
2.6 Kit.....	39
2.7 Buffere og løsninger.....	41
2.8 Antibiotika.....	45
2.9 Molekylvektsmarkører .....	45
2.10 Kromatografikolonner .....	46
2.11 Programvare .....	46
3. METODER.....	47
3.1 Tillaging av plasmid.....	47
3.1.1 Seterettet mutagenese .....	47
3.1.2 Design av primere .....	48
3.2 Isolering av plasmid .....	49
3.2.1 Måling av plasmidkonsentrasjon.....	50
3.2.2 PCR-reaksjon og transformering av mutanter.....	50
3.2.3 Kontroll av PCR-reaksjon .....	54
3.3 Sekvensering .....	57
3.4 Transformering av <i>Pichia pastoris</i> .....	59
3.4.1 Linearisering.....	59
3.4.2 PCR-clean up.....	60
3.4.3 Tillaging av kompetente celler .....	61
3.4.4 Transformering.....	62
3.4.5 Dyrkning av transformanter .....	63
3.4.6 SDS-Page .....	64
3.4.7 Enzymaktivitet .....	65
3.5 Overekspresjon av AMCase og HCHT i <i>Pichia pastoris</i> .....	68

3.5.1	Fluorometrisk bestemmelse av proteinkonsentrasjon .....	69
3.5.2	Fermentering .....	70
3.6	Isolering av humane kitinaser.....	73
3.6.1	Kolonner for rensing av humane kitinaser .....	73
3.6.2	Oppkonsentrering av protein .....	75
3.6.3	Western blot .....	75
3.7	Ekspresjon av bakterielle kitinaser .....	78
3.7.1	Tillaging av periplasmatisk ekstrakt .....	79
3.7.2	Isolering av bakterielle kitinaser .....	79
3.8	Framstilling og isolering av kitosan .....	83
3.8.1	Framstilling av kitosan ved homogen N-deacetylering av kitin .....	83
3.8.2	Isolering av kitosan .....	84
3.8.3	Bestemmelse av deacetyleringsgrad.....	85
3.9	Nedbrytning av kitosan .....	87
3.9.1	Oppløsning av kitosan .....	87
3.9.2	Nedbrytning av kitosan med bakterielle kitinaser.....	88
3.10	<sup>1</sup> H-NMR analyse av nedbrytningsprodukter .....	90
3.10.1	Prøvepreparering til NMR.....	90
3.10.2	Tolkning av NMR-spektre .....	91
3.11	SEC-analyse av nedbrytningsprodukter .....	92
3.12	Viskositetsassay .....	94
4.	RESULTATER .....	96
4.1	Mutasjonsanalyse humane kitinaser .....	96
4.2	Mutasjonsanalyse bakterielle kitinaser.....	97
4.3	Kloning.....	98
4.3.1	PCR .....	98
4.3.2	Dyrkning av transformanter .....	99
4.3.3	Sekvensering .....	100
4.4	Overekspressjon og rensing av humane kitinaser.....	101
4.4.1	Enzymaktivitet .....	101

4.4.2 SDS-PAGE.....	102
4.4.3 Rensing av AMCase.....	103
4.4.4 Western blotting .....	106
4.4.5 Fermentering .....	107
4.5 Overekspresjon og rensing av bakterielle kitinaser.....	109
4.6 <sup>1</sup> H-NMR av kitosan for å avgjøre deacetyleringsgrad .....	110
4.7 Nedbryting av kitosan ved bakterielle kitinaser .....	112
4.7.1 <sup>1</sup> H-NMR .....	112
4.7.2 SEC.....	115
4.8 Viskositetsassay .....	117
5. DISKUSJON .....	121
5.1 Overekspresjon av humane kitinaser.....	121
5.2 Kromatografi av humane kitinaser .....	122
5.3 Prosessivitet i humane kitinaser .....	123
5.4 Nedbrytning av kitosan ved bakterielle kitinaser .....	124
5.5 Viskositetsassay .....	125
6. OPPSUMMERING .....	126
7. VEIEN VIDERE .....	128
8. REFERANSER .....	129
9. VEDLEGG .....	134

## ***Sammendrag***

Astma er en kronisk betennelsessykdom som er et resultat av inflammasjon i luftveiene og det er anslått at 300 millioner mennesker lider av denne sykdommen. Antallet stiger ettersom flere land blir urbanisert og det er anslått at tallet vil nå 400 millioner innen 2025. Astmatikere krever kontinuerlig medisinsk pleie og en nedgang i antall tilfeller vil ha stor effekt på verdensøkonomien.

Kitin er en biopolymer som finnes i rikelige mengder i naturen, og årlig produseres det opp mot 100 milliarder tonn. Det er en lineær polymer bestående av repeterende  $\beta$ -(1,4)-*N*-acetylglukosamin [(GlcNc)<sub>n</sub>] som finnes som en strukturell polymer i cellevegger hos sopp, eksoskjelett hos insekter og skalldyr og hos helminter og artropoder. Kitin produseres og brytes ned av henholdsvis kitin syntaser og kitinaser. Kitinaser har vist å ha en rolle i antiparasittresponser i lavere livsformer, og mennesker produserer kitinaser som en del av immunforsvaret.

Acidic mammalian chitinase (AMCase) er en av kitinasene i glykosyl hydrolase familie 18, og anses som en komponent i astma og allergiske sykdommer. Proteinene er oppregulert i lungevev og makrofager hos astmapasienter, noe som indikerer at medfødte og arvelige defekter i AMCase kan ligge bak luftveisbetennelse og allergisk respons. AMCase har 57 % sekvenslikhet med chitotriosidase (HCHT), den andre kitinasen som er funnet hos mennesker. De har begge flere aromatiske residuer i direkte kontakt med substratet, og disse antas å påvirke enzymenes prosessivitet. HCHT er en del av det medfødte immunforsvar og er assosiert med flere sykdommer, blant annet Gaucher sykdom og sarkoidose, og forskning på de mekaniske egenskaper til HCHT er svært interessant. Det antas at ettersom de fleste substitusjonene av residuer fra HCHT til AMCase befinner seg på proteinoverflaten, vil dette være tegn på tilpassing av enzymet og ikke en forandring som påvirker proteinets reaksjonsmekanisme. Hemming av HCHT og AMCase er av medisinsk interesse og innsikt i enzymenes preferanser er viktig. Spesielt hemming av AMCase har vist å ha en positiv effekt på sykdomsforløpet hos astmatikere.



De bakterielle kitinasene kitinase A (ChiA) og kitinase B (ChiB) har store likheter med de humane kitinasene og forskning på ChiA og ChiB kan avdekke kunnskaper som også er relevante for de humane kitinasene. ChiA og ChiB er raskere å dyrke og isolere, noe som gjør forskning på disse mer tidseffektivt. De bakterielle kitinasene deler flere strukturelementer med de humane, blant annet har de aromatiske residuer i det aktive setet som bidrar til å øke prosessiviteten, evnen til å holde på substratet. Polare residuer nær det aktive setet bidrar til å forstyrre den krystallinske strukturen og øke tilgjengeligheten til substratet.

Ved å mutere residuer i og nær det aktive setet, antas det at prosessivitet og transglykosyleringsaktivitet kan påvirkes. Dette er svært interessant og vil gi mye kunnskap og muligheter innen kitinaseforskning.

## ***Abstract***

Asthma is a chronic disorder that is a result of airway inflammation. It is estimated that 300 million people are affected by this disease worldwide, and the number increases as more countries are urbanized. By 2025 it is estimated that the number has risen to 400 million. As asthmatics require continuous medical care, a decrease in the number of cases will have a massive effect on the world economy.

Chitin is a linear biopolymer that is abundant in nature. Almost 100 billion tons are produced annually. Chitin consists of repeated  $\beta$ -(1,4)-*N*-acetylglucosamine units [(GlcNc)<sub>n</sub>], and is a key structural polymer in fungi, insects, crustaceans, helminths and arthropods. Chitin is produced and degraded by chitin synthases and chitinases. Chitinases have been proven to be important in anti-parasite responses in lower life forms, and humans produce chitinases as a part of the immune system.

Acidic mammalian chitinase (AMCase) is one of the members of glycosyl hydrolase family 18, and is considered to be a component in asthma and allergic diseases. AMCase is upregulated in lung tissue and macrophages in asthmatics, thus indicating that innate and hereditary defects in AMCase can be a reason for airway inflammation and allergic response. AMCase has a 57 % sequence similarity with chitotriosidase (HCHT), the other human chitinase. They both have several aromatic residues in direct contact with the substrate, and these residues are assumed to affect the processivity of the enzymes. HCHT is a part of the innate immune system and is associated with several diseases, including Gaucher disease and sarcoidosis. Research on the mechanistic properties of HCHT is quite interesting. It is assumed that as most amino acid substitutions from HCHT to AMCase are located on the protein surface, this is a result of enzyme adaption and not a change that will affect the reaction mechanism. Inhibition of HCHT and AMCase is of great medical interest and insight into enzyme preferences is important. In particular inhibition of AMCase has been proven to have positive effects for asthmatics.

The bacterial chitinases chitinase A and chitinase B have similarities with the human chitinases, and research on ChiA and ChiB may uncover knowledge that can apply to them. As ChiA and ChiB are faster and simpler to cultivate and isolate, research on these proteins

are timesaving. The bacterial chitinases share several structural elements with the human chitinases and can be used as model systems. They have aromatic residues in the catalytic site that contributes to an increase in the processivity of the enzymes. Polar residues close to the catalytic site disturb the crystallinity of the substrate and will increase the availability of the substrate.

By mutating residues in and around the catalytic site it is assumed that processivity and transglycosylation may be affected. Research on this subject is quite interesting and will yield more knowledge and opportunities in the chitinase research field.

## ***Forkortelser***

4-MU	4-metylumbelliferyl
4-MU- (GlcNAc) <sub>2</sub>	4-metylumbelliferyl- <sub>2</sub> -D-N,N'-diacetylchitobiose
$\alpha$	Spaltningsgrad
A	2-acetamid-2-deoksy-D-glukose (GlcNAc)
AMCase	Acidic mammalian chitinase
Ala (A)	Alanin
Asp (D)	Aspartat
BMGY	Buffered Glycerol-Complex Medium
BMMY	Buffered Methanol-Complex Medium
Chi A	Kitinase A
Chi B	Kitinase B
Chi C	Kitinase C
D	2-amino-2-deoksy-D-glukose (GlcN)
Da	Dalton
dH <sub>2</sub> O	Sterilt vann (MilliQ)
DNA	Deoksyribonukleinsyre
DP	Polymeriseringsgrad
DP <sub>n</sub> pol	Depolymeriseringsgrad av polymertopp
F <sub>A</sub>	Acetyleringsgrad
GH18	Glykosyl hydrolase familie 18
GlcN	D-glukosamin
(GlcNAc) <sub>1-6</sub>	(N-acetylglukosamin) <sub>1-6</sub>
Gln (Q)	Glutamin
Glu (E)	Glutamat
HCHT	Human chitotriosidase
IL	Interleukin
KOS	Kitooligosakkarider
$\lambda_{\max}$	Bølgelengde der maksimal mengde lys absorberes av løsningen
MW	Molekylvekt
MWCO	Molecular Weight Cut Off
NMR	Kjernemagnetisk resonans

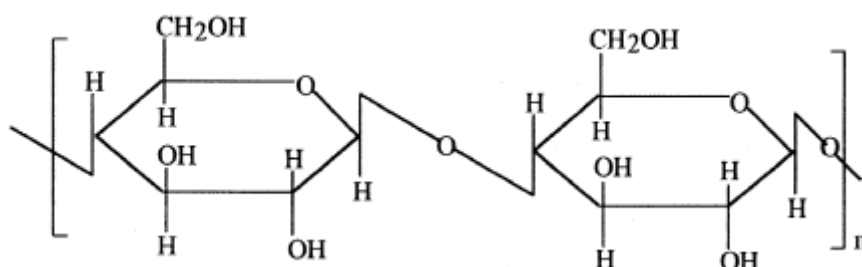
pI	Isoelektrisk punkt
Phe (F)	Fenylalanin
pKa	Syrekonstant
RI	Brytningsindeksdetektor (Refractive Index detector)
RNA	Ribonukleinsyre
rpm	Rotasjon per minutt
S	Siemens, enhet elektrisk ledningsevne
SEC	Størrelses eksklusjonskromatografi
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyakrylamide Gel Elektroforese
TMS	Tetrametylsilan
Trp (W)	Tryptofan
WT	Enzymets villtype

# 1. INTRODUKSJON

## 1.1 Karbohydrater

Karbohydrater finnes i alle planter og dyr og er en nødvendighet for alt liv. Monosakkarider er enkle sukkerenheter som ikke kan hydrolyseres til mindre deler, og kjeder av slike sukkerenheter kalles polysakkarider. Polysakkarider kan variere i kjedelengde og molekylvekt, og enhetene kan være koblet i rette eller forgreinede kjeder. (Hart et al. 2007) Gjennom fotosyntesen konverterer planter  $\text{CO}_2$  fra atmosfæren til karbohydrater, i hovedsak cellulose og stivelse. I planter brukes stivelse til energilagring, og de ulike sukkerenhetene i polymerene er koblet sammen med 1,4- $\alpha$ -glykosidbindinger. Stivelse kan deles inn i to fraksjoner: amylose, bestående av uforgreinede kjeder, og amylopektin som består av flere forgreinede kjeder. Glykogen er et polysakkarid som har høyere grad av forgreining enn amylopektin, i tillegg til en høyere molekylvekt. Glykogen benyttes som energilagring hos dyr. (Hart et al. 2007)

Cellulose er en uforgreinet polymer av glukosemolekyler koblet ved 1,4- $\beta$ -glykosidbindinger. Flere uløselige cellulosekjeder bindes sammen til sterke fibriller, som igjen kan bindes sammen og danne cellulosefibre. (Hart et al. 2007; Mittal et al. 2011) Cellulose har stor fysisk styrke fordi fibrebygges opp av fibriller som tvinnes i motsatt retning rundt en sentral akse. Tre, bomull, hamp og lin er produkter av cellulose. (Hart et al. 2007)



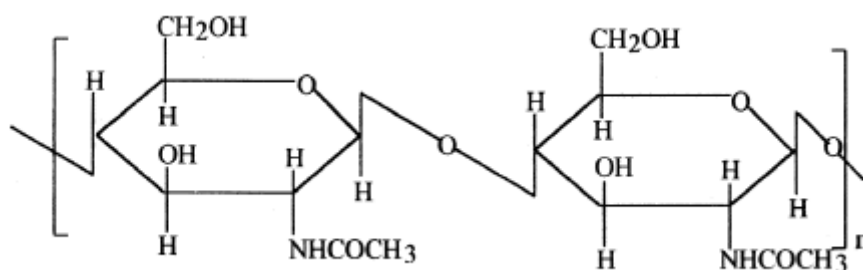
Figur 1: Struktur til cellulose. (Kumar 2000)

Cellulose eksisterer i to ulike krystallinske former. I cellulose I er polysakkaridkjedene pakket parallele og har alle reduserende ender pekende i samme retning. Cellulose II har kjeder som er pakket antiparallele, det vil si at i begge ender av polymeren vil det finnes reduserende ender. (Eijsink et al. 2008)

Enzymatisk nedbryting av motstandsdyktige polysakkarider som cellulose og kitin har stor biologisk og økonomisk viktighet. Disse biopolymerene produseres i store mengder i naturen, noe som gjør dem til omtrent utømmelige kilder av miljøvennlig råmateriale til produksjon av biodrivstoff og andre biovennlige produkter. (Zakariassen et al. 2009) Estimert årlig produksjon av cellulose er  $10^{11}$  -  $10^{12}$  tonn. Til sammenlikning er årlig produksjon av kitin  $10^{10}$  tonn. (Mittal et al. 2011) Utvikling av enzymer som effektivt omgjør uløselige biopolymerer er derfor et av hovedmålene i nåværende forskning på biodrivstoff. (Zakariassen et al. 2009)

## 1.2 Kitin

Kitin er en biopolymer som finnes i rikelige mengder i naturen, og årlig produseres det opp mot 100 milliarder tonn. Det er en lineær polymer bestående av  $\beta$ -(1,4)-koblede *N*-acetylglukosaminer [(GlcNc)<sub>n</sub>] som finnes som en strukturell polymer i cellevegger hos sopp, eksoskjelett hos insekter og skalldyr og hos helminter og artropoder. (Zakariassen et al. 2009) Hydroksylgruppen i hver D-glukose er erstattet med en acetylamingruppe. Dette er en substitusjon som gir mulighet for mange hydrogenbindinger mellom nabopolymerer og som gjør kitin resistent mot nedbrytning. (Shuhui et al. 2009) Ren kitin er et polysakkarid som fremstår som en pakket og ordnet struktur som kan defineres ved regularitet, type bindinger, grad av krystallinitet og egenskaper som avhenger av polysakkaridets form. (Muzzarelli 2010) Kitin, som cellulose, finnes i to ulike krystallinske former.  $\alpha$ -kitin består av antiparallele polysakkaridkjeder liknende cellulose II, mens  $\beta$ -kitin kun består av parallelle kjeder med reduserende ender som peker samme vei. Cellulose er pakket tettere enn kitin. (Eijsink et al. 2008)

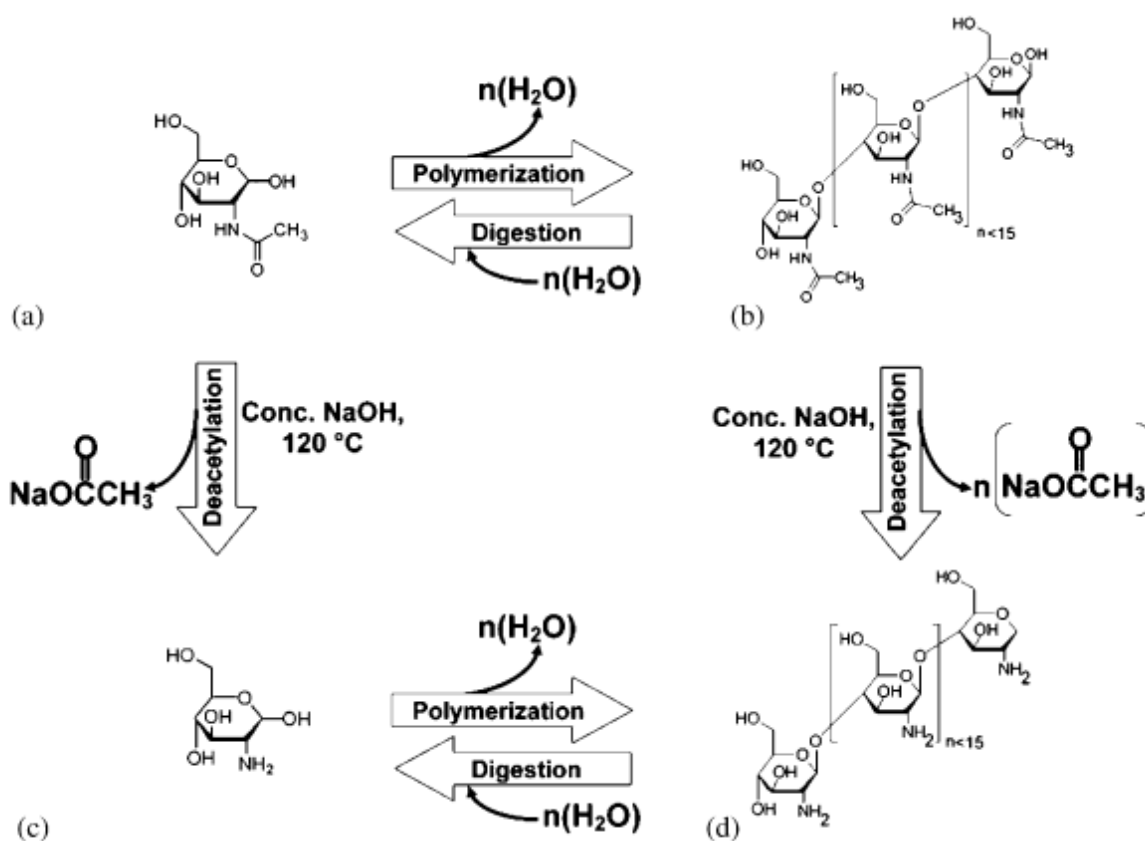


**Figur 2: Strukturen til kitin. (Kumar 2000)**

Kitin er en rikelig kilde for karbon, nitrogen og energi for marine mikroorganismer, og er ansett som den polymeren det finnes mest av i det marine miljøet. (Zhao et al. 2010) På tross av dens mengde i naturen og motstandsdyktighet mot nedbrytning akkumuleres ikke kitin i miljøet. (Kawada et al. 2007) Det meste av kitinet i naturen resirkuleres av kitinolytiske bakterier og saprofytter. (Lee 2009) Nedbrytingen av kitin i naturen utføres av enzymer som kalles kitinaser (avsnitt 1.3). (Eijsink et al. 2008)



Ren kitin har noen bruksområder, men det er hovedsakelig derivater av polymeren som blir brukt i biomedisinsk forskning og behandling. Et slikt derivat er kitosan som dannes ved deacetylering av kitin. Videre kan kitooligosakkarider (KOS) fremstilles ved delvis depolymerisering av både kitin og kitosan. Glucosaminer, også et produkt med flere anvendelser dannes ved fullstendig depolymerisering, se figur 3. (Muzzarelli 2010) Derivater av kitin er normalt ikke giftige eller allergene. De er bionedbrytbare og biokompatible og kan derfor brukes til medisinske formål. Kunstig hud, kontaktlinser og kirurgiske tråder har blitt produsert fra kitinderivater, og det er dermed vanlig for mennesker å bli utsatt for kitin og dets derivater i dagliglivet. (Chung et al. 2012; Lee 2009)



**Figur 3: Deacetylering og polymerisering av glukosaminer. (Webster et al. 2006)**

Forskning på dette feltet er fordelaktig da det er ønskelig med nye bruksområder for kitin. Kitin er en av de mest produserte polymerene i naturen, og bruk av kitin og kitosan i ulike prosesser vil være bærekraftig. Enzymer som skal bryte ned krystallinske polysakkarider som kitin har flere utfordringer. De må assosiere med det uløselige materialet, forstyrre pakkingen

av polymeren samtidig som de må tre en enkeltpolymer inn i det katalytiske setet. (Eijsink et al. 2008) Dette er begrensende faktorer som gjør anvendelse av ren kitin utfordrende. Høy molekylmasse og dårlig løselighet har stått i veien for bruk av kitin som terapeutisk middel. Derivatet kitosan viser høyere løselighet og har ulike bruksområder, blant annet er det vist å øke benvekst, ha gjennombyggende effekt på bindevev, behandle brannskader og være blodtrykkssenkende. Kitosan har i tillegg stor anvendelse innen industri. Eksempler på dette er vannbehandling, hår- og sminkeprodukter, oral hygiene, papir- og tekstilindustri, matvareindustri, agrikultur og fotografi. (Dutta et al. 2004) Kitooligosakkarider (KOS) har også fått mye oppmerksomhet. Disse er lett løselige i vann på grunn av kortere kjedelengde og viser større oral absorpsjon. De har flere biologiske effekter, blant annet antibakteriell, antitumor- og antioksidanteffekt. Det må dog merkes at de biologiske egenskapene til KOS avhenger av løselighet, molekylvekt og acetyleringsgrad (forholdet mellom glukosamin (GlcN) og *N*-acetylglukosamin (GlcNAc)). (Aam et al. 2010; Chung et al. 2012)

### **1.2.1 Humant immunforsvar mot kitininneholdende patogener**

Epitelceller og andre antigenpresenterende celler i luftveiene eller i mageregionen blir ofte utsatt for ulike allergener og patogener ved pusting og matinntak. Epitelceller uttrykker kitinaser og kitinbindende proteiner, og uttrykking av disse induseres ved stimulering av allergiske responser. (Lee 2009) Metabolisme av kitin i naturen kontrolleres av enzymer som kitin syntaser og kitinaser, som henholdsvis bygger opp og bryter ned kitin. (Eide et al. 2012) De fleste kitinaser hører til glykosyl hydrolase familie 18 (GH18), og det antas at disse enzymene spiller en viktig rolle i immunforsvarets antiparasitrespons hos flere livsformer, inkludert mennesker. (Eide et al. 2012) Kitin brukes av kitininneholdende organismer for å beskytte mot vilkårene i dets miljø og mot vertens anti-parasittiske immunresponser. (Lee 2009)

Mennesker produserer verken kitin eller kitin syntase, men det humane genomet koder for åtte familie 18 kitinaser. To av disse har kitinolytisk aktivitet, human chitotriosidase (HCHT) og acidic mammalian kitinase (AMCase). (Lee 2009) Begge antas å ha en rolle i immunresponsen mot parasitter, og HCHT antas å beskytte verten ved å kløyeve polysakkarider i bakterielle cellevegger. (Hollak et al. 1994) HCHT uttrykkes i hovedsak i

aktiverte humane immunceller kalt makrofager, mens AMCase finnes i mage, tårer, sinus mucosa (slimhinner i bihulene) og i lungene. (Eide et al. 2012)

Human chitotriosidase er homolog med kitinaser fra planter, bakterier, sopp, nematoder og insekter, og rekombinant chitotriosidase er funnet å ha en bakteriostatisk effekt på kitin-inneholdende sopp som *Candida* og *Aspergillus*. (Boot et al. 2001) I tillegg til at HCHT uttrykkes av fagocytiske celler, viser dette at enzymet kan ha en rolle i forsvar mot kitin-inneholdende patogener. (Boot et al. 1998) Det er funnet at HCHT er oppregulert i en rekke sykdommer, blant annet Gauchers sykdom, primær prostatakreft og bindevevssykdommen sarkoidose. Forskere vet lite om fysiske følger av oppreguleringen, men høye nivåer av HCHT viser seg å gi et bedre forsvar mot kitininneholdende patogener. Humane makrofager har vist seg å bli aktivert av HCHT-mediert nedbryting av kitin og kitosan. (Eide et al. 2012) Fordi HCHT antas å være en del av menneskets forsvar mot patogener er forskning på dette området av stor interesse.

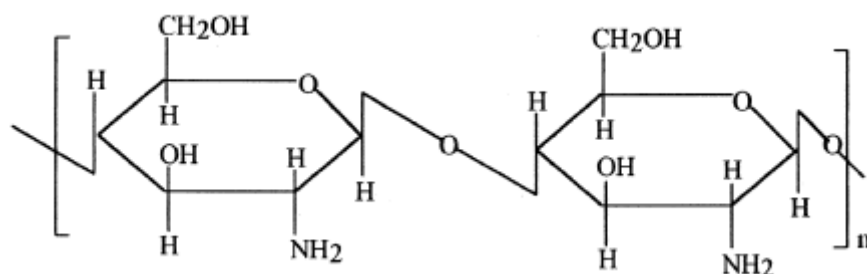
Forskning på AMCase tyder på at enzymet er en viktig komponent i astma, og mer kunnskap om enzymet og dets virkemåte kan bidra til utvikling av nye medisiner og behandlingsmåter mot astma og astma-relaterte plager.

### 1.2.2 Kitosan

Kitosan er en heteropolymer som består av 2-acetamid-2-deoksy-D-glukose (GlcNac, A) og 2-amino-2-deoksy-D-glukose (GlcN, D) (Sikorski et al. 2005), og er et vannløselig polysakkarid som dannes ved delvis eller fullstendig de-*N*-acetylering av kitin. (Eide et al. 2012; Hirai et al. 1991) Kitosanpolymerens molekylære struktur og egenskaper påvirkes av grad av deacetylering, og det er derfor ønskelig å vite den nøyaktige acetyleringsgraden før kitosan brukes i forsøk. (Hirai et al. 1991)

Figur 3 viser deacetylering og depolymerisering av kitosan. Kitosan som har blitt deacetylert ved hjelp av enzymet kitin deacetylase vil ha et mer ordnet acetyleringsmønster enn kitosan som har blitt deacetylert med NaOH. Ved bruk av enzymatisk deacetylering av kitosan kan acetyleringsmønster, i tillegg til grad av acetylering kontrolleres. Bedre tilgjengelighet til acetylgruppene kan oppnås ved å utsette kitinpolymeren for metoder som varme, sonikering, sliping, derivatisering og interaksjon med sakkarider. (Zhao et al. 2010) Deacetylering av

kitin fjerner volum inne i kjeden, og den resulterende kitosanpolymeren har mer strukturell frihet. (Webster et al. 2006)



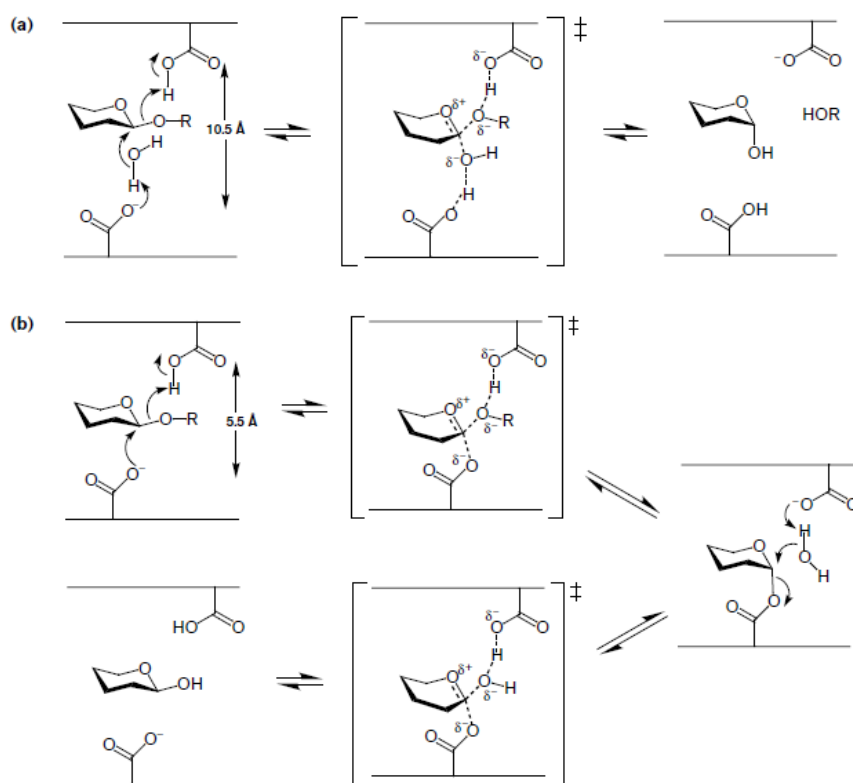
**Figur 4: Strukturen til kitosan. (Kumar 2000)**

Bindingsaffinitet mot substrat og selektivitet av subster er en variabel innen GH18 kitinaser. Nedbryting av kitosan kan brukes til å analysere disse parameterne. Kitosan er mer anvendelig enn kitin, og veldefinert kitosan egner seg godt til å karakterisere enzymer. (Eide et al. 2012)

### 1.3 Glykosyl hydrolaser

Glykosyl hydrolaser/glykosidaser er enzymer som hydrolyserer glykosidbindinger mellom suktermolekyler i et karbohydrat. Glykosidaser er ansvarlige for mange viktige biologiske funksjoner, blant annet remodelering av cellevegger og modifisering og nedbryting av polysakkarider. Slike enzymer kan deles inn i to klasser avhengig av hvilken stereokjemisk konfigurasjon produktet har. Begge klassene, inverterende og bevarende glykosidaser, krever både en syre og en base/nukleofil for å katalysere hydrolysen, (Jitonnom et al. 2011) og er avhengige av at protondonoren befinner seg i hydrogenbindingsavstand fra glykosidoksygenet. (Davies & Henrissat 1995).

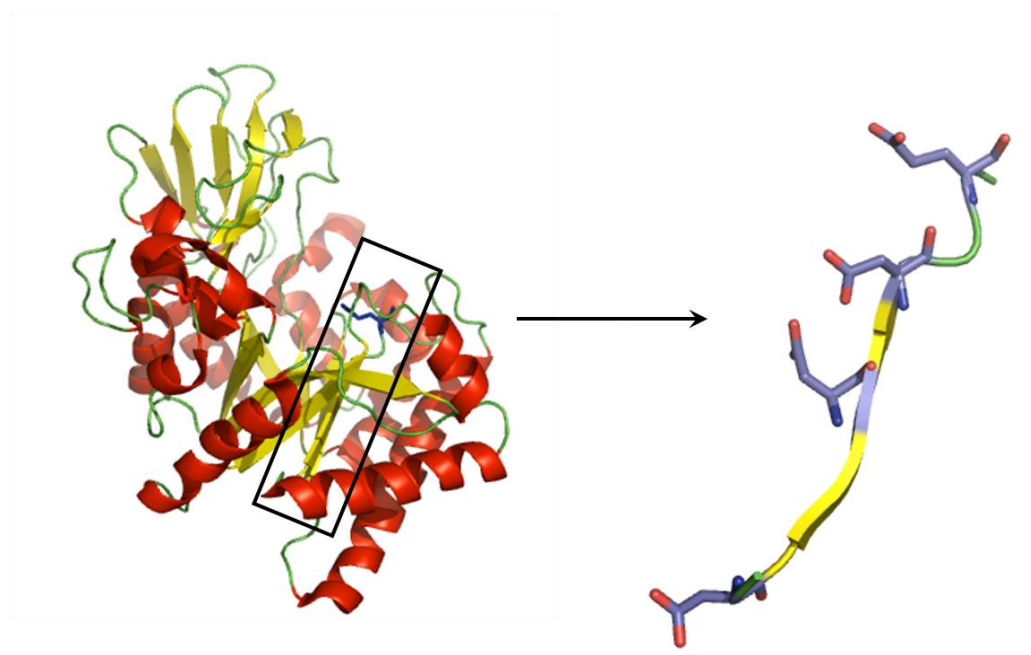
Inverterende glykosidaser har en enkeltforskyvingsmekanisme som involverer seter med aktive syre- og baseresiduer. Reaksjon med et enzym med en bevarende mekanisme fører til en dobbelforskyving som involverer sure, basiske og nukleofile residuer. (Jitonnom et al. 2011)



**Figur 5: Glykosidasemekanisme for (a) inverterende og (b) bevarende glykosidaser. (Rye & Withers 2000)**

### 1.3.1 Hydrolyse hos kitinaser

Kitinaser som er medlem av GH18 er konfigurasjonsbevarende enzymer. Disse enzymene benytter seg av en substrat-assistert mekanisme der acetamid-gruppen, som er en del av kitinpolymeren, bidrar med protoner fra et oksygenatom. (Jitonnom et al. 2011) Kitinaser i GH18 har et katalytisk domene i N-terminal ende av aminosyresekvensen. Det katalytiske domenet innehar en triose-fosfat isomerase fold som kalles en TIM-tønne. Denne består av en  $(\alpha/\beta)_8$ -tønne som inneholder et konservert sekvensmotiv som danner det aktive setet i enzymet. Dette sekvensmotivet består av aminosyre DXDXE, der D er aspartat, E er glutamat og X er en hvilken som helst annen aminosyre. Glutamatresiduen er den katalytiske syren som donerer protonet som kreves for å hydrolysere  $\beta(1\rightarrow4)$  glykosidbindingen i kitin. (Kawada et al. 2007; Shuhui et al. 2009) Mutering av denne glutamatresiduen vil deaktivere enzymet. (van Aalten et al. 2001)

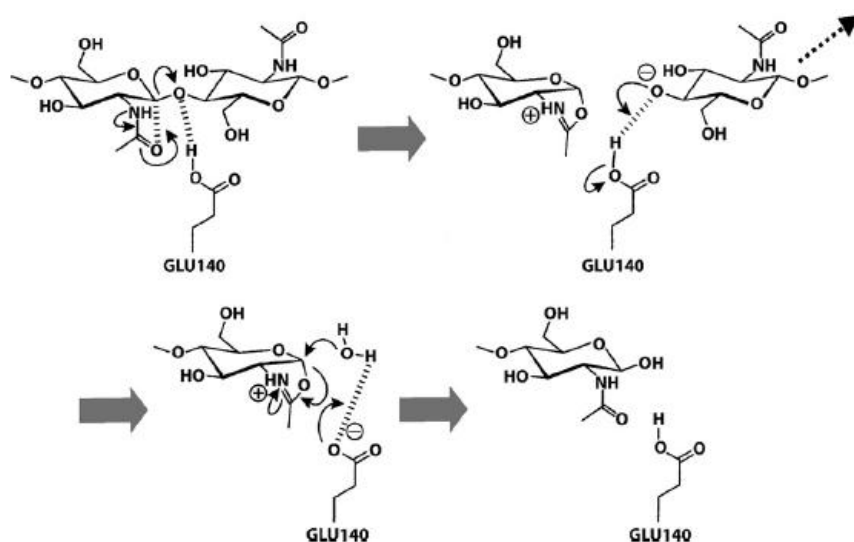


**Figur 6: Plassering av DXDXE motivet i HCHT.**

Det aktive setet hos glykosidaser er delt opp i regioner som er nummerert etter sukkerenhetene som bindes. Disse regionene kalles subseter. Subsetene nummereres fra  $-n$  til  $+n$  der  $n$  er et heltall. Residuene i et subsete reagerer med en sukkerenhet som har samme

nummerering. Nummereringen defineres ved at hydrolyse utføres mellom subsete -1 og +1. (Davies et al. 1997) Disse enzymene kutter kitinpolymeren ved hjelp av en katalytisk mekanisme der *N*-acetylgruppen i sukkeret binder -1 subsetet i det katalytiske området. Denne mekanismen fører til at kitinasene i denne familien har en absolutt preferanse for acetylte enheter i -1 subsetet. (Aguilera et al. 2003; Eide et al. 2012) Ved enzymatisk hydrolyse kuttet polymerkjeden mellom subsetene -1 og +1. Denne kuttingen avhenger av at *N*-acetyl gruppen på sukkeret binder i -1 subsetet i enzymets aktive sete. Posisjoneringen av substratet er avgjørende for hydrolyse. Dette er felles for alle GH18 kitinaser. (Sikorski et al. 2005)

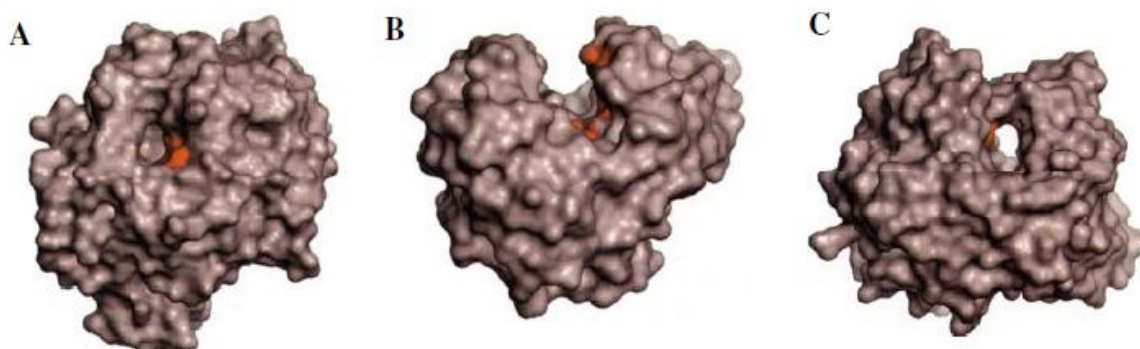
Kitinaser som tilhører GH18 bryter ned kitin ved å bevare stereokjemien til det anomere karbonatomet. Det antas at reaksjonen starter ved at -1 sukkerringen gjennomgår en konformasjonsendring fra stol til båt og den katalytiske syren protonerer glykosidoksygenet, se figur 7. Deretter er det et nukleofilt angrep av *N*-acetylgruppen på -1 sukkeret som resulterer i dannelse av et oxazoliniumion-intermediat. Hydrolyse av dette ionet avslutter reaksjonen. (van Aalten et al. 2001)



**Figur 7: Substrat-assistert mekanisme hos GH18 kitinaser. Den katalytiske syren (Glu140) protonerer substratet. *N*-acetyl oksygenatomet på substratet stabiliserer den delvis positive ladningen til det anomere karbonet. En tråd frigjøres og oxazoliniumion-intermediatet reagerer med vann, noe som gjenoppretter den originale sukkerkonformasjonen og reprotonerer Glu140. (Bussink et al. 2006)**

### 1.3.2 Endo- og eksoglykosidaser

Glykosidaser kan klassifiseres som endo- eller eksoenzymer. Endoglykosidaser kløyver det polymeriske substratet på tilfeldige steder, og eksoaktivitet defineres ved at glykosidasen kløyver substratet fra kjedens ender. (Bussink et al. 2006; Chou et al. 2006; Eide et al. 2012) Glykosidaser kan inneha aktive seter med ulike topografier, se figur 8. Noen endoaktive enzymer innehar en åpen substratbindende kløft, andre binder substratet i et krater. Enzymer med en åpen kløft tillater vilkårlig binding av flere sukker i et polysakkarid og er vanlig i polysakkaridaser som cellulaser,  $\alpha$ -amylaser og kitinaser. De fleste enzymer med kratertopologi er monosakkaridaser og ekso-polysakkaridaser der kun kjedeenden vil binde til enzymets substratbindende sete. Tunneltopologien tillater kun at enkeltkjeder tres igjennom setet, og muliggjør en prosessiv virkemåte der substratet forblir bundet til enzymet mens hydrolyseprodukter frigjøres. (Davies & Henrissat 1995)



**Figur 8: Substratbindende seter i GH18 kitinaser. Glykosidaser kan deles inn etter setets topologi: A) Krater, B) Kløft, C) Tunnel. Aktive residuer er merket røde.(Davies & Henrissat 1995)**

Ved degradering av krystallinske substrater er det endene av polysakkaridkjedene som er mest tilgjengelige og som foretrekkes av enzymene. Endoaktivitet vil derfor være vanligst blant glykosidaser på grunn av tilgjengeligheten til substratet. (Eide et al. 2012; Horn et al. 2006a)

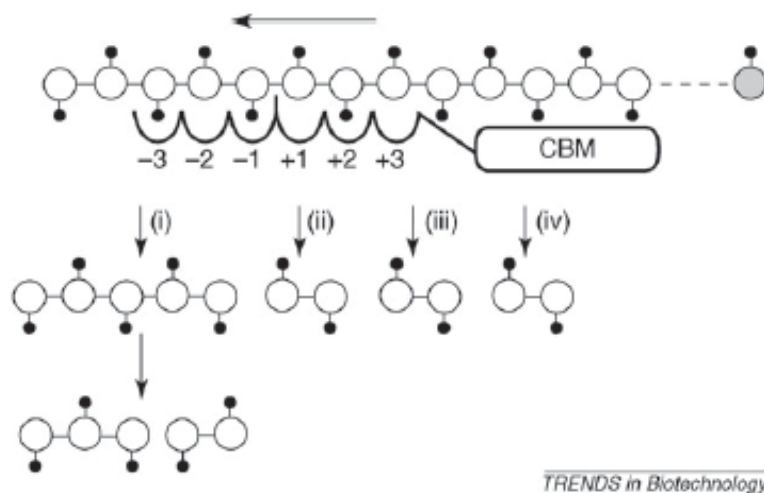


### 1.3.3 Prosessivitet

Prosessivitet er evnen til å forbli bundet til substratet etter hydrolyse har forekommet og er et fellestrekk blant mange enzymer som virker på krystallinske substrater. Assosieringen med kitinpolymeren er det hastighetsbestemmende steget i hydrolysen og prosessiv mekanisme øker enzymets effektivitet ved å øke antall hydrolytiske kutt per substrat-enzym assosiasjon. I tillegg hindrer prosessiv mekanisme re-assosiasjon av enkeltkjeder til den uløselige polymeren, noe som er ugunstig. (Eijsink et al. 2008; Zakariassen et al. 2009)

De dominerende krefter som bidrar til binding mellom protein og karbohydrat er hydrogenbindinger og hydrofobe interaksjoner mellom sukkerenhetene og aromatiske residuer i proteinet. (Sørliet et al. 2012) Prosessive enzymer har ofte lange og dype substratbindende kløfter eller tunneler som inneholder aromatiske residuer. Disse residuene, spesielt tryptofan, antas å gjøre prosessivitet mulig ved å danne en fleksibel og hydrofob duk som lar en enkelt polymerkjede gli gjennom setet samtidig som den sørger for en uspesifikk kontakt som dekker et større område. (Eide et al. 2012; Eijsink et al. 2008; Horn et al. 2006a; Sørliet et al. 2012; Zakariassen et al. 2009) Det antas at slike hydrofobe interaksjoner dermed bidrar til å holde enzymet festet til substratet i tillegg til å gi substratet evnen til å gli gjennom det aktive setet. Mutasjoner av slike aromatiske residuer i ChiA og ChiB har vist at prosessiv aktivitet nesten forsvinner. (Horn et al. 2012)

I kitin og kitosan er etterfølgende sukkerenheter rotert  $180^\circ$  i forhold til hverandre. Ved initiell binding kan første hydrolyse enten gi partall eller oddetall KOS. Ved videre nedbrytning av oddetall KOS vil en monomer tilslutt være et produkt. Under videre prosessiv hydrolyse, vil kun dimere dannes ettersom substratet må flyttes to enheter før neste produktive binding kan forekomme (figur 9). Dette medfører at prosessive enzymer vil gi et høyt dimer/monomer ratio i forhold til ikke-prosessive enzymer som har flere initielle bindinger enn prosessive enzymer. (Eijsink et al. 2008)



**Figur 9: Prosessiv nedbryting av kitin. Nummerene i-iv indikerer de første fire kutt i polymerkjeden. Den reduserende enden er farget grå, og de sorte kulene representerer N-acetylgrupper. (Eijsink et al. 2008)**

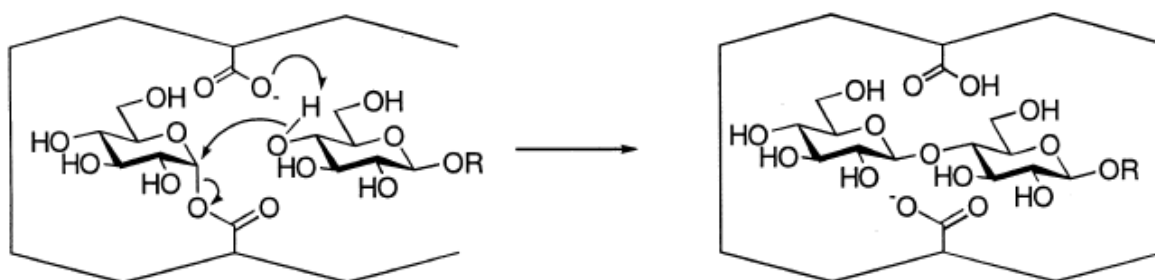
For kitosan, når et ikke-produktivt kompleks dukker opp vil et prosessivt enzym ikke dissosiere fra substratet, men fortsette til neste acetylerede enhet befinner seg i -1 subsetet. Ettersom acetylgruppene med "riktig" konfigurasjon er plassert på kun annet hvert sukker, vil det i hovedsak produseres partallsoligomerer og mengde partallsoligomerer versus oddetallsoligomerer er da også et mål på prosessivitet. (Eijsink et al. 2008)

HCHT har aromatiske residuer i subsetene +1,+2 og -3, i tillegg til aromatiske residuer i -6 og -5, og den substratbindende kløft har likheter med ChiA. HCHT antas dermed også å være prosessiv og vil bryte ned kitinkjeder fra reduserende ende, slik som ChiA. (Eide et al. 2012) Analyse av prosessivitet i HCHT påvirkes av enzymets grad av transglykosylering. HCHT er kjent for å ha relativt høy transglykosylerende aktivitet, noe som er bevist å henge sammen med en tryptofan i +2 subsetet, som er naturlig tilstede i HCHT. Dette har HCHT til felles med den hypertransglykosylerende ChiA-dobbelmutanten D313N/F396W. (Eide et al. 2012)

### 1.3.4 Transglykosylering

Transglykosylering er en enzymatisk assistert katalytisk reaksjon der en glykosidbinding erstattes med en ny. (Fukamizo 2000) Mange av GH18 kitinasene har transglykosyleringsaktivitet og kan dermed produsere oligomerer som er lenger enn initials substratet. (Zakariassen et al. 2011)

I bevarende glykosidaser oppnås hydrolyse ved at et vannmolekyl angriper intermediet ved hjelp fra den katalytiske syrens konjugerte base. (Zakariassen et al. 2011) Dette fører til frigjøring av et hydrolysert sukker. (Fukamizo 2000) Hvis enzymet derimot reagerer med en alkohol, for eksempel et sukker, vil resultatet bli transglykosylering og en ny glykosidbinding med bevaring av stereokjemi. (Williams & Withers 2000)

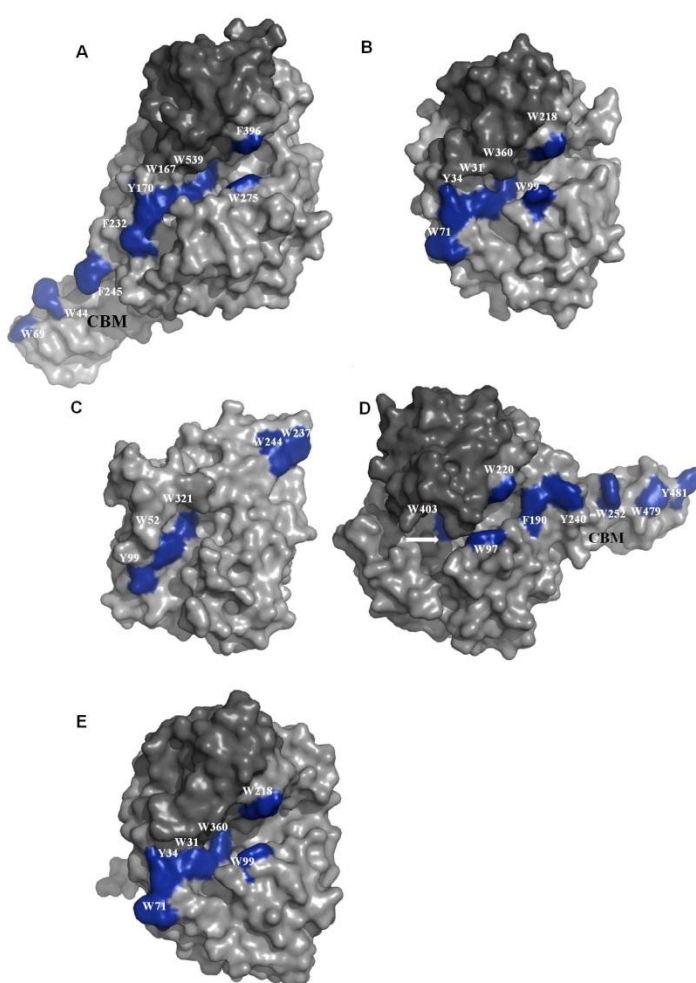


**Figur 10: Transglykosyleringsmekanisme for strukturbevarende glykosidaser. (Williams & Withers 2000)**

Transglykosylering er en kinetisk kontrollert reaksjon som krever et enzym med et aktivt sete der posisjonering av det hydrolytiske vannmolekyl er ugunstig, eller som favoriserer binding av innkommende karbohydratpolymerer. (Zakariassen et al. 2011)

## 1.4 GH18 kitinaser

Kitinaser er endo- $\beta$ -1,4-*N*-acetylglukosaminidaser som har blitt identifisert i flere organismer, og som er bevist å kunne hydrolysere kitin. (Boot et al. 1998) GH18 kitinaser kutter  $\beta$ -1,4-glykosidbindinger ved en bevarende mekanisme med  $\beta$ -anomerer som produkt. (Chou et al. 2006) Kitinase A, B og C, human chitotriosidase og acidic mammalian chitinase er alle medlemmer av denne familien.



**Figur 11: Krystallstruktur av (A) ChiA, (B) HCHT (39 kDa isoform), (C) ChiC, (D) ChiB og (E) AMCCase. Strukturene er justert etter deres konservative katalytiske sentere. De karbohydratbindende domenene til ChiA og ChiB er merket med CBM. Videre er de såkalte  $\alpha/\beta$ -domene til ChiA, ChiB, HCHT og AMCCase markert med grått. Det er disse domenene som gir enzymene dype substratbindingskløfter. Videre er taket som dannes i ChiB når substratet binder markert med en hvit pil. ChiC er et rent ikke-prosessivt endoenzym og tatt med som en sammenlikning av de tre prosessive eksoenzymene. Denne mangler en dyp substratbindingskløft og har også færre overflateeksponerte aromatiske residuer. Figuren er modifisert fra Eide et al. (2012).**

### 1.4.1 Kitinase A (ChiA) og kitinase B (ChiB)

Kitinase A og B er prosessive glykosidaser isolert fra *Serratia marcescens*. Disse deler mange karakteristiske trekk, blant annet et bredt pH optimum, temperaturoptimum mellom 50 og 60 °C og høy stabilitet. ChiB er mindre stabilt enn ChiA, men har et høyere pH optimum. (Brurberg et al. 1996) ChiA og ChiB har 32 % sekvenslikhet (Brurberg et al. 1994), og er vist å ha hemmende effekt på soppvekst under visse vilkår. (Schickler et al. 1993; Sundheim et al. 1988)

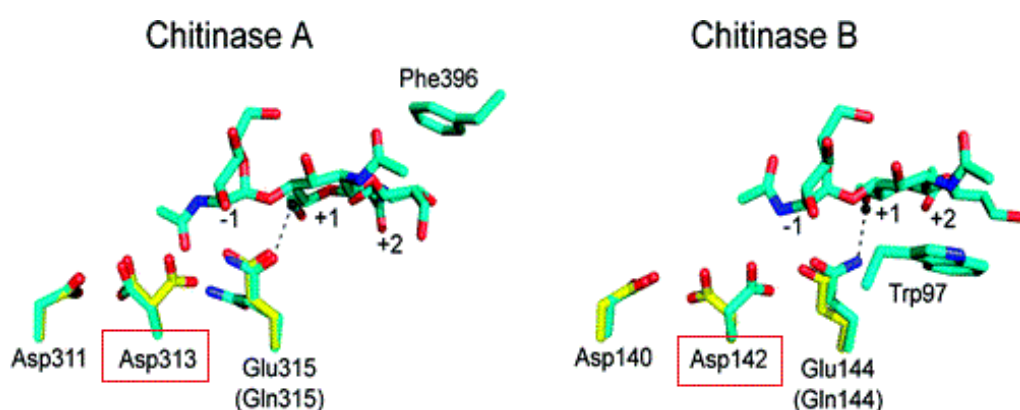
Figur 11 A og D viser at ChiA og ChiB har liknende katalytiske sentre med et konservert -1 subsete der den katalytisk aktive acetamidgruppen binder. Måten de bryter ned kitin på er derimot svært ulik. ChiA beveger seg mot den ikke-reduserende ende og frigjør produkter fra +1 og +2 subsetet, mens ChiB beveger seg i motsatt retning og frigjør produkter fra -1 og -2 subsetene. (Zakariassen et al. 2009) Begge er eksoaktive enzymer, men har vist å inneha noe endoaktivitet. (Eide et al. 2012) ChiB har et kortere aktivt sete, noe som kan tyde på at ChiB er optimalisert for å kløyve kortere KOS. Enzymet har også lavere spesifikk aktivitet mot kitin enn ChiA. ChiA finnes ekstracellulært mens ChiB er mest aktivt i periplasma. (Brurberg et al. 1996)

ChiB, som de andre enzymene i GH18, har et aktivt sete i kjernen av den kjente TIM-tønneformen. Dette enzymet inneholder et kitinbindende domene som kan interagere med den reduserende enden av substrater som strekker seg forbi subsetene i det aktive setet. (van Aalten et al. 2001) I en inaktiv mutant av ChiB vil det aktive setet vise seg med taket lukket over tunnelen i TIM-tønne når enzymet er i kompleks med substrat (figur 11 D). Sukkeret i posisjon -1 vil i tillegg bli endret fra en stolkonformasjon til en båtkonformasjon ved binding, og dette støtter teorien om den katalytiske mekanismen beskrevet i avsnitt 1.3.1. (van Aalten et al. 2001)

ChiA og ChiB er prosessive enzymer som bryter ned kitin ved å kutte av GlcNAc dimere i motsatt ende av polymeren. For ChiB har det blitt vist at det er to tryptofan-residuer i subsetene +1 og +2 som er viktige for enzymets prosessive virkemåte på kitosan. (Horn et al. 2006b) ChiA har også aromatiske residuer i disse posisjoner, men mutasjon av disse har kun vist moderat endring av prosessivitet. I ChiA er det i hovedsak en tryptofan i -3 subsetet som har innvirkning på prosessivitet. (Zakariassen et al. 2009) Denne bidrar til å styrke ryggraden i proteinkomplekset ved å interagere med substratet. Det dannes et nettverk for

intermolekylære interaksjoner som er nødvendig for gjenkjenning og posisjonering av *N*-acetylgruppen før subsete -1. Det er også funnet at tryptofan i subsete -3 er viktig for rekruttering av substrat til det katalytiske setet. (Norberg et al. 2011)

ChiA og ChiB har lite transglykosylerende aktivitet. Ved å mutere den midterste aspartatresiduen i DXDXE motivet dannes en sterk transglykosylerende mutant. Asp313/142 i henholdsvis ChiA og ChiB, interagerer med den katalytiske glutamatresiduen. Glu315(ChiA)/144(ChiB), se figur 12. Rollen Asp313/142 har i enzymet antas å være lik hos både ChiA og ChiB. Det samme antas å gjelde for resultatet av mutasjon av disse residuene. Asp313/142 har flere roller i GH18 kitinaser, den påvirker posisjonering og de nukleofile egenskapene til acetamidogruppen som er involvert i katalysen. Den interagerer også med den katalytiske syren og bidrar til stabilitet av pKa og posisjonering og aktivering av det katalytiske vannmolekylet. I tillegg bidrar den med interaksjon og stabilisering av oxazoliniumion-intermediatet. (Zakariassen et al. 2011)



**Figur 12: Nøkkelresiduer i det aktive setet hos kitinase A og B med de aktuelle residuer innrammet i rødt. (Zakariassen et al. 2011)**

To nye seterrettede mutanter ble laget for å studere effekten av affinitet for en sukkerenhet i et positivt subsete og hva denne affiniteten har å si for transglykosyleringsaktiviteten. Den allerede transglykosylerende ChiA D313N ble benyttet til å lage dobbelmutanten ChiA D313N/F396W. Mutasjonen fra fenylalanin (F) til tryptofan (W) øker den aromatiske overflaten i subsete +2. I tillegg ble mutanten ChiA D313N/F396A laget. Mutasjon fra

fenylalanin (F) til alanin (A) reduserer den aromatiske overflaten. Resultatet ble at ChiA D313N/F396W fikk økt transglykosyleringshastighet relativt til ChiA D313N, mens ChiA D313N/F396A fikk sin transglykosyleringsaktivitet drastisk redusert i forhold til ChiA D313N. Fjerning av aromatisk residue for ChiB resulterte også i redusert transglykosyleringsaktivitet. Dobbelmutanten ChiB D142N/W97A hadde mindre transglykosyleringsaktivitet enn ChiB D142N ved fjerning av aromatisk residue i subsete +1. (Zakariassen et al. 2011)

Til tross for at ChiA Asp313 og ChiB Asp142 er viktig for kitinase-katalysert hydrolyse av kitin og har sterke interaksjoner med substratet, har disse residuenes effekt på den prosessive mekanismen aldri blitt studert.

#### **1.4.2 Human Chitotriosidase (HCHT)**

Chitotriosidase i humant vev er heterogen med tanke på isoelektrisk punkt og molekylær masse. Proteinene har blitt isolert i to isoformer, sannsynligvis som et resultat av alternativ spleising under transkripsjon av chitotriosidasegenet. Den største isoformen på 50 kDa har en pI på 5,0 – 7,2, mens isoformen med en masse på 39 kDa har et isoelektrisk punkt ved pH 8,1. (Boot et al. 1998) Human chitotriosidase viser et bredt pH-optimum og blir fullstendig deaktivert ved lav pH. (Boot et al. 2001) Enzymet kan kløyve chitotriose, derav navnet chitotriosidase, men kløyver også kitin til chitobiose og antas derfor å være en eksokitinase med en bevarende mekanisme (avsnitt 1.3.2). (Fusetti et al. 2002)

Human chitotriosidase sekreteres av humane makrofager og nøytrofiler som isoformen med molekylvekt 50 kDa (Eide et al. 2012; van Eijk et al. 2005), i form av et C-terminalt kitin-bindende domene, et N-terminalt katalytisk domene på omtrent 39 kDa og en hengselsregion. (Boot et al. 2001) Makrofager i vev syntetiserer store mengder human chitotriosidase, og en stor del av produsert protein styres mot lysosomene hvor de blir spaltet til isoformen med molekylvekt 39 kDa. Denne isoformen mangler det kitin-bindende domenet (Bussink et al. 2006; Eide et al. 2012), men er vist å ha hydrolytisk aktivitet. (Boot et al. 1998) Observasjoner tyder på at de ulike isoformene av HCHT kodes av et enkelt gen, ettersom de 22 første aminosyrene i N-terminus i isoformen på 50 kDa er de samme som aminosyrene i N-terminus i isoformen på 39 kDa. (Renkema et al. 1995)

Den 39 kDa store hoveddelen består av en  $(\beta/\alpha)_8$  tønne med en dyp katalytisk kløft, som samsvarer med antatt eksoaktivitet, se figur 11 B. (Aguilera et al. 2003; Fusetti et al. 2002) Den katalytiske syren, Glu140, er lokalisert i enden av det konserverte DXDXE motivet som inkluderer tråd  $\beta_4$  av  $(\beta/\alpha)_8$  tønningen. Den substratbindende kløften i HCHT brer seg over en side av enzymet og er dekket av aromatiske residuer som dermed ligger utsatt til for løsemiddel. (Eide et al. 2012; Fusetti et al. 2002) Mutasjon av den katalytiske syren til aspartat eller leucin har blitt gjort tidligere. Forsøk viser at mutasjonen ikke påvirker evnen til å binde KOS i den katalytiske kløften (Aguilera et al. 2003), men vil påvirke evnen til å hydrolysere kitin. Det er allerede observert at HCHT også har en prosessiv mekanisme selv om denne er lavere enn det som er observert for ChiA og ChiB. I arbeidet til Eide et al. (2012) ble det spekulert i at den høye transglykosyleringsaktiviteten observert for HCHT kan skjule den reelle graden av prosessivitet (diskutert i avsnitt 5.5). Det er derfor interessant å studere sammenhengen mellom høy transglykosyleringsaktivitet og målt grad av prosessivitet.

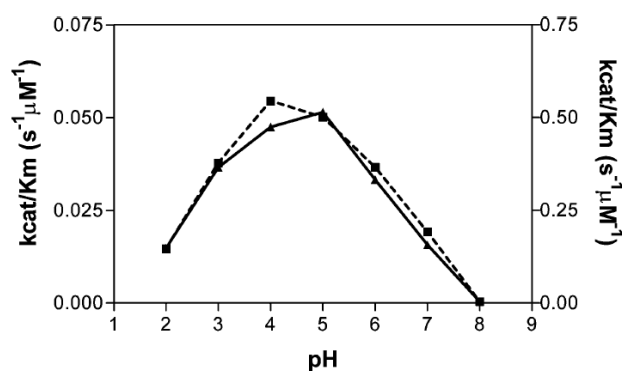
En recessivt nedarvet mangel på chitotriosidase-aktivitet har blitt påvist (Boot et al. 1998; Boot et al. 2001), og omtrent 1 av 20 viser en komplett mangel på enzymatisk aktiv chitotriosidase. (Boot et al. 2001) Disse individene har en økt sjanse for å pådra seg infeksjoner på grunn av nedsatt kitinolytisk aktivitet. (Shuhui et al. 2009) I kaukasiske populasjoner vil opptil 35 % være bærere av det inaktive allelet, mens 5 % er homozygote og vil ikke utrykke aktiv HCHT. (Boot et al. 2001; van Eijk et al. 2005) Utstrekningen av denne mangelen leder til en teori om at chitotriosidase ikke lenger har en viktig forsvarsposisjon, alternativt at andre mekanismer kan kompensere for mangel på funksjonell chitotriosidase. (Boot et al. 2001) I populasjoner sør for Sahara er det imidlertid ikke funnet noen individer som er homozygote for dette allelet, og bærere av inaktivt allel er svært sjeldent. Dette kan være et tegn på at opprettholdelse av funksjonell HCHT er nødvendig i en region der det er stor forekomst av parasittinfeksjoner. (Malaguarnera et al. 2003; van Eijk et al. 2005) Oppdagelsen av en annen human kitinase, AMCCase, kan bety at tilstedeværelse av AMCCase kan kompensere for mangel på HCHT. (Boot et al. 2001; Malaguarnera et al. 2003) Fordi HCHT er en del av det medfødte immunforsvar og er assosiert med flere sykdommer, er forskning på de mekaniske egenskaper til HCHT svært interessant. (Eide et al. 2012)



### 1.4.3 Acidic Mammalian Chitinase (AMCase)

Acidic mammalian chitinase er en av kitinasene i GH18 og anses som en komponent i astma og allergiske sykdommer. Proteinet er oppregulert i lungevev og makrofager hos astmapasienter. (Cole et al. 2010) Hemming av AMCase ved inhibitoren methylallosamidin eller AMCase-spesifikke antistoffer resulterer i dokumentert nedgang av luftveibetennelse. (Chou et al. 2006; Cole et al. 2010) AMCase gjenkjenner og hydrolyserer KOS fra den ikke-reduserende ende, i hovedsak som disakkarider. (Chou et al. 2006; Olland et al. 2009)

Det aktive setet domineres av de sure residuene i DXDXE, det kjente sekvensmotivet, der den katalytiske syren Glu140 befinner seg i enden av sekvensen. Det aktive sete er identisk hos HCHT og AMCase, men AMCase har en ekstra disulfidbinding som ikke har noen ekvivalent i HCHT, se figur 11 E. Denne bindingen fester den C-terminale region til basen i  $\beta$ -tønningen og bidrar mest sannsynlig ved å øke stabiliteten til det katalytiske domenet. (Olland et al. 2009) AMCase har et surt isoelektrisk punkt og skiller seg dermed fra HCHT som har en mer nøytral pI. AMCase i mus har to pH optimum, et ved pH 2 og et ved pH 3-6, og er ekstremt syrestabil. Human AMCase har kun et pH optimum. Dette befinner seg ved pH 4-5. Det er også kjent at proteinets aktivitet er betydelig forsterket i løsninger med høyt saltinnhold. Dette tyder på at aktivitet *in vivo* påvirkes av både pH og ionestyrke. Ingen kitinolytisk aktivitet er detektert ved pH over 8, se figur 13. (Chou et al. 2006) AMCase har lav transglykosyleringsaktivitet, men analyser tyder på at transglykosyleringsaktiviteten er høyere ved pH 2 enn ved pH 5 og 7. (Chou et al. 2006)



Figur 13 illustrerer AMCases pH profil. (Chou et al. 2006)

AMCase finnes som nevnt i store mengder i mage, tårer, sinus mucosa (slimhinner i bihulene) og i mindre mengder i lungene. (Boot et al. 2001; Eide et al. 2012) I likhet med human chitotriosidase syntetiseres AMCase som et 50 kDa protein med et C-terminalt kitinbindende domene, en hengselsregion og et N-terminalt katalytisk domene på 39 kDa. (Chou et al. 2006) AMCase sekreteres fra epitelceller og makrofager ut i luftveiene. (Donnelly & Barnes 2004) Human HCHT og AMCase har en sekvenslikhet på 57 %, og AMCase er funnet å ha to konserverte cysteinresiduer i den katalytiske kjerne. Disse finnes ikke hos HCHT. (Chou et al. 2006) Disulfidbinding mellom disse vil bidra til å hindre oppløsning av proteinstrukturen ved lav pH. (Bussink et al. 2006) To residuer nær det katalytiske setet, histidin269 (arginin269 i HCHT) og isoleucin300 (methionin300 i HCHT), gir AMCase et mer ladd aktivt sete. Histidin269 kan bidra til å senke pH optimumet til AMCase. (Sutherland et al. 2011) His187 finnes heller ikke hos HCHT (her er denne plassen fylt av en argininresidue), mens den i AMCase befinner seg svært nær det aktive sete. Dette residuet er konservert i alle AMCase. Forsøk på å erstatte den med en arginin (som originalt i HCHT) har vist at all aktivitet forsvinner ved lav pH og at proteinfoldingen ikke lenger er stabil. (Bussink et al. 2008) Det antas at ettersom de fleste substitusjonene av residuer fra HCHT til AMCase befinner seg på proteinoverflaten, vil dette være tegn på tilpassing av enzymet og ikke en forandring som påvirker proteinets reaksjonsmekanisme. De fleste substitusjonene resulterer i negativ ladning på overflaten av proteinet, noe som hjelper AMCase ved det lave pH optimum. (Bussink et al. 2008)

En triade av polare residuer er funnet å modulere det konserverte aktive setet med et nettverk av hydrogenbindinger som linker de nærliggende ladde residuene til det aktive setet. Det antas at det er residuene His208, His269 og Arg145 som er ansvarlige for enzymets lave pH optimum. Disse tre residuene finnes ikke i HCHT, men er konservert hos AMCase på tvers av arter. Dette peker mot en avgjørende rolle hos AMCase, og da sannsynligvis ved lav pH. Mutasjon av His208 til asparagin (tilsvarende plassering i HCHT) har vist at His208 har en viktig rolle i det sure pH optimum hos AMCase, og mutasjonen av histidin til asparagin har vist seg å påvirke binding til substrat. (Olland et al. 2009)

Inhibitoren allosamidin og dens variant metylallosamidin hemmer aktiviteten til AMCase ved å binde i det aktive setet og langs kløfta der kitin binder. (Cole et al. 2010) Allosamidin og metylallosamidin er pseudosakkarider og vil binde til det aktive setet i subsete -1, med festede

NAG-sukkerer som strekker seg inn i subsetene -2 og -3. (Olland et al. 2009; van Aalten et al. 2001)

Fordi human AMCCase finnes i store mengder i magesekken, har det tidligere blitt påpekt at det er lite sannsynlig at proteinets hovedrolle i magen er å spalte kitin. (Chou et al. 2006) Det lave pH optimum og motstand mot syre er ikke overraskende. Miljøet i magesekken krever slike egenskaper. (Boot et al. 2001; Bussink et al. 2007) I senere tid er det derimot blitt påvist at pusten hos mennesker med akutt astma har en pH på 5.2, mens den hos friske mennesker er 7.7. Dette styrker antakelsen om at AMCCase er en viktig aktør i patogenesen til astma og allergiske sykdommer. (Chou et al. 2006)

### **1.4.3.1 AMCCase og astma**

Astma er en kronisk betennelsessykdom som er et resultat av betennelse i luftveiene, og det er anslått at 300 millioner mennesker lider av denne sykdommen. Antallet stiger ettersom flere land blir urbanisert, og det er anslått at tallet vil nå 400 millioner innen 2025. Astmatikere krever kontinuerlig medisinsk pleie, og en nedgang i antall tilfeller vil ha stor effekt på verdensøkonomien. (Shuhui et al. 2009) Økningen i astmatilfeller i den vestlige verden er i overensstemmelse med nedgangen i infeksjoner hos barn. 'Hygienehypotesen' er et resultat av dette. Hypotesen sier at barn bør bli eksponert for potensielle allergener og infeksjoner ettersom dette beskytter mot kroniske allergiske sykdommer som astma. (Donnelly & Barnes 2004)

Luftveisbetennelse antas å være en følge av overdreven aktivitet av lymfocytiske hjelperceller. Denne hjelpercellebetennelsen ble utviklet for å kjempe mot parasitter, og det antas at astma og allergi oppstod som et resultat av dårlig kontrollerte hjelpercelleresponser. Det er funnet at slike hjelperceller stimulerer produksjon av AMCCase mRNA og protein. (Zhu et al. 2004) Forekomsten av astma har økt dramatisk i den vestre verden i løpet av de siste tiårene, og medisiner og behandlingsmetoder for denne livsstilssykdommen er svært ettertraktet. (Olland et al. 2009) Genetiske studier viser at ulike polymorfismer (genvarianter) av AMCCase kan kobles til mottakelighet for astma blant barn, noe som indikerer at medfødte og arvelige defekter i AMCCase kan ligge bak luftveisbetennelse og allergisk respons. (Bierbaum et al. 2005)

AMCase er oppregulert i astma både hos mennesker og mus, og inhibering har vist å være effektivt, noe som tyder på at AMCase kan være et viktig mål i utviklingen av nye behandlingsmetoder. AMCase er den eneste av kitinasene som settes i sammenheng med astma, selv om HCHT kobles med en rekke andre sykdommer. (Boot et al. 1998; Bussink et al. 2006; Olland et al. 2009)

#### 1.4.4 Humane kitinaser og immunforsvaret

Det humane immunforsvaret kan grovt deles inn i to hoveddeler som hver er representert med karakteristiske celler og forsvarsmekanismer. Ikke-adaptiv immunitet er medfødt og kan utøve sin funksjon umiddelbart, men vil ikke utvikles ettersom mennesket blir eldre. Elementene som tilhører medfødt immunitet vil reagere raskt mot egenskaper som er felles for mange mikroorganismer, mens adaptiv immunitet vil utvikle seg i takt med mennesket og reagere med unike strukturer som er karakteristiske for hver enkelt bakterie eller virus. (Alberts et al. 2008; Lea 2002)

Makrofager er primitive celler som representerer den medfødte delen av immunforsvaret, og har viktige oppgaver i de innledende fasene av immunresponsen. Makrofagene er fagocytter, de bryter ned partikulært materiale de ikke gjenkjenner og beskytter på denne måten kroppen fra angrep utenfra. I tillegg til å gjenkjenne egenskaper ved en rekke ulike mikroorganismer, kan de bryte ned kroppens egne skadde eller døde celler samt ødelagte proteiner. (Alberts et al. 2008; Lea 2002) Kitin stimulerer makrofager ved å interagere med reseptorer på makrofagens overflate. Disse reseptorene medierer innkapsling av kitinpartikler som skal brytes ned av lysozymer og *N*-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase. Immunitet mot slike patogene partikler avhenger i stor grad av at reseptorer på makrofager og andre celler i immunresponsen gjenkjenner partiklene. (Muzzarelli 2010)

Lymfocytter er celler som vi bare finner hos høyerestående dyr, og disse er de eneste cellene i kroppen som er utstyrt med reseptormolekyler med evne til å gjenkjenne fremmed materiale. Deres hovedoppgave er å overvåke kroppens indre miljø og settes kun i funksjon når mikroorganismer klarer å passere de ytre forsvarslinjene. (Alberts et al. 2008; Lea 2002) Lymfocytene grupperes i B og T-lymfocytter. B-lymfocytter vil videreutvikles ved binding til ukjente mikroorganismer og antistoffer mot mikroorganismen vil produseres i store

mengder. T-lymfocytter reagerer bare med fremmed materiale når dette befinner seg i membranen til andre celler, i motsetning til B-lymfocytter som kan binde til molekyler fritt i løsning. T-lymfocytterne er derfor avhengige av samarbeid med andre celletyper for å reagere. (Alberts et al. 2008; Lea 2002)

T-lymfocytterne deles ofte opp i tre hovedgrupper: cytotoksiske T-celler (T-dreperceller), T-hjelperceller og regulatoriske T-celler. T-hjelperceller virker ved å produsere signalmolekyler kalt cytokiner. Cytokiner er lavmolekylære proteiner eller glykoproteiner og fungerer som kjemiske kommunikasjonsmidler mellom celler. (Alberts et al. 2008; Lea 2002) I kronisk astma er det kjent at T-hjelperceller infiltrerer vevet i lungene og produserer betennelsesfremmende molekyler som cytokinet interleukin-13 (IL-13). T-hjelperceller spiller derfor en stor rolle i initiering og progresjon av allergiske sykdommer som astma. (Chung et al. 2012)

Den humane kitinasen AMC<sub>1</sub> er et av de viktige proteinene som er involvert i betennelsesreaksjoner medierte av T-hjelperceller og blir utpekt som en faktor i astma og allergisykdommer. (Chou et al. 2006; Elias et al. 2005) Disse funnene peker mot at astma er en antiparasittrespons uavhengig av parasittinfeksjon. (Elias et al. 2005) Det finnes også en inaktiv human kitinase som har blitt satt i sammenheng med astma. Nivået av YKL-40 er forhøyet i serum fra astmatikere og kan gi en pekepinn på en forverring av sykdommen. (Goldman et al. 2011)

AMC<sub>1</sub> er funnet oppregulert i lungevev hos pasienter med allergisk astma og har vist seg å være betydelig oppregulert i lungemakrofager fra pasienter med fatal astma. (Cole et al. 2010) Studier har også funnet at AMC<sub>1</sub> bidrar til effektorresponsen av IL-13 (Elias et al. 2005; Hartl et al. 2009; Zhu et al. 2004), og at hemming av AMC<sub>1</sub>'s aktivitet fører til en nedgang i luftveisbetennelse. (Chou et al. 2006; Zhu et al. 2004) Luftveisbetennelse kan muligens medieres av pH, da det antas at AMC<sub>1</sub>'s aktivitet avhenger av pH i luftveiene. Bruk av steroider som behandling mot astma har vist å øke pH i luftveiene og på den måten redusere AMC<sub>1</sub>'s bioaktivitet. (Zhu et al. 2004)

AMC<sub>1</sub> er oppregulert i adaptiv immunitet, mens HCHT kun er oppregulert i medfødt immunitet. (Sutherland et al. 2011) Høye verdier av HCHT i plasma kan være et tegn på Gauchers sykdom. Dette er en recessivt arvet sykdom der hydrolasen glucocerebrosidase har betydelig nedsatt aktivitet. (Hollak et al. 1994; Renkema et al. 1995) Følgene av dette er at mengder av glukolipidet glykosylceramid ikke spaltes og hopper seg opp i lysozymer i

makrofagene. Dette resulterer i forstørrede celler, også kalt Gaucher-celler, som påvirker alle organene i kroppen ved at organene forstørres og hindres i å fungere normalt. (Bussink et al. 2006)

Inhibering av humane kitinaser er av stor medisinsk interesse. Hemming av AMCase har blitt foreslått som et terapeutisk middel mot astma, men hemming av HCHT ikke vil ha den samme medisinske effekt. Tvert i mot vil inhibering av HCHT kunne ha en negativ effekt på immunforsvaret, hovedsakelig på grunn av kitinasens veksthemmende effekt på sopp. (Eide et al. 2012; van Eijk et al. 2005) Ettersom de humane kitinasene er en viktig del av det humane immunforsvaret er det interessant å studere mekanismen for hvordan disse bryter ned sine naturlige substrater. Spesielt er grad av prosessivitet viktig siden assosiering med det uløselige substratet er det hastighetsbestemmende trinnet i kitinhydrolysen. En prosessiv mekanisme gjør at flere kutt kan foretas per assosiasjon i forhold til et ikke-prosessivt enzym. I så henseende er det meget interessant å observere at både AMCase og HCHT har de samme residuene som har visst seg å være essensielle for prosessivitet i henholdsvis ChiA (subsite -3) og ChiB (subsite +1). Det er derfor meget interessant å bestemme hvilke residuer som er viktig for prosessivitet i AMCase og HCHT.

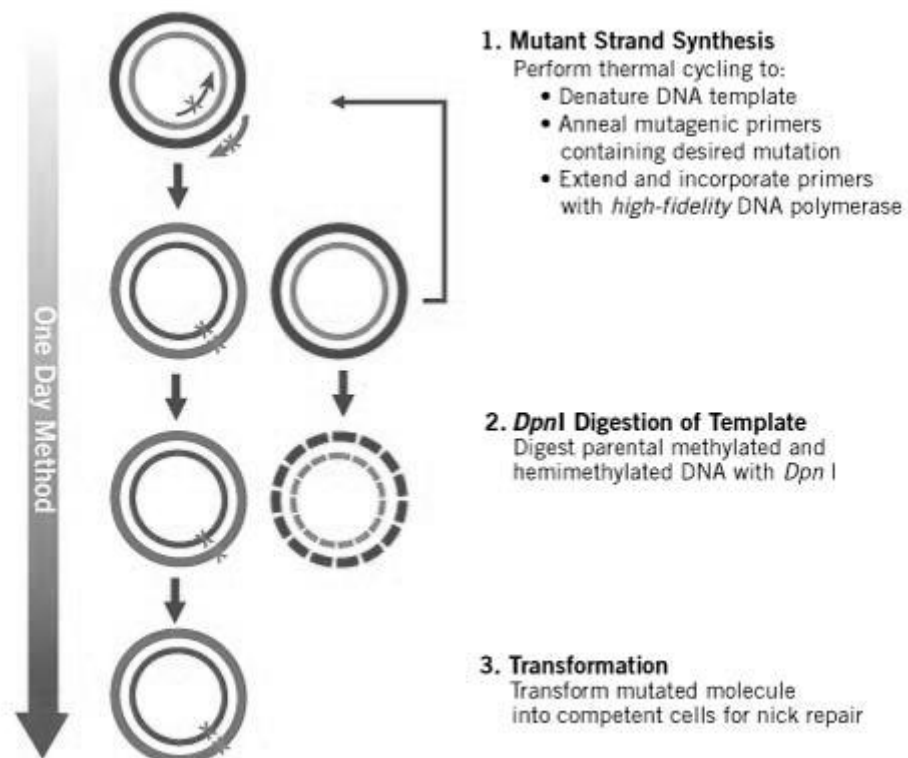
## 1.5 Seterettet mutagenese

*In vitro* seterettet mutagenese er en kloningsteknikk som gir forskeren mulighet til å studere forholdet mellom struktur og funksjon i proteiner, uttrykke gener og til å modifisere vektorer til ønsket bruk. (Agilent Technologies 2005) Polymerase chain reaction (PCR) er en metode som blir mye brukt til å oppamplifisere DNA. Metoden komplementerer kloning ved at samme resultat blir oppnådd, men på kortere tid og med mindre manipulasjoner, og uten bruk av vertsceller. En begrensning ved PCR er dog at det er nødvendig med informasjon om sekvensen som skal amplifiseres. (Klug et al. 2007) Setespesifikk mutasjon i et dobbeltrådet plasmid krever ingen spesialiserte vektorer, unike restriksjonsseter eller multiple transformasjoner, kun plasmid DNA. Det kan lages punktmutasjoner, aminosyrer kan byttes ut og slettes, eller enkelte eller flere aminosyrer kan settes inn. Figur 14 viser de generelle trinn i prosedyren.

Proseduren tar i bruk en dobbeltrådet DNA (dsDNA) vektor i tillegg til to syntetiske oligonukleotid primere som begge inneholder ønsket mutasjon og som er komplementære til motsatte tråder i vektoren. (Agilent Technologies 2005) Gjennom en serie reaksjoner vil en PCR-reaksjon produsere mange kopier av en spesifikk DNA-sekvens. Mengden klonet DNA er avhengig av hvor mange ganger trinnene i reaksjonen blir repetert. (Klug et al. 2007) Første trinn er å denaturere det DNA man vil oppamplifisere. Dette gjøres ved høy temperatur og fører til at dobbeltrådet DNA (dsDNA) blir enkeltrådet DNA (ssDNA). Neste trinn skjer ved senket temperatur, og fester primere til det denaturerte DNAet slik at enzymet som skal forleng primere har et startpunkt. Siste trinn i reaksjonen er tilsetning av DNA polymerase, et enzym som forlenger primerne ved å bygge nukleotider i 5' - 3' retning og på denne måten danner en dobbeltrådet kopi av DNAet. (Klug et al. 2007) Lengden av det siste trinnet avhenger av hvor stort DNA man vil kopiere, og avhengig av hvor mye DNA man ønsker å oppnå, gjentas disse tre trinnene et bestemt antall ganger. (Klug et al. 2007)

Maskinen som utfører PCR-reaksjonen kalles en 'thermocycler.' Denne kan stilles inn slik at reaksjonen går automatisk gjennom en syklus av ulike temperaturer som er optimale for polymerasens aktivitet. Denne forlengingen danner et mutert plasmid som har "nicks" i tråden. Etter fullført forlenging blir plasmidet fordøyd av et enzym som kutter DNA templatet og selekterer for syntetisert DNA som inneholder mutasjon (se figur 14). Vektoren blir så

transformert inn i ønskede celler. (Agilent Technologies 2005) *Escherichia coli* er en vanlig vertscelle.

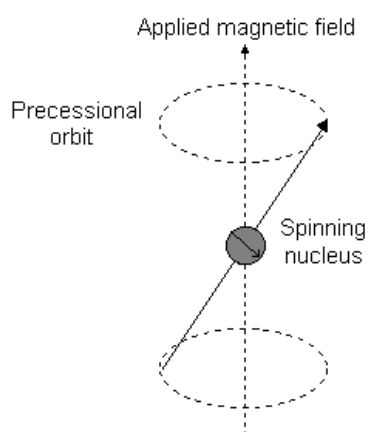


**Figur 14: Ulike trinn i seterrettet mutagenese , hentet fra mutagenesekitets medfølgende prosedyre. (Agilent Technologies 2005)**



## 1.6 Kjernemagnetisk resonans (NMR)

Kjernemagnetisk resonans er en form for absorpsjonsspektroskopi, og brukes blant annet for å identifisere og oppklare strukturen til ukjente organiske stoffer i et løsemiddel. Prinsippet for NMR spektroskopi er at en del atomkjerner, i tillegg til masse og ladning, har et spinn. Siden den spinnende kjernen er ladet vil den også ha et magnetisk moment. (Anthonsen 1979) Når den ladede kjernen spinner rundt sin egen akse dannes en magnetisk dipol med et moment som beskrives med et spinn-tall, se figur 15. Kjerner der atommassen er et partall og atomnummeret enten er partall eller oddetall er magnetiske og dermed godt egnet for NMR. Eksempler på slike kjerner er  $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  og  $^{19}\text{F}$ .  $^1\text{H}$  og  $^{13}\text{C}$  er de mest brukte NMR-variantene og har spinn-tall på  $\frac{1}{2}$ . (Williams & Fleming 2008)



**Figur 15: Ladd kjerne med spinn danner en magnetisk dipol. (Sheffield University 2012)**

Når kjernene utsettes for et sterkt magnetisk felt, vil de orientere seg med eller mot feltet. Kjernene vil eksiteres til en høyere energitilstand og resonans oppstår. Når magnetfeltet fjernes returnerer så kjernen til den opprinnelige energitilstanden og det sendes ut energi. Feltet vil sendes ut i pulser, og NMR-spekteret dannes på bakgrunn av energien som frigjøres og kan gi informasjon om type kjerne, stereokjemi og kjernens omgivelser. (Williams & Fleming 2008)

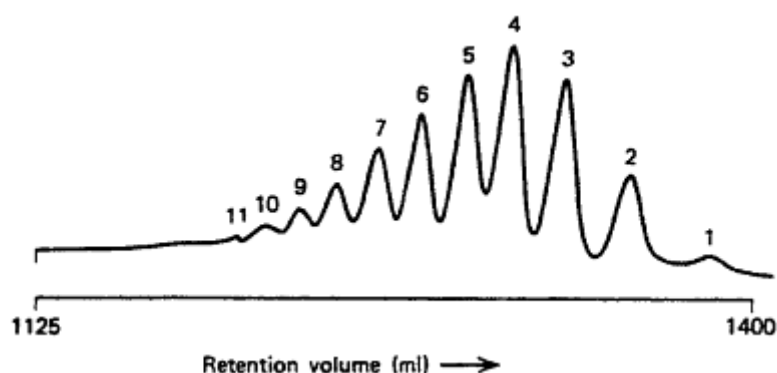
### 1.6.1 $^1\text{H}$ -NMR

$^1\text{H}$ -NMR, også kjent som proton NMR, er en variant av NMR der det er hydrogenkjernene som påføres magnetfeltet og bidrar til strukturoppklaring. Proton NMR egner seg til både organiske og uorganiske forbindelser, samt kvalitativ og kvantitativ analyse. Tetrametylsilan (TMS) blir ofte brukt som referanse i  $^1\text{H}$ -NMR og egner seg godt til dette fordi den gir en skarp topp ved et høyt skift som gjør den lett å identifisere. I tillegg er TMS lite reaktiv. (Hart et al. 2007) TMS settes som referansepunkt med et kjemisk skift på 0. (Hoffman 2003) Det kjemiske skiftet uttrykkes som fraksjon av påført felt i parts per million, p.p.m. Kjernens posisjon oppgis som et kjemisk skift, og måles i forhold til TMS. TMS får en p.p.m-verdi på 0. De fleste forbindelser vil da få et positivt kjemisk skift fordi de gir signaler ved lavere felt enn TMS. De fleste organiske forbindelser vil karakteriseres ved kjemiske skift fra -4 til 12 p.p.m, men ulike kjemiske grupper har ulike kjemiske skift. Koblinger vil beskrive interaksjoner mellom protoner. Dette fører til splitting av signaler og nyttig informasjon om antall naboatomer og beliggenhet. I et  $^1\text{H}$ -NMR spekter er absorpsjonen av signalet proporsjonalt med antall protoner som oppnår resonans ved en påført frekvens, som resulterer i at arealet under toppen er proporsjonalt med antall protoner som detekteres. (Williams & Fleming 2008)

$^1\text{H}$ -NMR er et godt redskap for analyse av sukkerpolymerer. Det er en enkel og rask metode som egner seg godt til analyse av acetyleringsgrad og spaltningsgrad. (Liu et al. 2011; Zakariassen et al. 2009) Spaltningsgraden ( $\alpha$ ) beskriver fraksjon av kuttete glykosidbindinger. (Eide et al. 2012) Ved hjelp av polymerens integrerte spekter kan acetyleringsgrad ( $F_A$ ), polymeriseringsgrad ( $DP_n$ ) og spaltningsgrad ( $\alpha$ ) bestemmes.

## 1.7 Størrelseseksklusionskromatografi (SEC)

Størrelseseksklusionskromatografi er en kromatografisk teknikk der løsninger separeres etter størrelse. SEC-systemet består av en kilde med mobilfase, en pumpe, separasjonskolonner koblet i serie, en fraksjonssamler og en detektor. I tillegg vil en datamaskin samle data fra detektoren i et eget program. Kolonnene er pakket med en stasjonærfase bestående av porøst materiale med en bestemt porestørrelse, og molekylene som skal separeres vil retarderes i ulik grad avhengig av størrelse, se figur 16. Store molekyler vil ikke retarderes overhodet og elueres ut i en egen voidtopp. (Greibrokk et al. 1998)



**Figur 16:** SEC separasjon av oligomerer, mindre molekyler elueres sist. (Miller 2005)

Oligomerene vil detekteres av en RI-detektor (brytningsindeksdetektor) som egner seg godt til forbindelser som ikke kan detekteres av fluorometriske, UV-, eller elektrokjemiske metoder. (Greibrokk et al. 1998) Eksempler på slike forbindelser inkluderer biopolymerer, organiske syrer, lipider og karbohydrater.

## 1.8 Mål med oppgaven

Både human chitotriosidase (HCHT) og acidic mammalian chitinase (AMCase) uttrykkes av forsvarsceller i det humane immunforsvaret. Selv om deres biologiske funksjon er kartlagt har de roller i flere sykdommer.

Hovedmålet med denne oppgaven er å undersøke grad av prosessivitet og faktorer som påvirker dette i humane og bakterielle kitinaser. De humane kitinasene HCHT og AMCase, samt ulike mutanter av disse skal uttrykkes og isoleres. Hvis mulig skal enzymene brukes til å bryte ned kitosan og kitin, og produktene skal analyseres ved  $^1\text{H-NMR}$  og SEC. Aktuelle mutanter i humane kitinaser befinner seg i det aktive setet, og disse er valgt for å undersøke hvilken effekt de aromatiske residuene her har på enzymets prosessivitet. Ved å mutere ulike residuer nær og i det aktive setet, kan en eventuell endring i prosessivitet måles. Det er også interessant å se på forskjeller mellom HCHT og AMCase når det gjelder prosessivitet, da HCHT har høy og AMCase har lav transglykosyleringsaktivitet.

Bakterielle kitinaser hvor det viktige midtresiduet Asp i DXDXE motivet er mutert skal dyrkes opp og renses, deretter skal de brukes til å bryte ned kitosan. Nedbrytningsproduktene skal analyseres ved  $^1\text{H-NMR}$  og SEC for å se hva slags effekt mutasjonen har på grad av prosessivitet.

## 2. MATERIALER

### 2.1 Laborieutstyr

<i>Laborieutstyr</i>	<i>Spesifikasjon</i>	<i>Leverandør</i>
Autoklavteip	13mm	SteriKing
Automatpipetter	Finnpipette	Thermo Scientific
Avtrekkskap	mc6	Waldner
Cryorør	2 ml	Sarstedt
Blåkorkflasker		Boro, VWR, SCHOTT
Bordrister	Swip	Edmund Bühler
Dialyseslange kitosan	Spectra/Por® Membrane, 8 ml/cm, MWCO 6-8000	Spectrum Laboratories, Inc.
Dialyseslange protein	SnakeSkin™ 3.7ml/cm, 10000 MWCO	Thermo Scientific
Dialyseklemmer	55mm	Spectrum Laboratories, Inc.
Diverse glassutstyr		Schott-Duran, Boro, VWR
Dyrkningsflasker, baffeled	250 ml, 1 L, 2 L	Nalgene
<u>Elektroforeseutstyr:</u>		
Gelkjøringskammer	Novex Mini-Cell, XCell SureLock	Invitrogen
Spenningskilde	250V	VWR
Eppendorfrør	1,5 ml	Plastibrand, Axygen
Filter	Steritop 0,22µm Stericup 0,40µm	Milipore Milipore
<u>Fotoutstyr:</u>		
Gelfotosystem	GSF1000	Techtum Lab ab
Lyskilde		Kilab AS
UV Transluminator		UVP, inc.
Fluorometer protein	Qubit™ Fluorometer	Invitrogen
Frysetørker	ALPHA 2-4 LD Plus	CHRIST
HIC-kolonne	XK16	Amersham Biosciences
Inkubator	Multitron Standard	Infors
Inokuleringsnål m/øye		Sarstedt
<u>Ionebytterkolonner:</u>		
	HiTrap CM FF 5 ml	GE Healthcare
	HiTrap SPXL 5 ml	GE Healthcare
	HiTrap OctylFF 5 ml	GE Healthcare

	HiLoad® SP Sepharose	GE Healthcare
Kanyler	0,8 x 40mm	BD Microlance
Kyvette Fluorescens	10mm, kvarts	QS
Magnetrører	Magnetic stirrer	www.labworld-online.com
Merketeip		TimeMed Labeling Systems, Inc.
Microvekt	Extend ED2245	Sartorius
Nitrilhansker		VWR
NMR	Oxford NMR 300	Varian
NMR-rør	WILMAD®, 5mm, 7" lengde	Sigma-Aldrich
Nuncrør	Cellstar® 10 ml, 50 ml	Greiner bio-one
Oppkonsentrator	Amicon 8400	Milipore
Oppkonsentratorfilter	10000 MWCO	Sigma-Aldrich
Oppkonsentratorrør	Ultra-15, 10 kDa	Sigma-Aldrich
	Vivaspin 6, Vivaspin 20, 10kDa	GE Healthcare
Pasteurpipetter glass	230mm	VWR
PCR	Doppio	VWR
Petriskåler		Heger
pH-meter	Seven Easy	Mettler Toledo
Pipettespisser	0,5 µl - 10 ml	VWR, Thermo Scientific
<u>Proteinrensesystem:</u>		
Pumpe	BioLogic LP	Bio-Rad
Risteinkubator bord	Thermomixer Comfort	Eppendorf
Spektrofotometer DNA	ND-1000	NanoDrop®
<u>SEC:</u>		
Pumpe	HiLoad pump P-50	GE Healthcare
Detektor	133 Refractive Index Detector	Gilson
Fraksjonssamler	Superfrac	Pharmacia
Kolonner	HiLoad 26/60Superdex, Prepgrade	GE Healthcare
Sentrifuger	Avanti J-25	Beckman
	1 - 14	Sigma
	CS-6R Centrifuge	Beckman
	5430R	Eppendorf
Sentrifugerør Avanti J-25	250 ml, 450 ml	Nalgene
Sentrifugerotor Avanti J-25	JA-10, JA-14	Beckman
SpeedVac	ThermoSavant SPD2010	Thermo
Sprøyter	1 ml, 2 ml, 5 ml	BD Plastipak
Sprøytefilter	0,22 µm, 0,45 µm	Sarstedt
Sterilbenk	AV-100	Telstar
Vannbad	OLS200	Grant

Vekt	Basic	Sartorius
	Extend ED2245	Sartorius
Vortex	VortexGenie 2	Scientific Industries
	MS2 Minishaker	IKA
Qubit™ assayrør		Invitrogen

## 2.2 Kjemikalier

<i>Kjemikalie</i>	<i>Leverandør</i>
4-methylumbelliferyl-D-N,N'-diacetylchitobiose	Sigma-Aldrich
4-methylumbelliferone	Sigma-Aldrich
Acetonitril	Sigma-Aldrich
Agar	Merck
Ammoniumacetat	Merck
Ammoniumsulfat	Sigma-Aldrich
Bacto™ Peptone	BD
Bacto™ Tryptone	BD
Bacto™ Yeast Extract	BD
Biotin	Sigma-Aldrich
Coomassie® Brilliant Blue R-250	Bio-Rad
D(+)-Saccharose	VWR
Dekstrose	Sigma-Aldrich
Destillert vann	VWR
Deuteriumklorid	Sigma-Aldrich
Deuteriumoksid	Aldrich, CDN Isotopes
Di-kaliumhydrogenfosfat	AppliChem
Di-natriumhydrogenfosfat	Merck
Eddiksyre	sds
Etanol	Arcus
Etanolamin	Merck
Glyserol	Fluka
Glysin	VWR
Helium	Yara Industrial AS
Hydrogenklorid	AppliChem
Isopropanol	A/S Vinmonopolet
Kaliumdihydrogenfosfat	Merck
Kaliumhydroksid	Sigma
Kitin (fra krabbe, practical grade)	Sigma-Aldrich
Metanol (HPLC Grade)	Merck



MOPS SDS Runningbuffer	Aldrich
Natriumdeuteriumoksid	Merck
Natriumdihydrogenfosfat	Merck
Natriumhydroksid	VWR
Natriumklorid	Sigma-Aldrich
Natriumacetat	Sigma-Aldrich
NEB1 Buffer	New England Biolabs
NuPAGE® Samplebuffer (4x)	Invitrogen
NuPAGE® Sample reducing agent (10x)	Invitrogen
SeaKem® LE Agarose	Lonza
Trizma base	Sigma-Aldrich
Yeast Nitrogen Base med ammoniumsulfat, uten aminosyrer	Invitrogen

## 2.3 Enzymer, substrater og proteiner

<i>Enzym/Protein</i>	<i>Leverandør</i>
Bovine Serum Albumin (BSA) purified 100x, 10 mg/ml	New England Biolabs
Alkaline phosphatase calf intestinal (CiAP)	New England Biolabs
Kitosan:	Selvlaget (kitin fra Sigma-Aldrich)
FA = 0,63	
FA = 0,39	
SacI restriksjonsenzym	New England Biolabs
Pepperrot peroksidase	New England Biolabs

## 2.4 Medier

### 2.4.1 Selvlagde medier

#### *BMGY – Buffered Glycerol-complex Medium*

- 10 g Bacto™ Yeast Extract
- 20 g Bacto™ Tryptone
- 700 ml dH<sub>2</sub>O
- Autoklaveres
- Tilsettes deretter:
  - 100 ml 10x Glycerol
  - 100 ml 10x YNB
  - 100 ml 1 M Kaliumfosfatbuffer
  - 2 ml 500x Biotin
- Oppbevares ved 4 °C

#### *BMMY – Buffered Metanol-complex Medium*

- 10 g Bacto™ Yeast Extract
- 20 g Bacto™ Tryptone

- 700 ml dH<sub>2</sub>O
- Autoklaveres
- Tilsettes deretter: 100 ml 10x Metanol  
100 ml 10x YNB  
100 ml 1M Kaliumfosfatbuffer  
2 ml 500x Biotin
- Oppbevares ved 4 °C

*Luria-Bertani (LB) medie*

- 10 g Bacto™ Yeast Extract
- 20 g Bacto™ Tryptone
- 10 g NaCl
- 1000 ml dH<sub>2</sub>O
- Ved laging av LB til agarplater tilsettes 15 g agar
- pH-justeres til pH 7 med NaOH
- Autoklaveres
- Oppbevares ved romtemperatur
- Antibiotika tilsettes før bruk

*YPD – Yeast Extract Peptone Dextrose medium*

- 10 g Bacto™ Yeast Extract
- 20 g Bacto™ Peptone
- 900 ml dH<sub>2</sub>O
- Autoklaveres
- Tilsettes deretter: 100 ml 10x Dekstrose
- Oppbevares ved romtemperatur

*MD – Minimal Dextrose medium*

- 15 g agar

- 800 ml dH<sub>2</sub>O
- Autoklaveres
- Tilsettes deretter:
  - 100 ml 10x YNB
  - 100 ml 10x Dekstrose
  - 2 ml 500x Biotin
  - 2,5 ml 100 mg/ml Geneticin

### 2.4.2 Ferdiglagde medier

*SOC-medium* (Multi-Copy *Pichia* Expression Kit, Invitrogen)

### 2.5 Celler

<u>Celler</u>	<u>Leverandør</u>
KM71 <i>Pichia pastoris</i>	Invitrogen
BL21 Star ( <i>E.coli</i> )	Life Technologies
XL1-Blue Superkompetente celler ( <i>E.coli</i> )	Agilent Technologies

### 2.6 Kit

<u>Kit</u>	<u>Leverandør</u>
<b>Nucleospin® Extract II PCR Clean up and Gel Extraction</b>	Macherey-Nagel

- Binding buffer NT
- Wash buffer NT3
- Elution buffer NE

**Pichia EasyComp™ Transformation Kit**

Invitrogen

- Solution I
- Solution II
- Solution III

**E.Z.N.A.™ Plasmid Miniprep Kit I**

Omega BIO-TEK

- Solution I
- Solution II
- Solution III
- Equilibration buffer
- HB buffer
- DNA wash buffer
- RNase A
- Elution buffer

**Quant-IT™ Protein Assay Kit 0.25-5 µg**

Invitrogen

- Protein reagent
- Protein buffer
- BSA protein standards 0-500ng/µl

**QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit**

Agilent Technologies

- 10x Reaksjonsbuffer
- DpnI
- pWhiteScript4.5 Ctl Temp
- dNTP mix
- Pfu Ultra,
- Control Primer #1 og #2

## 2.7 Buffere og løsninger

### Stockløsninger til *P. pastoris*:

- 10x YNB (yeast nitrogen base without amino acids)
  - 15,5 g i 110 ml dH<sub>2</sub>O
  - Sterilfilteres, oppbevares ved 4°C
  
- 10x D (20% Dekstrose)
  - 200g i 1L dH<sub>2</sub>O
  - Sterilfilteres, oppbevares ved 4°C
  
- 10x M (10% Metanol)
  - 5 ml metanol i 95 ml dH<sub>2</sub>O
  - Sterilfilteres, oppbevares ved 4°C
  
- 10x GY (10% Glyserol)
  - 23 ml 87% Glyserol i 177 ml dH<sub>2</sub>O
  - Autoklaveres
  
- 1M Kaliumfosfatbuffer, pH 6
  - 132 ml 1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - 868 ml 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - pH justeres med fosforsyre/KOH
  - Autoklaveres

### Buffere til rensinger:

- 0.05 M Natriumacetat, pH 4.2 og pH 6.8
  - 6,8 g natriumacetat i 1000 ml dH<sub>2</sub>O
  - pH justeres med NaOH/CH<sub>3</sub>COOH
  
- 0.05 M NaAc, pH 5 + 150 mM NaCl

- 6.8 g NaAc
  - 8,76 g NaCl
  - dH<sub>2</sub>O til 1L
  - pH justeres med CH<sub>3</sub>COOH
- 4 M CH<sub>3</sub>COOH
    - 235 ml konsentrert CH<sub>3</sub>COOH
    - dH<sub>2</sub>O til 1L
- 20 mM CH<sub>3</sub>COOH
    - 25 ml konsentrert eddiksyre i 975 ml dH<sub>2</sub>O
- 40 mM Etanolamin, pH 9.4
    - 80 ml 0.5M Etanolamin i 920 ml dH<sub>2</sub>O
    - pH justeres med HCl
- 40 mM Etanolamin + 1 M NaCl
    - 80 ml 0,5M Etanolamin i 920 ml dH<sub>2</sub>O
    - 58,44 g NaCl
    - pH justeres med HCl
- 1 M Tris-HCl, pH 8
    - 121,1 g Trizma base i 800 ml dH<sub>2</sub>O
    - pH justeres med HCl
    - dH<sub>2</sub>O til 1L
- 3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
    - 198,21 g ammoniumsulfat i 500 ml dH<sub>2</sub>O
- 20 mM Tris-HCl, pH 8 + 0,5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
    - 20 ml 1M Tris-HCl
    - 166,7 ml 3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
    - dH<sub>2</sub>O til 1L

- 20 mM Tris-HCl, pH 8 + 4 % Isopropanol
  - 20 ml 1M Tris-HCl
  - 40 ml Isopropanol
  - dH<sub>2</sub>O til 1L
  
- 0.3 M NaOH
  - 12,6 g i 1000 ml dH<sub>2</sub>O
  
- 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 20 mM TrisHCl
  - 333,3 ml 3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
  - 20 ml 1M Tris-HCl
  - dH<sub>2</sub>O til 1L
  
- 50 mM Tris-HCl, pH 8
  - 6,06 g Trizma base i 800 ml dH<sub>2</sub>O
  - pH justeres med HCl
  - dH<sub>2</sub>O til 1L
  
- 50 mM Tris-HCl + 1 M NaCl, pH 8,5
  - 6.06 g Trizma base i 800 ml dH<sub>2</sub>O
  - 58,44 g NaCl
  - pH justeres med HCl
  - dH<sub>2</sub>O til 1L

Løsninger til Western blot:

- TBS (tris buffered saline), pH 7.6
  - 8 g NaCl
  - 20 ml 1M TrisHCl, pH 7.6
  - dH<sub>2</sub>O til 1L
  - pH justeres med HCl



- Transfer buffer
  - 3,03 g Tris
  - 14,4 g glycin
  - 200 ml methanol
  - 1 ml SDS 10 %
  - dH<sub>2</sub>O til 1L
  
- Vaskebuffer (TBS-T)
  - 1 ml Tween 20
  - 999 ml dH<sub>2</sub>O
  
- Blokkeringsbuffer
  - 20 ml TBS-T
  - 1 g fettfri tørrmelk

Diverse:

- Spheroplastbuffer:
  - 100 ml 1 M Tris-HCl, pH 8.0
  - 171 g sukrose
  - 1 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0 (etylendiamintetraacetat)
  - 2 ml PMSF (fenylmetylsulfonyl fluorid, serin proteasehemmer)
  - dH<sub>2</sub>O til 1L
  
- Fargeløsning SDS:
  - 0.25g Coomassie Brilliant Blue
  - 62,5 ml 100 % metanol
  - 25 ml konsentrert eddiksyre
  - 162,5 ml dH<sub>2</sub>O

- Avfargingsløsning SDS:
  - 5 ml 100 % metanol
  - 5 ml konsentrert eddiksyre
  - 490 ml dH<sub>2</sub>O
  
- McIlvain buffer, pH 5.2:
  - 23,3 ml 0.1 M sitronsyre
  - 26,7 ml 0.2 M natriumfosfat
  - dH<sub>2</sub>O til 100 ml
  - pH justeres med fosforsyre/NaOH
  
- Glycin/NaOH buffer, pH 10.6:
  - 50 ml 0.3 M Glycin
  - 45,5 ml 0.3 M NaOH
  - dH<sub>2</sub>O til 200 ml

## 2.8 Antibiotika

<u>Antibiotikum</u>	<u>Leverandør</u>
Geneticin 50 mg/ml	Gibco
Ampicillin sodium salt	Sigma

## 2.9 Molekylvektsmarkører

<u>Markør</u>	<u>Leverandør</u>
DNA Ladder 1 kb	New England Biolabs
BenchMark™ Protein Ladder	Invitrogen

## 2.10 Kromatografikolonner

<i>Kolonne</i>	<i>Spesifikasjon</i>	<i>Leverandør</i>
HiTrap CMFF	Svak kationbytter	GE Healthcare
HiTrap OctylFF	Hydrofob interaksjon	GE Healthcare
HiTrap SPXL	Sterk kationbytter	GE Healthcare
HiTrap QXL	Sterk anionbytter	GE Healthcare
HiLoad® SP Sepharose	Sterk kationbytter	GE Healthcare
Kitinkuler		New England Biolabs
Phenyl Sepharose	Hydrofob interaksjon	GE Healthcare
HiLoad 26/60Superdex™	Dekstran/agarose, 34µm	GE Healthcare

## 2.11 Programvare

<i>Bruksområde</i>	<i>Programvare</i>
Rensing av protein	LP Data View
NMR	VnmrJ
SEC	Advantec Adamview
Sekvensering	CLC DNA Workbench

## 3. METODER

### 3.1 Tillaging av plasmid

For å lage mutantene som skal karakteriseres i denne oppgaven behøves det villtype (WT) plasmid for genet som skal muteres, i tillegg til primere for den ønskede mutasjonen. Genet som koder for HCHT og AMCase WT var bestilt tidligere. Genet har blitt kuttet ut av en pPUC57-vektor og ligert sammen med en pPIC9K-vektor. Denne vektoren har blitt kuttet med et restriksjonsenzym slik at ønsket gen ble inkorporert i leserammen for sekresjonssignalet. pPIC9K-vektoren med AMCase WT har så blitt transformert inn i *Esterichia coli* TOP10-celler og lagret ved -80 °C.

For å utføre de ulike forsøkene og kunne sammenlikne ulike mutanter, var det nødvendig å lage plasmider for de ønskede mutanter. Disse skal brukes til å uttrykke muterte proteiner. De ønskede plasmidene er HCHT W99A og W31A, i tillegg til AMCase W31A. Disse må lages ved bruk av de respektive villtyper. HCHT WT, AMCase WT og AMCase W99A hadde gruppen allerede tilgang til.

#### 3.1.1 Seterettet mutagenese

For å utføre seterettet mutagenese og lage de plasmidene som er nødvendig for utførelsen av denne oppgaven, ble det brukt et kit fra Agilent Technologies, *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit*. Manualen fra Agilent Technologies ble fulgt under mutagenesen.

Prosedyren tok i bruk en supercoilet dobbeltrådet DNA (dsDNA) vektor, i tillegg til to syntetiske oligonukleotid primere som begge inneholder ønsket mutasjon og som er komplementære til motsatte tråder i vektoren. Primerne ble forlenget ved hjelp av *PfuUltra* HF DNA polymerase ved en syklus av ulike temperaturer som er optimale for polymerasens aktivitet. Denne forlengingen dannet et mutert plasmid som hadde "nicks" i tråden, og etter fullført forlenging ble plasmidet kuttet av endonukleasen *DpnI*. *DpnI* kuttet DNA templatet og

selekterer slik for syntetisert DNA som inneholder mutasjoner. Vektoren ble deretter transformert inn i XL1-Blue superkompetente *E.coli* celler som reparerer nicksene' i vektoren (Agilent Technologies 2005).

### 3.1.2 Design av primere

For å mutere villtypeplasmidet behøves to promotere med ønsket mutasjonsekvens. Disse er komplementære, og vil sikre en korrekt mutasjon i villtypeplasmidet. Primere til den seterrettede mutagenesen ble bestilt av stipendiat Linn Wilhelmsen fra Invitrogen/Life Technologies.

**Tabell 3.1.2.1: Primersekvenser til ønskede mutasjoner, mutert kodon er markert rødt.**

Ønsket primer	Sekvens
<b>HCHT W31A forward</b>	5' GCTACTTCACTAAC <b>GCG</b> GCTCAATATAGAC 3'
<b>HCHT W31A revers</b>	5' GTCTATATTGAGC <b>CGC</b> GTTAGTGAAGTAGC 3'
<b>HCHT W99A forward</b>	5' GCTATTGGTGGAA <b>GCG</b> AACTTTGGAACC 3'
<b>HCHT W99A revers</b>	5' GGTTCCAAAGTT <b>CGC</b> TCCACCAATAGC 3'
<b>AMCase W31A forward</b>	5' TGTTATTTTACTAAC <b>GCG</b> GCTCAATACAGACCAGG 3'
<b>AMCase W31A reverse</b>	5' CCTGGTCTGTATTGAGC <b>CCA</b> GTTAGTAAAATAACA 3'

En beskrivelse av hvorfor disse mutasjonene er valgt finnes i avsnitt 1.8.

Ved design av primere kan programvaren GENTle anvendes. GENTle er en software som brukes til plasmidkart, restriksjon og ligeringsanalyse, alignments, import av sekvensdata, verktøy for manipulering av gelbilder, i tillegg til design av primere til PCR-reaksjoner. Programmet vil også kunne kjøre virtuelle PCR-reaksjoner for å analysere DNA-primernes virkning. Sekvensdata kan finnes i databaser eller lastes opp, og primere vil genereres automatisk, dog vil de kun være forslag, ikke optimalisert til ønsket sekvens. GENTle kan gi informasjon om DNA templatets egenskaper og eventuelle utfordringer, aminosyresekvenser til både templat og resulterende DNA, i tillegg til restriksjonsseter i det resulterende DNA. (Manske 2010)

### 3.2 Isolering av plasmid

Før ønsket mutant kan lages ved hjelp av seterettet mutagenese, må celler med villtype plasmid dyrkes opp og plasmid isoleres. Dette ble gjort for både HCHT WT og AMCase WT. Til renseprosedyren ble *E.Z.N.A.<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit I* fra Omega Bio-Tek brukt. Kitet forenkler ekstraksjon og rensing av nukleinsyrer, og baserer seg på en HiBind-matriks som binder DNA og RNA reversibelt. Dette gjør det enkelt å fjerne proteiner og andre kontaminanter, og nukleinsyrene kan videre enkelt elueres med vann eller en saltbuffer. (Agilent Technologies 2005)

#### Materialer:

- *E.Z.N.A.<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit I* (Omega Bio-Tek)
- Frysestock med pPIC9K-AMCase/HCHT WT i *E. coli*-celler
- Luria-Bertani (LB)-medium
- 50 mg/ml ampicillin

#### Metode

4 ml LB-medium ble tilsatt 50 mg/ml ampicillin til en sluttkonsentrasjon på 50 µg/ml. En tannpirker med *E.coli* frysestock fra henholdsvis HCHT villtype og AMCase villtype ble deretter tilsatt mediet. Kulturen ble satt til inkubasjon i risteinkubator ved 37 °C over natt. Cellene ble sentrifugert ved 10,000 x g i 1 minutt ved romtemperatur, og mediet ble dekantert. Pelleten ble deretter resuspendert i 250 µl RNase A/Solution I. 250 µl Solution II ble så tilsatt, og løsningen ble blandet ved å snu røret forsiktig noen ganger til det oppstod et klart lysat. Deretter ble 350 µl Solution III tilsatt før røret ble blandet umiddelbart. En hvit utfelling ble dannet. Løsningen ble sentrifugert ved 13,000 x g i 10 minutter for å pelletere utfellingen.

En HiBind<sup>TM</sup> DNA miniprepkolonne ble satt i et tilhørende oppsamlingsrør. Kolonnen ble klargjort ved å tilsette 100 µl ekvibreringsbuffer og sentrifugert i 1 minutt ved 13,000 x g. Oppsamlingsrøret ble tømt. Den klare supernatanten ble overført til den ekviliberte miniprepkolonnen og sentrifugert i 1 minutt ved 13,000 x g. Oppsamlingsrøret ble tømt, deretter ble 500 µl Buffer HB tilsatt for å vaske kolonnen. Kolonnen ble sentrifugert i 1

minutt ved 13,000 x g. Oppsamlingsrøret ble tømt, kolonnen ble videre tilsatt 700 µl DNA Wash Buffer og sentrifugert 1 minutt ved 13,000 x g. Vasketrinnet ble repetert, oppsamlingsrøret tømt og den tomme kolonnen ble sentrifugert ved 13,000 x g i 2 minutter.

Miniprekolonnen ble flyttet til et rent eppendorfrør og tilsatt 30 µl elueringsbuffer. Kolonnen ble deretter sentrifugert i 1 minutt ved 13,000 x g for å eluere plasmidene. Plasmidene ble oppbevart ved -20 °C.

### 3.2.1 Måling av plasmidkonsentrasjon

For å måle konsentrasjonen til det isolerte plasmidet, benyttes et spektrofotometer. Dette er en enkel og rask metode som kan måle konsentrasjonen i volum ned til 0,5 µl og uten ytterligere fortykning. Spektrofotometeret måler DNA/RNA ved en bølgelengde på 260 nm og protein ved en bølgelengde på 280 nm, og kan detektere konsentrasjoner av dsDNA fra 2–15000 ng/µl. (Thermo Scientific 2009)

#### Materialer:

- NanoDrop ND1000 Spektrofotometer
- Renset plasmid
- E.Z.N.A.<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit I (Omega Bio-Tek)
  - Elution Buffer

#### Metode

Spektrofotometeret ble nullstilt med dH<sub>2</sub>O, og kalibrert med elueringsbufferen fra *E.Z.N.A.<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit I*. Deretter ble 2 µl prøve analysert og konsentrasjonen avlest.

### 3.2.2 PCR-reaksjon og transformering av mutanter

PCR-reaksjonen utfører en seterettet mutagenese på dobbeltrådede DNA plasmider (dsDNA) for å generere de ønskede mutantene. Mutasjonen avhenger av hvilke primere som tilsettes blandingen. PCR-reaksjonen vil oppamplifisere og mutere dobbeltrådet plasmid isolert fra villtype. Ved hjelp av primere som inneholder den ønskede mutasjonen dannes plasmid med

korrekt sekvens. Syklusen gjentas flere ganger og resulterer i mutert plasmid. Plasmidet kuttet ved hjelp av restriksjonsenzymet *DpnI*, transformeres inn i *E.coli* og plates ut på LB-agarplater. Dette gjøres for å øke antall celler med innsatt plasmid, og dermed også mengde plasmid. Deretter kan plasmidene isoleres på nytt (avsnitt 3.2), sekvenseres og videre inkorporeres inn i *P. pastoris*.

Isolerte og rensede plasmider fra HCHT og AMCase WT (avsnitt 3.2) ble brukt i denne oppgaven.

Mutantene som ble laget:

- HCHT W31A
- HCHT W99A
- AMCase W31A

#### Materialer:

- Isolert og rensert villtypeplasmid HCHT og AMCase
- QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)
  - Reaksjonsbuffer
  - pWhitescript 4.5kb Control Plasmid
  - Oligonucleotide Control Primer 1
  - Oligonucleotide Control Primer 2
  - dNTP-mix
  - ddH<sub>2</sub>O
  - *PfuUltra* HF DNA Polymerase
- Primere: forward og reverse (Invitrogen, avsnitt 3.1.2)
- Mastercycler Gradient PCR-maskin (Eppendorf)

#### Metode

Kontrollreaksjon ble laget etter følgende tabell:



**Tabell 3.2.2.1: Kontrollreaksjon til PCR**

Reagent	Mengde
Reaksjonsbuffer	5 µl
pWhitescript 4.5kb Ctrl Plasmid	2 µl
Ctrl Primer 1	1,25 µl
Ctrl Primer 2	1,25 µl
dNTP-mix	1 µl
Dobbeldestillert H <sub>2</sub> O	38,5 µl
<i>PfuUltra</i> HF DNA Polymerase	1 µl
<b>Totalt</b>	<b>50</b>

Reaksjonsløsning for hver mutant ble laget etter følgende tabell:

**Tabell 3.2.2.2: Reaksjonsløsning til PCR**

Reagent	Mengde
Reaksjonsbuffer	5 µl
dsDNA templat	1,5 µl (45 ng)
Primer 1	1,3 µl
Primer 2	1,3 µl
dNTP-mix	1 µl
Dobbeldestillert H <sub>2</sub> O	39,9 µl
<i>PfuUltra</i> HF DNA Polymerase	1 µl
<b>Totalt</b>	<b>51 µl</b>

Alle reaksjoner ble laget i 200 µl PCR-rør og holdt på fryseblokk.

Følgende PCR-program ble kjørt:

**Tabell 3.2.2.3: Oversikt over PCR-program brukt i oppgaven**

Reaksjon	Temperatur	Tid	Antall Runder
<b>Heating Lid</b>	110 °C		1
<b>Initial denaturation</b>	95 °C	30 sekunder	1
<b>Denaturation</b>	95 °C	30 sekunder	
<b>Annealing</b>	55 °C	1 minutt	18*
<b>Extension</b>	65 °C	10 minutter**	
<b>Cooling</b>	10 °C	∞	1

\* Det benyttes 18 syklers der det utføres multiple aminosyredelesjoner og insersjoner.

\*\* Protokollen anbefaler 1 minutt ekstensjon per kb vektor (pPIC9K-vektoren er 9.3kb).

Fra hvert PCR-rør ble det tatt ut 9 µl som ble lagret ved 4 °C. Dette ble brukt til å kontrollere PCR-produktet på en agarosegel (avsnitt 3.2.3).

### ***DpnI* digestion**

#### Materialer:

- *DpnI* restriksjonsenzym, QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)
- Vannbad 37 °C

#### Metode

1 µl av restriksjonsenzymet *DpnI* ble tilsatt hver PCR-reaksjon, inkludert kontrollreaksjonen. Deretter ble løsningen blandet forsiktig ved å pipettere opp og ned og sentrifugert ved 10,000 x g i 1 minutt. Reaksjonsblandingen ble videre inkubert i 1 time i vannbad på 37 °C for å bli kvitt resterende supercoilet dsDNA.

9 µl av blandingen ble tatt ut og kjørt på agarosegel sammen med PCR-produktene (avsnitt 3.2.3).

### **Transformerings av XL1-Blue Superkompetente celler**

#### Materialer:

- *DpnI*-behandlet DNA
- Eppendorfrør
- XL1-Blue Superkompetente celler
- Vannbad 42 °C
- Forvarmet Luria-Bertani (LB)-medium, 42 °C
- LB-plater med 50 µg/ml ampicillin

## Metode

De superkompetente cellene ble tint forsiktig på is. Deretter ble eppendorfrør satt på is og 50 µl XL1-Blue Superkompetente celler tilsatt hvert rør (1 rør pr. PCR-reaksjon, inkludert kontrollreaksjonen). 1 µl *DpnI*-behandlet DNA ble tilsatt cellene, løsningen ble blandet forsiktig og inkubert på is i 30 minutter. Reaksjonene ble deretter varmebehandlet på 42 °C i nøyaktig 45 sekunder, før rørene igjen ble satt på is og inkubert i 2 minutter.

I sterilskap ble 500 µl LB-medium (forvarmet til 42 °C) tilsatt hvert rør, og blandingen ble inkubert ved 37 °C i en ristekubator i 1 time. Tilslutt ble reaksjonene plattet ut på LB-plater med 50 µg/ml ampicillin (se tabell 3.2.1.4).

**Tabell 3.2.2.4: PCR-reaksjonene og kontrollreaksjonene pWhitescript og pUC18 ble sådd ut på LB-plater med ampicillin**

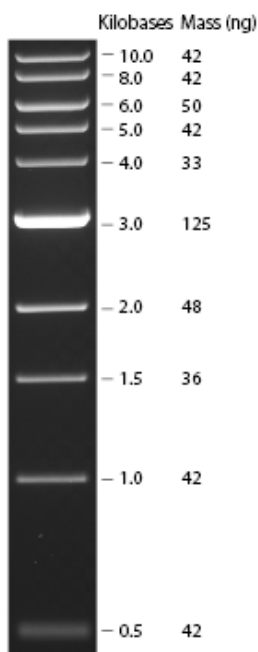
Reaksjonstype	Volum
Mutagenesekontroll (pWhitescript 4.5kb Ctrl Plasmid)	250 µl
Transformasjonskontroll (pUC18)	250 µl
Prøve	250 µl x 2

### 3.2.3 Kontroll av PCR-reaksjon

#### Tillaging av agarosegel

DNA elektroforese er en teknikk som i hovedsak brukes til å separere løselige nukleinsyrer etter størrelse, og blir ofte brukt for å sjekke resultatet etter restriksjonskutting samt for å bekrefte inkorporering av gen i vektor. Den mest brukte formen av DNA elektroforese involverer en polymer, ofte agarose, med et ledende medium som man setter under spenning slik at flere prøver kan migrere parallellt. En voltparallel dannes langs gelen og prøvene vil migrere ulik lengde avhengig av størrelse. Store molekyler migrerer saktere enn små molekyler. Tris (2-amino-2-(hydroksymetyl)-1,3-propanediol) acetat EDTA (TAE-buffer) er den bufferen som blir mest brukt som gelens ledende medium. (Brody & Kern 2004) Etidiumbromid (EtBr) er et gelfargingsreagens som binder til nukleinsyrene, og denne tilsettes til gelen før prøvene appliseres. EtBr brukes sammen med UV illuminering for deteksjon. (Ohta et al. 2001)

Prøvene ble blandet med loading buffer for at de skulle bli tunge nok til å synke ned i brønnene, og en standard DNA ladder ble brukt for å sammenlikne prøvene etter elektroforesen.



**Figur 17: 1kb DNA Ladder fra New England Biolabs.**

### Materialer

- SeaKem® LE Agarose
- 1xTAE buffer
- EtBr
- Elektroforesekammer
- 1 kb standard DNA ladder
- Loading buffer

### Metoder:

0,5 g agarose ble blandet med 50 ml 1xTAE buffer. Blandingen ble varmet i mikrobølgeovn i omtrent 2 minutter til all agarosen var løst opp. Kolben ble deretter kjølt ned og 2  $\mu$ l etidiumbromid ble tilsatt. Løsningen ble overført til et gelkammer med brønnekam, og fikk stivne i 45 minutter.

Den stive gelen ble flyttet fra stativet til elektroforesekammeret, og kammen ble fjernet forsiktig. 1xTAE buffer ble tilsatt gelkammeret og 5 µl molekylvektstandard ble påsatt den første brønnen. Prøvene ble tilsatt 1 µl loading buffer og blandet godt ved hjelp av vortex eller bordsentrifuge. Deretter ble prøvene tilsatt de etterfølgende brønner, og elektroforesen ble startet ved å stille inn apparatet på 90 V. Elektroforesen ble foretatt i omtrent 40 minutter. Etter endt elektroforese ble det tatt bilde av gelen ved hjelp av "UV Trans " funksjonen på gelfotosystemet.

### **Dyrking av transformanter**

Dersom det hadde vokst frem kolonier på platene fra mutagenesen (avsnitt 3.2.2) ble disse dyrket i dyrkningsrør over natt med 5 ml LB-medium og ampicillin til en sluttkonsentrasjon på 50 µg/ml. De transformerte plasmidene ble så rensert som beskrevet i avsnitt 3.2 og plasmidkonsentrasjonen ble målt med Nanodrop, avsnitt 3.2.1. Deretter ble plasmidene sekvensert.

### 3.3 Sekvensering

For å sjekke at produktet fra seterettet mutagenese har den riktige sekvensen, må produktet sekvenseres. Plasmidet fra mutagenesen blir sammenliknet med sekvensen til villtypen av det proteinet som har blitt mutert, og en eventuell mutasjon vil her blir utpekt som en feil i plasmidets sekvens. Finnes kun denne ene feilen i sekvensen er plasmidet korrekt og kan transformeres inn i *Pichia pastoris* celler.

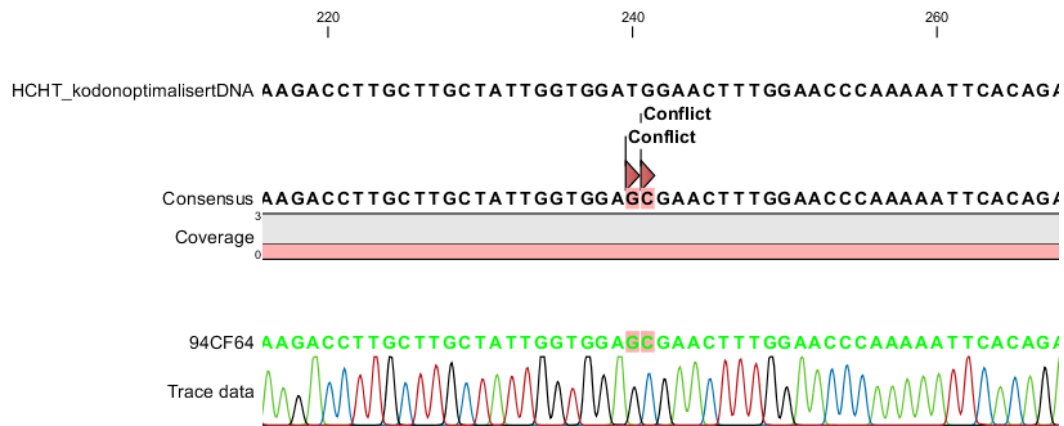
Sekvenseringen foregår ved at en sekvenseringsblanding av primer og det DNA man ønsker å sekvensere lages. Dobbeltrådet DNA, med kjent konsentrasjon, ble blandet med elueringsbuffer til ønsket konsentrasjon, 80-100 ng/μl, mens primerne ble blandet med sterilt vann til en konsentrasjon på 5 pmol/μl. Sekvenseringsmiksen ble merket og sendt til GATC Biotech i Constance, Tyskland for sekvensering.

**Tabell 3.3.1: Sekvenseringsprimere for HCHT og AMCcase**

Primer	Sekvens
<b>HCHT forward</b>	ACGGTCTTGATTGGACTGG
<b>HCHT reverse</b>	CCAACCCACTGGTTGTCTCT
<b>AMCase AOX 5' forward</b>	GACTGGTCCAATTGACAAGC
<b>AMCase AOX 3' reverse</b>	GCAAATGGCATTCTGACATCC

Programmet CLC DNA Workbench ble brukt for å sette sammen sekvensene og for å sjekke hvorvidt riktig mutasjon var til stede i plasmidet.

Figur 18 viser hvordan resultatet etter en sekvensering kan bli. Her illustreres hvordan en feil oppdages i programmet CLC DNA Workbench. Ved å bruke programmets verktøy for sekvensalignement vil den muterte sekvensen sammenliknes med sekvensen for villtype, og en eventuell mutasjon vil vises.



**Figur 18:** Et eksempel på hvordan sekvenseringsresultatet vises. Dette er HCHT W99A. Mutasjonen sees som en "konflikt" i sekvensen.

### 3.4 Transformering av *Pichia pastoris*

Etter at sekvenseringen har vist riktig mutasjon i plasmidet kan dette transformeres inn i vertscellen som i dette tilfellet er gjæren *Pichia pastoris*. *P.pastoris* er en metyloτροφ gjær med mulighet til å benytte metanol som eneste karbonkilde. Fordi den er en eukaryot har *P.pastoris* mange av egenskapene til høyere eukaryote ekspresjonssystemer som for eksempel prosessering av protein, proteinfolding og post-translasjonell modifisering. Allikevel er *P.pastoris* like enkel å manipulere som *E.coli* og *Saccharomyces cerevisiae*. Den er enklere, raskere og billigere å bruke enn de høyere eukaryote ekspresjonssystemene, og gir generelt et høyere ekspresjonsnivå. En av de store fordelene med å bruke *P.pastoris* som vertsorganisme, er at den sekreterer svært lave mengder av gjærens egne proteiner. (Invitrogen 2010)

#### 3.4.1 Linearisering

For at det muterte genet skal kunne settes inn i *Pichia pastoris* må plasmidet lineariseres. Dette gjøres ved hjelp av restriksjonsenzymet *SacI*, som har følgende gjenkjenningssekvens:

5' ... G A G C T | C ... 3'

3' ... C | T C G A G ... 5'

Plasmidet inkuberes sammen med *SacI*, og dette danner såkalte 'sticky ends' slik at plasmidet raskt kan limes sammen igjen etter at transformeringen inn i *P.pastoris* er utført.

#### Materialer:

- Renset plasmid med ønsket mutasjon
- 10 x BSA
- 10 x NEB1-buffer
- *SacI* restriksjonsenzym
- CiAP (Alkaline Phosphatase Calf Intestinal)



### Metode

Følgende ble blandet i et eppendorfrør:

- 30 µl plasmid
- 5 µl 10 x BSA
- 5 µl 10 x NEB1-buffer

Deretter ble blandingen tilsatt 3 µl *SacI* (holdt på is), og eppendorfrøret ble inkubert på vannbad ved 37 °C i 1 time. Etter inkubasjonstiden ble det tilsatt 1 µl CiAP, og løsningen ble inkubert på vannbad ved 37 °C i ytterlige 30 minutter. Etter 30 minutter ble 1 µl CiAP tilsatt før blandingen ble inkubert ved 56 °C i 15 minutter. Etter inkubasjonstiden ble løsningen flyttet til en kjøleblokk og produktet ble analysert på en agarosegel (avsnitt 3.2.3).

### **3.4.2 PCR-clean up**

Etter analyse på agarosegel ble ønsket produkt ble kuttet ut av agarosegelen med skalpell. Båndene ble videre rensed ved hjelp av *NucleoSpin Extract II Kit* fra Omega BioTek for å fjerne agarosegel før transformering.

### Materialer:

- NucleoSpin Extract II Kit
- Bordsentrifuge

### Metode

Gelbitene ble veid, og for hver 100 mg agarosegel ble det tilsatt 200 µl Buffer NT. Gelbitene ble inkubert ved 50 °C i 5-10 minutter, eller til de var løst opp i bufferen.

En NucleoSpin Extract II kolonne ble satt i et oppsamlingsrør, prøven ble tilsatt og røret ble sentrifugert i 1 minutt ved 11,000 x g. Oppsamlingsrøret ble tømt og 700 µl buffer NT3 ble tilsatt kolonnen. Igjen ble røret sentrifugert i 1 minutt ved 11,000 x g. Supernatanten ble kastet før røret ble sentrifugert i 2 minutter. Deretter ble kolonna satt i et rent rør og 15 µl NE

elueringsbuffer ble tilsatt. Prøven ble så inkubert i 1 minutt ved romtemperatur før den ble sentrifugert i 1 minutt ved 11,000 x g.

Eluatet ble oppbevart ved 4 °C.

### 3.4.3 Tillaging av kompetente celler

*Pichia pastoris* cellene som skal brukes i forsøkene tilhører stammen KM71. Det er disse cellene det muterte genet skal settes inn i, men før transformasjonen kan skje, må KM71-cellenes gjøres kompetente slik at de er i stand til å ta opp plasmidet. Dette ble gjort ved hjelp av *Pichia EasyComp*<sup>™</sup> Kit fra Invitrogen.

#### Materialer:

- YPD-medium
- *Pichia pastoris* KM71-celler
- *Pichia EasyComp*<sup>™</sup> Kit
- Bordsentrifuge
- Cryorør

#### Metode

En forkultur med KM71-celler ble satt ved å pipettere 10 ml YPD-medium over i et dyrkningsrør. Deretter ble mediet tilsatt KM71-celler med en tannpirker. Forkulturen ble dyrket over natt ved 30 °C og 250 rpm. Deretter ble 1 ml forkultur overført til 1 ml nytt YPD-medium og inkubert ved 28 °C og 230 rpm til OD var 0,6 – 1,0. Forkulturen ble så høstet ved sentrifugering i 5 minutter ved 1700 x g, og supernatanten ble pipettert ut og kastet. Cellene ble resuspendert i 10 ml Solution I fra *Pichia EasyComp*<sup>™</sup> Kitet før de ble sentrifugert i 5 minutter ved 1700 x g. Supernatanten ble kastet. Cellepelletten ble så resuspendert i 1 ml Solution II fra kitet. Cellene er nå kompetente.

Aliquouts på 50 µl ble overført til sterile cryorør som lagres ved – 80 °C. De superkompetente cellene kan tines og fryses flere ganger uten å miste særlig mye transformasjonseffektivitet.

### 3.4.4 Transformerings

De kompetente cellene er i stand til å oppta linearisert plasmid. Plasmidet vil limes igjen inne i cellene. Cellene dermed dyrkes på plater med antibiotika for å sikre at kun *P.pastoris* cellene brukes videre.

#### Materialer:

- 50 µl kompetente celler (avsnitt 3.4.3)
- PichiaEasyComp™ Kit
- Linearisert plasmid

#### Metode:

Et cryorør med 50 µl kompetente celler ble tint, og 3 µl linearisert og rensert pPIC9K-plasmid (avsnitt 3.4.1 og 3.4.2) ble tilsatt. 1 ml Solution II fra PichiaEasyComp™ Kitet ble tilsatt blandingen og vortexet godt. Deretter ble løsningen inkubert i 1 time ved 37 °C i vannbad, og det ble vortexet godt hvert 15. minutt. Cellene ble utsatt for et varmesjokk på 42 °C i 10 minutter, før de ble spunnet ned ved 3,000 x g i 5 minutter. Supernatanten ble dekantert og kastet.

Cellene ble resuspendert i 1 ml Solution III og sentrifugert i 5 minutter ved 3,000 x g. Supernatanten ble kastet. Cellene ble igjen resuspendert, denne gang i 100 µl Solution III, før de ble platet ut på MD-plater med 0,25 mg/ml geneticin. Platene ble inkubert i 2-4 dager ved 30 °C til synlige kolonier vokste frem.

Koloniene ble renstrøket to ganger på nye MD-plater for å sikre at det videre arbeidet foregår med en ren koloni. Det ble videre laget frysestocker av rene kolonier. Dette ble gjort ved å lage en forkultur med 100 ml Buffered Glycerol-Complex Medium og pirk fra ønsket koloni. Kulturen ble inkubert ved 30 °C og 200 rpm til OD var 0,2 – 0,6. Deretter ble 1050 µl kultur tilsatt 450 µl 87 % glyserol og overført til cryorør. Frysestockene ble oppbevart ved – 80 °C.

### 3.4.5 Dyrkning av transformanter

For å optimalisere dyrkningsprosessen ble det foretatt en prøvedyrkning der koloniene fra 3.4.4 ble dyrket i medium tilpasset *Pichia pastoris*. Hovedgrunnen til å foreta en slik prøvedyrkning er for å fastslå at proteinet sekreteres ut i mediet og at proteinet er aktivt. I tillegg er det gunstig å vite hvor mange døgn det er optimalt å tilføre metanol og hvor mange døgn kulturene vil leve. Denne kunnskapen kan deretter brukes når dyrkingen skal oppskaleres. Protokollen *Multi-Copy Pichia Expression Kit* fra Invitrogen ble fulgt, med visse modifikasjoner.

#### Materialer:

- Buffered Glycerol-Complex Medium (BMGY)
- Buffered Metanol-Complex Medium (BMMY)
- 100 % metanol, steril

#### Metode

Forkulturen bestående av 100 ml BMGY i en 1 liters dyrkningsflaske ble inokulert med *Pichia pastoris*, fra plate eller frysestock. Forkulturen ble inkubert i risteinkubator på 200 rpm ved 30 °C over natt. Deretter ble 5 ml forkultur overført til en ny 1 liters dyrkningsflaske med 100 ml BMGY og inkubert ved 23 °C og 200 rpm til OD var 2-6.

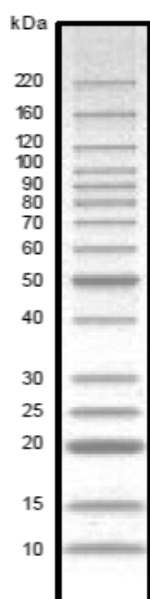
Kulturene ble så spunnet ned i 5 minutter ved 3000 rpm og 20 °C. Pelleten ble resuspendert i 40 ml BMMY og overført til 250 ml kolber for uttrykk av protein. Kolbene ble inkubert ved 200 rpm og 30 °C. Hver 24. time ble kulturene tilsatt 100 % høykvalitetsmetanol til en totalkonsentrasjon på 0,5 %. Prøver på 1 ml ble tatt ut hver dag, og sjekket på SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) (avsnitt 3.4.6) for å bekrefte uttrykk av AMCase. Test for enzymaktivitet (avsnitt 3.4.7) ble gjort hver dag for å bekrefte aktivt enzym og for å få en oversikt over hvor mange tilsetninger av metanol som er optimalt for sekresjon av protein.

### 3.4.6 SDS-Page

SDS-PAGE er en rask og enkel teknikk som separerer proteiner med hensyn på molekylvekt. (Dong et al. 2011) Denne metoden ble benyttet for å sjekke at *P. pastoris*-cellene uttrykte ønsket protein.

Sodium dodecyl sulfat (SDS) er en detergent som består av en hydrofil og en hydrofob del. Den hydrofile delen av detergenten orienterer seg mot vann i løsningen, mens den hydrofobe delen vil binde til hydrofobe grupper på proteinet. En følge av dette vil være at proteinet denaturerer og får en negativ ladning. Proteinene blir så applisert på en polyakrylamidgel som blir plassert i et elektrisk felt. Proteinets negative ladning fører til at det trekkes mot den positive polen, og ettersom polyakrylamidgelen består av porer og tunneler, vil proteinene i prøven separeres etter størrelse. Små proteiner vil vandre raskere gjennom gelen enn store. Ved bruk av en proteinstandard med kjente molekylvekter, vil det være enkelt å bestemme molekylvekt og identifisere proteinene.

BenchMark™ Protein Ladder fra Life Technologies/Invitrogen består av 15 proteiner med størrelser fra 10 til 220 kDa, og egner seg godt til bruk ved SDS-PAGE og Coomassie Blue-farging. Båndene med størrelse 20 og 50 kDa er sterkere enn de resterende båndene. (Life Technologies 2011)



**Figur 19: BenchMark™ Protein Ladder (Life Technologies 2011).**

### Materialer:

- Proteinløsning til analysering
- BenchMark™ Ladder Proteinstandard
- NuPAGE® 10 % Bis-Tris Gel 1,0 mm x 10 well (Life Technologies)
- Arbeidsløsning:
  - NuPAGE® Samplebuffer (4x)
  - NuPAGE® Sample reducing agent (10x)
- MOPS (morpholinopropanesulfonate) SDS Running Buffer
- Fargeløsning
- Avfargingsløsning

### Metode

10 µl arbeidsløsning bestående av 5 µl NuPAGE® Samplebuffer, 2µl NuPAGE® Sample reducing agent og 3 µl dH<sub>2</sub>O ble tilsatt 10 µl proteinløsning. Prøvene ble varmet ved 70 °C i 10 minutter for å denaturere proteinene.

Gelen var ferdig støpt og ble sammen med en veggplate satt direkte i gelkammeret. Det indre kammeret ble fylt med MOPS SDS Running Buffer, mens det ytre kammeret ble fylt halvfullt med samme buffer. Deretter ble 10 µl proteinstandard og 20 µl av proteinprøvene applisert i hver sine brønner. Gelen ble påsatt en spenning på 250 V i 50 minutter for migrering og separering av proteiner. Proteinløsningen ble videre inkubert i fargeløsning på risteinkubator i omtrent 30 minutter. Deretter ble fargeløsningen fjernet før gelen ble avfarget ved bruk av avfargingsløsning.

### **3.4.7 Enzymaktivitet**

*N-N'*-diacetylchitobiose [(GlcNAc)<sub>2</sub>] er et av produktene ved nedbryting av kitin. (Toratani et al. 2008) 4-methylumbelliferyl-*-D-N,N'*-diacetylchitobiose (4-MU-(GlcNAc)<sub>2</sub>) er et kunstig substrat som ofte benyttes i enzymassay for å bestemme aktivitet til GH18 kitinaser.

Substratet er en trimer-analog bestående av to sukkerenheter, (GlcNAc)<sub>2</sub>, bundet til en

fluoriserende gruppe (4-methylumbelliferon). (Brurberg et al. 1996) Når enzymet hydrolyserer det kunstige substratet, brytes bindingen mellom sukkerenhetene og den fluoriserende gruppen. 4-methylumbelliferon er fluorescerende når den blir ionisert og fluorescensen kan kvantiteres. (Goldman et al. 2011) Den frie fluoriserende gruppen absorberer lys ved en bølgelengde på 350 nm og avgir fluorescens med en bølgelengde på 460 nm som kan detekteres. Mengden avgitt fluorescens kan omgjøres til konsentrasjon av hydrolysert produkt som gjør det mulig å bestemme enzymets aktivitet. Dette assayet for kitinolytisk aktivitet mot 4-MU-(GlcNAc)<sub>2</sub> er sensitivt og pålitelig. (Brurberg et al. 1996)

### Materialer:

- Proteinløsning
- 4-MU-(GlcNAc)<sub>2</sub>
- 4-methylumbelliferone
- 0,3 M Glycine/NaOH, pH 10,6
- McIlvain buffer, pH 5,2
- Bovint serum albumin (BSA)
- Fluorometer

### Metode

Det ble laget en arbeidsløsning av BSA og McIlvain buffer i forholdet 1:990. Blindprøve og to paralleller for hver enzymprøve ble laget. 8 µl 4-MU-(GlcNAc)<sub>2</sub> ble blandet med 87 µl arbeidsløsning. Reaksjonsblandingen ble videre tilsatt 5 µl enzym. Reaksjonene ble stoppet med 1,9 ml 0,3 M Glycine/NaOH, pH 10,6, etter nøyaktig 10 minutter. Et fluorometer ble benyttet til bestemmelse av konsentrasjonen til 4-methylumbelliferone. Fluorometeret ble nullstilt med 0,3 M Glycine/NaOH og kjent mengde 4-methylumbelliferone ble benyttet for å kalibrere fluorometeret. Den spesifikke aktiviteten, med benevning nmol 4MU/sek/mg, ble beregnet ved hjelp av formelen under.

$$(0,01 \times 10^{-3} L) \times \frac{(\text{målt aktivitet} \times 100)}{10} \div 10 \text{ minutter} \div 0,005 \text{ ml} \\ \times \text{enzymkonsentrasjon} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right) = \text{spesifikk enzymaktivitet}$$



### 3.5 Overekspresjon av AMCCase og HCHT i *Pichia pastoris*

Kulturer av *Pichia pastoris* med det transformerte genet for 39 kDa AMCCase WT ble benyttet til å uttrykke AMCCase. Det samme ble gjort med AMCCase W99A og W31A, i tillegg til HCHT WT, HCHT W99A og W31A.

Forkulturer ble laget (avsnitt 3.4.5) og sådd ut på MD-plater. Disse lagres ved 4 °C. Dette gjøres fordi kontinuerlige cellekulturer gir bedre uttrykk og raskere vekst enn cellekulturer fra frysestock. Alt arbeid med *P.pastoris* ble gjort i sterilskap med sterilt utstyr for å unngå forurensing av medier og utstyr. Dette er viktig fordi det ikke benyttes antibiotika i mediet.

#### Materialer:

- Buffered Glycerol-Complex Medium (BMGY)
- Buffered Metanol-Complex Medium (BMMY)
- 100 % metanol, steril
- Milipore Stericup sterilfilter, 0,2 µm
- Proteasehemmer PMSF
- Amicon 8400 Oppkonsentrator
- 0,05 M natriumacetat (NaAc), pH 4,2
- Dialyseslange 3.7 ml/cm, 10,000MWCO

#### Metode

Forkulturen bestående av 100 ml BMGY i en 1 liters dyrkningsflaske ble inokulert med *Pichia pastoris*, fra plate eller frysestock. Forkulturen ble inkubert i risteinkubator på 200 rpm ved 30 °C over natt. Deretter ble 5 ml forkultur overført til en 2 liters dyrkningsflaske med 500 ml BMGY og inkubert ved 23 °C og 200 rpm til OD var 2-6.

Kulturene ble så spunnet ned i 5 minutter ved 3000 rpm og 20 °C. Pelleten ble resuspendert i 100 ml BMMY og overført til 1 liters kolber for uttrykk av protein. Kolbene ble inkubert ved 200 rpm og 30 °C. Hver 24. time ble kulturene tilsatt 100 % høykvalitetsmetanol til en sluttkonsentrasjon på 0,5 %. Prøver på 1 ml ble tatt ut hver dag, og sjekket på SDS-PAGE

(avsnitt 3.4.6) for å bekrefte uttrykk av AMC<sub>Case</sub>. Test for enzymaktivitet (avsnitt 3.4.7) ble gjort for å bekrefte aktivt enzym. Den tidligere dyrkningen (avsnitt 3.4.5) bør ha gitt en pekepinn på hvor mange dager metanol skal tilsettes for å oppnå maksimalt uttrykk av protein. Gel og aktivitetsassay er derfor kun for å konstatere aktivitet. Kulturene ble deretter høstet ved sentrifugering ved 3500 rpm i 30 minutter. Supernatanten ble sterilfiltrert med et 0,22 µm filter i romtemperatur og tilsatt 50 mM proteasehemmer (PMSF), 200 µl per 100 ml løsning, for å hindre proteaseaktivitet.

Den filtersteriliserte proteinløsningen ble oppkonsentrert ved hjelp av en oppkonsentrator (Amicon 8400) med et 10000 MWCO filter til et sluttvolum på omtrent 50 ml.

Oppkonsentrert proteinløsning ble så overført til dialyseslanger og satt til dialyse i 72 timer ved 4 °C for å fjerne komponenter fra mediet. Dialysebufferen som ble brukt var 5 L 0,05 M NaAc, pH 4,2. Dialysebufferen ble skiftet hver 24. time. Etter endt dialyse ble løsningen høstet og spunnet ned, og supernatanten ble overført til en ny beholder.

For å bekrefte protein i den dialyserte løsningen ble det foretatt en ny SDS-PAGE og enzymaktivitetstest. Proteinet ble rensert (avsnitt 3.6) og videre oppkonsentrert med oppkonsentratorrør til 1-2 ml (avsnitt 3.6.2). Tilslutt ble proteinkonsentrasjon bestemt ved bruk av *Quant-It™ Protein Assay Kit* (avsnitt 3.5.1).

### 3.5.1 Fluorimetrisk bestemmelse av proteinkonsentrasjon

Quant-iT™ er en enkel og rask teknikk som ofte benyttes til konsentrasjonsbestemmelse. Dette er en fluorimetrisk metode som bestemmer proteinkonsentrasjon ved at Quant-IT™ Protein reagenten binder til protein, DNA eller RNA. Dette komplekset eksiteres ved ~ 470 nm og emitterer lys ved ~ 570 nm. Mengden emittert lys detekteres av et Qubit™ fluorometer og lysets intensitet avhenger av mengden protein i prøven. Metoden har en øvre deteksjonsgrense på 5 µg. (Invitrogen 2011)

#### Materialer:

- Løsning med oppkonsentrert protein
- Quant-iT™ Protein Assay Kit 0,25-5 µg

- Quant-iT™ protein buffer
- Quant-iT™ protein reagent

### Metode

Det ble først laget en arbeidsløsning av Quant-iT™ protein reagent og Quant-iT™ protein buffer i forholdet 1:200. Tre paralleller av hver proteinprøve ble så laget i forholdene 1:100 (proteinløsning: arbeidsløsning). Prøvene ble deretter inkubert i 15 minutter før proteinkonsentrasjonen ble målt med ferdig kalibrert Quant-IT™-fluorometer. Proteinkonsentrasjonen ble vist direkte og benevnes µg/ml.

### **3.5.2 Fermentering**

Fermentering er en industriell metode for å produsere enzymer, og involverer bruk av mikroorganismer som bakterier eller gjær. To mulige metoder kan anvendes ved fermentering: flytende og fast fase. Ved flytende fermentering produseres enzymer i et flytende næringsmedium. Fast fase-fermentering utnytter dyrkning av mikroorganismer, og dermed enzym, på et fast stoff. Karbonkilder i substratet, flytende eller fast, brytes ned av mikroorganismene som deretter produserer enzymene, enten ved intracellulær produksjon eller ved sekresjon. Enzymer kan dermed høstes ved henholdsvis lysing av celler eller sentrifugering. Ved flytende fermentering dyrkes mikroorganismer i flytende medium ved høy oksygenkonsentrasjon. Etersom mikroorganismene bryter ned næringsstoffene i mediet vil enzymet frigjøres ut i løsning. (Weir & McSpadden 2011)

Det er viktig å ha kontroll på OD (celletetthet) i fermentering slik at det kontrolleres hvor mange celler som tilsettes til fermentoren. Det kan være en god ide å teste de ulike klonene før fermentering for å kunne velge den klonen som viser mest aktivitet, avsnitt 3.4.7. Det var kun HCHT WT med kitinbindende domene som ble dyrket på denne måten.

### Materialer:

- Buffered Glycerol-Complex Medium (BMGY)
- Basal salt medie
- Glycerol
- PMT1 Saltløsning

### Metode

Kolonier ble plukket fra MD-plate og tilsatt 100 ml BMGY. Kulturene ble inkubert ved 30 °C og 200 rpm i et døgn. OD ble målt med jevne mellomrom for å ha kontroll på celledetthet i tillegg til å gi et overblikk over hvor raskt klonen vokser. Frysestocker (450 µl 87 % glyserol og 1050 µl kultur) ble laget etter hvert som OD ble sjekket.

Forkultur med 50 ml BMGY ble inokulert med omtrent 1 ml av nevnte frysestock og satt til inkubering ved 30 °C og 200 rpm. OD skal nå et punkt mellom 2 og 5 før forkulturen kan tilsettes fermentoren. Fermentoren ble montert mens forkulturen vokste. pH og temperatur ble justert, røring, DO (dissolved oxygen) og luft inn/ut ble kalibrert. 2 ml PMT1 saltløsning ble tilsatt.

Da OD på forkulturen nådde et punkt mellom 2 og 5, ble 50 ml tilsatt fermentoren sterilt. DO skal være 35 % ved inokuleringstidspunkt, og luftinntaket skal være 1,25 vvm.

Startkonsentrasjonen av glyserol var 4 %. Ettersom glyserolen ble konsumert steg DO mot 100 %. Når all glyserolen er konsumert kan glyserol FED batch starte. OD skal da være mellom 60 og 70. Glycerolpumpen ble satt på 15 ml/L\*h og stod på i 4 timer. Etter 4 timer ble pumpen skrudd av og OD ble målt. OD bør nå være mellom 100 og 120. Når DO stiger tyder det på at kulturen ikke nyttiggjør seg av glyserolen lenger. All glyserol må være brukt opp. DO skal stige til nærmere 100 % før metanol kan tilsettes. OD ble målt før metanol ble tilsatt.

Før metanelpumpen ble satt på, ble det tilsatt 2 ml PMT1 pr. L metanol. Pumpen ble deretter satt på 3,5 ml/L\*h. Cellene vil tilpasse seg sin nye karbonkilde, og DO synker ned til omtrent 40 % på en periode på 1-3 timer. Hvis DO synker og går opp igjen raskt betyr det at cellene spiser metanol raskere enn det kommer inn og hastigheten kan økes til 5 ml/L\*h. Cellene produserer nå protein. Fermenteringen bør kjøres i 18-96 timer etter indusering til OD ikke lenger stiger. Prøver tas ut hvert døgn, gjerne oftere, og aktiviteten måles.

Prosedyren ble i hovedsak utført av stipendiat Linn Wilhelmsen med kyndig støtte fra Oskar Bengtsson, forsker i PEP-gruppa ved UMB.

### 3.6 Isolering av humane kitinaser

HCHT WT uten kitinbindende domene har tidligere blitt rensset på svak kationbytter med 0,05 M NaAc, pH 4.2 med gradvis pH-endring til pH 6.8 (Eide et al. 2012), og prosedyren ble gjentatt i dette forsøket. HCHT WT med kitinbindende domene produsert ved fermentering (avsnitt 3.5.2) ble rensset på HiTrap CM Sepharose Fast Flow svak kationbytter. Denne kolonnen egner seg godt for proteinrensing i småskala og er industristandarden for ionebytterkromatografi. Den tåler høy flow og gir et resultat med godt potensiale for oppskalering. Den består av 6 % krysskoblet agarose i perleform (*GE Healthcare* 2012). Fordi AMCase og HCHT er like i struktur og funksjon er det nærliggende å tro at samme kolonne og buffere vil kunne brukes til å rensse begge proteinene.

#### 3.6.1 Kolonner for rensing av humane kitinaser

For å separere proteiner i en løsning fra hverandre kan kromatografi benyttes. Ved å føre proteinløsningen på en kolonne kan proteinene separeres etter ulike karakteristikk som størrelse, ioniske egenskaper eller hydrofobe egenskaper.

HCHT WT med kitinbindende domene fra fermentering ble rensset på en svak kationbytter med 0,05 M natriumacetat, pH 4.2 og 6.8 som buffere. Buffer B ble tilsatt ved gradient over 120 minutter. AMCase har store likheter med HCHT så det er naturlig å prøve denne rensemetoden på AMCase først. Det var kun HCHT WT med kitinbindende domene og AMCase WT som ble forsøkt rensset, de resterende mutantene ble kun dyrket. Tiden strakk ikke til.

#### Materialer:

- Kolonner: HiTrap CMFF  
HiTrap OctylFF  
HiTrap SPXL  
HiTrap QXL  
Kitinkuler (New England Biolabs)  
HiLoad® SP Sepharose

## Phenyl Sepharose

- Buffere til de ulike kolonnene (se tabell 3.6.1.1)

Under følger en oversikt over de ulike metodene som ble forsøkt for å rense AMCCase WT.

**Tabell 3.6.1.1: Ulike kolonner ved rensing av AMCCase WT**

Kolonne	Spesifikasjon	Buffere
HiTrap CMFF	Svak kationbytter, ingen gradient og gradient	A: 0,05 M NaAc, pH 4.2
	pKa 3,5 – 4	B: 0,05 M NaAc, pH 6.8
HiTrap CMFF	Svak kationbytter, gradient	A: 0,05 M NaAc, pH 4.2
	pKa 3,5 – 4	B: 0,05 M NaAc, pH 6.8 + 150 mM NaCl
HiTrap CMFF	Svak kationbytter, gradient	A: 0,05 M NaAc, pH 4.2
	pKa 3,5 – 4	B: 4 M CH <sub>3</sub> COOH
Kitinkuler	Gradient	A: 0,05 M NaAc, pH 4.2
		B: 0,05 M NaAc, pH 6.8
HiLoad® SP Sepharose	Sterk kationbytter, gradient	A: 40 mM Etanolamin, pH 9.4
		B: 40 mM Etanolamin, pH 9.4 + 1 M NaCl
Phenyl Sepharose	Hydrofob interaksjonskolonne, gradient	A: 20 mM TrisHCl + 0,5 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
		B: 20 mM TrisHCl + 4% Isopropanol
HiTrap OctylFF	Hydrofob interaksjonskolonne, gradient	A: 20 mM TrisHCl + 1 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
		B: 0,05 M TrisHCl pH 8.0
HiTrap SPXL	Sterk kationbytter, gradient	A: 0,05 M NaAc, pH 4.2
	pKa 2	B: 0,05 M NaAc, pH 6.8
HiTrap QXL	Sterk anionbytter, gradient	A: 0,05 M TrisHCl, pH 8.5
		B: 0,05 M TrisHCl pH 8.5 + 1 M NaCl

Rensingene ble utført ved å kondisjonere kolonnen ved hjelp av buffer A, deretter ble proteinløsningen tilsatt kolonnen. Voidtoppen ble samlet opp. Etter at proteinløsningen var tilsatt ble systemet igjen koblet til buffer A. Denne ble ført gjennom kolonnen til voidtoppen var ute og baselinjen flat. Videre ble gradient fra buffer A til B startet og alle fraksjoner og topper ble samlet opp. Da gradienten var ferdig ble buffer B tilsatt til baselinjen igjen var flat. Deretter ble kolonnen vasket med 20 % EtOH. Etter rensing ble de ulike fraksjoner analysert ved SDS-PAGE (avsnitt 3.4.6) og enzymaktivitet ble testet ved 4-MU assay (avsnitt 3.4.7).

### 3.6.2 Oppkonsentrering av protein

Amicon Ultra-15 er et sentrifugerør med filter som benyttes til å filtrere og oppkonsentrere løsninger. For å oppkonsentrere rensede proteiner ble det benyttet Amicon Ultra-15 filter som kun slipper gjennom molekyler med molekylvekt mindre enn 10 000 Da. Dette fører til at større molekyler, som HCHT og AMCCase blir igjen i filteret, mens mindre molekyler vil bli filtrert ut av løsningen. På denne måten er det mulig å fjerne eller bytte løsningsmiddel samt å oppkonsentrere proteinet.

#### Materialer:

- Renset protein
- Amicon Ultra-15 rør

#### Metode

Fraksjonen med påvist protein ble overført til oppkonsentreringsrør og sentrifugert ved 3000 rpm ved 4 °C til kun 1500 µl proteinløsning var igjen i filterenheten. Deretter ble proteinets lagringsbuffer tilsatt og røret sentrifugert. Prosedyren ble gjentatt 3-4 ganger. Løsningen ble videre oppkonsentrert til 1 ml, før eluatet ble overført til eppendorfrør og oppbevart ved 4 °C.

### 3.6.3 Western blot

Western blot/immunoblot er en standard laboratorieteknikk som kommer fra immunologi og utnytter den sensitive interaksjonen mellom antigen og antistoff. Ved hjelp av spesifikke primærantistoffer mot antigenet kan det påvises svært små mengder av et protein i en løsning eller homogen vevsløsning. (Bolt & Mahoney 1997; Penna & Cahalan 2007) I de tilfeller der mengden protein er for liten til å gi noe utslag på vanlig SDS-PAGE vil Western blot være en mer sensitiv metode. I tillegg er metoden mer spesifikk da flere proteiner kan ha samme molekylvekt. Første trinn i metoden er separering ved hjelp av gelelektroforese. For å gjøre proteinene mer tilgjengelige for deteksjon med antistoff blir proteinene overført til en nitrocellulose eller polyvinylidenefluoride membran. Binding av protein til membranen



baseres på hydrofobe interaksjoner i tillegg til ladningsinteraksjoner mellom membran og protein. (Penna & Cahalan 2007) Enzymet pepperrot peroksidase konjugert med sekundært antistoff tilsettes løsningen og binder til det primære antistoffet. Enzymet reagerer med fremkallervæsken luminol, og det dannes et detekterbart og kvantiterbart signal som fremkalles ved hjelp av autoradiografi og fotografisk film. Metoden kalles kjemoluminescens. (abcam 2012; Penna & Cahalan 2007)

### Materialer:

- Utstyr til SDS-PAGE (avsnitt 3.4.6)
- Positiv kontroll: nasale polypper fra astmapasient
- Transferbuffer
- Blottekammer
- Filterpapir
- Nitrocellulosemembran
- Tørrmelk
- Vaskebuffer
- Primære og sekundære antistoffer
- Pepperrot peroksidase
- Luminol

### Metode

Proteinprøvene ble separert vha SDS gelelektroforese med en proteinstandard (avsnitt 3.4.6) og en positiv kontroll. 6-8 filterpapir ble vætet med transferbuffer og gelen ble lagt mellom filterpapir og en nitrocellulosemembran. Membranen var på forhånd vætet med metanol. Overføringen skjedde i et blottekammer med en spenning på 65 mV. Etter overføring ble membranene flyttet til en beholder. Membranen ble blokkert med 5 % tørrmelk i en time, noe som gjøres for å hindre uønsket uspesifikk binding mellom protein og antistoff. Primærantistoff ble deretter tilsatt i et forhold på 1:200. Inkubasjon ble foretatt på ristebord ved 4 °C over natt. Etter inkubasjon ble membranene vasket 3 x 15 minutter med vaskebuffer. Deretter ble sekundærantistoffet tilsatt. Membranen ble videre inkubert på ristebord i to timer

ved romtemperatur. Vasketrinnet ble gjentatt. Til sist ble membranen tilsatt fargereagens og inkubert i 5 minutter, før den ble fremkalt med luminol på mørkerom.

Prosedyren ble gjennomført med god og kyndig hjelp fra stipendiatene Linn Wilhelmsen og Kaia Mobråten.

### 3.7 Ekspresjon av bakterielle kitinaser

Bakterielle kitinaser er enklere å uttrykke enn humane kitinaser hovedsakelig fordi de uttrykkes i *Escherichia coli* som ikke krever like mye som *Pichia pastoris*. *E.coli* er en kjent og godt brukt modellorganisme som det er mye kunnskap om. Denne bakterien er brukt både til å overuttrykke prokaryote og eukaryote proteiner. (Miroux & Walker 1996) Resistens mot en type antimikrobielle forbindelser kalt  $\beta$ -lactamer er utbredt i *E.coli*. Denne resistensen er mediert av  $\beta$ -lactamase, et enzym som hydrolyserer  $\beta$ -lactamringen i antibiotikumet og dermed inaktiverer det. (Brinas et al. 2002) Ampicillin er et antibiotikum som ofte blir brukt mot bakterieinfeksjoner og klassifiseres som et  $\beta$ -lactam fordi det har den kjente  $\beta$ -lactamringen. (Parr & Bryan 1984) Ved å tilsette ampicillin til mediet ved dyrkning av *E.coli* elimineres faren for kontaminering, og det er derfor mindre krav til sterilitet når det arbeides med *E.coli*.

#### Aktuelle bakterielle kitinaser:

ChiA D313N

ChiA D313A

ChiA D313N/F396W

ChiB D142N

ChiB D142A

For begrunnelse av valg av mutanter, se avsnitt 1.8.

### 3.7.1 Tillaging av periplasmatisk ekstrakt

#### Materialer:

- LB-medium
- Ampicillin 50 mg/ml
- Frysestock med ønsket mutant
- Sentrifugerør JA10
- Spheroplastbuffer
- Iskaldt autoklavert dH<sub>2</sub>O
- 20 mM MgCl<sub>2</sub>
- Milipore Stericup sterilfilter 0,4 µm

#### Metode

500 ml LB-medium ble tilsatt ampicillin til en sluttkonsentrasjon på 50 µg/ml og inokulert med celler fra ønsket frysestock. Kulturen ble satt i risteinkubator ved 37 °C og inkubert over natt.

Ved høsting av cellene ble kulturen overført til sentrifugerør og sentrifugert ved 8000 rpm i 10 minutter. Pelleten ble resuspendert i 50 ml spheroplastbuffer og inkubert på is i 5 min før løsningen igjen ble sentrifugert. Supernatanten ble så fjernet og cellene inkubert i romtemperatur i 10 minutter før de ble resuspendert i 25 ml kaldt vann. Løsningen ble inkubert på is i 45 sekunder før tilsetning av 1,25 ml 20 mM MgCl<sub>2</sub>. Cellene ble igjen sentrifugert. Til slutt ble supernatanten dekantert og sterilfiltrert.

### 3.7.2 Isolering av bakterielle kitinaser

#### **Ionebytterkromatografi**

I ionebytterkromatografi benyttes et ionebyttermateriale med en kovalent bundet gruppe som enten er ionisk eller ioniserbar og tilknyttet et motion med motsatt ladning. Dette motionet kan byttes ut, og gir metoden sitt navn. Ionebytterne kan karakteriseres som anionbyttere eller

kationbyttene, og mens *anionbyttene* har et kovalent bundet kation og et utskiftbart *anion*, har *kationbyttene* et kovalent bundet anion og et utskiftbart *kation*. Begge gruppene kan i tillegg deles inn i sterke eller svake ionebyttere, avhengig av syrestyrken til den kovalent bundne gruppen. Ionebytterens matriks består i hovedsak av porøse partikler bestående av polymere karbohydrater som cellulose, agarose, dekstran eller silika. Ionebyttens kapasitet kan være avhengig av pH, og særlig ved bruk av svake ionebyttere kan små pH-endringer gi store utslag på retensjon. Det er derfor viktig at prøven foreligger i ionisert form, og mobilfasens pH må velges slik at ionebytterens funksjonelle gruppe er ionisert. Ionebyttere basert på cellulose, dekstran eller agarose har et stort bruksområde når det gjelder proteiner, peptider og andre biologisk aktive molekyler. (Greibrokk et al. 1998)

### Materialer:

- Kolonne: HiLoad® SP Sepharose
- 0,5 M Etanolamin
- Buffer A: 40 mM Etanolamin pH 9.4
- Buffer B: 40 mM Etanolamin + 1 M NaCl
- 1 M NaOH
- 20 % EtOH
- BioLogic LP rensesystem (Bio-Rad)

### Metode

Kolonnen ble koblet sammen med systemet, og buffer A ble kjørt igjennom for å kondisjonere kolonnen. Den sterilfiltrerte supernatanten fra 3.7.1 ble preparert ved å tilsette 0,5 M etanolamin til en konsentrasjon lik buffer A.

Prøven ble rensert etter følgende prosedyre:

- 100 ml buffer A
- Prøven ble satt på kolonna. Flowthrough ble samlet i egen beholder
- Buffer A til rett baselinje
- Gradvis overgang til buffer B: Gradient 0-100 % buffer B over et tidsrom på 120 minutter

- 100 ml buffer B
- 75 ml 1 M NaOH
- 75 ml dH<sub>2</sub>O
- 50 ml 20% EtOH

Flow var konstant på 4 ml/min. Hver topp ble samlet for seg, da flere proteiner vil eluere sammen. I noen tilfeller vil det aktuelle proteinet eluere ut i flowthrough. Derfor bør denne også samles opp og analyseres på SDS-PAGE (avsnitt 3.4.6). Kolonnen ble regenerert med 1 M NaOH etter rensing for å tilføre nye ioner til kolonnematriksen.

De ulike toppene ble analysert ved SDS-PAGE for å undersøke hvilke som skulle renses videre på hydrofob interaksjonskolonne.

### **Hydrofob interaksjonskromatografi (HIC)**

Hydrofob interaksjonskromatografi separerer forbindelser etter hydrofobisitet, og egner seg dermed godt til separasjon av biopolymerer. Stasjonærfasen er ofte basert på silika eller krysskoblet agarose som er bundet til hydrofobe ligander, for eksempel butyl eller octyl. I tillegg til å ha større porestørrelser er dette kolonnematerialet best egnet til bruk ved mildere omstendigheter som ikke denaturerer prøven. (Miller 2005) Mobilfasen består som regel av en vandig saltløsning og ammoniumsulfat er det vanligste saltet brukt i HIC. Ettersom den hydrofobe interaksjonen mellom biomolekyler og stasjonærfase øker ved høyere ionestyrker vil gradvis eluering oppnås ved en gradient med minkende saltinnhold, motsatt av situasjonen ved ionebytterkromatografi. Ettersom mobilfasens saltinnhold minker vil de svakest bundne analyttene elueres først. (Miller 2005)

#### Materialer:

- Kolonne: Phenyl Sepharose (Sigma)
- 1 M Tris-HCl, pH 8.0
- 3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Buffer A: 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 + 0.5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Buffer B: 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 + 4% Isopropanol
- 20 % EtOH

- BioLogic LP rensesystem (Bio-Rad)

### Metode

Kolonnen ble koblet sammen med systemet og buffer A ble kjørt igjennom for å kondisjonere kolonnen. De aktuelle fraksjoner ble preparert ved å tilsette 1 M Tris-HCl, pH 8.0 og 3 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  til en konsentrasjon lik buffer A.

Prøven ble rensset etter følgende prosedyre:

- 100 ml buffer A, flow 3 ml/min
- Prøven ble satt på kolonnen med flow 1,5 ml/min
- Buffer A i 10 min, flow 1,5 ml/min
- Buffer A til rett baselinje, flow 3 ml/min
- Gradvis overgang til buffer B: Gradient 0-100 % buffer B over et tidsrom på 30 minutter, flow 3 ml/min
- Buffer B til alt protein er ute
- 25 ml 20 % EtOH

De fleste proteiner ble eluert tidlig i gradienten, mens noen også ble eluert ved 100 % buffer B. Topper ble analysert ved SDS-PAGE for å undersøke hvor ønsket protein befinner seg.

Etter rensing ble proteinet oppkonsentrert med Vivaspin20 oppkonsentreringsrør (avsnitt 3.6.2) og proteinkonsentrasjon ble målt (avsnitt 3.5.1).

### 3.8 Framstilling og isolering av kitosan

Ettersom kitosan er et mer vannløselig derivat av kitin egner dette seg godt til ulike analyser av kitinaser der prosessivitet og transglykosylering er sentralt. Kitosan med acetyleringsgrad 0,65, som tilsier at 65 % av kitosanpolymeren er acetykert, ønskes til forsøk med både humane og bakterielle kitinaser. Acetyleringsgraden  $F_A$  defineres som den molare konsentrasjonen av acetylte enheter (A) dividert på den totale molare konsentrasjonen av monomerer (A og D). (Sorboten et al. 2005) De fleste kitinaser har en preferanse for en acetykert enhet i -1 subsetet, og dermed avhenger hydrolyse av acetyleringsgraden. (Eide et al. 2012)

#### 3.8.1 Framstilling av kitosan ved homogen N-deacetylering av kitin

Kitosan med acetyleringsgradene 0,65 og 0,32 ble fremstilt til nedbrytingsforsøk med både bakterielle og humane kitinaser. Basert på tidligere erfaringer med deacetylering av kitosan, ble det anbefalt å inkubere løsningen i 48 timer for å oppnå en acetyleringsgrad på 0,65. En acetyleringsgrad på 0,32 bør dermed oppnås ved inkubering på omtrent 96 timer. Kitosan laget på denne måten får en tilfeldig fordeling av A (acetylte enheter) og D (deacetylte enheter). (Sikorski et al. 2006)

#### Materialer

- Finmalt krabbe (Sigma)
- 40 % w/w NaOH (kald)
- Prefryst is
- Sentrifugerør til rotor JA10, Beckman-sentrifuge

#### Metode:

4,0 g finmalt kitin fra krabbe ble veid ut og tilsatt 100 g kald 40 % w/w NaOH. Blandingen ble lett blandet og satt i kjøleskap over natt. Lav temperatur holder deacetyleringen under kontroll. 300 g prefryst is ble tilsatt under kraftig røring med glass-stav før løsningen ble



overført til en blåkorkflaske og satt til røring på magnetrører til all is var løst opp. Blandingen bør holdes kald, da deacetyleringen kontrolleres bedre på denne måten. Løsningen ble sentrifugert ved 10 000 rpm i 15 minutter ved 4 °C, og supernatanten ble dekantert tilbake i flasken og avgasset med N<sub>2</sub> i 10 min. Kitinløsningen ble deretter satt på vannbad i henholdsvis 48 og 96 timer for å oppnå ønsket acetyleringsgrad.

### 3.8.2 Isolering av kitosan

Etter at deacetyleringen er komplett må reaksjonen stoppes. Dette gjøres ved raskt å endre temperatur og pH i løsningen. For å eliminere uløst kitin og forurensninger dialyseres løsningen. Deretter filtreres den for å fjerne de utfelte komponentene.

#### Materialer:

- Prefryst is
- Konsentrert HCl, kjøleskapskald
- 1 M HCl
- pH-papir og pH-meter
- Spectra/Pore® Dialysepølser
- WTW Tetracon 96 Konduktivitetmåler
- Millipore Nitrocellulosefilter
- Frysetørker

#### Metode

Etter deacetyleringen, ble prøven avkjølt ved å tilsette 280 g prefryst is under stadig omrøring. Kald, konsentrert HCl ble tilsatt under sakte røring til pH var nøytral. Flasken ble holdt på is for å unngå oppvarming. pH-papir ble brukt til å kontrollere pH. pH ble deretter justert ned til 4.5 med 1 M HCl.

Dialysepølsene ble skyllet i dH<sub>2</sub>O. Deretter ble løsningen overført til dialysepølsene slik at disse var 2/3 fulle. Den deacetylerede kitosanløsningen ble deretter dialysert i dH<sub>2</sub>O til

konduktiviteten var ca. 3  $\mu\text{S}$ . pH i kitosanløsningen ble så justert til 4.5 med 1M HCl før den ble filtrert med 0,8  $\mu\text{m}$  nitrocellulosefilter. Deretter ble prøvene frysetørket.

### 3.8.3 Bestemmelse av deacetyleringsgrad

For å sjekke at deacetyleringen var fullført, i tillegg til bestemmelse av oppnådd deacetyleringsgrad, ble frysetørket kitosan analysert ved  $^1\text{H-NMR}$ . Valgt løsemiddel var tungtvann,  $\text{D}_2\text{O}$ .

#### Materialer:

- Frysetørket kitosan med ukjent acetyleringsgrad
- $\text{D}_2\text{O}$
- DCl og NaOD til pD-justering
- WILMAD® NMR-rør

#### Metode:

Før analysen kunne utføres ble 20 mg kitosan løst opp i 2 ml  $\text{D}_2\text{O}$ , og blandingen ble inkubert ved risting ved 37 °C over natt. Deretter ble det tilsatt 30  $\mu\text{l}$   $\text{NaNO}_2$  (10 mg/ml) og 150  $\mu\text{l}$  1 M DCl. Rørene ble dekket med aluminiumsfolie og satt til risting i 2 timer ved 37 °C. pD ble justert til 4.5 med NaOD og DCl, før 700  $\mu\text{l}$  av løsningen ble tilsatt NMR-rør og analysert ved  $^1\text{H-NMR}$  ved 85 °C og 300 Hz.

Acetyleringsgraden bestemmes ved følgende likning:

$$FA = \frac{(A + A\alpha + A\beta)}{(A + A\alpha + A\beta + D + D\alpha)}$$

ppm-verdiene som benyttes: (Sorbotten et al. 2005)

A $\alpha$  (acetylerede) på reduserende ende: 5.19 ppm

A $\beta$  på reduserende ende: 4.7 – 4.8 ppm

D (deacetylerede) inni eller på ikke-reduserende ende: 4.9 ppm

A inni eller på ikke-red. ende: 4.6 ppm

D $\alpha$  på reduserende ende: 5.43 ppm

### 3.9 Nedbrytning av kitosan

Kitosan med acetyleringsgrad 0,63 ble nedbrutt av mutanter av de bakterielle kitinasene ChiA og ChiB, henholdsvis D313N og D313A (ChiA), og D142N og D142A (ChiB). Fra stipendiat Anette Dybvik ved NTNU fikk gruppen tilsendt en oversikt over tidspunkter det kunne være hensiktsmessig å stoppe reaksjonene ved. Målet var å oppnå en lav spaltningsgrad, omtrent 0,05. En  $\alpha$  på 0,05 forteller at det kun er 5 % av glykosidbindingene som er kuttet. På bakgrunn av nedbrytningsmønsteret ved denne spaltningsgraden kan enzymenes prosessivitet analyseres.

ChiA og ChiB er begge eksoaktive enzymer som bryter ned polysakkarider fra enden av kjeden (Eijsink et al. 2008), og målet er å undersøke hvilken effekt de utførte mutasjoner har på prosessiviteten. Et enzyms prosessivitet vises best ved lav spaltningsgrad ettersom det i begynnelsen av hydrolysen vil produseres en sterk overvekt av partallsfragmenter, spesielt dimerer. Alle oddetallsprodukter vil etter hvert omdannes til dimerer og monomerer. Derfor vil det være hensiktsmessig å stoppe reaksjonene ved lav spaltningsgrad. Reaksjonen har kommet godt i gang, men det er fortsatt endel polymer i løsningen. Tilstedeværelse av flere partalloligomerer enn oddetallsoligomerer tidlig i reaksjonen tyder på prosessivitet. (Horn et al. 2006a)

Nedbrytningsproduktene ble analysert ved hjelp av kjernemagnetisk resonans og størrelseseksklusjonskromatografi (SEC).

#### 3.9.1 Oppløsning av kitosan

Før enzym kan tilsettes må kitosan være fullstendig oppløst i nedbrytningsbuffer. BSA tilsettes for å stabilisere proteinet og for å hindre at proteinet binder seg til veggene i reaksjonsrøret. Dette er vanlig i reaksjoner der enzymkonsentrasjonen er lav. (Horn & Eijsink 2004)

Materialer:

- Nedbrytningsbuffer: 0,08 M NaAc + 0,2 M NaCl pH 5.5
- dH<sub>2</sub>O
- Frysetørket kitosan med acetyleringsgrad  $F_A = 0,63$
- 10 mg/ml BSA

#### Metode:

150 mg kitosan med  $F_A$  0,63 ble tilsatt nedbrytningsbuffer og dH<sub>2</sub>O i forhold 1:1 til et sluttvolum på 15 ml. BSA ble deretter tilsatt løsningen til en sluttkonsentrasjon på 0,1 mg/ml. Løsningen ble inkubert på risting ved 37 °C over natt.

### **3.9.2 Nedbrytning av kitosan med bakterielle kitinaser**

Enzymer som skal bryte ned kitosan:

ChiA: D313N og D313A

ChiB: D142N og D142A

Målet er å oppnå en spaltningsgrad på 0,05. Grunnet mangel på tid og enzym var det ikke anledning til å prøve ulike inkubasjonstidspunkter for å oppnå dette. Derfor har stipendiat Anette Dybvik hjulpet med å finne enzymkonsentrasjoner samt passende inkubasjonstider for å oppnå en spaltningsgrad nær 0,05.

#### Materialer:

- Enzym
- Oppløst kitosan
- Konsentrert HCl til pH justering
- 1 M NaOH til pH-justering

Metode:

Kitosanløsningen fra 3.9.1 ble tilsatt enzym til sluttkonsentrasjoner gitt av stipendiat Anette Dybvik, se tabell 3.9.2.1. Reaksjonene ble stoppet ved å endre pH til 2,5, etterfulgt av koking i 2 minutter. Reaksjonsblandingen ble deretter skilt i to rør: ett til NMR (avsnitt 3.10) og ett til SEC (avsnitt 3.11). Rørene ble deretter frysetørket over natt.

**Tabell 3.9.2.1: Nedbryting av kitosan ved bakterielle kitinaser**

<b>Enzym</b>	<b>Konsentrasjon (<math>\mu\text{g}/10</math> mg kitosan)</b>	<b>Reaksjon stoppet (minutter)</b>
<b>D313N</b>	275	25
<b>D313A</b>	500	250
<b>D142N</b>	500	20
<b>D142A</b>	1500	200

### 3.10 $^1\text{H}$ -NMR analyse av nedbrytingsprodukter

Ved hjelp av et integrert spekter fra  $^1\text{H}$ -NMR analysen av kitosanløsningen kan polymeriseringsgrad ( $DP_n$ ) og spaltningsgrad ( $\alpha$ ) bestemmes. (Liu et al. 2011; Zakariassen et al. 2009) Spaltningsgrad ( $\alpha$ ) er fraksjon av kuttete glykosidbindinger dividert på det totale antall glykosidbindinger. Ved en lav spaltningsgrad kan prosessivitet avgjøres.  $^1\text{H}$ -NMR er et godt redskap for analyse av sukkerpolymerer. Det er en enkel og rask metode som egner seg godt til analyse av acetylering- og spaltningsgrad. (Eide et al. 2012)

#### 3.10.1 Prøvepreparering til NMR

Før prøven kan analyseres på  $^1\text{H}$ -NMR må man forsikre seg om at det ikke er noen protoner fra vannmolekyler i prøven. Disse vil forstyrre signalene fra NMR-analysen, og vi vil få et spekter som ikke gjenspeiler innholdet i prøven på en nøyaktig måte. Det er derfor viktig å frysetørke prøven slik at vannet fordamper og deretter løse prøven i  $\text{D}_2\text{O}$ . Etersom kitosan er svært hygroskopisk (Hirai et al. 1991), bør dette trinnet gjentas for å kunne analysere prøven uten at analysen detekterer løsemiddelet som er brukt.

##### Materialer:

- Frysetørket nedbrutt kitosan
- $\text{D}_2\text{O}$
- NaOD og DCl til pD-justering
- WILMAD® NMR-rør

##### Metode:

Den frysetørkede prøven fra nedbrytningen av kitosan ble løst i 500  $\mu\text{l}$   $\text{D}_2\text{O}$  før den ble pD-justert til 4.5. Deretter ble prøven frysetørket før den igjen ble løst i  $\text{D}_2\text{O}$  og pD-justert til 4.5. Løsningen ble videre overført til NMR-rør og analysert med  $^1\text{H}$ -NMR ved 85  $^\circ\text{C}$  og 300 MHz.

### 3.10.2 Tolkning av NMR-spektre

<sup>1</sup>H-NMR-spektrene ble integrert ved hjelp av VnmrJ-programmet, og spaltningsgraden,  $\alpha$ , ble regnet ut ved hjelp av følgende formel:

$$DP_n = \frac{(A + A\alpha + D + D\alpha + A\beta)}{(A\alpha + A\beta)}$$

$$\alpha = \frac{1}{DP_n}$$

$DP_n$  viser grad av polymerisering.  $\alpha$  er symbolet for spaltningsgrad, som forteller om forholdet mellom spaltet og uspaltet kitosan. En  $\alpha$  på 0,05 forteller at det kun er 5 % av glykosidbindingene som er kuttet. Målet var å oppnå en prøve med spaltningsgrad på 0,05 som videre skulle analyseres ved størrelseseksklusjonskromatografi for å se på fordelingen av nedbrutte oligomerer. På bakgrunn av nedbrytingsmønsteret kan det avgjøres hvorvidt enzymet er prosessivt eller ikke.



### 3.11 SEC-analyse av nedbrytningsprodukter

Størrelseseksklusjonskromatografi (SEC) er en kromatografisk teknikk som kan benyttes for å separere blandinger av delvis N-acetylerede oligomerer basert på størrelse. (Horn et al. 2006a) SEC blir ofte brukt til separasjon av større biologiske polymerer, og egner seg derfor godt til analyse av KOS. Denne kromatografiske metoden vil separere oligomerer av nedbrutt kitin og kitosan med ulike lengder. (Miller 2005) Systemet består av 3 Superdex™ kolonner der stasjonærfasen består av dekstran og krysskoblet agarose med porestørrelse på 34 µm. (Greibrokk et al. 1998) Stasjonærfasen fungerer som en molekylær sil (Miller 2005) der molekyler på polymerform, for eksempel kitin og kitosan, vil være for store til å gå inn i stasjonærfasens porer og blir derfor ført ut med mobilfasen. Molekyler med tilstrekkelig lav molekylvekt vil retarderes og elueres med ulik hastighet. Retardasjon vil avta med økende molekylstørrelse. (Greibrokk et al. 1998)

Mobilfasen brukt ved SEC-forsøkene i denne oppgaven er 0,15 M ammoniumacetat (NH<sub>4</sub>Ac), pH 4.5. Molekylene vil elueres isokratisk, det vil si at mobilfasens konsentrasjon og sammensetning holdes konstant under hele analysen. (Greibrokk et al. 1998; SeQuant 2001)

Fraksjoner med ønsket spaltningsgrad ble analysert på SEC-kolonne for å analysere prosessivitet. Ettersom grad av prosessivitet hovedsakelig avgjøres av de oligomerer som er kappet av kitosanpolymeren vil man være tjent med å skille polymertoppen fra prøven før analysen. Disse kan så analyseres på SEC.

#### Materialer:

- Frysetørkede prøver av nedbrutt kitosan
- Mobilfase (0,15 M NH<sub>4</sub>Ac, pH 4.5)
- Amicon oppkonsentreringsrør
- Sprøyter
- Sprøytefilter 22 µm
- Kanyler

### Metode

De frysetørkede kitosanprøvene ble løst i 2 ml mobilfase før de ble sentrifugert gjennom et Amicon oppkonsentreringsrør for å skille oligomerene fra polymerene. Prøven ble så filtrert ved bruk av sprøyte og sprøytefilter og deretter injisert inn i prøveløopen som leder inn i den første SEC-kolonnen. RI-detektoren ble innstilt med sensitivitet 1.

### 3.12 Viskositetsassay

Endoglykosidaser vil redusere viskositet raskere enn enzymer med en eksoaktiv mekanisme fordi endoaktive enzymer vil bryte ned polymertoppen raskere. (Horn et al. 2012)

Syrehydrolyse av kitosan er ofte brukt som en modell for aktiviteten til endoglykosidaser fordi denne metoden introduserer vilkårlige kutt langs polymerkjeden. Forsøk som tidligere er gjort på kitinase B og human chitotriosidase har vist at begge disse er endoglykosidaser, da relativ viskositet raskt reduseres ved hydrolysering av kitosan. (Eide et al. 2012)

Enzymatisk nedbrytning av kitin og kitosan resulterer i kitoligosakkarider (KOS) av varierende størrelse. Hver glykosidbinding som brytes gir opphav til en ny reduserende ende. Nedbrytningsprosessen kan følges ved å måle produksjon av reduserende ender. Metoder for å måle dette er ofte basert på redoksreaksjoner som involverer elektronoverføring fra acetyl/hemiacetal til metallioner. Ved å bruke 3-metyl-2-benzothiazolinon hydrazon (MBTH) som elektronakseptor er metoden uavhengig av lengden på oligosakkaridene. MBTH antas å være den mest sensitive metoden for å kvantifisere KOS basert på reduserende ender. (Horn & Eijsink 2004) I denne reaksjonen kombineres et aldehyd med to molekyler av MBTH i en to-trinns prosess. Det første trinnet skjer ved nøytral pH. Aldehydet kondenserer med et molekyl av MBTH. Det andre trinnet skjer i et surt og oksiderende miljø. Aldehyd-MBTH komplekset reagerer med det andre MBTH-molekyler, og det dannes et farget produkt. Dette har en  $\lambda_{\max}$  på 620 nm og kan avleses med et spektrofotometer. (Anthon & Barrett 2002)

#### Materialer:

- Kitosan med ønsket acetyleringsgrad: 0,35, 0,46, 0,55, 0,70
- 40 mM acetatbuffer, pH 5.4
- 0,1 M NaCl
- Ønsket protein: ChiA  
ChiA D313N/F396W  
ChiB  
HCHT

### Metode

For å bestemme viskositet og grad av reduserende ender i løsningen, ble kitosan med Fa 0.35, 0.46, 0.55, og 0.70 løst til endelig konsentrasjon 1 mg/ml i 40 mM acetatbuffer (pH 5.4) med 0,1 M NaCl. Protein ble tilsatt til sluttkonsentrasjon 66 ng/ml. Bestemmelse av relativ viskositet i polymerløsningen og bestemmelse av antall reduserende ender ble gjort ved MBTH-metoden (Horn & Eijsink 2004) som beskrevet av Sikorski et al. (Sikorski et al. 2006). Prøver ble tatt ut ved følgende tidspunkter: 5, 20, 40, 70, 100, 120, 150 og 180 min.

Dette forsøket ble gjort av stipendiat Anette Dybvik ved NTNU som en del av et større forskningsprosjekt.

## 4. RESULTATER

### 4.1 Mutasjonsanalyse humane kitinaser

Humane kitinaser produseres av forsvarsceller i det humane immunforsvaret. Begge de kjente kitinasene, HCHT og AMCase, er oppregulert i alvorlige sykdommer, noe som fører til at høyere kunnskap innen dette feltet er ønskelig.

Aktuelle mutanter i humane kitinaser:

- HCHT W31A (subsete -3)
- HCHT W99A (subsete +1)
- AMCase W31A (subsete -3)

Disse mutantene ble valgt for å undersøke hvordan de aromatiske residuene påvirker enzymets prosessivitet. Residuene befinner seg i det aktive setet: W99A ligger i +1 subsetet og W31A i -3 subsetet. Hydrolysen skjer i -1 subsetet, og en acetyllert enhet her er nødvendig for at glykosidbindingen skal kunne kuttes. Den aromatiske residuen i -3 subsetet antas å ha en rolle i bindingen av substratet. I ChiA spiller subsete -3 en viktig rolle i enzymets prosessive virkemåte. Tryptofanresiduen (W) i dette subsetet interagerer med substratet og styrker proteinkomplekset. Den støtter dannelse av et nettverk for intermolekylær interaksjon som er nødvendig for gjenkjenning og posisjonering av den acetyllerte enheten før det hydrolytiske subsete -1. Fordi residuen interagerer med polymeren og bidrar til den glidende bevegelsen gjennom det aktive setet er den viktig for prosessivitet. (Norberg et al. 2011)

De aktuelle residuene bidrar mest sannsynlig til enzymets prosessive virkemåte, og ved å mutere disse til en aminosyre som er nøytral, hydrofob og upolar (alanin, A) kan endring i prosessivitet undersøkes. Dette er tidligere observert for ChiA og ChiB. Mutasjonen fra W til A i disse subsetene forventes å være ukomplisert siden tilsvarende mutasjoner har vist seg å være det for andre tilsvarende systemer.

## 4.2 Mutasjonsanalyse bakterielle kitinaser

Bakterielle kitinaser som allerede er mutert skal dyrkes opp og renses, deretter bryte ned kitosan, og produktene skal analyseres ved  $^1\text{H-NMR}$  og SEC. Ved å mutere polare residuer i nærheten av det katalytiske setet kan en eventuell endring i prosessivitet analyseres.

Aktuelle bakterielle kitinaser:	ChiA D313N
	ChiA D313A
	ChiA D313N/F396W
	ChiB D142N
	ChiB D142A

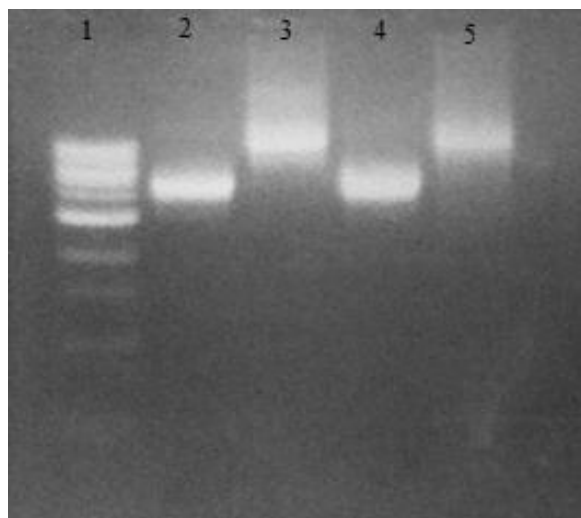
Asp313 i ChiA og Asp142 i ChiB er nøkkelresiduer for kitinase-katalysert hydrolyse av kitin med viktige interaksjoner internt i proteinet og mot substratet. Det har ikke tidligere blitt undersøkt om dette residuet er viktig for prosessivitet. ChiA D313N/F396W er en hypertransglykosylerende mutant der fenylalanin (F) er mutert til tryptofan (W). Dette øker den aromatiske overflaten det innkommende sukkeret interagerer med og forbedrer posisjoneringen av sukkeret. Siden transglykosyleringsaktiviteten øker med denne mutasjonen, vil denne mutanten være et godt enzym å benytte for å se om høy transglykosyleringsaktivitet har en effekt på prosessivitet. (Zakariassen et al. 2011)

## 4.3 Kloning

### 4.3.1 PCR

Under vises noen eksempler på hvordan resultatet etter en agarosegel kan bli. Gelene er laget som forklart i avsnitt 3.2.3 og tilsatt EtBr. EtBr kan detekteres ved hjelp av UV-lys, og det ble tatt bilde av gelene.

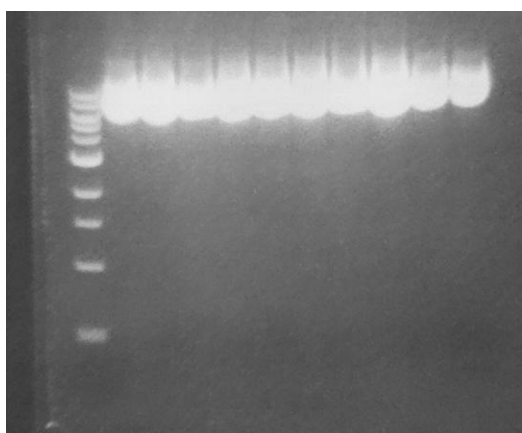
Figuren under viser resultatet av PCR reaksjonen der AMCase WT plasmid ble mutert til W31A. En kontrollreaksjon ble i tillegg utført med kontrollplasmid som fulgte med *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit* fra Agilent Technologies. Dette har en størrelse på 4,5 kb. pPIC9K plasmid som brukes i mutagenese av HCHT og AMCase er 9,3 kb stort. Ved linearisering bør ikke plasmidets størrelse endres stort. Det skal kun kuttes slik at det lettere kan transformeres inn i kompetente celler.



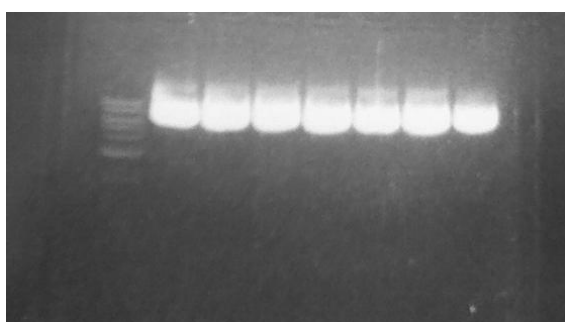
**Figur 20: DNA gel AMCase W31A før og etter kutting av plasmid. Påsatt i brønn 1 er 1kb DNA ladder. Brønn 2 viser kontrollplasmid etter PCR-reaksjonen mens brønn 3 viser pPIC9K med AMCase W31A etter PCR. Brønn 4 og 5 viser henholdsvis kontrollplasmid og pPIC9K med AMCase W31A etter linearisering med restriksjonsenzymet *DpnI*.**

### 4.3.2 Dyrkning av transformanter

Etter PCR-reaksjonen ble plasmidene transformert inn i XL1-Blue Superkompetente celler. Cellene ble platet ut på agarplater med LB- medium for å uttrykke det muterte plasmidet. Eventuelle kolonier ble deretter dyrket i dyrkningsrør og isolert ved hjelp av E.Z.N.A.<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit I fra Omega Bio-Tek. Plasmidet ble videre sekvensert. Det er vanlig å analysere plasmidet på agarosegel før det sendes til sekvensering for å sjekke at cellene har uttrykt riktig plasmid. Gelbilder fra en slik analyse vises i figur 21 og 22.



**Figur 21: Plasmid HCHT W99A (1-5) og HCHT W31A (6-10). Plasmidene har en størrelse på omtrent 6 kb.**



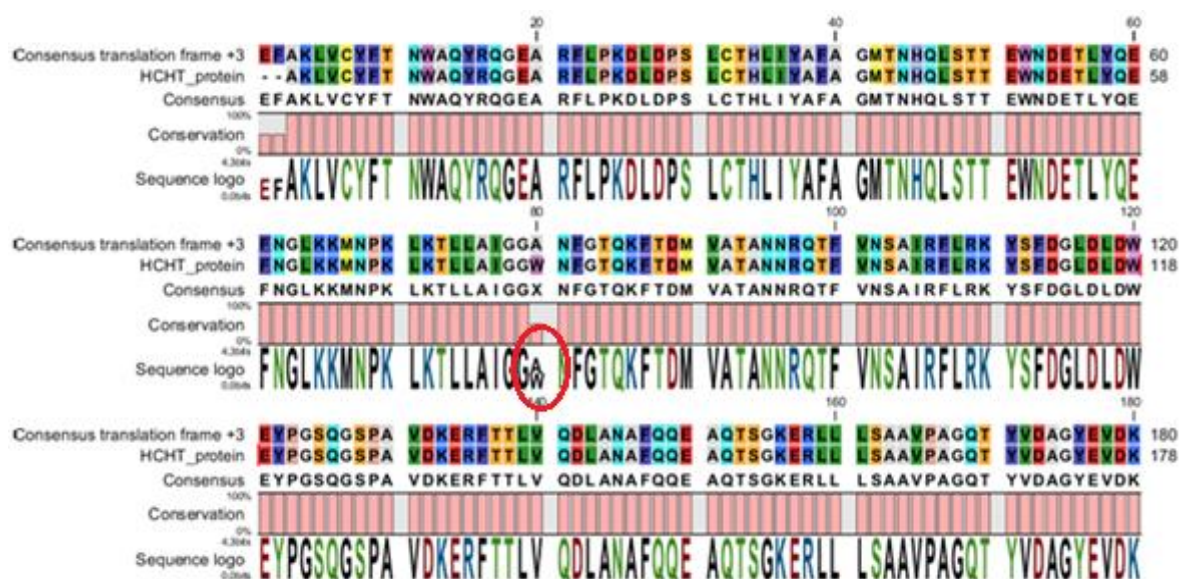
**Figur 22: Analyse av innsatt AMCase W31A plasmid.**

Begge bildene viser at plasmidene har blitt satt inn i XL1-Blue superkompetente celler, og at cellene har klart å uttrykke de muterte plasmidene.



### 4.3.3 Sekvensering

Plasmidene ble sendt til GATC Biotech i Constance, Tyskland. Resultatet analyseres ved hjelp av programmet CLC DNA Workbench. Ved å bruke programmets sekvensverktøy, blant annet sekvensalignment, kan den muterte sekvens sammenliknes med en villtypesekvens og en eventuell mutasjon vil vises. I tillegg kan programmet oversette DNA-sekvensen til aminosyresekvens, illustrert ved bildet under.



**Figur 23: Resultatet av sekvenseringen av HCHT W31A. Mutasjonen vises som en substitusjon i aminosyresekvensen og er markert med en rød ring.**

Bildet viser at mutering har gått riktig for seg, og mutasjonen kan sees som en substitusjon fra W (tryptofan) til A (alanin). Nummereringen av aminosyrene vil ikke stemme ettersom sekvensen mangler et lederpeptid. Ettersom denne sekvensen ikke viste noen andre mutasjoner, ble plasmidet videre transformert inn i *P.pastoris* for overekspressjon.

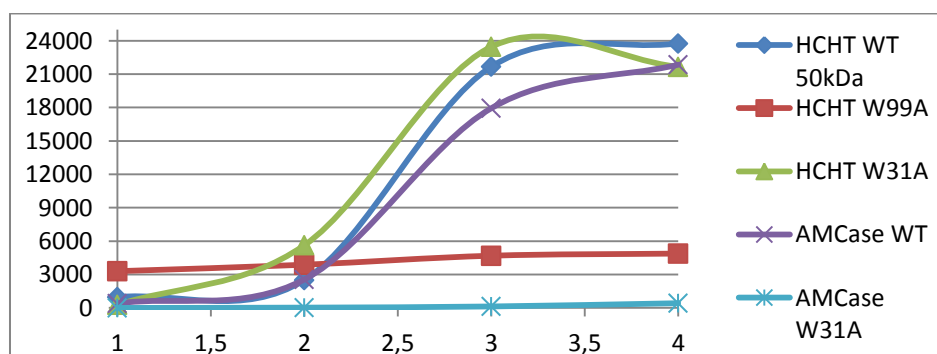
Sekvensering av AMCase W31A, HCHT W99A og HCHT W31A viste at alle plasmidene hadde riktig mutasjon.

#### 4.4 Overekspressjon og rensing av humane kitinaser

I tillegg til de tre mutantene beskrevet overfor, har HCHT WT (50 kDa isoform) og AMCase WT (50kDa isoform) også blitt klonet inn i *P.pastoris*. De to villtypene og de tre aktuelle mutantene ble isolert. Dyrkingsbetingelsene er som beskrevet i avsnitt 3.5 og underveis i dyrkningsprosessen ble det tatt ut mindre prøver som ble analysert ved aktivitetsassay og SDS-PAGE. Under følger noen grafer som viser utviklingen i aktivitet mot 4-MU-(GlcNAc)<sub>2</sub> i løpet av dyrkningen. Figur 24 viser alle mutantene plottet sammen i en graf.

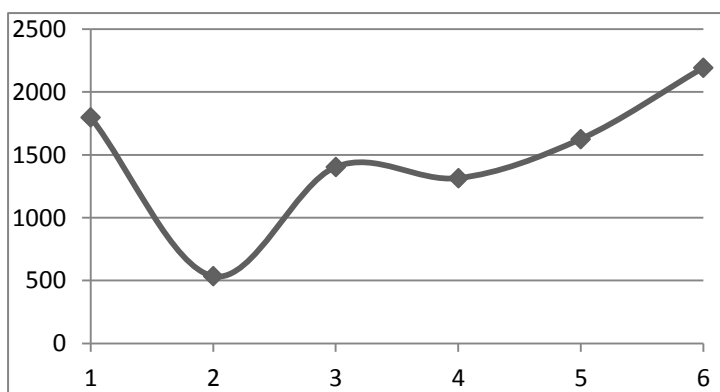
##### 4.4.1 Enzymaktivitet

Figur 24 viser en oversikt over utviklingen av spesifikk enzymaktivitet i kulturene. Prøver er tatt ut hver dag over en 4-dagers periode. Hvert enzym er representert med en egen kurve.



Figur 24: Enzymaktivitet humane kitinaser. X-aksen viser antall dager med metanoltilsetting.

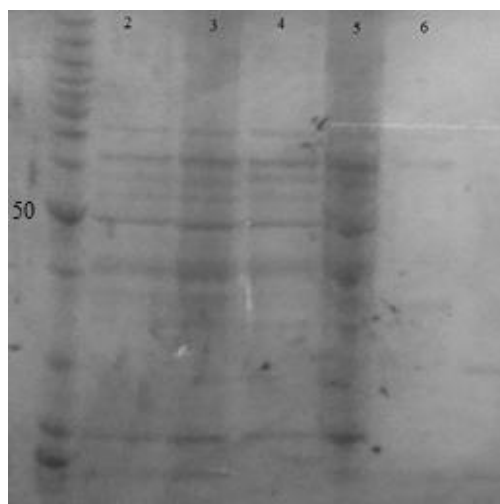
Under vises en oversikt over utvikling av enzymaktivitet gjennom alle trinnene i ekspresjonen av AMCase WT. Aktiviteten stiger, dette påvirkes av høyere konsentrasjon av enzym i prøvene. De samme prøvene ble forsøkt analysert ved SDS-PAGE, men uten særlig godt resultat.



**Figur 25: Aktivitetsmålinger av AMCase WT overekspressjon ved ulike trinn i prosedyren. 1) Urenset 1, 2) Før oppkonsentrering med Vivaflow, 3) Før dialyse, 4) Etter dialyse, 5) Etter rensing, 6) Etter oppkonsentrering med Amiconrør.**

#### 4.4.2 SDS-PAGE

Etter å ha undersøkt ulike fraksjoner gjennom dyrkning og etterarbeid med HCHT og AMCase har det blitt klart at det underveis i prosessen forsvinner mye enzym. SDS-PAGE analyser av tidlige prøver, som illustrert i figuren under, viser at det uttrykkes større mengder enzym enn resultat av rensing har vist. Det ble derfor utført analyser for å undersøke hvor alt proteinet forsvinner. Det ble tatt ut prøver ved hvert trinn etter høsting av proteinløsningene, resultatet kan sees under.



**Figur 26: SDS-PAGE av HCHT W99A og HCHT W31A utført for å undersøke hvor proteinet forsvinner. Bånd med størrelse 50 kDa er markert i ladder. Brønn 2) HCHT W99A før oppkonsentrering med Vivaflow, 3) HCHT W99A etter oppkonsentrering med Vivaflow, 4) HCHT W31A før oppkonsentrering, 5) HCHT W31A etter oppkonsentrering, 6) HCHT W31A etter dialyse.**

Figur 26 viser hvordan proteinet forsvinner i løpet av prosessen med å bearbeide løsningen. Brønn 2 og 4 viser to ulike mutanter av HCHT før oppkonsentrering. Her sees båndet ved 50 kDa klart. Videre vises den samme løsningen etter oppkonsentrering i brønn 3 og 5. Båndet ved 50 kDa blir sterkere, men som forventet forsvinner lite av de uspesifikke proteinene. Brønn 6 viser derimot HCHT W31A etter dialyse, og resultatet illustrerer at dette er det kritiske trinnet. De uspesifikke proteinene har forsvunnet, inkludert proteinet ved 50 kDa. Dette viser at dialysen ikke fungerer optimalt.

#### 4.4.3 Rensing av AMCcase

Isolering av de bakterielle kitinasene har tidligere gitt gode resultater ved bruk av sterk kationbytter og etterfølgende isolering ved hydrofob interaksjon. Proteinene kan også renses på kitinkuler som utnytter interaksjonen mellom enzym og substrat.

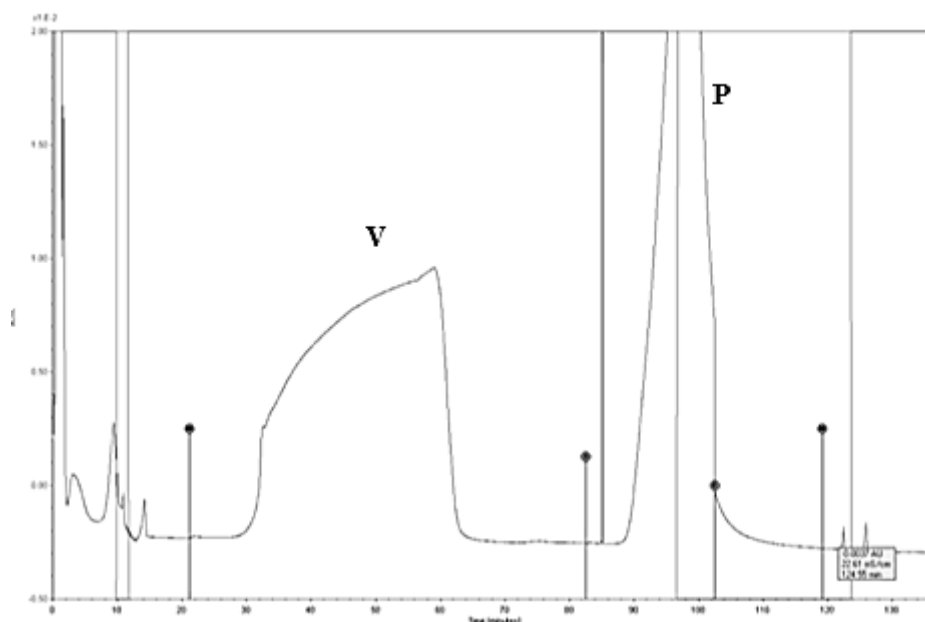
AMCcase WT viste seg derimot vanskelig å isolere, som illustrert i tabellen under, i motsetning til gruppens erfaring med å isolere HCHT WT uten kitinbindende domene. Den samme metoden ble dermed benyttet ved rensing av HCHT med kitinbindende domene. Metoden som ble brukt var svak kationbytter med natriumacetatbuffer, med gradvis økende pH. Denne metoden gav lite og urent utbytte. Forskjellige metoder ble forsøkt, men ingen av disse gav noe bedre utbytte, se tabell 4.4.3.1.

**Tabell 4.4.3.1: Oversikt over de ulike rensemetodene som er prøvd ved rensing av AMCase WT. Beskrevet er også kolonnens spesifisering, hvilke buffere som er anvendt og hva resultatet ble.**

Kolonne	Spesifikasjon	Buffere	Resultat
HiTrap CMFF	Svak kationbytter, ingen gradient	A: 0,05 M NaAc, pH 4.2	Protein i topp, urent
	pKa 3,5 – 4	B: 0,05 M NaAc, pH 6.8	
HiTrap CMFF	Svak kationbytter, gradient	A: 0,05 M NaAc, pH 4.2	Aktivitet i flowthrough
	pKa 3,5 – 4	B: 0,05 M NaAc, pH 6.8 + 150 mM NaCl	
HiTrap CMFF	Svak kationbytter, gradient	A: 0,05 M NaAc, pH 4.2	Aktivitet i flowthrough
	pKa 3,5 – 4	B: 4 M CH <sub>3</sub> COOH	
Kitinkuler	Gradient	A: 0,05 M NaAc, pH 4.2	Aktivitet i flowthrough
		B: 0,05 M NaAc, pH 6.8	
HiLoad® SP Sephacrose	Sterk kationbytter, gradient	A: 40 mM Etanolamin, pH 9.4	Aktivitet i flowthrough
		B: 40 mM Etanolamin + 1 M NaCl	
Phenyl Sepharose	Hydrofob interaksjonskolonne, gradient	A: 20 mM TrisHCl + 0,5 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Aktivitet i flowthrough
		B: 20 mM TrisHCl + 4% Isopropanol	Aktivitet i flere topper
HiTrap OctylFF	Hydrofob interaksjonskolonne, gradient	A: 20 mM TrisHCl + 1 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Aktivitet etter flowthrough
		B: 0,05 M TrisHCl pH 8.0	Topp med litt aktivitet
HiTrap SPXL	Sterk kationbytter, gradient	A: 0,05 M NaAc, pH 4.2	Ingenting
	pKa 2	B: 0,05 M NaAc, pH 6.8	
HiTrap QXL	Sterk anionbytter, gradient	A: 0,05 M TrisHCl, pH 8.5	Aktivitet etter flowthrough, Topp med litt aktivitet
		B: 0,05 M TrisHCl pH 8.5 + 1 M NaCl	

Alle løsninger som gav topper i kromatogrammene ble analysert ved SDS-PAGE og aktivitetsassay for å undersøke hvor proteinet forsvant. SDS-PAGE og aktivitetsassay gav ingen klare svar på hvor AMCase blir av under rensingen. Flere metoder ble forsøkt, men da ingen av disse metodene gav noe bedre resultat er det nærliggende å tro at AMCase binder så sterkt til kolonnen at ikke alt proteinet elueres ut. Alternativt var mengde protein som ble applisert på de ulike kolonnene for liten.

Figur 27 viser et kromatogram fra rensing av fermentert HCHT WT med kitinbindende domene. Proteinet ble isolert på en svak kationbytter med 50 mM NaAc buffere og pH-gradient. De aktuelle toppene er markert.



**Figur 27: Kromatografisk resultat av rensing av HCHT WT ved svak kationbytter. Buffere som ble brukt var 50 mM NaAc med pH-gradient. Voidtoppen er markert med V, proteintoppen med P.**

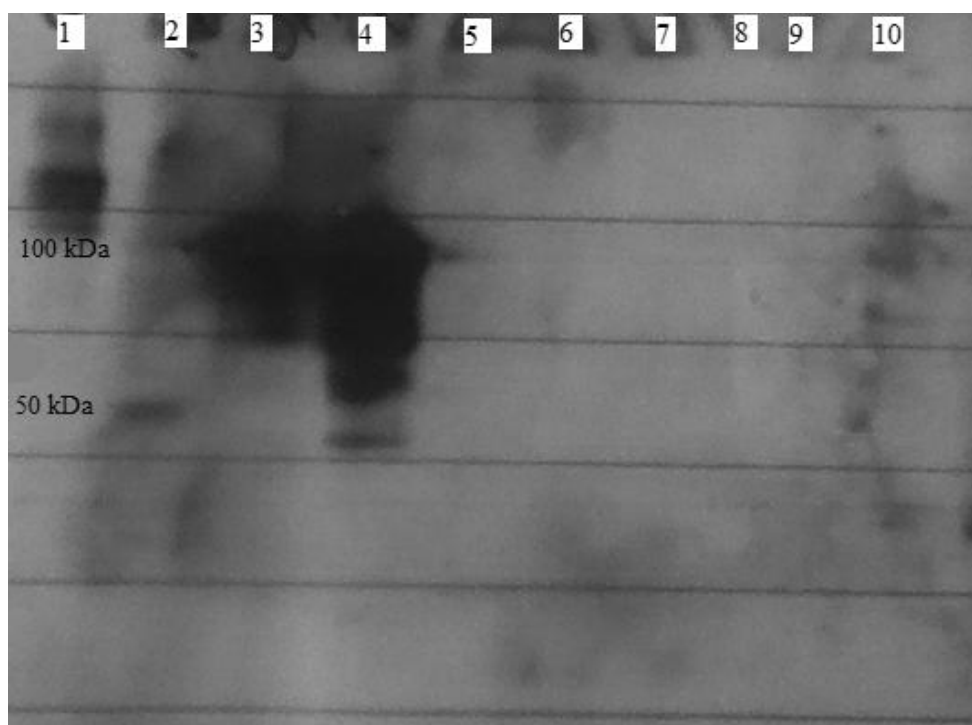
Ved isolering av AMCcase WT var konsentrasjonen av AMCcase i de ulike fraksjonene svært lav, noe som førte til at båndene på SDS-gelen ble svært svake. Flere analyser fra ulike isoleringsforsøk ble separert med SDS-PAGE. Analysene viste ingen bånd, og før konklusjoner om at det ikke finnes noe protein i løsningen ble trukket, ble det bestemt at noen av løsningene fra isoleringsforsøkene skulle analyseres ved Western blotting. Western blotting er en sensitiv metode der det komplekse forholdet mellom antigen og antistoff utnyttes. Ved å merke antistoffene som binder til AMCcase (antigenet) kan det detekteres lavere konsentrasjoner av protein enn ved SDS-PAGE.

#### 4.4.4 Western blotting

Figur 28 viser en analyse gjort av AMCase WT ved Western blotting. Nasale polypper fra astmapasient ble brukt som positiv kontroll. Ettersom denne inneholder påvist AMCase, agerer den både som molekylvektmarkør og kontroll. I tillegg dannes et bilde av hvor godt båndet burde synes. Analysen ble gjort med flere forskjellige fraksjoner av AMCase, både før og etter ulike rensinger. Tabell 4.4.4.1 viser en oversikt over de ulike fraksjonene som ble analysert og i hvilke brønner de ble tilsatt.

Tabell 4.4.4.1: Oversikt over prøver analysert ved Western blotting

Prøve	Brønn
BenchMark™ Protein Ladder	1
Positiv kontroll	2
Oppkonsentrert og rensset AMCase	3
Før oppkonsentrering Vivaflow	4
Etter oppkons. Vivaflow	5
Flowthrough SP Sepharose Sterk kationbytter	6
Flowthrough CMFF Svak kationbytter	7
Flowthrough QXL Sterk anionbytter	8
Buffer A etter flowthrough QXL	9
Topp QXL	10



**Figur 28: Western blotting. AMCase WT fra ulike rensinger er analysert. Ladder synes i brønn 1, deretter er prøvene fordelt som beskrevet i tabell 4.4.4.1. Noen molekylvekter er markert.**

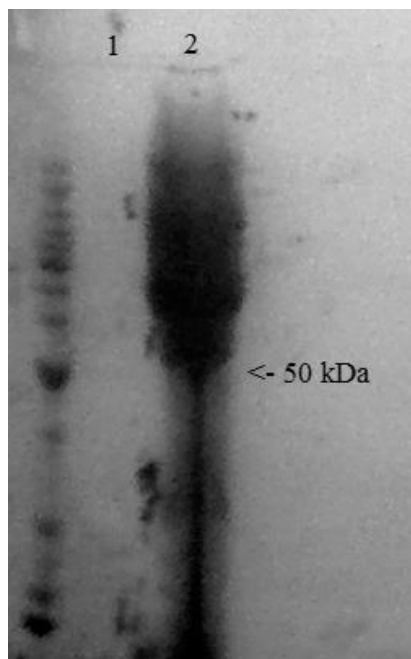
Molekylvektmarkøren og positiv kontroll synes godt. Kontrollen har et bånd med molekylvekt på omtrent 50 kDa, noe som stemmer med molekylvekten av AMCase. Brønn 3 og 4, henholdsvis oppkonsentrert og rensset AMCase gir sterke utslag ved 100 kDa, men som figur 28 viser var det mye uspesifikt protein i løsningen. I brønn 4 sees et svakt bånd ved 50 kDa og er prøve tatt fra løsningen rett etter høsting. Det forventes at det her finnes enzym. De resterende brønnene gir ingen bånd, og det antas derfor at det ikke finnes noe protein i disse fraksjonene.

#### **4.4.5 Fermentering**

Fermentering er en industriell metode for å produsere enzymer og gir generelt et bedre proteinutbytte enn tradisjonell dyrkning. Figur 29 viser resultatet av fermenteringen av HCHT WT med kitinbindende domene. Brønn 1 viser prøven før oppkonsentrering (avsnitt 3.6.2). Det sterkeste båndet i molekylvektsmarkøren har en størrelse på 50 kDa (se avsnitt 3.4.6 for



bilde av molekylvektsmarkør), og kontrollen har et svakt bånd ved denne størrelsen. Den oppkonsentrerte prøven i brønn 2 har et kraftig bånd ved 50 kDa, men prøven er ikke ren.



**Figur 29: Oppkonsentrering av HCHT WT med kitinbindende domene fra fermentering. Brønn 1 viser proteinet før oppkonsentrering, brønn 2 viser protein etter oppkonsentrering.**

Utbytte av rensede proteiner er gitt nedenfor:

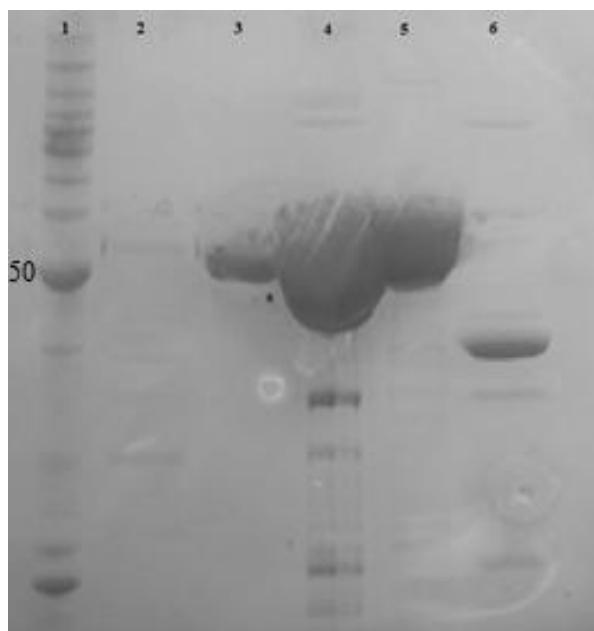
### Utbytte

Totalt utbytte av humane kitinaser etter dyrkning og isolering:

- HCHT WT med kitinbindende domene: 1,4 mg/ml, 3 ml.
- AMCase WT: 1 mg/ml, 2 ml. Forsøkene på å rense AMCase gav svært lite utbytte. Ettersom dette ikke er en ren proteinløsning egner ikke proteinet seg til analyse.
- Mutantene av HCHT og AMCase ble ikke dyrket på grunn av tidspress.

#### 4.5 Overekspresjon og rensing av bakterielle kitinaser

Figur 30 viser SDS-PAGE analyse av de fire bakterielle mutantene. Proteinene er isolert og oppkonsentrert. Utbytte av mutantene står beskrevet under. Som figuren viser, var det kun D142N som var helt ren, de resterende mutantene kunne ikke isoleres til en ren proteinløsning.



**Figur 30: SDS-PAGE analyse av bakterielle kitinaser etter isolering. Brønn 1 viser proteinstandard BenchMark™ Protein Ladder, brønn 2 viser periplasmatisk ekstrakt D142N, brønn 3 viser D142N, brønn 4 viser D142A, brønn 5 viser D313N og brønn 6 viser D313A. Proteinene har en størrelse på omtrent 50kDa.**

De bakterielle kitinasene ble isolert ved å separere periplasmatisk ekstrakt på sterk kationbytter, for deretter å isolere proteinene ved hydrofob interaksjon. De bakterielle kitinasene gav et bedre utbytte enn de humane kitinasene.

#### Utbytte

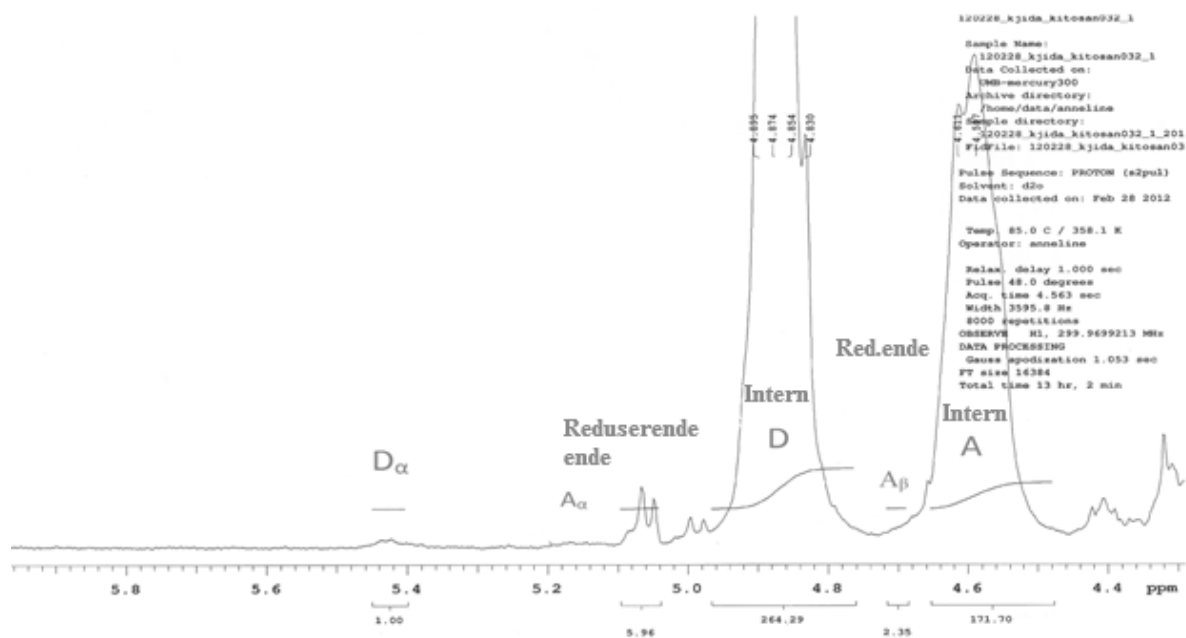
Mutant	Utbytte mg/ml	Utbytte ml
D313N	2,5	0,2
D313A	1	1
D142N	0,46	1,4
D142A	2,5	1

#### 4.6 $^1\text{H-NMR}$ av kitosan for å avgjøre deacetyleringsgrad

Figur 31 viser  $^1\text{H-NMR}$ -spekteret for kitosan med acetyleringsgrad 0,39.

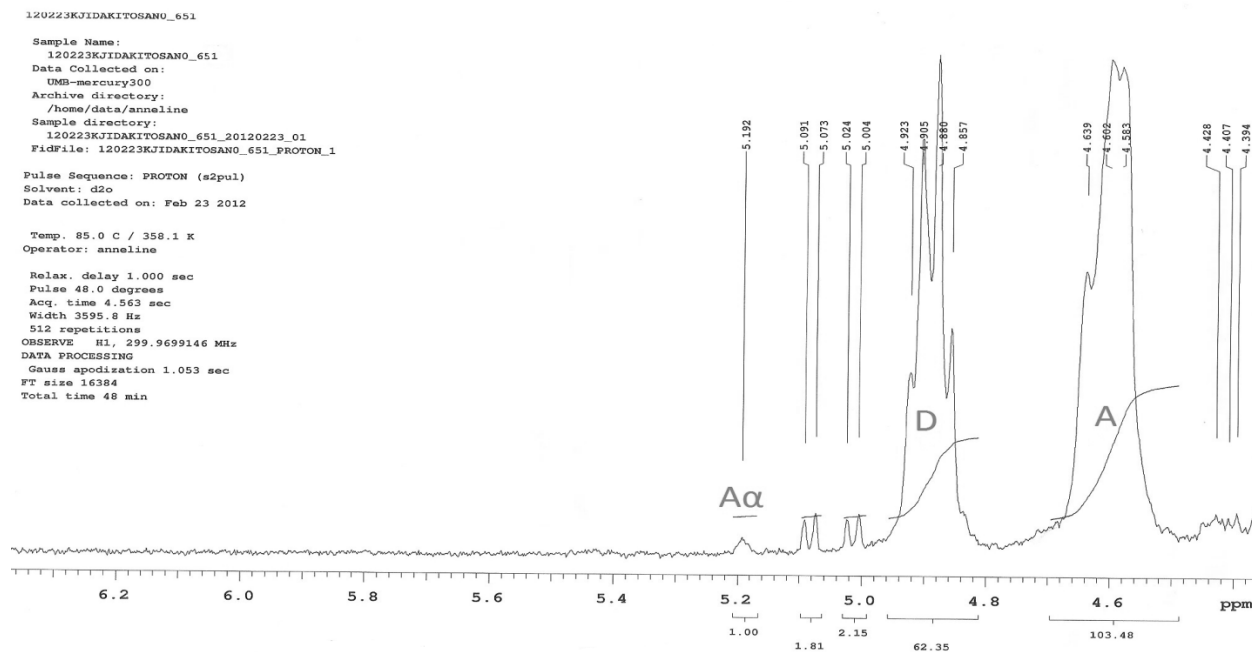
Acetyleringsgraden ble bestemt ved formelen vist i avsnitt 3.8.3.

$$FA = \frac{(A + A\alpha + A\beta)}{(A + A\alpha + A\beta + D + D\alpha)}$$



Figur 31:  $^1\text{H-NMR}$ -spekter for kitosan med acetyleringsgrad 0,39, se avsnitt 3.8.3 for beskrivelse av plassering av de ulike toppene.

Under vises  $^1\text{H-NMR}$ -spekteret til kitosan med acetyleringsgrad 0,63.



Figur 32:  $^1\text{H}$ -NMR-spekter for kitosan med acetyleringsgrad 0,63.

Ved acetyleringsgrad 0,39 finnes en større andel deacetylerede enheter, dette vises i spekteret ved toppen merket  $D\alpha$ . Disse deacetylerede sukkerenhetene har i stor grad forsvunnet i figur 32, da en acetyleringsgrad på 0,63 har færre deacetylerede enheter enn acetyleringsgrad 0,39. En acetyleringsgrad på 0,63 tilsier at kitosanpolymeren består av 63 % acetylerede sukkerenheter. Produktiv binding med enzym er mer sannsynlig ved en høyere acetyleringsgrad, ettersom hydrolyse er avhengig av en acetyleret enhet i -1 subsetet.

Tabell 4.6.1: Utbytte ved deacetylering av kitin. To ulike acetyleringsgrader ble produsert.

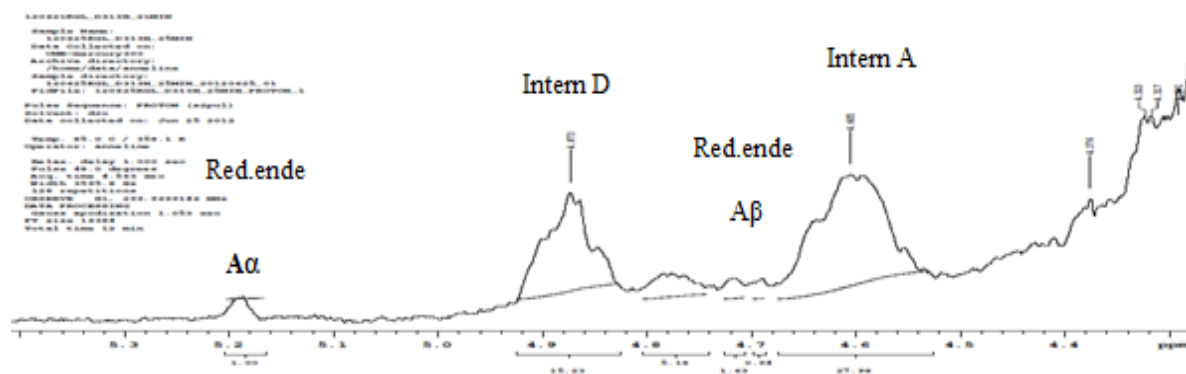
Startvekt kitin (gram)	Acetyleringsgrad	Utbytte (gram)
4,00	0,63	1,6
4,01	0,39	1,1

## 4.7 Nedbryting av kitosan ved bakterielle kitinaser

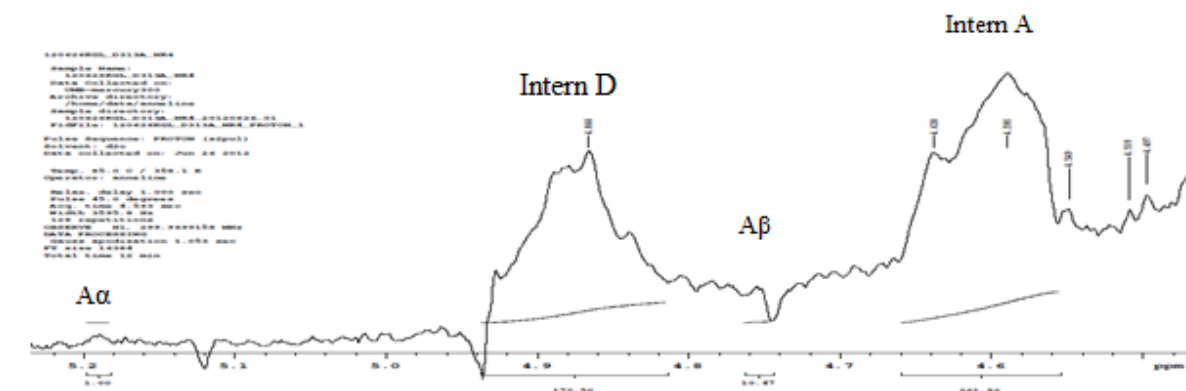
### 4.7.1 $^1\text{H-NMR}$

Spaltningsgrad ( $\alpha$ ) ble bestemt ved hjelp av  $^1\text{H-NMR}$  og regnet ut ved hjelp av signalintensitet av reduserende ender relativt til signalintensitet av interne anomere protoner (avsnitt 3.10.2).

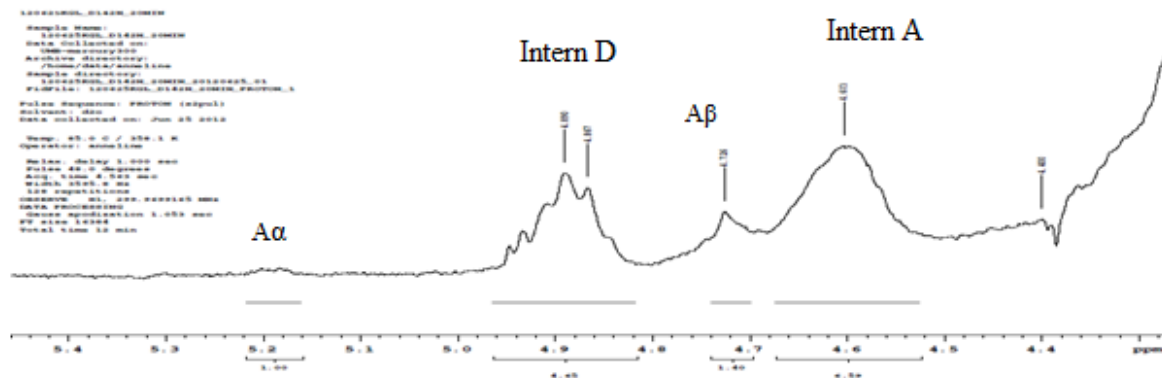
Under følger spektrene fra  $^1\text{H-NMR}$  analysen av nedbrutt kitosan ( $F_A$  0,63).



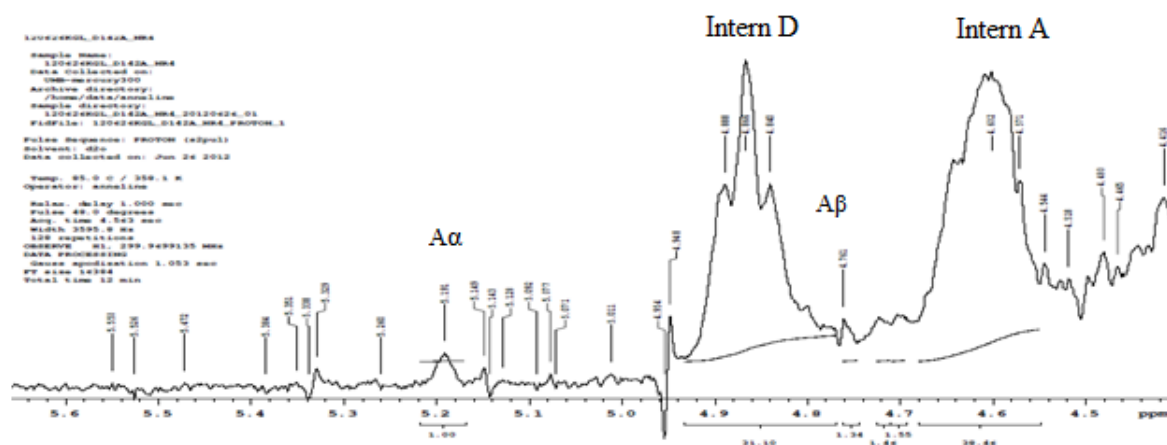
Figur 33:  $^1\text{H-NMR}$  spekter for D313N. Kitosan med  $F_A$  0,63 ble inkubert med enzym i 25 minutter. Oppnådd spaltningsgrad var 0,125.



Figur 34:  $^1\text{H-NMR}$  spekter for D313A. Kitosan med  $F_A$  0,63 ble inkubert med enzym i 250 minutter. Oppnådd spaltningsgrad var 0,026.



Figur 35: <sup>1</sup>H-NMR spekter for D142N. Kitosan med F<sub>A</sub> 0,63 ble inkubert med enzym i 20 minutter. Oppnådd spaltningsgrad var 0,12.



Figur 36: <sup>1</sup>H-NMR spekter for D142A. Kitosan med F<sub>A</sub> 0,63 ble inkubert med enzym i 2000 minutter. Oppnådd spaltningsgrad var 0,033.

Alle <sup>1</sup>H-NMR-spekterne er opptatt ved 85 °C og 300 MHz i 13 min. Tabell 4.7.1.1 viser de resulterende spaltningsgradene etter inkubering med kitosan med F<sub>A</sub> 0,63.

**Tabell 4.7.1.1: Resulterende spaltningsgrader ( $\alpha$ ) etter inkubering av kitosan med  $F_A$  0,63.**

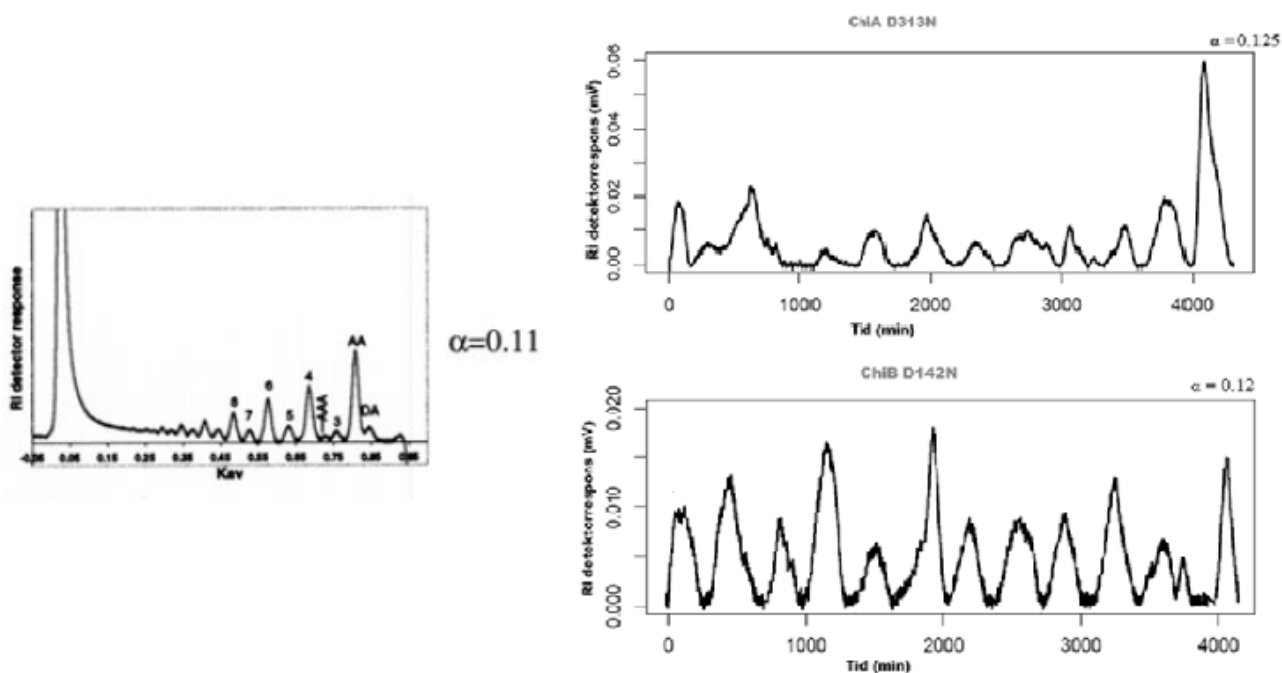
<b>Enzym</b>	<b>Spaltningsgrad (<math>\alpha</math>)</b>
<b>D313N</b>	0,125
<b>D313A</b>	0,026
<b>D142N</b>	0,12
<b>D142A</b>	0,033

## 4.7.2 SEC

Kitosankjeder lenger enn 40 enheter eluerer ut i en egen topp. Denne polymertoppen er filtrert bort for å øke sensitiviteten mot kortere oligosakkarider i prøven. Dersom det tidlig i nedbrytningen produseres flere partallsoligomerer enn oddetallsoligomerer, er dette et tegn på prosessivitet. (Horn et al. 2006a) En spaltningsgrad på 0,05 vil gi et godt bilde på nedbrytningsprodukter i initialfasen av nedbrytningen.

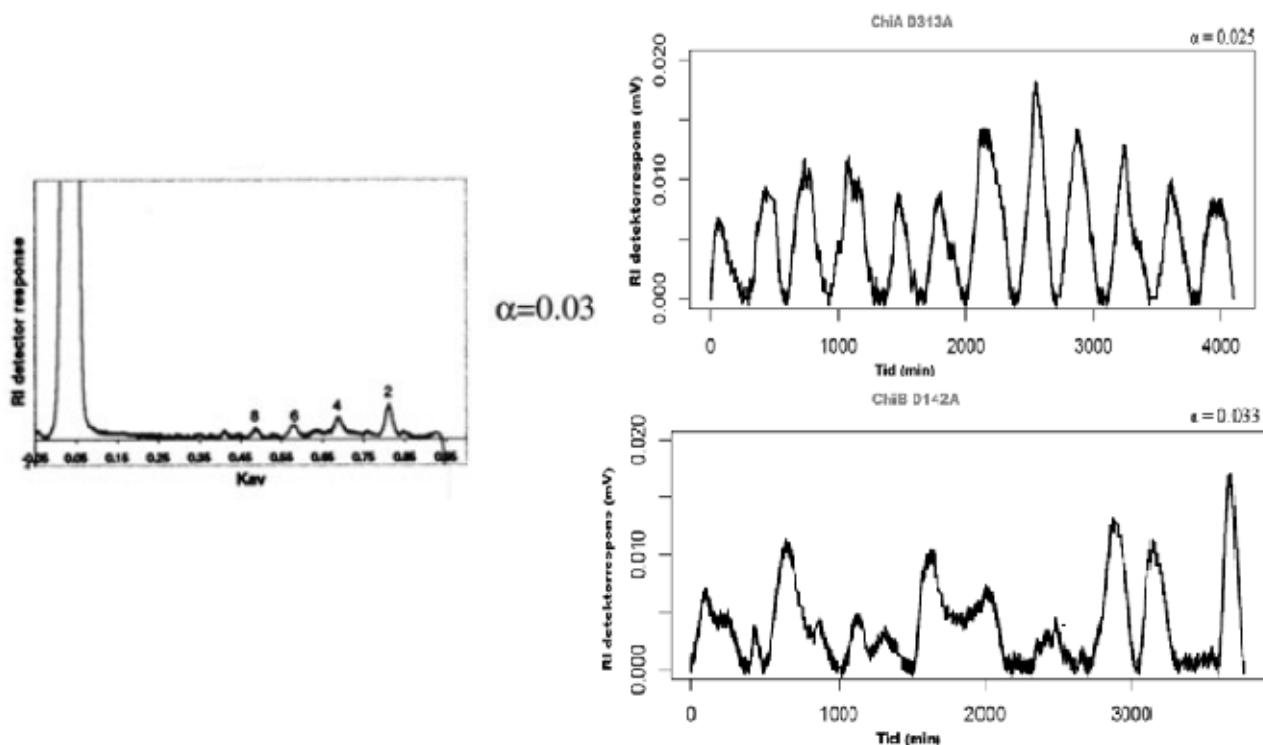
Figurene 37 og 38 viser baselinjekorrigerte spektre fra SEC-analyse av kitosan nedbrutt av ChiA og ChiB mutantene. Kitosan ble tilsatt enzym og inkubert et bestemt tidsrom for å oppnå en  $\alpha$  så nær 0,05 som mulig. Under vises spektre til enzymene med mutasjon sidestilt med spekter av oligomerer fra en nedbryting ved ChiB WT utført av Sørbotten et al. (2005). Spaltningsgradene på spektrene er omtrent like, noe som gir et godt grunnlag for sammenlikning. Spektre fra ChiB WT vises til venstre, mutert enzym vises til høyre.

Spektrene er markert med aktuell mutant og spaltningsgraden  $\alpha$ .



**Figur 37:** Til venstre: Størrelsesdistribusjon for oligomerer etter nedbryting med ChiB WT. (Sorbotten et al. 2005) ChiB WT, et prosessivt enzym, har brutt ned kitosan med  $F_A$  0,65. Til høyre: Baselinjekorrigert spekter av fordeling av KOS for ChiA D313N og ChiB D142N ved nedbryting av kitosan med  $F_A$  0,63.





**Figur 38:** Til venstre: Størrelsesfordeling for oligomerer etter nedbryting med ChiB WT. (Sorboten et al. 2005) ChiB WT, et prosessivt enzym, har brutt ned kitosan med  $F_A$  0,65. Til høyre: Baselinjekorrigert spekter av fordeling av KOS for ChiA D313A og ChiB D142A ved nedbryting av kitosan med  $F_A$  0,63.

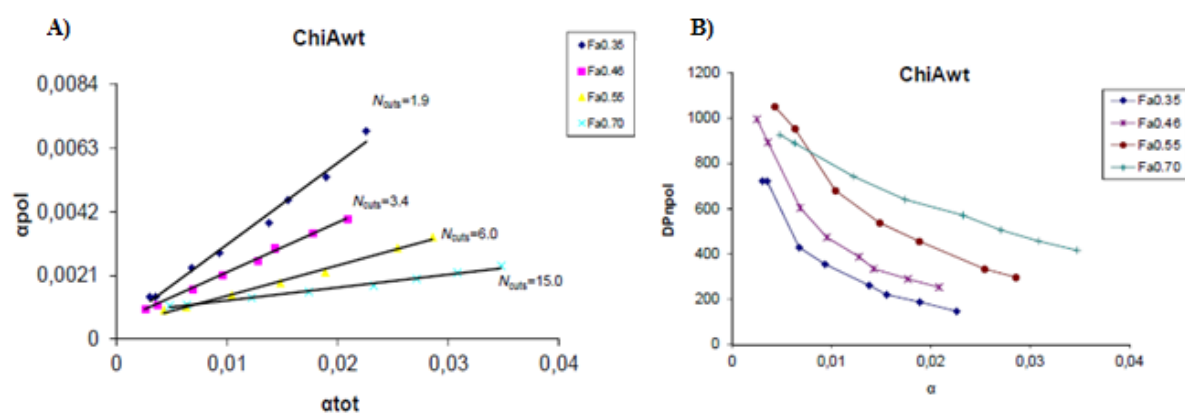
Til venstre i figurene 37 og 38 vises fordeling av oligomerer dannet ved nedbryting av et prosessivt enzym. Det er en klar overvekt av partallsprodukter, noe som er forventet når kitosan brytes ned av et prosessivt enzym. De aktuelle mutantene analysert i denne oppgaven er illustrert til høyre. Disse ser ut til å ha mistet noe av sin prosessivitet da det ikke er finnes det forventede mønster av partallsprodukter. Toppene er ikke annotert.

## 4.8 Viskositetsassay

Viskositetsmålingene ble utført av Anette Dybvik, stipendiat ved NTNU. Kitosan med ulike acetyleringsgrader ( $F_A$  0,35, 0,46, 0,55 og 0,70) ble tilsatt aktuelt enzym. Bestemmelse av relativ viskositet i polymerløsningen og bestemmelse av antall reduserende ender ble gjort ved MBTH-metoden (Horn & Eijsink 2004) som beskrevet av Sikorski et al (2006).

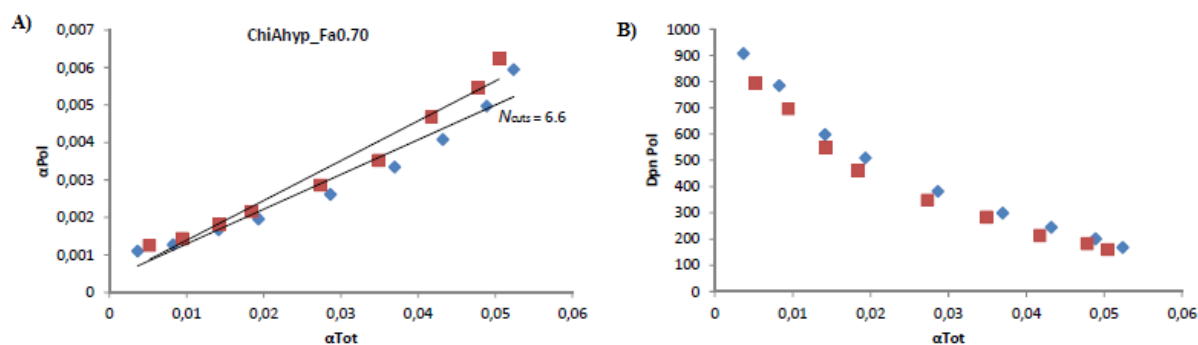
Viskositetsmålinger gir mulighet til å regne ut antall kutt per enzym-substratassosiasjon,  $N_{cuts}$ . Dette representerer grad av prosessivitet. (Sikorski et al. 2006) Sikorski et al. (2006) har funnet at ChiA og ChiB viser raskere nedgang i viskositet enn hva som forventes av eksoaktive enzymer. Dette kan tyde på at enzymene også har endoaktivitet, ettersom vilkårlig kutting av kjeden fører til en raskere nedbrytning.

### ChiA WT



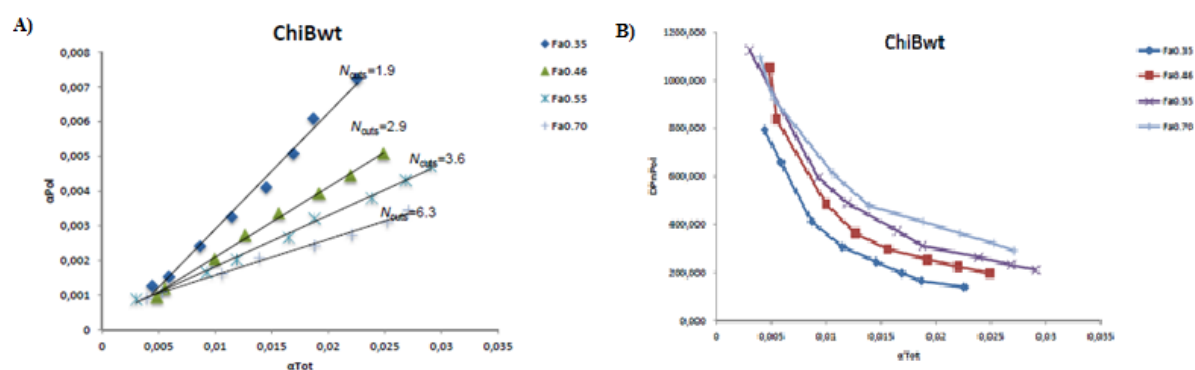
**Figur 39: A) Gjennomsnittlig antall kutt per enzym-substratassosiasjon for ChiA WT. B) Viskositetsmåling/MBTH-måling av ChiA WT. Endring i  $DP_n$  (depolymeriseringsgrad av polymertopp) som funksjon av  $\alpha$ . Rask nedgang i viskositet for alle acetyleringsgrader tyder på et endoprosessivt enzym.**

Ved kitosan med  $F_A$  0,70 har ChiA WT et gjennomsnittlig antall kutt per enzym-substratassosiasjon på 15, etter korleksjon for syrehydrolyse er  $N_{cuts}$  15.2.

ChiA D313N/F396W

**Figur 40:** A) Viser 2 paralleller fra viskositetsassay og 2 paralleller fra MBTH-målinger. Her er  $N_{cuts}$  korrigert for syrehydrolyse. ChiA wildtype har  $N_{cuts}$  15.2 når korrigert for syrehydrolyse. B) Viskositetsmåling/MBTH-måling av ChiA D313N/F396W. Endring i  $DP_{npol}$  som funksjon av  $\alpha$ .

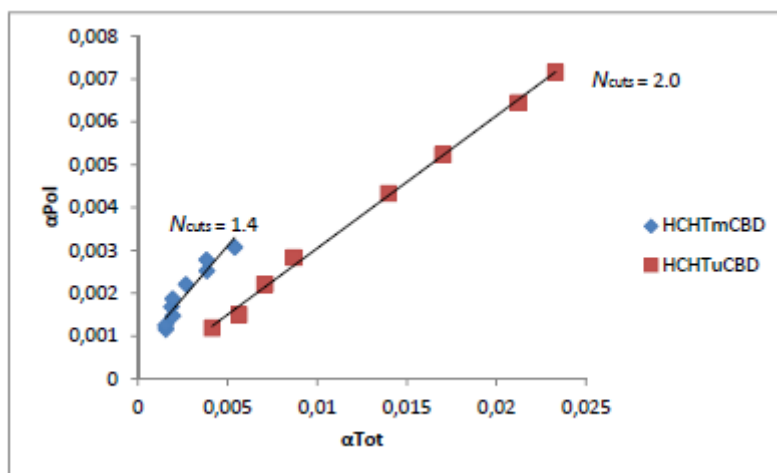
ChiA WT har  $N_{cuts}$  15,2. D313N/F396W viser seg å være mindre prosessiv enn ChiA WT, og har en  $N_{cuts}$  på 6,6. Dette betyr at per enzym-substratassosiasjon kuttes gjennomsnittlig 6,6 glykosidbindinger.

ChiB WT

**Figur 41:** A) Gjennomsnittlig antall kutt per enzym-substratassosiasjon for ChiB WT. B) Viskositetsmåling/MBTH-måling av ChiB WT. Endring i  $DP_{npol}$  som funksjon av  $\alpha$ . Rask nedgang i viskositet av alle acetyleringsgrader tyder på et endoprosessivt enzym.

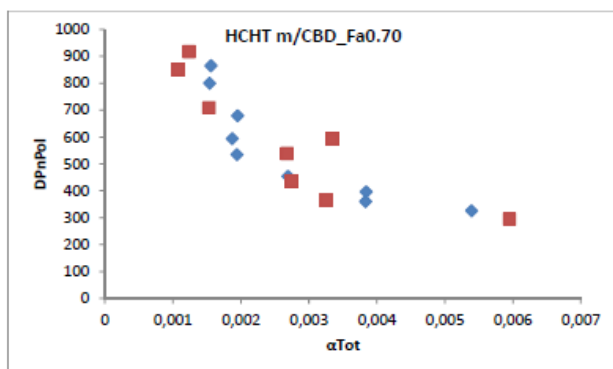
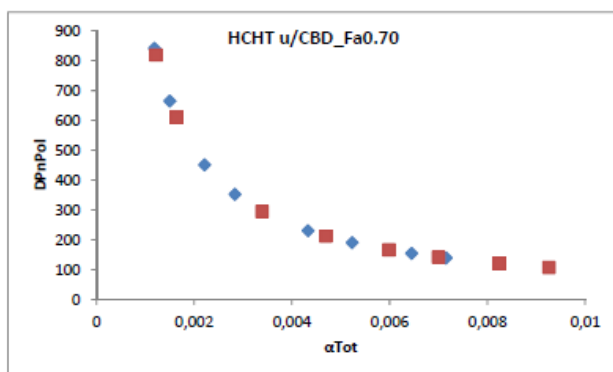
Inkubert med kitosan med  $F_A$  0,70 viser ChiB WT et gjennomsnittlig antall kutt per enzym-substratassosiasjon på 6.3. Dette er lavere enn både ChiA WT og ChiA D313N/F396W.

## HCHT



**Figur 42: Gjennomsnittlig antall kutt per enzym-substratassosiasjon for HCHT med og uten kitinbindende domene.**

Med en  $N_{cuts}$  på 1,4 og 2 er HCHT mindre prosessivt enn både ChiA og ChiB.



**Figur 43:** Viser nedgang i  $DP_{nPol}$  som funksjon av  $\alpha$ . HCHT med og uten kitinbindende domene er analysert på kitosan med  $F_A$  0,70.

HCHT uten kitinbindende domene viser en raskere nedgang i viskositet enn HCHT med kitinbindende domene, i tillegg til et høyere antall kutt per enzym-substratassosiasjon.

**Tabell 4.8.1:** Oversikt over antall gjennomsnittlige kutt per enzym-substratassosiasjon ( $N_{cuts}$ ) for ChiA WT, ChiA D313N/F396W, ChiB WT og HCHT med og uten kitinbindende domene.

Enzym	$N_{cuts}$ (antall kutt per enzym-substratassosiasjon), $F_A$ 0,70
ChiA WT	15,2
ChiA D313N/F396W	6,6
ChiB WT	6,3
HCHT <sup>m</sup> / kitinbindende domene	1,4
HCHT <sup>u</sup> / kitinbindende domene	2

## 5. DISKUSJON

### 5.1 Overekspresjon av humane kitinaser

Så langt har vår forskningsgruppe benyttet *Pichia pastoris* som ekspresjonsvert ved dyrkning av AMCase og HCHT. Utfordringene vår gruppe har erfart med blant annet lavt utbytte av isolert protein kunne kanskje ha vært unngått ved benyttelse av et annet ekspresjonssystem. *P.pastoris* er sensitiv for temperaturendringer og inkubasjonstemperatur kan være avgjørende ved bruk av *P.pastoris* som ekspresjonsvert. Vekst ved temperaturer over 32 °C kan føre til nedsatt proteinekspresjon og celledød. (Invitrogen 2010) Inkubatorskap kan variere i temperatur, og det har blitt forsøkt å senke temperaturen på hele dyrkningsprosessen noen grader – med varierende hell. Ved lavere temperatur går hele prosessen saktere og ved å følge med på celledetall (OD) er det mulig å kontrollere dyrkningen bedre. De fleste trinn i dyrkningsprotokollen har blitt utbedret. Et trinn som viser seg å være et kritisk punkt er overgangen fra BMGY til BMMY. Ved å resuspendere cellene i nytt glyserolholdig medium (BMGY) i stedet for metanolholdig medie og videre tilsette metanol til en konsentrasjon på 0,5 % kan det unngås at cellene får sjokk når de bytter karbonkilde. Dette har vist seg å være effektivt. Cellene vokser bedre og de dør ikke før de har sekretert ut proteinet.

Ved isolering av proteinet ble det lagt merke til at mye protein har forsvunnet. Dette i tillegg til at *P.pastoris* sekreterer lave nivåer av protein. Analyser av løsninger ved SDS-PAGE viser at proteinet forsvinner ved dialysen. Konklusjonen er at proteinet enten diffunderer ut av dialyseslangen og ut i løsning, eller feller ut i dialyseslangen. Prøver tatt etter sentrifugering har påvist protein i utfellingen. Ved å filtrere den dialyserte løsningen i stedet for å sentrifugere den vil det være mulig å unngå å miste protein.

## 5.2 Kromatografi av humane kitinaser

Rensing og isolering av de humane kitinasene har vært utfordrende. HCHT uten kitinbindende domene har tidligere vært enkel å rense ved hjelp av svak kationbytter og 50 mM NaAc med pH gradient fra 4.2 til 6.8. HCHT med kitinbindende domene fra fermentering ble renset på denne måten, og dette proteinet ble heller ikke helt rent. Utbytte av protein etter fermenteringen med et volum på 1 liter ble 4,2 mg, betydelig mindre enn tilsvarende fermentering for HCHT uten kitinbindende domene. Det må bemerkes at denne omgangen av fermentering ble stoppet tidligere enn da HCHT uten kitinbindende domene ble fermentert. Det antas derfor at utbytte av HCHT med kitinbindende domene kunne ha blitt større hvis fermenteringen hadde blitt forlenget. AMCase ble også forsøkt fermentert men uten hell. *P.pastoris* cellene døde før noe protein kunne sekreteres.

Rensemetsoden som ble brukt til å isolere HCHT ble også brukt for å rense AMCase. Proteinene ble ikke rent og konsentrasjonen av protein som ble eluert var svært liten. Tabell 4.4.3.1 viser de ulike kolonnene som AMCase ble forsøkt renset på. Som forklart i denne oversikten resulterer rensingene i at proteinet enten elueres ut med voidtoppen, altså at det ikke binder til kolonnen, eller så elueres proteinet ikke i det hele tatt. Hvorfor proteinet binder dårlig til kolonnen eller ikke binder til kolonnen i det hele tatt er noe usikkert, men kolonnemateriale og buffer A er avgjørende faktorer. Det beste resultatet var dog med samme kolonne og buffere brukt ved isolering av HCHT, svak kationbytter og 0,05 M natriumacetat pH 4.2. Ved isolering av AMCase uten gradient ble noe protein eluert, men dette var absolutt ikke rent. Flere typer kolonner er prøvd, men ettersom ionebytter gir et godt resultat ved isolering av bakterielle kitinaser, er dette forsøkt flere ganger. Ionebyttere finnes med forskjellige ionestyrker, og den eneste ionebytteren som ikke er forsøkt er svak anionbytter. Chou et. al (2006) har renset AMCase med nikkelskolonne, hydrofob interaksjonskolonne og gelfiltrering. En slik prosedyre krever at det er en His-tag på proteinet, og utstyret er ikke tilgjengelig på instituttet.

### 5.3 Prosessivitet i humane kitinaser

En høyere acetyleringsgrad gir større sjans for produktiv binding ettersom muligheten for en acetyleret enhet i -1 subsetet øker. Det ble laget kitosan med to acetyleringsgrader, 0,63 og 0,39. Som sett fra resultatene til Dybvik (figur 39 A og 41 A) ville det vært forventet at målt prosessivitet for de humane kitinasene ville ha vært mindre for kitosan med  $F_A$  med 0,39 sammenliknet med  $F_A$  0,63 fordi dette fører en økning av non-produktiv binding som igjen fører til økt diffusjon av substratet fra enzymet og ut i løsning.

Første trinn ville ha vært å bestemme graden av prosessivitet for AMCase WT. Siden denne er meget lik HCHT antas det at denne også er prosessiv. Mutasjonene som er gjort i de humane kitinasene er utført for å avgjøre residuernes rolle i henholdsvis forventet og observert prosessivitet. De aromatiske residuene i subsetene +1 og -3 er mutert til den hydrofobe aminosyren alanin, og dette forventes å gjøre enzymene mindre prosessive. Dette kan også gi informasjon om direksjonalitet, det vil si om enzymene bryter ned kitin fra den reduserende ende (som ChiB) eller fra den ikke-reduserende ende (som ChiA). Dersom prosessiviteten forsvinner når Trp i subsete -3 muteres, så tyder det på at substratet bryter ned kitin fra den ikke-reduserende ende ettersom det er det Trp-residuet som fortsatt binder til substratet etter hydrolyse som har størst effekt på prosessivitet som observert for ChiA og ChiB. (Horn et al. 2006a; Zakariassen et al. 2009)



## 5.4 Nedbrytning av kitosan ved bakterielle kitinaser

De bakterielle kitinasene som ble undersøkt har alle en mutasjon av det Asp-residuet som er nærmest den katalytiske syren som er i det konserverte DXDXE motivet. Dette for å se om dette viktige residuet har en påvirkning av grad av prosessivitet. For ChiA og ChiB ble Asp erstattet med to residuer, Asn (N) som gir en mutant med relativ høy aktivitet og Ala (A) som gir en mutant med meget lav aktivitet. (Zakariassen et al. 2011)

Spaltningsgrad ( $\alpha$ ) ble regnet ut ved hjelp av formelen i avsnitt 3.10.2. De resulterende  $\alpha$  ble vist i tabell 4.7.1.1. Det ser ut til at det er en sammenheng mellom enzymets egenskaper og spaltningsgrad. Det er åpenbart fra spekterne i figur 37 og 38 at ingen av mutantene viser samme forhold mellom partall og oddetallsoligomerer og det ser dermed ut som om at dette Asp-residuet påvirker prosessivitet. Årsaken til dette kan være at Asn og Ala ikke binder like sterkt til substratet, sidestilt med hvordan Trp binder sterkere enn Ala i henholdsvis subsete -3 for ChiA og +1 for ChiB. Dette kan føre til at substratet glir lettere ut av det aktive setet. En annen forklaring kan være at alle fire mutanter er mindre aktive enn villtypeenzymene. Diffusjonen av polymeren gjennom det aktive setet kan være lik for villtypene og alle fire mutantene, og det vil da være større sannsynlighet for at polymeren diffunderer ut av det aktive setet før produktive bindinger finner sted. Prosessiviteten vil påvirkes av dette.

Kromatogrammene for de fire mutantene er mer rotete enn det som er observert for Sørbotten et al. (2005). En annotering av toppene hvor massespektrometri benyttes til å bestemme massen til de KOS som tilsvarer de ulike toppene burde ha vært gjort, men tidspress umuliggjorde dette. Det burde også ha vært gjort flere nedbrytningsforsøk med de aktuelle mutanter, men mengde enzym og tid tilgjengelig begrenset dette. For å bekrefte resultatene oppnådd i denne studien bør flere forsøk utføres.

## 5.5 Viskositetsassay

ChiA viser høyere grad av prosessivitet enn ChiB når det sammenliknes antall kutt per enzym-substratassosiasjon. Dette fører til at ChiB ikke er like prosessivt som ChiA. ChiA D313N/F396W, som er hypertransglykosylerende, viser seg å være mindre prosessiv enn ChiA WT. Dette kan skyldes at transglykosyleringsaktiviteten skjuler grad av prosessivitet. Ved hydrolyse dannes det to nye reduserende ender mens det i en transglykosyleringsreaksjon kun dannes en. I et plott med relativ viskositet mot reduserende ender, vil stigningstallet øke, og med det en redusert  $N_{\text{cuts}}$ , dersom en transglykosyleringsreaksjon forekommer. Den reduserte prosessiviteten kan også komme av at en mutasjon fra Asp til Asn i posisjon 313 i seg selv reduserer grad av prosessivitet som resultatene antyder.

Resultatene viser at HCHT med kitinbindende domene har en lavere  $N_{\text{cuts}}$  enn enzymet uten kitinbindende domene. Det kitinbindende domenet antas å øke enzymets evne til prosessiv hydrolyse ettersom det inneholder flere aromatiske residuer. En faktor som kan forklare den lavere observerte  $N_{\text{cuts}}$  er at det kitinbindende domenet utgjør positive sub seter, og økt bindingsstyrke i positive sub seter fører til økt transglykosylering (Zakariassen et al. 2011) som igjen kan medføre en maskering av grad av prosessivitet som beskrevet over.

For å bedre forstå hvordan prosessivitet påvirkes av transglykosylering kan tillaging av mutanten ChiA F396W og testing av denne gi et svar. Denne har ikke endring for Asp313 og innføring av Trp for Phe burde gjøre denne mer transglykosylerende enn det villtypen er og ikke i selv redusere grad av prosessivitet.

## 6. OPPSUMMERING

De humane kitinasene har vist seg å være delaktige i sykdommer og allergier, og det er derfor i samfunnets interesse å få mer kunnskap om dem. Parallelt er det interessant å studere bakterielle kitinaser ettersom disse har blitt studert over lengre tid og gitt mye kunnskap om hvordan familie 18 kitinaser generelt interagerer med substrat. I denne oppgaven er HCHT WT (m/kitinbindende domene), AMCcase WT (m/kitinbindende domene), mutantene HCHT W31A (subsete -3), HCHT W99A (subsete +1) og AMCcase W31A (subsete -3) blitt klonet inn i *Pichia pastoris*. Videre er HCHT WT (m/kitinbindende domene) blitt dyrket via fermentering og isolert etter standard kromatografiske metoder. AMCcase WT (m/kitinbindende domene) har også blitt uttrykt i flasker og forsøkt isolert. Viskositetsmålinger utført i samarbeid med NTNU viser at HCHT m/kitinbindende domene er mindre prosessivt enn det uten kitinbindende domene. Økt grad av transglykosyleringsaktivitet kan være en årsak til dette.

Ved dyrking og isolering av AMCcase har flere problemer vist seg. Ekspresjonsverten *Pichia pastoris* kan være vanskelig å tilfredsstillere. Dette har ført til at prosedyren for overekspresjon har blitt revidert. Isolering av enzymet er fortsatt ikke optimal og vil kreve videre forsøk og analyser. Det beste resultatet av rensingen var lite utbytte og urent protein.

De bakterielle kitinasene er gode modellsystemer for de humane kitinasene. To mutanter av ChiA og to av ChiB ble isolert uten problemer. Disse enzymene ble deretter inkubert med kitosan for å analysere hvorvidt mutasjon av det meget viktige residuet Asp i den konserverte DXDXE motivet nær det aktive setet påvirker enzymets prosessive aktivitet. Forsøkene tyder på at dette residuet bidrar til prosessivitet. Fordelingen av oligomerer produsert av de muterte enzymene skiller seg helt klart fra en fordeling produsert av et prosessivt enzym, se figur 37 og 38 i avsnitt 4.7.2.

Viskositetsmålinger av ChiA WT, ChiB WT og den hypertransglykosylerende ChiA-mutanten D313N/F396W tyder på at enzymene har endoaktivitet på det løselige substratet kitosan. Resultatene av viskositetsmålingene tyder også på at ChiA WT er det mest prosessive

enzymet. Den hypertransglykosylerende mutanten har nedsatt prosessivitet. Dette kan være et resultat av den økte transglykosyleringsaktiviteten.

## 7. VEIEN VIDERE

Videre arbeid med AMCcase innebærer å optimalisere dyrkningsprosessen slik at *P.pastoris* kan uttrykke større mengder med protein. Det kan eventuelt være en idé å forsøke et nytt ekspresjonssystem der *Aspergillus* kan være en aktuell vert. Fermentering av proteinet virker som den beste måten å oppnå en betydelig mengde enzym, derfor bør dette også forsøkes videre. Isolering av AMCcase bør utprøves, og rensing på nikkelkolonne, HIC og gelfiltrering foreslått av Chou et al. (2006) bør prøves. Dette har her vært gjort med suksess.

Videre er prosessivitet og direksjonalitet i AMCcase interessant, og nedbrytingsforsøk på kitosan og kitin etterfulgt av henholdsvis SEC og HPLC kan gi et bilde av nedbrytningsmekanismen til enzymet.

HCHT med kitinbindende domene bør sammenliknes med isoformen uten kitinbindende domene for å øke kunnskap om det kitinbindende domenets rolle i hydrolyse og transglykosylering. Eide et al. (2012) har gjort forsøk med HCHT *uten* kitinbindende domene på kitosan og resultater herfra kan sammenliknes med analyser av HCHT *med* kitinbindende domene. Det vil også være interessant å undersøke HCHTs prosessivitet og transglykosyleringsevne på kortere oligomerer.

Mutasjonene i de bakterielle kitinasene bør undersøkes videre. Resultat av denne studien tyder på at de polare residuene nær det aktive setet bidrar til økt prosessivitet ved å forstyrre den strukturelle oppbygningen av kitosan. Videre analyser vil kunne bekrefte dette. Senere vil denne kunnskapen kunne brukes på de humane kitinasene.

## 8. REFERANSER

- Aam, B. B., Heggset, E. B., Norberg, A. L., Sorlie, M., Varum, K. M. & Eijsink, V. G. (2010). Production of chitoooligosaccharides and their potential applications in medicine. *Marine Drugs*, 8 (5): 1482-517.
- abcam. (2012). *WESTERN BLOTTING - A BEGINNER'S GUIDE*: abcam plc. 13 s.
- Agilent Technologies. (2005). *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit*. 19 s.
- Aguilera, B., Ghauharali-van der Vlugt, K., Helmond, M. T., Out, J. M., Donker-Koopman, W. E., Groener, J. E., Boot, R. G., Renkema, G. H., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., et al. (2003). Transglycosidase activity of chitotriosidase: improved enzymatic assay for the human macrophage chitinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (42): 40911-6.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the cell - fifth edition*. New York, NY, USA: Garland Science.
- Anthon, G. E. & Barrett, D. M. (2002). Determination of reducing sugars with 3-methyl-2-benzothiazolinonehydrazone. *Analytical Biochemistry*, 305 (2): 287-9.
- Anthonsen, T. (1979). *Kjernemagnetisk resonans i organisk kjemi*: Tapir.
- Bierbaum, S., Nickel, R., Koch, A., Lau, S., Deichmann, K. A., Wahn, U., Superti-Furga, A. & Heinzmann, A. (2005). Polymorphisms and haplotypes of acid mammalian chitinase are associated with bronchial asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 172 (12): 1505-9.
- Bolt, M. W. & Mahoney, P. A. (1997). High-efficiency blotting of proteins of diverse sizes following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 247 (2): 185-92.
- Boot, R. G., Renkema, H., Verhoek, M., Strijland, A., Blik, J., de Meulemeester, T. M. A. M. O., Mannens, M. M. A. M. & Aerts, J. M. F. G. (1998). The Human Chitotriosidase Gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 273 (40): 6.
- Boot, R. G., Blommaart, E. F., Swart, E., Ghauharali-van der Vlugt, K., Bijl, N., Moe, C., Place, A. & Aerts, J. M. (2001). Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (9): 6770-8.
- Brinas, L., Zarazaga, M., Saenz, Y., Ruiz-Larrea, F. & Torres, C. (2002). Beta-lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (10): 3156-63.
- Brody, J. R. & Kern, S. E. (2004). History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 333 (1): 1-13.
- Brurberg, M. B., Eijsink, V. G. & Nes, I. F. (1994). Characterization of a chitinase gene (*chiA*) from *Serratia marcescens* BJL200 and one-step purification of the gene product. *FEMS Microbiology Letters*, 124 (3): 399-404.
- Brurberg, M. B., Nes, I. F. & Eijsink, V. G. (1996). Comparative studies of chitinases A and B from *Serratia marcescens*. *Microbiology*, 142 ( Pt 7): 1581-9.
- Bussink, A., Vaneijk, M., Renkema, G., Aerts, J. & Boot, R. (2006). The Biology of the Gaucher Cell: The Cradle of Human Chitinases. *International Review of Cytology*, 252: 71-128.
- Bussink, A. P., Speijer, D., Aerts, J. M. & Boot, R. G. (2007). Evolution of mammalian chitinase(-like) members of family 18 glycosyl hydrolases. *Genetics*, 177 (2): 959-70.

- Bussink, A. P., Vreede, J., Aerts, J. M. & Boot, R. G. (2008). A single histidine residue modulates enzymatic activity in acidic mammalian chitinase. *FEBS Letters*, 582 (6): 931-5.
- Chou, Y., Yao, S., Czerwinski, R., Fleming, M., Krykbaev, R., Xuan, D., Zhou, H., Brooks, J., Fitz, L., Strand, J., et al. (2006). Kinetic Characterization of Recombinant Human Acidic Mammalian Chitinase. *Biochemistry*, 45: 11.
- Chung, M. J., Park, J. K. & Park, Y. I. (2012). Anti-inflammatory effects of low-molecular weight chitosan oligosaccharides in IgE-antigen complex-stimulated RBL-2H3 cells and asthma model mice. *International Immunopharmacology*, 12 (2): 453-9.
- Cole, D. C., Olland, A. M., Jacob, J., Brooks, J., Bursavich, M. G., Czerwinski, R., DeClercq, C., Johnson, M., Joseph-McCarthy, D., Ellingboe, J. W., et al. (2010). Identification and characterization of acidic mammalian chitinase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53 (16): 6122-8.
- Davies, G. & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3 (9): 853-9.
- Davies, G. J., Wilson, K. S. & Henrissat, B. (1997). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal*, 321 ( Pt 2): 557-9.
- Dong, W. H., Wang, T. Y., Wang, F. & Zhang, J. H. (2011). Simple, Time-Saving Dye Staining of Proteins for Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis Using Coomassie Blue. *PloS One*, 6 (8): 3.
- Donnelly, L. E. & Barnes, P. J. (2004). Acidic mammalian chitinase--a potential target for asthma therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25 (10): 509-11.
- Dutta, P. K., Dutta, J. & Tripathi, V. S. (2004). Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 63: 12.
- Eide, K. B., Norberg, A. L., Heggset, E. B., Lindbom, A. R., Varum, K. M., Eijsink, V. G. & Sorlie, M. (2012). Human Chitotriosidase-Catalyzed Hydrolysis of Chitosan. *Biochemistry*, 51 (1): 487-95.
- Eijsink, V. G., Vaaje-Kolstad, G., Varum, K. M. & Horn, S. J. (2008). Towards new enzymes for biofuels: lessons from chitinase research. *Trends in Biotechnology*, 26 (5): 228-35.
- Elias, J. A., Homer, R. J., Hamid, Q. & Lee, C. G. (2005). Chitinases and chitinase-like proteins in T(H)2 inflammation and asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116 (3): 497-500.
- Fukamizo, T. (2000). Chitinolytic enzymes: catalysis, substrate binding, and their application. *Current Protein and Peptide Science*, 1 (1): 10.
- Fusetti, F., von Moeller, H., Houston, D., Rozeboom, H. J., Dijkstra, B. W., Boot, R. G., Aerts, J. M. & van Aalten, D. M. (2002). Structure of human chitotriosidase. Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (28): 25537-44.
- GE Healthcare *Life Sciences Product catalog - HiTrap CM Sepharose FF*. (2012). GE Healthcare (lest 03.07).
- 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. *Clinical and Experimental Allergy : Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 42(4):523-30
- Greibrokk, T., Lundanes, E. & Rasmussen, K. E. (1998). *Kromatografi*: Universitetsforlaget AS. 294 s.
- Hart, H., Crane, L. E., Hart, D. J. & Hadad, C. M. (2007). *Organic Chemistry: A Short Course*. Boston, MA, U.S.A: Houghton Mifflin Company.

- Hartl, D., He, C. H., Koller, B., Da Silva, C. A., Kobayashi, Y., Lee, C. G., Flavell, R. A. & Elias, J. A. (2009). Acidic mammalian chitinase regulates epithelial cell apoptosis via a chitinolytic-independent mechanism. *Journal of Immunology*, 182 (8): 5098-106.
- Hirai, A., Odani, H. & Nakajima, A. (1991). Determination of degree of deacetylation of chitosan by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Polymer Bulletin*, 26: 87-94.
- Hoffman, R. E. (2003). Variations on the chemical shift of TMS. *Journal of Magnetic Resonance*, 163 (2): 7.
- Hollak, C. E. M., van Weely, S., van Oers, M. H. J. & Aerts, J. M. F. G. (1994). Marked Elevation of Plasma Chitotriosidase Activity. *The Journal of Clinical Investigation*, 93: 5.
- Horn, S. J. & Eijnsink, V. G. H. (2004). A reliable reducing end assay for chito-oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 56: 5.
- Horn, S. J., Sikorski, P., Cederkvist, J. B., Vaaje-Kolstad, G., Sorlie, M., Synstad, B., Vriend, G., Varum, K. M. & Eijnsink, V. G. (2006a). Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (48): 18089-94.
- Horn, S. J., Sorbotten, A., Synstad, B., Sikorski, P., Sorlie, M., Varum, K. M. & Eijnsink, V. G. (2006b). Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. *FEBS Journal*, 273 (3): 491-503.
- Horn, S. J., Sørli, M., Vårum, K. M., Våljamäe, P. & Eijnsink, V. G. H. (2012). Measuring processivity. *Methods in Enzymology*, 510: 27.
- Invitrogen. (2010). *Multi-Copy Pichia Expression Kit - User manual*. Carlsbad, CA. 107 s.
- Invitrogen. (2011). *Qubit® Protein Assay Kits*. Carlsbad, CA, USA: Life Technologies Corporation. 9 s.
- Jitonnom, J., Lee, V. S., Nimmanpipug, P., Rowlands, H. A. & Mulholland, A. J. (2011). Quantum mechanics/molecular mechanics modeling of substrate-assisted catalysis in family 18 chitinases: conformational changes and the role of Asp142 in catalysis in ChiB. *Biochemistry*, 50 (21): 4697-711.
- Kawada, M., Hachiya, Y., Arihiro, A. & Mizoguchi, E. (2007). Role of mammalian chitinases in inflammatory conditions. *The Keio Journal of Medicine*, 56 (1): 7.
- Klug, W. S., Cummings, M. R. & Spencer, C. A. (2007). *Essentials of Genetics*. 6 utg. Upper Saddle River, NJ, USA: Pearson Education, Inc. 553 s.
- Kumar, M. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46 (1): 28.
- Lea, T. (2002). *Immunologi og immunologiske teknikker*. Berger: Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS.
- Lee, C. G. (2009). Chitin, Chitinases and Chitinase-like Proteins in Allergic Inflammation and Tissue Remodeling. *Yonsei Medical Journal*, 50 (1): 9.
- Life Technologies Corporation (2011). *Benchmark Protein Ladder - Description and procedure*. tools.invitrogen.com: Life Technologies Corporation.
- Liu, F. C., Su, C. R., Wu, T. Y., Su, S. G., Yang, H. L., Lin, J. H. & Wu, T. S. (2011). Efficient H-NMR Quantitation and Investigation of N-Acetyl-d-glucosamine (GlcNAc) and N,N'-Diacetylchitobiose (GlcNAc)<sub>2</sub> from Chitin. *International Journal of Molecular Sciences*, 12 (9): 5828-43.
- Malaguarnera, L., Simpo, J., Prodi, D. A., Angius, A., Sassu, A., Persico, I., Barone, R. & Musumeci, S. (2003). A 24-bp duplication in exon 10 of human chitotriosidase gene from the sub-Saharan to the Mediterranean area: role of parasitic diseases and environmental conditions. *Genes and Immunity*, 4 (8): 5.
- Manske, M. (2010). *The GENTle manual - PCR and primer design*. Cologne, Germany.



- Miller, J. M. (2005). *Chromatography - Concepts and Contrasts*. 2 utg. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Miroux, B. & Walker, J. E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of Molecular Biology*, 260 (3): 289-98.
- Mittal, A., Katahira, R., Himmel, M. E. & Johnson, D. K. (2011). Effects of alkaline or liquid-ammonia treatment on crystalline cellulose: changes in crystalline structure and effects on enzymatic digestibility. *Biotechnology for Biofuels*, 4 (41).
- Muzzarelli, R. A. (2010). Chitins and chitosans as immunoadjuvants and non-allergenic drug carriers. *Marine Drugs*, 8 (2): 292-312.
- Norberg, A. L., Dybvik, A. I., Zakariassen, H., Mormann, M., Peter-Katalinic, J., Eijsink, V. G. & Sorlie, M. (2011). Substrate positioning in chitinase A, a processive chito-biohydrolase from *Serratia marcescens*. *FEBS Letters*, 585 (14): 2339-44.
- Ohta, T., Tokishita, S. & Yamagata, H. (2001). Ethidium bromide and SYBR Green I enhance the genotoxicity of UV-irradiation and chemical mutagens in *E. coli*. *Mutation Research*, 492 (1-2): 8.
- Olland, A. M., Strand, J., Presman, E., Czerwinski, R., Joseph-McCarthy, D., Krykbaev, R., Schlingmann, G., Chopra, R., Lin, L., Fleming, M., et al. (2009). Triad of polar residues implicated in pH specificity of acidic mammalian chitinase. *Protein Science : a Publication of the Protein Society*, 18 (3): 569-78.
- Parr, T. R., Jr. & Bryan, L. E. (1984). Mechanism of resistance of an ampicillin-resistant, beta-lactamase-negative clinical isolate of *Haemophilus influenzae* type b to beta-lactam antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 25 (6): 747-53.
- Penna, A. & Cahalan, M. (2007). Western Blotting using the Invitrogen NuPage Novex Bis Tris minigels. *Journal of Visualized Experiments* (7): 264.
- Renkema, G. H., Boot, R. G., Muijsers, A. O., Donker-Koopman, W. E. & Aerts, J. M. (1995). Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 270 (5): 2198-202.
- Rye, C. S. & Withers, S. G. (2000). Glycosidase mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4 (5): 573-80.
- Schickler, H., Haran, S., Oppenheim, A. B. & Chet, I. (1993). Cloned chitinases and their role in biological control of plant pathogenic fungi. *Chitin Enzymology*: 8.
- Thermo Scientific Inc. (2009). *Thermo Scientific NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometers*. Wilmington, DE, USA: Thermo Fisher Scientific Inc. 2 s.
- SeQuant. (2001). *Jonkromatografi i praktiken*. Umeå. 24 s.
- Sheffield University. (2012). *Nuclear Magnetic Spectroscopy - Theoretical principles* (lest 07.02).
- Shuhui, L., Mok, Y. & Wong, F. W. S. (2009). Role of Mammalian Chitinases in Asthma. *International Archives of Allergy and Immunology*, 149: 9.
- Sikorski, P., Stokke, B. T., Sorbotten, A., Varum, K. M., Horn, S. J. & Eijsink, V. G. (2005). Development and application of a model for chitosan hydrolysis by a family 18 chitinase. *Biopolymers*, 77 (5): 273-85.
- Sikorski, P., Sorbotten, A., Horn, S. J., Eijsink, V. G. & Varum, K. M. (2006). *Serratia marcescens* chitinases with tunnel-shaped substrate-binding grooves show endo activity and different degrees of processivity during enzymatic hydrolysis of chitosan. *Biochemistry*, 45 (31): 9566-74.
- Sorbotten, A., Horn, S. J., Eijsink, V. G. & Varum, K. M. (2005). Degradation of chitosans with chitinase B from *Serratia marcescens*. Production of chito-oligosaccharides and insight into enzyme processivity. *FEBS Journal*, 272 (2): 538-49.

- Sundheim, L., Poplawsky, A. R. & Ellingboe, A. H. (1988). Molecular cloning of chitinase genes from *Serratia marcescens* and their expression in *Pseudomonas* species. *Phys Molecular Plant Pathology*, 33: 9.
- Sutherland, T. E., Andersen, O. A., Betou, M., Eggleston, I. M., Maizels, R. M., van Aalten, D. & Allen, J. E. (2011). Analyzing airway inflammation with chemical biology: dissection of acidic mammalian chitinase function with a selective drug-like inhibitor. *Chemistry & Biology*, 18 (5): 569-79.
- Sørli, M., Zakariassen, H., Norberg, A. L. & Eijsink, V. G. H. (2012). Processivity and substrate-binding in family 18 chitinases. *Biocatalysis and Biotransformation*, 30 (3): 12.
- Toratani, T., Shoji, T., Ikehara, T., Suzuki, K. & Watanabe, T. (2008). The importance of chitobiose and N-acetylglucosamine (GlcNAc) uptake in N,N'-diacetylchitobiose [(GlcNAc)<sub>2</sub>] utilization by *Serratia marcescens* 2,170. *Microbiology*, 154 (Pt 5): 1326-32.
- van Aalten, D. M., Komander, D., Synstad, B., Gaseidnes, S., Peter, M. G. & Eijsink, V. G. (2001). Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (16): 8979-84.
- van Eijk, M., van Roomen, C. P., Renkema, G. H., Bussink, A. P., Andrews, L., Blommaart, E. F., Sugar, A., Verhoeven, A. J., Boot, R. G. & Aerts, J. M. (2005). Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity. *International Immunology*, 17 (11): 1505-12.
- Webster, A., Osifo, P. O., Neomagus, H. W. & Grant, D. M. (2006). A comparison of glycans and polyglycans using solid-state NMR and X-ray powder diffraction. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, 30 (3-4): 150-61.
- Weir, E. & McSpadden, C. (2011). *Production of Industrial Enzymes in Fermentation* Dublin City University. Upublisert manuskript.
- Williams, D. H. & Fleming, I. (2008). *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*. 6 utg. Maidenhead, Berkshire: McGraw-Hill Higher Education.
- Williams, S. J. & Withers, S. G. (2000). Glycosyl fluorides in enzymatic reactions. *Carbohydrate Research*, 327 (1-2): 27-46.
- Zakariassen, H., Aam, B. B., Horn, S. J., Varum, K. M., Sørli, M. & Eijsink, V. G. (2009). Aromatic residues in the catalytic center of chitinase A from *Serratia marcescens* affect processivity, enzyme activity, and biomass converting efficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (16): 10610-7.
- Zakariassen, H., Hansen, M. C., Jøranli, M., Eijsink, V. G. H. & Sørli, M. (2011). Mutational Effects on Transglycosylating Activity of Family 18 Chitinases and Construction of a Hypertransglycosylating Mutant *Biochemistry*, 50: 11.
- Zhao, Y., Park, R. D. & Muzzarelli, R. A. (2010). Chitin deacetylases: properties and applications. *Marine Drugs*, 8 (1): 24-46.
- Zhu, Z., Zheng, T., Homer, R. J., Kim, Y. K., Chen, N. Y., Cohn, L., Hamid, Q. & Elias, J. A. (2004). Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science*, 304 (5677): 1678-82.

## 9. VEDLEGG

### SEKVENSER

#### HCHT villtype, fullengde:

DNA: TAGAATTCGCTAAACTTGTTTGCTACTTCACTAAC**TGC**GCTCAATATAGAC  
+3: E F A K L V C Y F T N **W** A Q Y R Q

DNA: AGGGAGAGGCTAGATTCCCTCCTAAAGATTTGGACCCATCACTTTGTACTC  
+3: G E A R F L P K D L D P S L C T H

DNA: ATTTGATCTACGCTTTTGCCGGTATGACCAACCACCAATTGTCTACTACCG  
+3: L I Y A F A G M T N H Q L S T T E

DNA: AATGGAATGATGAGACTCTTTATCAGGAGTTTAAACGGTTGAAGAAAATGA  
+3: W N D E T L Y Q E F N G L K K M N

DNA: ACCCAAAGCTTAAGACCTTGCTTGTATTGGTGG**TGC**AACTTTGGAACCC  
+3: P K L K T L L A I G G **W** N F G T Q

DNA: AAAAATTCACAGATATGGTTGCAACAGCTAACAATAGACAGACTTTTGTC  
+3: K F T D M V A T A N N R Q T F V N

DNA: ATTCGGCTATCAGATTTTGGAGAAAGTACTCATTCGACGGTCTTGATTTGG  
+3: S A I R F L R K Y S F D G L D L D

DNA: ACTGGGAATATCCAGGTTCCCAAGGATCACCTGCCGTTGATAAAGAGAGAT  
+3: W E Y P G S Q G S P A V D K E R F

DNA: TCACTACTCTTGCCAAAGACTTGGCCAACGCATTCCAACAGGAAGCTCAGA  
+3: T T L V Q D L A N A F Q Q E A Q T

DNA: CAAGTGGTAAAGAGAGATTGCTTTTGTCTGCTGCCGTTCCAGCCGGTCAAA  
+3: S G K E R L L L S A A V P A G Q T

DNA: CTTACGGTTGATGCAGGATATGAAGTTGATAAGATTGCTCAGAACCTTGATT  
+3: Y V D A G Y E V D K I A Q N L D F

DNA: TTGTTAATTTGATGGCCCTACGACTTCCATGGTAGTTGGGAGAAGGTCACCTG  
+3: V N L M A Y D F H G S W E K V T G

DNA: GACACAACCTCTCCTTTGTATAAAAAGACAAGAAGAGAGTGGTGCAGCTGCCT  
+3: H N S P L Y K R Q E E S G A A A S

DNA: CTTTGAATGTTGATGCAGCTGTCCAACAGTGGTGCAGAAAGGAACTCCAG  
+3: L N V D A A V Q Q W L Q K G T P A

DNA: CCTCCAAACTTATCTTGGGTATGCCTACCTACGGAAGATCTTTTACTTTGG  
+3: S K L I L G M P T Y G R S F T L A

DNA: CATCTTCCTCAGACACCAGAGTTGGTGTCCAGCCACTGGTAGTGGAAACCC  
+3: S S S D T R V G A P A T G S G T P

DNA: CAGGACCTTTCACAAAAGAAGGTGGAATGTTGGCATACTATGAGGTTTGT  
+3: G P F T K E G G M L A Y Y E V C S

DNA: CTTGGAAGGGTGTACCAAAACAAGAATCCAAGATCAGAAGGTTCCCTTACA  
+3: W K G A T K Q R I Q D Q K V P Y I

DNA: TCTTTAGAGACAACCAGTGGGTTGGTTTTGATGACGTCGAATCCTTCAAGA  
+3: F R D N Q W V G F D D V E S F K T

DNA: CTAAGTTTCATATCTTAAGCAAAGGGATTGGGTGGAGCAATGGTCTGGG  
+3: K V S Y L K Q K G L G G A M V W A

DNA: CTCTTGATTTGGATGACTTTGCTGGTTTCTCCTGCAATCAAGGAAGATACC

```

+3:  L D L D D F A G F S C N Q G R Y P
DNA:  CACTTATCCAAACATTGAGACAGGAGCTTAGTTGCCATATTTGCCTTCTG
+3:  L I Q T L R Q E L S L P Y L P S G
DNA:  GTACTCCTGAACTTGAGGTTCCAAAGCCTGGACAACCATCCGAACCTGAGC
+3:  T P E L E V P K P G Q P S E P E H
DNA:  ATGGTCCATCACCTGGACAAGATACTTTCTGTGTCAGGGTAAAGCTGACGGAT
+3:  G P S P G Q D T F C Q G K A D G L
DNA:  TGTACCCAAACCTTAGAGAAAGAAGTTCTTTCTACTCTTGCGCCGACGGTA
+3:  Y P N P R E R S S F Y S C A A G R
DNA:  GATTGTTCCAGCAGTCTTGCCCTACTGGTCTTGTCTTTTCTAACTCCTGTA
+3:  L F Q Q S C P T G L V F S N S C K
DNA:  AATGTTGCACTTGGAACCTGA
+3:  C C T W N *

```

Øverste linje viser nukleotidsekvens, mens nederste linje viser nukleotidsekvens oversatt til aminosyresekvens. Mutasjon **W31A** er markert med gult i aminosyresekvensen, mutasjon **W99A** er markert med grønt. Primersekvenser til seterettet mutagenese finnes i avsnitt 3.3.

### **Kodonoptimalisert HCHT**: brukt i CLC DNA Workbench

```

TAGAATTCGCTAAACTTGTTTGCTACTTCACTAACTGGGCTCAATATAGACAGGGAGAGGCTAGAT
TCCTTCCTAAAGATTTGGACCCATCACTTTGTACTCATTTGATCTACGCTTTTGCCGGTATGACCAA
CCACCAATTGTCTACTACCGAATGGAATGATGAGACTCTTTATCAGGAGTTTAAACGGTTTTGAAGAA
AATGAACCCAAAGCTTAAGACCTTGCTTGCTATTGGTGGATGGAACCTTGGAACCCAAAATTCAC
AGATATGGTTGCAACAGCTAACAATAGACAGACTTTTGTCAATTCCGCTATCAGATTTTTGAGAAA
GTACTCATTTCGACGGTCTTGATTTGGACTGGGAATATCCAGGTTCCAAGGATCACCTGCCGTTGAT
AAAGAGAGATTCACTACTCTTGTTCCAAGACTTGCCCAACGCATTCCAACAGGAAGCTCAGACAAGT
GGTAAAGAGAGATTGCTTTTGTCTGCTGCCGTTCCAGCCGGTCAAACCTTACGTTGATGCAGGATAT
GAAGTTGATAAGATTGCTCAGAACCCTTGATTTTGTTAATTTGATGGCCTACGACTTCCATGGTAGTT
GGGAGAAGGTCACTGGACACAACCTCTCCTTTGTATAAAAAGACAAGAAGAGAGTGGTGCAGCTGCC
TCTTTGAATGTTGATGCAGCTGTCCAACAGTGGTTGCAGAAGGGAACCTCCAGCCTCCAACTTATC
TTGGGTATGCCTACCTACGGAAGATCTTTTACTTTGGCATCTTCTCAGACACCAGAGTTGGTGCTC
CAGCCACTGGTAGTGAACCCAGGACCTTTCACAAAAGAAGGTGGAATGTTGGCATACTATGAG
GTTTGTCTTGGAAGGGTGTACCAAACAAGAATCCAAGATCAGAAGGTTCCCTACATCTTTAGA
GACAACCAGTGGGTTGGTTTTGATGACGTCGAATCCTTCAAGACTAAAGTTTCATATCTTAAGCAA
AAGGGATTGGGTGGAGCAATGGTCTGGGCTCTTGATTTGGATGACTTTGCTGGTTTCTCCTGCAATC
AAGGAAGATACCCACTTATCCAAACATTGAGACAGGAGCTTAGTTTGCCATATTTGCCTTCTGGTA
CTCCTGAACTTGAGGTTCCAAAGCCTGGACAACCATCCGAACCTGAGCATGGTCCATCACCTGGAC
AAGATACTTTCTGTGTCAGGGTAAAGCTGACGGATTGTACCCAAACCCTAGAGAAAGAAGTTCTTTCT
ACTCTTGCGCCGACGGTAGATTGTTCCAGCAGTCTTGCCCTACTGGTCTTGTCTTTTCTAACTCCTGT
AAATGTTGCACTTGGAACCTGAGAATTCTA

```

### **HCHT aminosyresekvens (FASTA)**:

```

AKLVCYFTNWAQYRQGEARFLPKDLDP SLCTH LIYAFAGMTNHQLSTTEWNETLYQEFNGLKKNP
KLKTL LAIGGW NFGTQKFTDMVATANNRQTFVNSAIRFLRKY SFDGLDL DWEYPGSQGSPA VDKERFT
TLVQDLANAFQQEAQTS GKERLLLSAAVPAGQTYVDAGYEVDKIAQNLDFVNLMAYDFHGSWEKVT
GHNSPLYKRQEESGAAASLNVDAAVQQWLQKGPASKLILGMP TYGRSFTLASSSDTRV GAPATGSGT

```

PGPFTKEGGMLAYYEVC SWKGATKQRIQDQKVPYIFRDNQWVGFDDVESFKTKVSYLKQKGLGGAM  
 VWALDLD DFAGFSCNQGRYPLIQTLRQELSLPYLPSGTPELEVPKPGQPSEPEHGPPSPGQDTCQ GKAD  
 GLYPNPRERSSFYSCAAGR L FQQSCPTGLVFSNSCKCCTWN

### AMCase villtype, fullengde:

DNA: GAATTCTATCAATTAACATGTTATTTTACTAAC TGGGCTCAATACAGACCA  
 +1: E F Y Q L T C Y F T N W A Q Y R P

DNA: GGATTGGGTAGATTTCATGCCTGACAATATAGATCCATGCTTGTGTACCCAC  
 +1: G L G R F M P D N I D P C L C T H

DNA: TTGATCTATGCTTTTGCTGGTAGACAAAATAATGAAATCACTACAATTGAG  
 +1: L I Y A F A G R Q N N E I T T I E

DNA: TGGAAATGATGTA ACTCTGTACCAGGCTTCAATGGACTGAAAAACAAGAAC  
 +1: W N D V T L Y Q A F N G L K N K N

DNA: TCACA ACTAAAGACATTGCTTGCAATTGGAGGTGCGAACTTTGGAACTGCT  
 +1: S Q L K T L L A I G G A N F G T A

DNA: CCTTTTACAGCTATGGTTAGTACACCAGAAAATAGACAACTTTTCATTACT  
 +1: P F T A M V S T P E N R Q T F I T

DNA: TCAGTTATTAAGTTCCTTAGACAATATGAATTTGATGGCTAGACTTTTGAC  
 +1: S V I K F L R Q Y E F D G L D F D

DNA: TGGGAATATCCAGGCTCTAGAGGTTACCCCTCAAGACAAGCATTGTGTC  
 +1: W E Y P G S R G S P P Q D K H L F

DNA: ACTGTATTAGTACAAGAGATGAGAGAAGCTTTTGAACAGGAGGCAAAGCAA  
 +1: T V L V Q E M R E A F E Q E A K Q

DNA: ATTAACA AACCAAGATTGATGGTTACTGCTGCAGTAGCAGCAGGTATATCT  
 +1: I N K P R L M V T A A V A A G I S

DNA: AATATTCAATCTGGTTATGAAATTC CCAATTGAGTCAATACTTGGATTAC  
 +1: N I Q S G Y E I P Q L S Q Y L D Y

DNA: ATCCATGTGATGACCTATGACCTACATGGTAGCTGGGAGGATATACTGGA  
 +1: I H V M T Y D L H G S W E G Y T G

DNA: GAAAATAGTCCATTATACAAGTATCCTACTGATACAGGTTCAAATGCCTAC  
 +1: E N S P L Y K Y P T D T G S N A Y

DNA: TTAAATGTAGATTATGTTATGAATTATGGAAAGATAATGGTGTCCAGCT  
 +1: L N V D Y V M N Y W K D N G A P A

DNA: GAAAAGCTGATTGTTGGTTTTCCCACTTATGGTCACAATTTTATTCTGAGT  
 +1: E K L I V G F P T Y G H N F I L S

DNA: AATCCTTCCAACACAGGTATTGGTGCCCTACCTCTGGAGCAGGACCAGCA  
 +1: N P S N T G I G A P T S G A G P A

DNA: GGTCCATATGCCAAGGAATCTGGAATATGGGCTTACTATGAAATCTGTACT  
 +1: G P Y A K E S G I W A Y Y E I C T

DNA: TTCTTGAAGAATGGTGTACCCAGGTTGGGATGCTCCTCAGGAAGTGCCT  
 +1: F L K N G A T Q G W D A P Q E V P

DNA: TATGCCTATCAAGGTAATGTTTGGGTTGGTTATGACAACATTAATCTTTT  
 +1: Y A Y Q G N V W V G Y D N I K S F

DNA: GATATTAAGGCCCAATGGTTGAAGCACAATAAGTTTGGTGGAGCAATGGTT  
 +1: D I K A Q W L K H N K F G G A M V

DNA: TGGGCTATTGATCTTGATGATTTTACAGGTACATTCTGCAATCAAGGAAAA  
 +1: W A I D L D D F T G T F C N Q G K

DNA: TTCCTCTAATATCTACTTTGAAGAAGGCACTTGGTTTACAGTCTGCTAGT  
+1: F P L I S T L K K A L G L Q S A S

DNA: TGCACAGCTCCTGCTCAGCCTATTGAACCTATCACTGCAGCACCCCTCAGGA  
+1: C T A P A Q P I E P I T A A P S G

DNA: TCAGGTAATGGATCAGGTTTCATCATCCTCTGGTGGTTCTTCTGGTGGATCT  
+1: S G N G S G S S S S G G S S G G S

DNA: GGTTTCTGTGCTGTTAGAGCCAATGGTTTATACCCAGTTGCTAATAATAGG  
+1: G F C A V R A N G L Y P V A N N R

DNA: AATGCTTTTGGCACTGTGTCAATGGAGTTACTTACCAACAAAATTGCCAG  
+1: N A F W H C V N G V T Y Q Q N C Q

DNA: GCTGGTTTGGTATTTGATACCTCATGTGATTGTTGTAAGTGGGCTTAATGA  
+1: A G L V F D T S C D C C N W A \* \*

Mutasjonen **W31A** er markert med gult i aminosyresekvensen.

### **Kodonoptimalisert AMCase:** (sekvens brukt i CLC DNA Workbench)

GAATTCTATCAATTAACATGTTATTTTACTAACTGGGCTCAATACAGACCAGGATTGGGTAGATTCA  
TGCCTGACAATATAGATCCATGCTTGTGTACCCACTTGATCTATGCTTTTGTGGTAGACAAAATAA  
TGAAATCACTACAATTGAGTGGAAATGATGTAACCTGTACCAGGCTTCAATGGACTGAAAAACAA  
GAACTCACAATAAAGACATTGCTTGCATTTGGAGGTGCGAACTTTGGAAGTCTCCTTTTACAGC  
TATGGTTAGTACACCAGAAAATAGACAAACTTTCATTACTTCAGTTATTAAGTTCCTTAGACAATAT  
GAATTTGATGGCCTAGACTTTGACTGGGAATATCCAGGCTCTAGAGGTTACCCCCCTCAAGACAAG  
CATTGTTCACTGTATTAGTACAAGAGATGAGAGAAGCTTTTGAACAGGAGGCAAAGCAAATTAAC  
AAACCAAGATTGATGGTTACTGCTGCAGTAGCAGCAGGTATATCTAATATTCAATCTGGTTATGAA  
ATTCCCAATTGAGTCAATACTTGGATTACATCCATGTGATGACCTATGACCTACATGGTAGCTGGG  
AGGGATATACTGGAGAAAATAGTCCATTATAACAAGTATCCTACTGATACAGGTTCAAATGCCTACT  
TAAATGTAGATTATGTTATGAATTATTGGAAAGATAATGGTGCTCCAGCTGAAAAGCTGATTGTTG  
GTTTTCCCACTTATGGTCACAATTTTATTCTGAGTAATCCTTCCAACACAGGTTATTGGTGCCCCTAC  
CTCTGGAGCAGGACCAGCAGGTCCATATGCCAAGGAATCTGGAATATGGGCTTACTATGAAATCTG  
TACTTTCTTGAAGAATGGTGCTACCCAGGGTTGGGATGCTCCTCAGGAAGTGCCTTATGCCTATCAA  
GGTAATGTTTGGGTTGGTTATGACAACATTAATCTTTTATGATTAAGGCCAATGGTTGAAGCAC  
AATAAGTTTGGTGGAGCAATGGTTTGGGCTATTGATCTTGATGATTTTACAGGTACATTCTGCAATC  
AAGGAAAATCCCTCTAATATCTACTTTGAAGAAGGCACTTGGTTTACAGTCTGCTAGTTGCACAG  
CTCCTGCTCAGCCTATTGAACCTATCACTGCAGCACCCCTCAGGATCAGGTAATGGATCAGGTTTCATC  
ATCCTCTGGTGGTTCTTCTGGTGGATCTGGTTTCTGTGCTGTTAGAGCCAATGGTTTATACCCAGTT  
GCTAATAATAGGAATGCTTTTTGGCACTGTGTCAATGGAGTTACTTACCAACAAAATTGCCAGGCT  
GGTTTGGTATTTGATACCTCATGTGATTGTTGTAAGTGGGCTTAATGACGAATTC

### **AMCase aminosyresekvens (FASTA):**

MATKLILLTGLVLILNLQLGSAYQLTCYFTNWAQYRPLGRFMPDNIDPCLCTHLYAFAGRQNEITTIEWNDVTL  
YQAFNGLKNKNSQLKTLAIGGWNFGTAPFTAMVSTPENRQTFITSVIKFLRQYEFDFDGLDFDWEYPGSRGSPQDKH  
LFTVLVQEMREAFEQEAKQINKPRMLMVTAAVAAGISNIQSGYEIPQLSQYLDYIHVMTYDLHGSWEGYTGENSPLY  
KYPTDTGSNAYLNVDYVMNYWKDNGAPAELKLVGFPTYGHNFILSNPSNTGIGAPTSAGAGPAGPYAKESGIWAYYE  
ICTFLKNGATQGWDAPEVPYAYQGNVWVGYDNIKSFDIKAQWLKHNKFGGAMVWVAIDLDDFTGTFCNQKGFPL  
ISTLKKALGLQSASCTAPAQPIEPITAAPSGSGNGSGSSSSGGSSGGSGFCVVRANGLYPVANNRNFAFWHCVNGVTY  
QQNCQAGLVFDTSCDCCNWARIL

**Nukleotidsekvensen til pPIC9K-vektoren med genet for AMCase inkorporert:**

(AMCase vises i uthevet skrift)

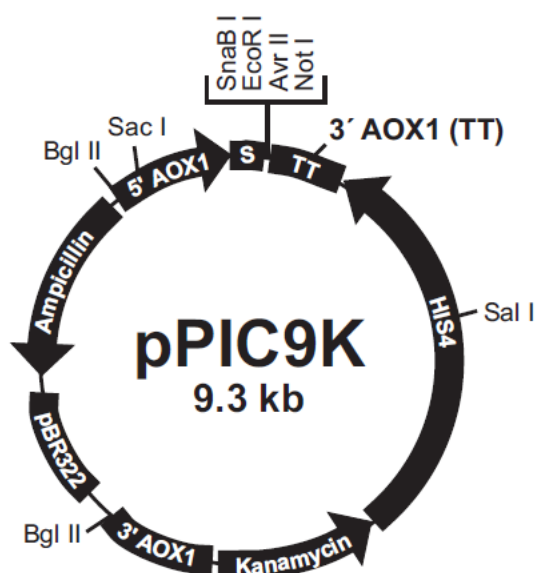
agatctaacaatccaaagacgaaaggtgaatgaaaccttttgcacatccacaggtccattctcacacataagtccaaacgca  
 acaggaggggatacactagcagcagaccggtgcaaacgcaggacctccactcctctctcctcaacacccactttgccatcgaaaaac  
 cagcccagttattgggcttgattggagctcgtcattccaattccttctattaggctactaacaccatgactttattagcctgtctatcctggc  
 cccctggcgagggtcatgtttgtttatttcgaatgcaacaagctccgcattacaccgaacatcactccagatgagggctttctgagtgt  
 ggggtcaaatagttcatgttcccaaatggccaaaactgacagttaaacgctgcttggaacctaataatgacaaaagcgtgatctcat  
 ccaagatgaaactaagtttggtcgttgaatgtaacggccagttggcaaaaagaaacttcaaaagtcgccataccgttgtcttgtttg  
 gtattgattgacgaatgctcaaaaataatcattaatgcttagcgcagctctctatcgttctgaacccgggtgcacctgtccgaaacg  
 caaatggggaaacaccgcttttggatgattatgcattgtctccacattgtatgctccaagattctgggggaactgctgatagcctaa  
 cgttcatgatcaaaatctaactgttcaaccctacttgacagcaatataaacagaaggaagctgccctgtcttaaaccttttttatcatc  
 attattagcttacttcataattgcgactggtccaattgacaagcttttgatttaacgactttaacgacaacttgagaagatcaaaaaaca  
 ctaattatcgaaggatccaaacgatgagatttctcaattttactgcagttttatcgcagcatcctccgcattagctgctccagtcaca  
 ctacaacagaagatgaaacggcacaattccggctgaagctgcatcggttactcagatttagaaggggatttcgatgttgcgttttggc  
 atttccaacagcacaataacgggttattgtttataaataactactattgccagcattgctgctaaagaagaaggggtatctctcgaaaa  
 gagaggtgaaagcttacgtagaattctagcggccaccat**ggctactaaaattgattttacttactggtttgactgaccttaattt**  
**gcaactagggtcagcctatcaat**taacatg**tattttactaaactgggctcaatacagaccaggattgggtagattcatgcctgac**  
**aatatagatccatgcttgttaccacttgatctatgcttttctggttagacaaaataatgaaatcactacaattgagtggaatga**  
**tgtaactctgtaccaggttcaatggactgaaaaacaagaactcacaactaaagacattgcttgaattggaggttggaaactt**  
**ggaactgctcttttacagctatggttagtacaccagaaaatagacaaaacttcaactcagttattaagtcccttagacaatat**  
**gaatttgatggcctagacttgcactgggaatatccaggcttagaggtcaccctcaagacaagcatttgttactgtattagt**  
**acaagagatgagagaagctttgaaacaggaggcaagcaaatcaaaaccaagattgatggttactgctgcagtagcagca**  
**ggtatatctaataattcaatctggttatgaaattcccaattgagtcacttggattacatccatgtgatgacctatgacctacat**  
**ggtagctgggagggatatactggagaaaatagtccattatacaagatcctactgatacaggttcaaatgectacttaaatgta**  
**gattatgttatgaaatttgaaagataatggtgctccagctgaaaagctgattgttggtttccacttatggtcacaattttatc**  
**tgagtaactctccaacacaggtattggtgccctacctctggagcaggaccagcaggtccatagccaaggaatctggaatat**  
**gggcttactatgaaatctgacttcttgaagaatggtgctaccagggttgggatgctcctcaggaagtgccttatgcctatcaa**  
**ggtaatgttgggttggatgacaacattaaatctttgatattaaggcccaatggttgaagcacaataagtttggaggcaat**  
**ggttgggctattgatcttgatgatttacaggctacattctgcaatcaaggaaaatccctctaataatctacttgaagaaggcact**  
**tggtttacagctctgctagttgcacagctctgctcagcctattgaacctatcactgcagcaccctcaggatcaggtaatggatca**  
**ggttcatcatcctctggtggttctctggtggatctggttctgtgctgtagagccaatggtttataccagttgctaataatagga**  
**atgcttttggcactgtgcaatggagttacttaccacaaaatggcaggctgggttggatttgatacctcatgtgattgtttaa**  
**ctgggcttaatgacgaattccctagggcgccgcgaattaatgccttagacatgactgttctcagttcaagttgggcacttacgag**  
 aagaccggtctgtagattctaataagaggatgctagaatgccattgectgagagatgcaggcttcattttgatactttttatttgaac  
 ctatatagtataggattttttgtcattttgttctctcgtacgagcttgcctctgatcagcctatctcgcagctgatgaatatctgtgtagg  
 ggittgggaaaatcattcagtttgatgttttcttgatattccactcctctcagagtacagaagattaagtgagaagttcgtttgtcaag  
 cttatcgataagcttaatgcggtagtttatcacagttaaattgtaacgcagtcaggcaccgtgtatgaaatcaacaatgcgctcatcgtc  
 atcctcggcaccgtcacctggatgctgtaggcataggcttggttatgccggtactgccgggctcttgcgggatatgctcattccgac  
 agcatcggcagcactatggcgtgctgtagcgtatgcgttgatgcaattctatgcgaccctctcggagcactgtccgaccgct  
 ttggccgccgccagctctgctcgttctgacttggagccactatcgactacgcgatcatggcgaccacaccgctctgtgatctatc  
 gaatcaaatgtaagftaaaatctcaaaataaataaagtcaccagtttctcctacgaaccttaacagcattgcggtgagcatctagacct  
 tcaacagcagccagatccatcactgcttggccaatatgttcagtcctcaggagttacgtcttgtgaagtgatgaactctggaaggttc  
 agtgttaactccgctgtattgacggcatalccgtacgttggcaagtgggttggtaccggaggagtaatctccacaactctctggaga  
 gtaggcaccaacaacacagatccagcgtgttacttgatcaacataagaagaagcattctcgattgcaggatcaaggttcaggag  
 cgtactgattggacatttcaaaagcctgctgtaggtgcaaccgatagggtgtagagtgtcaatacacttgcgtacaatttcaaccctt  
 ggcaactgcacagcttgggtgaaacagcatctcaattctggcaagctccttctgctgcatatcgacagccaacagaatcactgggaat

caataccatgttcagcttgagacagaaggctctgaggcaacgaaatctggatcagcgtatttatcagcaataactagaacttcagaaggcc  
 cagcagcagatgtcaactacacagggctgatgtgtcattttgaaccatcatcttggcagcagtaacgaactggttcttgaccataat  
 tttgtcacacttaggaacagtttctgtccgtaagccatagcagctactgcctgggcgcctcctgctagcacgatacacttagcaccaccc  
 ttgtgggcaacgtagatgacttctgggtaagggtaccatccttcttaggtggagatgcaaaaacaatttcttgaaccagcaactttgg  
 caggaacaccagcatcaggggaagtggaaaggcagaattgcggttccaccaggaatatagaggccaacttttcaataggtcttgcaaa  
 acgagagcagactacaccagggaagtctcaacttgaacgtctccgtagttgagcttcatggaatttctgacgttatctatagagaga  
 tcaatggctctttaacgttatctggcaattgcataagttcctctgggaaaggagcttcaaacaggtgtcttcaaacgactccatcaa  
 ctggcagttagtctaaaagggtttgtcaccattttgacgaacattgtcgacaattggttgactaattccataatctgtccgtttctggat  
 aggacgacgaaggcatctcaatttctgtgaggggccttagaaacgtcaattttgacaattcaatacagcttcagaagggtactct  
 ttaggtttgattctttaggttcttctgtgtatcctggcttggcatctccttctctagtacctttagggacttcataatccaggttct  
 ctccacctgtccaacgtcacaccgacttggcacatctaactaatgcaaaaataaataagtcagcacattcccaggctatattcttctgg  
 attagcttctgcaagttcatcagcttctccctaattttagcgttcaacaaaactcgtcgtcaaaataaccgtttggtataagaaccttctgga  
 gcattgtctttacgatcccacaagggtgcttccatggctctaaagacctttagttggcaaaaacaggaagtgcgttccaagtgcagaaaa  
 ccaacacctgtttgtcaaccacaaattcaagcagctcctatcaaatcaatcgataaccagcaacttttgagttgctccagatgtagc  
 accttataaccacaaaccgtgacgacgagattggtagactccagtttgtctctatagcctccggaatagactttttggacgagtagacca  
 ggcccaacgagtaattagaagagtcagccacaaagtagtgaatagaccatcggggcggcagtagtcaaacgcaacacaaat  
 cactgacagggaacttttgacatctcagaaagttcgtattcagtagtcaattgccgagcatcaataatggggattataccagaagcaac  
 agtggaaagtcacatctaccaactttgcggtctcagaaaaagcataaacagtttactaccgccatttagtgaacttttcaaatgccaggt  
 ggagaagaaaaaggcacagcgatactagcattagcgggcaaggatgcaactttatcaaccagggtctatagataaccttagcgcct  
 gggatcatcctttgacaactcttctgccaatctaggtccaaaactcattcattgataccattattgtacaacttgagcaagttgtcgtatca  
 gctcctcaaatggctctgtaacggatgactcaacttgcacattaactgaagctcagtcgattgagtgaaactgacaggttgcgagc  
 tggtagcagcatagggaaacacggctttctaccaaaactcaaggaattatcaaaccttgcacacttgcgtatgcaggtagcaaggg  
 aatgtcatacttgaagtcggacagtgagtgtagtcttgagaaattctgaagccgtattttattatcagtgagtcagtcacagagatcct  
 ctacgccggacgcatcgtggccgacctgcagggggggggggggcgtgaggtctgcctcgtgaagaaggtgtgctgactcatacc  
 aggctgaatgcccatcatccagccagaaagtgagggagccaggtgatgagagcttggtaggtggaccagttggtgattttg  
 aactttgtcttccacggaacggctctgcgttgcgggaagatgcgtgatctgaccttcaactcagcaaaaagttcgattattcaaaaag  
 ccgctgcccgtcaagtcagcgtaatgctctgccagtggtacaaccaattaaccaattctgattagaaaaactcagcagcatcaaatgaa  
 actgcaatttattcatalcaggattatcaataccatattttgaaaaagccgttctgtaatgaaggagaaaaactcaccgagcagttccata  
 ggatggcaagatcctggtatcggctgcgattccgactgtccaacatcaatacaacctattaattcccctcgtcaaaaataaggttatca  
 agtgagaatcaccatgagtgacgactgaatccggtgagaatggcaaaagcttatgcatttcttccagacttgttcaacagccagcca  
 ttacgctcgtcatcaaaactcgcacatcaacaaaccgttattcattcgtgattgcgcctgagcgagacgaaatacgcgacgctgttaa  
 aaggacaattacaacaggaatcgaatgcaaccggcgaggaacactgccagcgcacatacaaatatttcacctgaatcaggatattct  
 tcaataacctggaatgctgtttcccggggatcgcagtggtgagtaaccatgcatcatcaggagtacggataaaatgcttgatggtcggga  
 agaggcataaattccgtagccagtttagtctgacctctcatctgtaacatcattggcaacgctactttgccatgtttcagaacaactct  
 ggcgcatcgggcttccatacaatcagatagattgtcgcacctgattgcccagacttatcgcgagcccatttataccatataaatcagcat  
 ccatgttgaattaatcgcggcctcagcaagacgttcccgtgaatattggtcataaacacccttctgattactgtttatgtaagcagaca  
 gttttattgtcatgatgatataattttatcttgtgcaatgtaacatcagagattttgagacacaacgtggcttccccccccctgcaggtc  
 ggcatcaccggcgccacaggtgcgggtgctggcgctatcgcgcacatcaccgatggggaagatcgggctcggcacttcgggctc  
 atgagcgttgtttcggcgtgggtatgggtggcagggcccgtggccgggggactgttgggcgccatctccttgcacaccattccttgc  
 ggcggcgggtcacaacggcctcaactactgggctgcttccataatgcaggagtcgcataaggagagagcgtcagatctatgattg  
 gaagtatgggaatggtgataccgcatttctcagtgctttaggtctctatcagattatgccaactaaagcaaccggaggaggagatt  
 catggtaaatttctgactttgtcatcagtagactgaactgtgagactatctcggttatgacagcagaatgtccttctggagacagt  
 aaatgaagtcccacataaagaatcctgttatcaggaacaaacttctgttgcgaacttttgggtgcttgaactataaatgtagagt  
 ggatattgcggtaggaatggagcgggcaaatgcttacccttggacctcaagaggtatgtaggggtttagatactgatccaactc  
 agtgacaacgttctatttcttcaaacattccgaatccagagaaatacaagttgttctactattgatccaagcagtcgggtcttga  
 actgacaatagtgctcgtgttttaggtcatctttgatgataaatactagctttgatcaataatctgacgagccaaggcgataaata  
 ccaaatctaaaactctttaaactgtaaaaggacaagtatgtctgctgtattaaaccccaatcagctcgtagtctgatcctcatcaact  
 tgaggggcactatctgttttagagaaatttgcggagatgcgatcagaaaaaggtacgctgattttaaactgaaatttatctcaagat  
 ctctgctcgcgcgttccgggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttctgtgtaagcggatgc  
 cgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggcgcagccatgaccagtcacgtagcgtatg



cggagtgtatactggcttaactatcgggcatcagagcagattgtactgagagtgcacatgatcggtgtgaaataccgcacagatgcgt  
 aaggagaaaataccgcatcagcgcctctccgcttctcgtcactgactcgtcgcctcggcgttcggctcggcggagcggatca  
 gctcactcaaaggcggtaatacgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggc  
 caggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcggtttccataggctccgccccctgacgagcatcacaatacagcgtcaagtcag  
 aggtggcgaaacccgacaggactataaagataaccaggcgttccccctggaagtcctcctcgtcgcctcctcgttccgacctgccgt  
 taccggatacctgtccgctttctccctcgggaagcgtggcgctttctcaatgctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgtc  
 gctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccaccgctgcgcttatccggtaactatcgtcttgagtccaaccggta  
 agacacgacttatgccactggcagcagccactgtaacaggattagcagagcggaggtatgtaggcgggtgctacagagttctgaa  
 ggtggcctaactacggctacactagaaggacagattttggtatctgcgctcgtgaagccagttacctcggaaaaagagttgtagct  
 ctgtagccggcaacaaccaccgctggtagcgggtggtttttgttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaa  
 gatcctttgatctttctacggggtcgtcagctcagtggaacgaaaactcacgtaagggttttggatgagattatcaaaaaggatctc  
 acctagatccttttaataaaaaatgaagtttaaatcaatctaaagtataatgagtaaacctggctcgcaggtaccaatgcttaacagtg  
 ggcacctatctcagcgatctgtctatctgttcacatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggttaccat  
 ctggccccagtgtgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccggaggggcc  
 gagcgcagaagtggctcctgcaactttatccgctccatccagcttattaattgttggcgggaagctagagtaagtagttcggcagtaata  
 gtttgcgaacgttggccattgctgcagcagcagcgtcgtcgtcgttggatggcttcattcagctccgggtccaacgatca  
 aggcgagttacatgatccccatgttgcaaaaaagcggtagctcctcggctcctccgatcgttgcagaagtaagttggccgagtg  
 ttatcactcatggttatggcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgactggtgagtactcaaccaagt  
 cattctgagaatagtgtatgcgcgaccgagttgctcttggccggcgtcaacacgggataataccgcgccacatagcagaacttaaaa  
 gtgctcatattgaaaacgttctcggggcgaactcctcaaggatctaccgctgttgatccagttcgtatgtaaccactcgtgcac  
 ccaactgatctcagcatctttacttaccagcgttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaagggaataagg  
 gcgacacggaaatgtgaatactcatacttctctttcaatattatgaagcatttatcagggtattgtctcatgagcggatacatattgaa  
 tgatttagaaaaataaacaataggggtccgcgcacattccccgaaaagtccacctgacgtctaagaaccattattatcatgacatt  
 aacctataaaaatagcgtatcacgagggcccttcgtctcaagaattaattctcatgttgacagcttatcatcgataagctgactcatgtg  
 gtattgtgaaatagacgcagatcgggaacactgaaaaataacagttattatcg

### pPIC9K-vektoren:



Figur 44: pPIC9K-vektoren som HCHT og AMCCase inkorporeres inn i.