

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP





## **FORORD**

Denne masteroppgaven har blitt utført ved Instituttet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap ved Universitetet for miljø- og biovitenskap i perioden januar til mai 2013.

Vi ønsker å rette en stor takke til vår hovedveileder Morten Sørli for god faglig oppfølging og til våre medveiledere Anne Grethe Hamre og Anne Line Norberg for super god hjelp på laboratoriet. I tillegg vil vi takke Kristine Bistrup Eide for oppmuntrende ord underveis. Vi vil også takke våre medstudenter for å ha bidratt til et koselig miljø på labben fylt med latter, kaker og vårruller.

Til slutt vil vi takke våre familier for støtte og oppmuntring, spesielt våre kjære menn; Adnan Bouiri og Tommy Nygren for deres tålmodighet i frustrerte tider.

Universitet for miljø- og biovitenskap

Ås 15.05.13

---

Theresa Dang

---

Karima Amara



## INNHALDSFORTEGNELSE

FORORD.....	I
SAMMENDRAG .....	VII
ABSTRACT .....	IX
FORKORTELSER.....	XI
<b>1. INTRODUKSJON .....</b>	<b>1</b>
1.2KITIN .....	2
1.2.1 Struktur og egenskaper .....	2
1.2.2 Anvendelser av kitin og kitosan.....	4
1.3 GLYKOSYLHYDROLASER.....	5
1.3.1 Klassifisering, struktur og topologi.....	5
1.3.2 Mekansime.....	7
1.4 PROSESSIVITET .....	9
1.5 KITINASER.....	10
1.5.1 Klassifisering.....	11
1.5.2 Substrat-assistert katalyse.....	12
1.5.3 <i>Serratia marcescens</i> kitinaser .....	13
1.5.4 ChiB.....	15
1.6 SETERETTET MUTAGENESE .....	16
1.7 MÅL MED OPPGAVEN.....	19
<b>2. MATERIALER.....</b>	<b>21</b>
2.1 LABORATORIEUTSTYR.....	21
2.2 KJEMIKALIER .....	25
2.3 PROTEINER, ENZYMER OG SUBSTRATER .....	26
2.4 BAKTERIESTAMME OG PLASMID .....	27
2.5 PRIMERE.....	28

2.6 MEDIER .....	29
2.6.1 Ferdiglaget medium.....	29
2.6.2 Selvlaget medium.....	29
2.7 KITS .....	30
2.8 LØSNINGER OG BUFFERE.....	31
2.8.1 Løsninger .....	31
2.8.2 Buffere.....	33
2.9 PROGRAMVARE .....	34
<b>3. METODER.....</b>	<b>35</b>
3.1 DESIGN AV CHIB MUTANTER .....	35
3.1.1 Oppdyrking av ChiB wt- og E144Q bakteriestammer.....	35
3.1.2 Isolering av plasmid-DNA fra <i>E. coli</i> .....	36
3.1.3 Måling av DNA konsentrasjon med NanoDrop.....	37
3.1.4 Primer design .....	39
3.1.5 Seterettet mutagenese.....	39
3.1.6 Polymerase chain reaction (PCR) .....	41
3.1.7 Dpn I reaksjon .....	42
3.1.8 Oppkonsentrering av plasmid med Pellet Paint.....	42
3.1.9 Transformering av TOP10 superkompetente celler.....	43
3.1.10 Oppdyrking av transformanter .....	44
3.1.11 Tillaging av frysestock.....	44
3.1.12 Isolering av plasmider til sekvensering.....	45
3.1.13 Tillaging av sekvenseringsreaksjoner.....	45
3.1.14 Databehandling for sekvensering .....	45
3.2 PRODUKSJON AV CHIB MUTANTER.....	46
3.2.1 Overekspresjon av ChiB mutanter.....	46
3.2.2 Tillaging av periplasmatisk ekstrakt.....	47
3.3 RENSING AV CHIB MUTANTER.....	48

3.3.1 Rensing av periplasmatisk ekstrakt på kitinkuler .....	48
3.3.2 Sodium Dodecyl Sulfate-Polyakrylamid Gel Elektroforese (SDS-PAGE).....	49
3.3.3 Oppkonsentrering av ChiB mutanter .....	50
3.3.4 Fluorimetrisk bestemmelse av proteinkonsentrasjon.....	51
3.3.5 Kontroll av enzymaktivitet.....	52
3.4 NEDBRYTNING AV KITOSAN F <sub>A</sub> 0,65 MED CHIB MUTANTER.....	54
3.4.1 Proton kjernemagnetisk resonans ( <sup>1</sup> H NMR) .....	55
3.4.2 Tolkning av <sup>1</sup> H NMR-spektra.....	56
3.4.3 Størrelsesekklusjonskromatografi (SEC).....	57
3.4.4 2-Aminoacridone (AMAC) derivatisering av kitoooligosakkarider .....	58
3.4.5 Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight (MALDI TOF) Massespektrometri (MS) .....	60
3.5 NEDBRYTNING AV β-KITIN MED CHIB MUTANTER .....	61
3.5.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	63
3.5.1.1 Tillaging av standarder .....	63
3.5.1.2 HPLC - analyse.....	64
<b>4. RESULTATER.....</b>	<b>65</b>
4.1 MUTASJONSANALYSE .....	65
4.1.1 Y240A og W252A.....	66
4.1.2 W479A og Y481A.....	67
4.2 SETERETTET MUTAGENESE .....	67
4.3 RENSING AV CHIB MUTANTER.....	68
4.3.1 Isolering av Y481A .....	69
4.3.2 Fluorimetrisk bestemmelse av proteinkonsentrasjon.....	70
4.3.3 Kontroll av enzymaktivitet.....	71
4.4 NEDBRYTNING AV KITOSAN F <sub>A</sub> 0,65 MED CHIB MUTANTER.....	73
4.4.1 <sup>1</sup> H NMR.....	73
4.4.1.1 W252A.....	73

---

4.4.1.2 Y240A.....	75
4.4.1.3 W479A.....	76
4.4.1.4 Y481A.....	78
4.4.2 7 dagers nedbrytning av kitosan $F_A = 0,65$ .....	79
4.4.3 SEC.....	80
4.4.4 MALDI-TOF-MS/MS.....	82
4.5 NEDBRYTNING AV $\beta$ -KITIN MED CHIB MUTANTER.....	84
4.5.1 HPLC - [A2] mot tid.....	85
4.5.2 HPLC - [A2]/[A1] mot nedbrutt $\beta$ -kitin.....	86
<b>5. DISKUSJON.....</b>	<b>87</b>
5.1 NEDBRYTNING AV 4 MU-(GLCNAC) <sub>2</sub> .....	87
5.2 NEDBRYTNING AV KITOSAN $F_A 0,65$ MED CHIB MUTANTER.....	88
5.3 NEDBRYTNING AV $\beta$ -KITIN MED CHIB MUTANTER.....	89
<b>6. OPPSUMMERING OG VIDERE ARBEID.....</b>	<b>91</b>
6.1 OPPSUMMERING.....	91
6.2 VIDERE ARBEID.....	92
<b>7. REFERANSER.....</b>	<b>93</b>
<b>8. APPENDIX.....</b>	<b>99</b>
8.1 SEKVENSER.....	99
8.1.1 Nukleotidsekvens.....	99
8.1.2 Aminosyresekvens:.....	100
8.2 RENSING AV CHIB MUTANTER.....	100
8.2.1 Isolering av Y240A.....	100
8.2.2 Isolering av W252A.....	101
8.2.3 Isolering av W479A.....	102
8.3 MALDI-TOF-MS/MS.....	102



## SAMMENDRAG

Kitin er et uløselig lineært polysakkarid som er beslektet med cellulose. Det består av repeterende  $\beta$ -1,4-*N*-acetylglucosamin enheter der sukkerenhetene er rotert 180 °C i forhold til hverandre. I naturen finnes det rikelige mengder med kitin, blant annet som strukturelt materiale hos krepsdyr, artropoder, sopp, bakterie og insekter. Kitosan er et løselig derivat av kitin som dannes ved deacetylering av kitin. Polymeren består av  $\beta$ -1,4 linket *N*-acetylglukosamin og glukosamin. Kitin og kitosan anvendes innen blant annet medisin, landbruk, kosmetikk og tekstilindustrien. Kitin og dets derivater degraderes enzymatisk av en gruppe enzymer, kalt kitinaser.

Kitinase B (ChiB) som ble studert i denne oppgaven, tilhører familie 18 kitinaser og kommer fra jordbakterien *Serratia marcescens*. *S. marcescens* er en av den mest effektive bakterien for degradering av kitin og har et kitinolytisk maskineri som involverer tre kitinaser: ChiA, ChiB og ChiC.

I ChiB er det en sti av aromatiske overflateresiduer fra det kitinbindende domenet (ChBD) via en support loop og inn mot det aktive setet. Tidligere studier har vist at enkelte aromatiske residuer i det aktive setet i ChiB er viktige for prosessivitet. På bakgrunn av dette var det interessant å undersøke om Y240 og W252 i support loop og Y481 og W479 i ChBD, også hadde en effekt på prosessivitet.

De ulike residuene ble mutert til alanin ved hjelp av seterettet mutagenese. Deretter ble de konstruerte mutantene benyttet i flere ulike forsøk med kitin og kitosan som substrat. Resultatene fra forsøkene viste at de aromatiske residuene i ChBD har like egenskaper og at disse er mindre viktig for prosessivitet. Aromaten Y240 som ligger nærmest det aktive setet, viste seg å være mer viktig for prosessivitet. Dermed kan det konkluderes med at aromater nær den katalytiske syren er viktig for prosessivitet, mens rollen til aromater på et ChBD er å øke binding til det uløselige polysakkaridet kitin.



**ABSTRACT**

Chitin is an insoluble linear polymer of  $\beta$ -1, 4-linked *N*-acetylglucosamine residues and exhibits structural similarities to cellulose. Chitin is the second most abundant polymer in nature, after cellulose. It is a major structural component of the exoskeleton of insects, crustaceans and cell walls of a variety of fungi. Chitosan, a soluble derivative of chitin, is composed of  $\beta$ -1, 4-linked *N*-acetylglucosamine and glucosamine units. Chitin and Chitosan are utilized in medicine, agriculture, cosmetics and in the textile industry. A group of enzymes called chitinases degrades chitin and its derivatives.

Chitinase B (ChiB) studied in this project, belongs to family 18 chitinases from the soil bacteria *Serratia marcescens*. *S. marcescens* is one of the most efficient bacteria for degradation of chitin and the chitinolytic machinery includes three chitinases: ChiA, ChiB and ChiC.

In ChiB a path of surface exposed aromatic residues, starts at the chitin binding domain (ChBD) and leads into the active site via a support loop. Previously studies have shown that residues near the active site are important for processivity. Based on this, it was interesting to investigate if Y240 and W252 in the support loop and Y481 and W479 in the ChBD had an effect on processivity.

The residues were mutated to alanine and the newly engineered mutants were used in different experiments with chitin and chitosan as substrates. The results from this study showed that aromatic residues in the ChBD have similar properties and are less important for processivity. Y240, the aromatic residue that lies nearest to the active site, showed to be more important for processivity. Thus it can be concluded that the aromatic residues near the catalytic acid are important for processivity, while the role of aromatic residue in the ChBD is to increase the binding between the enzyme and the insoluble polysaccharide chitin.



---

**FORKORTELSER**

4-MU	4-metylumbelliferyl
°C	Grader (celsius)
µg	Mikrogram
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
dH <sub>2</sub> O	Destillert vann
DNA	Deoksyribonukleinsyre
dsDNA	Dobbeltrådet DNA
GlcNAc	N-acetylglukosamin
GlcN	2-amino-2deoksy-D-glukopyranose eller D-glukosamin
Gln	Glutamin
kb	kilobaser
kDa	KiloDalton
M	Molar (mol/L)
mg	Milligram
mL	Milliliter
mM	Millimolar (millimol/L)
<i>m/z</i>	Masse/ladning
ng	nanogram
nm	nanometer
pmol	picomol
Pr	per
Rpm	Runder per minutt
Trp (W)	Tryptofan
Tyr (Y)	Tyrosin
WT	villtype
Å	Ångstrøm (0,1 nm)



## 1. INTRODUKSJON

Karbohydrater er en fellesbetegnelse for en stor gruppe organiske forbindelser som spiller en rekke ulike roller i levende organismer og er nødvendig for alt liv.

Forbindelsene lagres som cellulose, stivelse og sukker i planter som gjennom fotosyntesen omdanner atmosfærisk karbondioksid til karbohydrater. Forbrenning av karbohydrater er en viktig energikilde (Mathews et al., 2000).

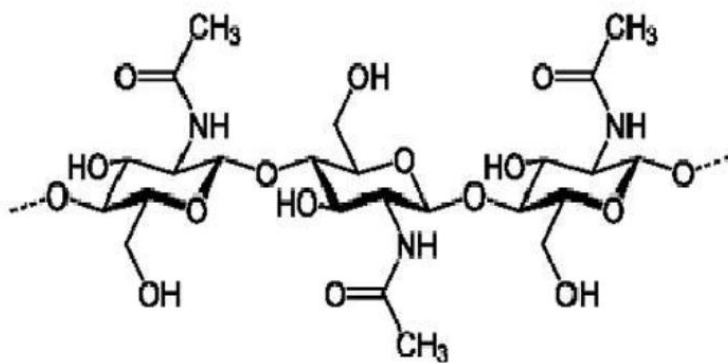
Karbohydrater klassifiseres i grupper etter forbindelsenes oppbygning og består av grunnstoffene: Karbon, hydrogen og oksygen med den generelle formelen  $(CH_2O)_n$ . Monosakkarid er den enkleste formen for et karbohydrat og er grunnelement for oppbygningen av andre karbohydrater. Monosakkarider med fem eller seks karbonatomer kan danne stabile ringstrukturer som kalles for henholdsvis pyranose og furanose (Hart et al., 2007). Polysakkarider og oligosakkarider dannes ved at henholdsvis flere eller noen få monosakkarider bindes sammen ved glykosidbindinger. Glykosidbindinger er en av de mest stabile bindingene som finnes i naturlige polymerer. Hydrolyse av glykosidbinding i polymere som cellulose og kitin katalyseres av en gruppe enzymer kalt glykosylhydrolaser (Yip & Withers, 2004).

Karbohydrater har i tillegg til det å være en viktig energikilde, andre biologiske funksjoner. Homopolysakkaridene cellulose og kitin er strukturelt materiale i henholdsvis plantecellevegger og exoskjelettet til skalldyr. Bakteriell cellevegg består av polysakkarider i form av peptidoglykaner. Polysakkarider festet til cellemembrans-overflate er involvert i celsignalisering og er i denne sammenhengen ofte bundet til protein eller lipider (Mathews et al., 2000).

## 1.2 Kitin

### 1.2.1 Struktur og egenskaper

Kitin er et uløselig lineært polysakkarid bestående av  $\beta$  1-4 linket *N*-acetyl-D-glucosamin residuer rotert 180 °C relativt til hverandre. Polysakkaridet syntetiseres av krepsdyr, alger, insekter, sopp og gjær. Kitin, med unntak av cellulose, er den biopolymeren det eksisterer mest av i naturen. Kitin har stor strukturell likhet med cellulose, forskjellen er residuet ved C2, der kitin har en acetamidgruppe istedenfor en hydroksylgruppe (Synowiecki & Al-Khateeb, 2003). Figur 1.1 viser strukturen til kitin.



**Figur 1.1:** Den kjemiske strukturen til kitin (Wikipedia, 2008).

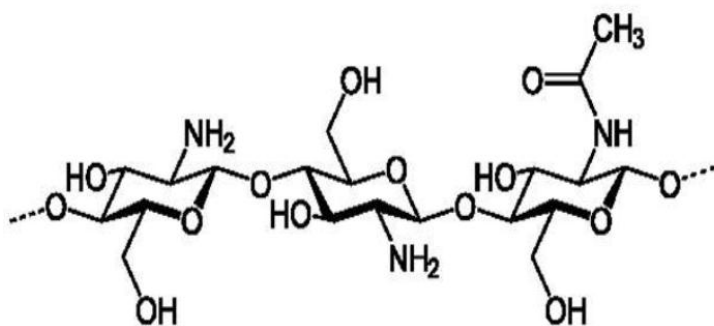
Kitin forekommer i ulike krystallinske strukturer, avhengig av hvordan de individuelle kitinkjedene er organisert. Kitinkjedene assosieres med hverandre ved at det dannes hydrogenbindinger mellom C=O gruppen på en kjede og NH gruppen på en annen (Synowiecki & Al-Khateeb, 2003). De individuelle kjedene vil kunne tillegges en retning fordi glykosidenhetene i kitinkjeden er bundet til hverandre med oksygen som linker C1 på en enhet til C4 på en annen. De krystallinske formene foreligger som  $\alpha$ ,  $\beta$  og  $\gamma$  strukturer.



$\alpha$ -kitin er den mest vanlige strukturen og kjedene er arrangert antiparallelt, der annenhver kjede ligger i motsatt retning.  $\beta$ -kitin er mindre vanlig og kjedene er arrangert parallelt.  $\alpha$ -kitin har sterkere intermolekulære interaksjoner og er derfor vanskeligere å degradere enn  $\beta$ -kitin. Den tredje konformasjonen,  $\gamma$ -kitin, der to av tre kjeder ligger parallelt og den tredje kjeden antiparallelt, er kontroversiell (Synowiecki & Al-Khateeb, 2003).

På grunn av den høye tettheten av hydrogenbindinger i fast fase, viser kitin ingen smeltetemperatur og er løselig i kun noen få løsemidler. Kjemisk modifisering som bryter hydrogenbindinger uten å kløyve glykosidlinkingen, anvendes for å omdanne kitin til mer løselige derivater. *N*-deacetylering av kitin for å produsere kitosan, forekommer naturlig i noen bakterier og prosesseres kommersielt (Synowiecki & Al-Khateeb, 2003).

Kitosan er et løselig heteropolysakkarid dannet av  $\beta$ -1-4-linket *N*-acetylglukosamin (GlcNAc, A) og glukosamin (GlcN, D) (jfr. figur 1.2). Kitosan er løselig i vandige syrer, avhengig av acetyleringsgraden. Årsaken er de positive ladde aminogruppene på de deacetylte enhetene som protoneres ved pH lavere enn 6.5 (Berth & Dautzenberg, 2001).



**Figur 1.2:** Den kjemiske strukturen til kitosan (Wikipedia, 2008).

### **1.2.2 Anvendelser av kitin og kitosan**

Kitin og kitosan er naturlige polymerer med flere egenskaper som kan utnyttes industrielt. Polymerene er biodegraderbare og ikke-toksiske.

Innenfor medisin benyttes kitosan til sårbehandling, antikolesterol dietter og kontroll av medisiner i kroppen (Synowiecki & Al-Khateeb, 2003). Kitin og kitosan har antimikrobielle, antimetastatiske og bakteriostatisk egenskaper. Kitin og dets derivater kan forebygge og helbrede ulike sykdommer. Kitosan inkorporeres i kroppen gjennom antikolesterol dietter og ved påføring av bandasje. Ved bruk av kitin og kitosan for å kontrollere frigjøring av medisin i kroppen, sikres det et konstant nivå av medisin i blodet.

Kitosan anvendes som en komponent i ulike kosmetiske produkter. Polysakkaridet har avhengig av molekylvekt og deacetyleringsgrad, en fuktighetsgivende effekt på huden og er derfor godt egnet til bruk i hånd- og kroppskremer. Tannkrem som inneholder kitosan, forsterker beskyttelsen av dentin ved å redusere gjennomtrengning av væsker, lys, varme og kulde. Kitosan reduserer også mikrobiell infeksjon i tenner (Synowiecki & Al-Khateeb, 2003).

Andre anvendelsesområder er innenfor landbruk og tekstilindustrien. Kitosan fra celleveggen til noen sopper og fra skallet til krepsdyr, hemmer vekst av fytopatogene mikroorganismer og induserer motstand mot sopp- og bakterieinfeksjoner i planter. Tilsetning av kitin til jordbunnen gir effektiv eliminering av noen plantesykdommer. Kitin og kitosan benyttes i tekstilindustrien som lakkeringsmateriale for blant annet nylon, bomull og ull fiber (Synowiecki & Al-Khateeb, 2003).

### 1.3 Glykosylhydrolaser

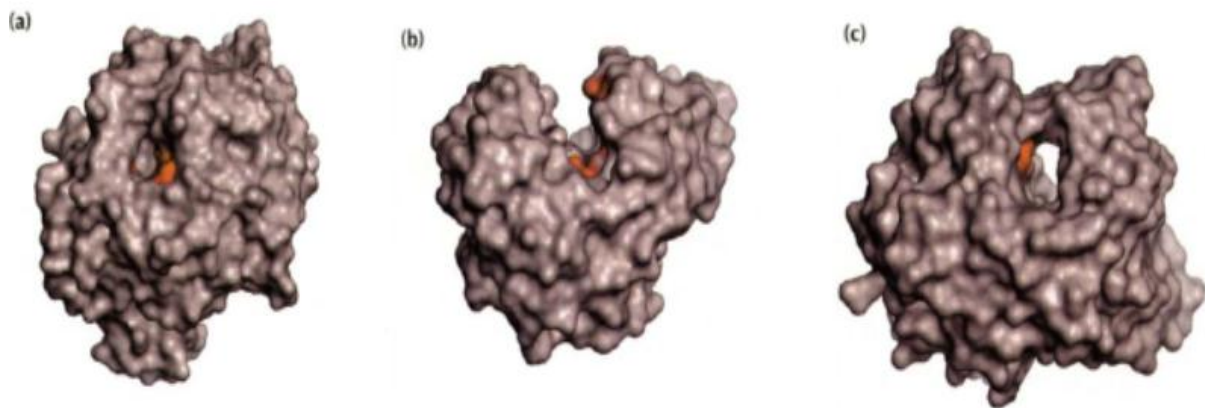
I naturen finnes det en bred stereokjemisk variasjon av karbohydrater. Levende organismer utnytter denne diversiteten ved å anvende polysakkarider og oligosakkarider til en rekke biologiske funksjoner som for eksempel struktur oppbygning, lagring og celledisignalisering. Selektiv hydrolyse av glykosidbindinger er nødvendig for at levende organismer skal kunne utføre essensielle funksjoner. Det eksisterer derfor en stor variasjon blant enzymer som kan hydrolysere glykosidbindingene (Davies & Henrissat, 1995).

#### 1.3.1 Klassifisering, struktur og topologi

Den enorme variasjonen av enzymer som finnes i naturen krever et klassifiserings-system. The International Union Of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) har konstruert et klassifiseringssystem basert på substrat spesifisitet, der klassene tildeles et EC nummer. Systemet er enkelt, men skaper problemer for enzymer som hydrolyserer flere ulike substrater. Et eksempel er glykosylhydrolaser som viser bred overlapping mellom EC-klasser. Disse enzymene krever et bedre og mer presist system som tar hensyn til tre-dimensjonale strukturer, reaksjonsmekanisme og substrat spesifisitet. Et system som klassifiserer enzymer i familier etter aminosyresekvens-likheter, vil gi nyttig informasjon om struktur og mekanisme. Struktur og den katalytiske mekanismen er lik innenfor hver enzymfamilie (Henrissat & Davies, 1997).

Glykosylhydrolaser er en gruppe enzymer som hydrolyserer glykosidbinding mellom to eller flere karbohydrater, eller mellom et karbohydrat og en annen forbindelse. Glykosylhydrolaser består som regel av et katalytisk domene og ett eller flere ikke-katalytiske domener. Hydrolyse foregår i det aktive sete i det katalytiske domenet. (Davies & Henrissat, 1995). Glykosylhydrolaser er på bakgrunn av homologi i aminosyresekvens, klassifisert i 132 familier (CAZy, 2006).

Innen disse familiene der 3D strukturen er påvist, finnes det forskjeller ved det aktive setet basert på hvordan substratet bindes. Vanligvis skilles det mellom tre kategorier: Lomme, kløft og tunnel (jfr. figur 1.3). Disse tre topologiene er uavhengige av om enzymet har en inverterende eller bevarende mekanisme om det anomeriske karbonet ved hydrolyse (beskrevet nedenfor), og kan i prinsippet bygges på de samme foldingene med de samme katalytiske residuene (Davies & Henrissat, 1995).



**Figur 1.3:** De tre mulige strukturene for det aktive setet blant glykosylhydrolaser: Lommestruktur (a), kløft (b) og tunnel (c) (Davies & Henrissat, 1995).

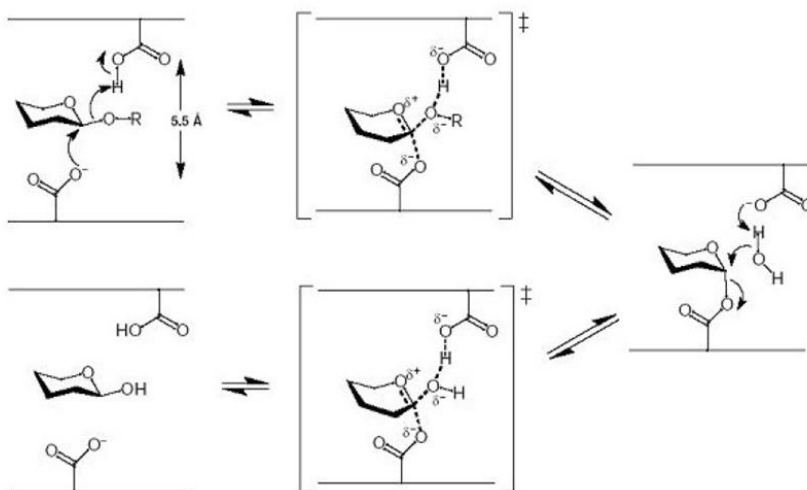
Lommetopologien er optimal for å gjenkjenne substrater med flere tilgjengelige ender, som for eksempel stivelses granuler. Enzymer med lommestruktur i det aktive setet, er hovedsakelig enzymer med eksoaktivitet. Kløft strukturen er en mer åpen struktur som tillater tilfeldig binding av flere sukkerenheter i polymeriske substrater. Kløft er en vanlig struktur på det aktive setet hos endo-aktive polysakkarider som for eksempel visse kitinaser. Den tredje strukturen, tunnelstruktur, karakteriseres ved at substratet utvikler lange loops som dekker deler av substratbindings-kløften. Substrat kjeden trer gjennom tunnelen og forblir bundet til enzymet etter at hydrolyse produktet frigjøres. Dermed muliggjør tunnelstrukturen prosessiv hydrolyse. Tunnelformede aktive seter er karakteristisk for eksoenzymer (Davies & Henrissat, 1995).

### 1.3.2 Mekansime

Enzymatisk hydrolyse av glykosidbindinger forekommer ved en generell syrekatalyse (jfr. figur 1.4) som krever to residuer: En proton donor/syre og en nukleofil/base.

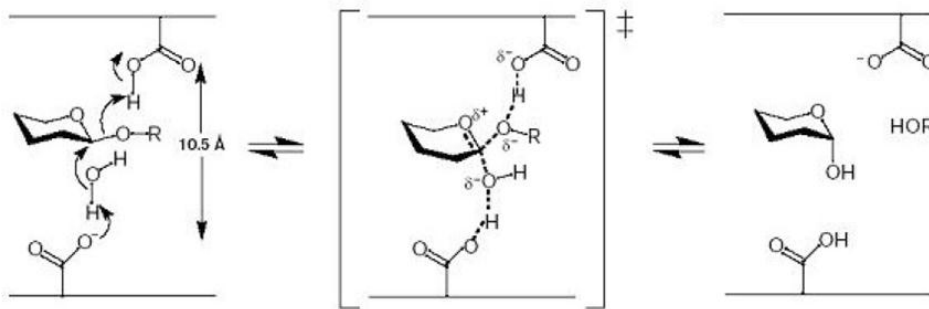
Glykosylhydrolaser kan anvende to hovedmekansimer der hydrolysen fører til enten en bevaring eller inversjon av den anomere konfigurasjonen. Posisjonering av proton donoren er identisk for begge mekanismene. Proton donoren er plassert fra glykosidbindingen som skal spaltes, med en avstand som gjør det mulig for protonet å inngå i en hydrogenbinding med glykoksid-oksygenet (Davies & Henrissat, 1995).

I bevarende enzymer er de to nevnte residuene lokalisert med en distanse på 5.5 Å fra hverandre. Reaksjonen foregår ved *double-displacement mechanism*, og er en to-trinns mekanisme som involverer et glykosid-enzym intermediat (jfr. figur 1.4). I det første trinnet blir glykoksid-oksygenet protonert av syre-residuet, glykosidbindingen brytes og det dannes en positiv ladning på det anomere karbonet. En nukleofil substitusjon på det anomerske karbonet danner et glykosid-enzym intermediat. I det andre trinnet hydrolyseres glykosid-enzymet av et vannmolekyl. Dette genererer et hydrolyseprodukt med lik konfigurasjon som substratet (Rye & Withers, 2000; Davies & Henrissat, 1995).



**Figur 1.4:** Generell glykosidase mekanismer for bevarende  $\beta$ -glykosidaser som fremgår gjennom et intermediat (Rye & Withers, 2000).

Avstanden mellom de katalytiske residuene i inverterende enzymer er på rundt 10 Å. Dette gir plass til et vannmolekyl mellom base-residuet og substratet. Inverterende enzymer anvender en ett-trinns mekanisme, *single-displacement mechanism*, som gir en direkte utbytting av den utgående gruppen med et vannmolekyl (jfr. figur 1.5). Vannmolekylet aktiveres av det nukleofile residuet. Det anomere karbonet angripes av det aktiverte vannmolekylet samtidig som oksygenet ved glykosidbindingen blir protonert av syre-residuet. Glykosidbindingen brytes og hydrolyse produktet får en invers stereokjemi sammenlignet med substratet.



**Figur 1.5:** Generell glykosidase mekanisme for inverterende  $\beta$ -glykosidase (Rye & Withers, 2000).

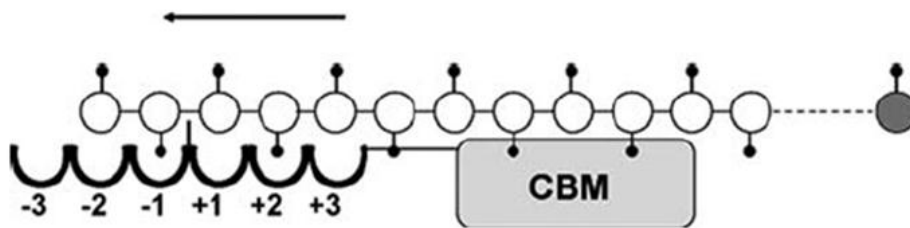
Glykosylhydrolaser kan degradere polysakkarider fra kjede-endene, enten fra den reduserende enden eller den ikke-reduserende enden. Disse enzymene opptrer da med eksoaktivitet. I tillegg kan glykosylhydrolaser degradere tilfeldig langs polymer kjeden. Dette benevnes endoaktivitet (Horn et al., 2006b).

### 1.4 Prosessivitet

I enzymkatalyse er prosessivitet evnen til å forbli bundet til substratet etter hydrolyse har forekommet, og er et fellestrekk for glykosylhydrolaser som degraderer krystallinske polysakkarider som kitin og cellulose (Davies & Henrissat, 1995; Rouvinen et al., 1990). Prosessivitet antas å forbedre enzymatisk effektivitet fordi enkle polymer kjeder forhindres i å reassosiere med det uløselige materialet mellom påfølgende katalytiske reaksjoner. Dermed reduseres antall ganger enzymet må utføre den energiske ugunstige prosessen for å få tilgang til en enkelt kjede. Prosessive enzymer har ofte lange og dype, noen ganger tunnelformede, aktive seter (Horn et al., 2006a; Sorlie et al., 2012).

For substrater som kitin og cellulose, vil et prosessivt enzym binde produktivt til annen- hver sukkerenhet. Dette er fordi sukkerenhetene er rotert 180 ° C i forhold til hverandre. Den initiale produktive bindingen kan produsere enten partall – eller oddetallsprodukter. Deretter vil påfølgende hydrolyseprodukter være dimere. Prosessiv degradering vil derfor gi disakkarider (Horn et al., 2006a).

Katalyse med kitinase B (ChiB) danner produktiv binding med kitin ved at en *N*-acetyl enhet binder til -1 subsete i det aktive setet (jfr. figur 1.6).



**Figur 1.6:** ChiB i kompleks med en enkel kitin kjede. Enzymet har seks subseter nummerert fra -3 til +3 og et kitinbindende domene (CBM). Sukkerets reducerende ende er farget grått og pilen indikerer retningen substratet skyves gjennom det aktive setet. Korrekt posisjonering av *N*-acetyl gruppe i -1 subsete er essensielt for katalyse (Horn et al., 2006a).

Prosessivitet blir ofte vurdert ved sammenlikning av produserte løselige og uløselige reducerende ender. Hvis andelen løselige ender er større enn andelen uløselige ender, er dette en indikasjon på at enzymet er prosessivt. Ulempen med denne tilnærmingen er at den ikke diskriminerer mellom endo- og eksoenzymer. Både eksoenzymer, uavhengig av prosessivitet, og endoenzymer med høy grad av prosessivitet, vil gi høy ratio av løselige/uløselige reducerende ender. Omtrentlig grad av prosessivitet kan også vurderes etter forholdet mellom dimer og monomer (Horn et al., 2006a)

## 1.5 Kitinaser

Kitinaser er enzymer som hydrolyserer  $\beta$ -glykosidbindingene i polysakkaridet kitin og kitinderivater. Enzymene er utbredt i naturen og finnes i stor variasjon i organismer fra prokaryote til mennesker (Brurberg et al., 2000)



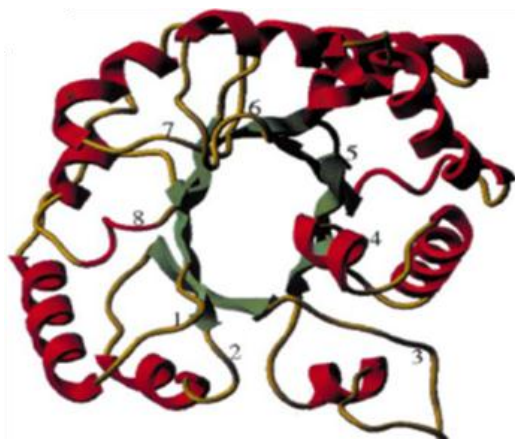
I organismer som inneholder kitin, er kitinaser viktig for opprettholdelse av normal livssyklus i form av celledeling og tidlig utvikling. Planter som produserer kitinaser anvender disse enzymene til beskyttelse mot patogene mikroorganismer. Mange bakterier og sopp benytter kitinolytiske enzymer til å konvertere kitin til mindre forbindelser som igjen kan benyttes som energikilde (Brurberg et al., 2000).

Kitinaser er av stor bioteknologisk interesse. Disse enzymene kan benyttes til konvertering av kitin til nyttige forbindelser og til kontroll av sopp- og insekts sykdommer i planter (Brurberg et al., 2000).

### 1.5.1 Klassifisering

Kitinaser er klassifisert i to glykosylhydrolase familier, familie 18 og 19. Familie 18 kitinaser inneholder kitinaser fra ulike prokaryote og eukaryote organismer. Kitinaser fra familie 19 har blitt funnet i karplanter og i den gram-positive bakterien, *Streptomyces*. De to familiene inneholder både ekso- og endoaktive kitinaser (Brurberg et al., 2000).

Det katalytiske domenet til familie 18 kitinaser har en  $(\beta/\alpha)_8$  TIM-barrel fold (jfr. figur 1.7) som inneholder et konservert motiv, DXXDXDXE, og er lokalisert på  $\beta$ -strand 4 i det aktive setet. Den katalytiske syren/basen er glutamat residuet E i sekvensmotivet (Brurberg et al., 2000; Vaaje-Kolstad et al., 2013).

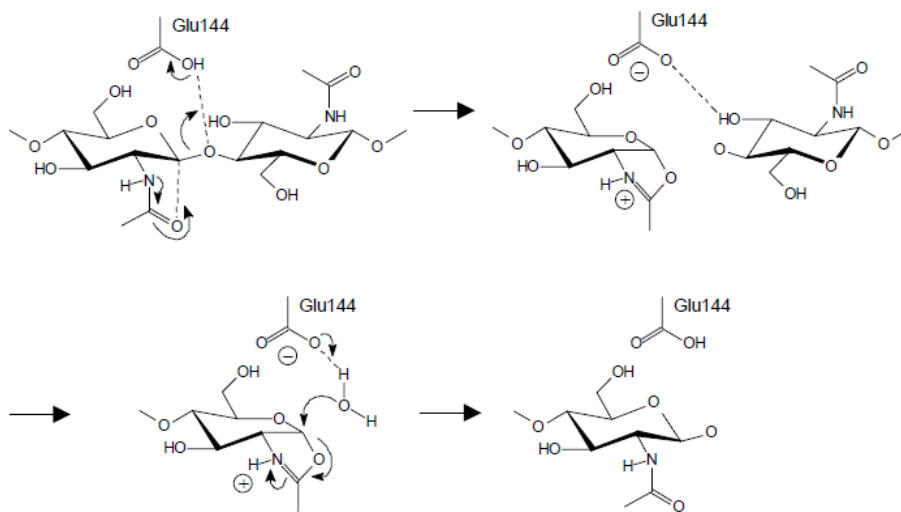


**Figur 1.7:** Oversikt over  $(\beta/\alpha)_8$  TIM-barrel fold. Figuren viser de 8 parallelle  $\beta$ -strands som er omringet av 8  $\alpha$ -helikser (Wierenga, 2001).

Familie 18 kitinaser benytter en substrat-assistert reaksjonsmekanisme som fører til bevaring av den anomere konfigurasjonen. Kitinaser tilhørende familie 19 anvender en inverterende mekanisme som endrer den anomere konfigurasjonen.

### 1.5.2 Substrat-assistert katalyse

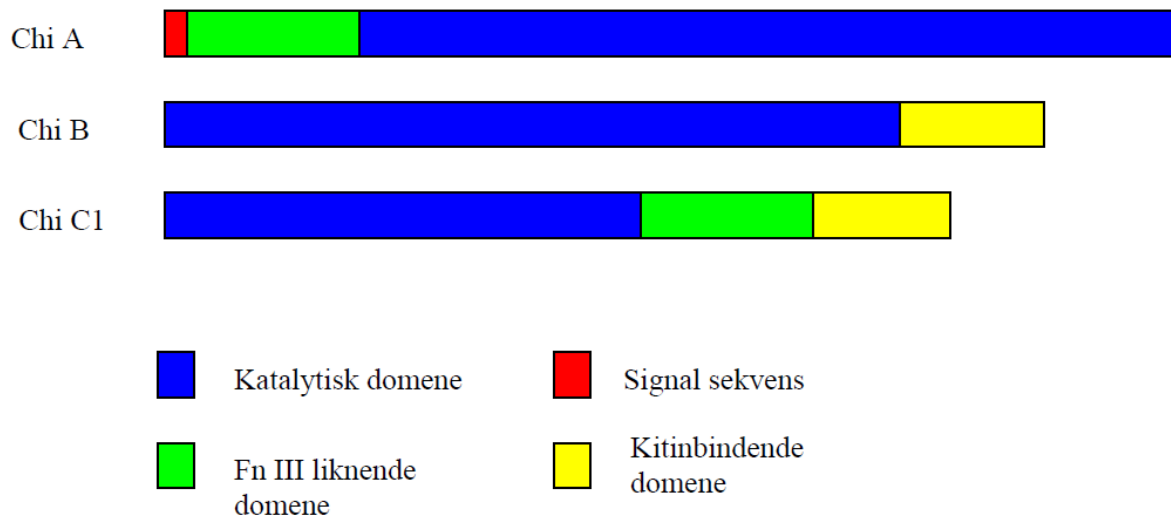
Ulike studier av familie 18 kitinaser har vist at enzymene benytter en substrat-assistert katalyse. Det aktive setet hos disse enzymene mangler syre-residuet som er nødvendig for stabilisering av oksokarbeniumion intermedietet som vanligvis dannes ved *double-displacement mechanism* (Brurberg et al., 2000). Double-displacement oppnås derimot ved at *N*-acetylgruppen på C2 i sukkerenheten, istedenfor et syre-residu, opptrer som en nukleofil og angriper det anomere karbonet. Karbonyl oksygenet reagerer med det anomere karbonet og det katalytiske glutamat residuet, Glu 144, protonerer glykoksid-oksygenet (jfr. figur 1.8).



**Figur 1.8:** Den substrat-assisterte mekanismen til familie 18 kitinaser. Glu 144 er det katalytiske glutamat residuet (Brurberg et al., 2000).

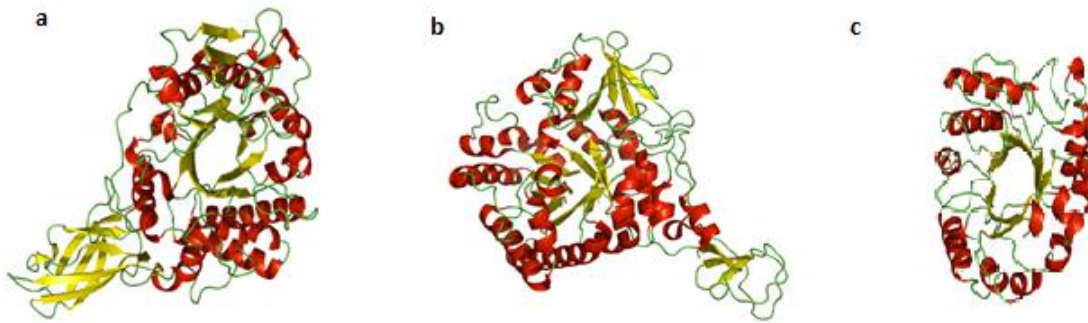
### 1.5.3 *Serratia marcescens* kitinaser

Det kitinolytiske maskineriet til den gram-negative jordbakterien, *Serratia marcescens*, er et av de mest effektive systemene for degradering av kitin. Dette maskineriet inkluderer kitin aktive kitinasene: ChiA, ChiB og ChiC som alle tilhører familie 18 kitinaser (Brurberg et al., 2000; Vaaje-Kolstad et al., 2013). I tillegg til det katalytiske domenet, har disse tre enzymene ett eller flere mindre domener som antas å være involvert i substratbinding (Horn et al., 2006c). Sammenlikning av sekvensen til de tre *S. marcescens* kitinasene er vist i figur 1.9.



**Figur 1.9:** Sammenlikning av sekvensen til ChiA, ChiB og ChiC 1 fra *Serratia marcescens*. Figuren viser at ChiA har et FnIII liknende domene istedenfor et ChBD slik som ChiB har. ChiC har begge domene (Horn et al., 2006c).

ChiA og ChiB er prosessive eksoenzymer som degraderer kitin fra henholdsvis den reduserende enden og den ikke-reduserende enden. ChiC har vist seg å være et ikke-prosessivt endoenzym (Sikorski et al., 2006; Baban et al., 2010). Figur 1.10 viser strukturen til de tre enzymene.



**Figur 1.10:** Oversikt over strukturer til familie 18 kitinaser fra *Serratia marcescens*. Figuren viser krystall strukturen til ChiA (a), ChiB (b) og ChiC (c).

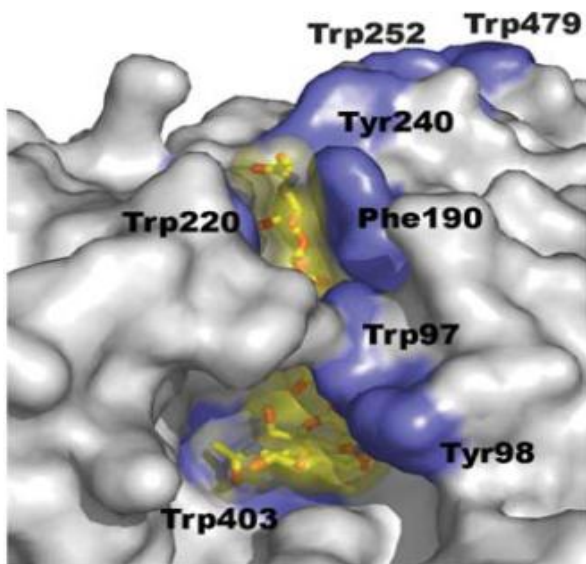
#### 1.5.4 ChiB

ChiB består av et kitinbindende domene (ChBD) som er linket til det aktive setet via en support loop. ChiB har et stort antall aromatiske residuer som danner en sti fra det aktive setet til det ChBD (Van Aalten et al., 2000).

Det ChBD består av tre antiparallele  $\beta$ -strands som er bundet sammen ved hjelp av lange loops. Dette domenet danner interaksjoner med den reduserende enden til substratet som strekker seg forbi subsetene i det aktive sete. (Van Aalten et al., 2000).

Det aktive setet er en dyp kløft som består av subseter merket fra  $-n$  til  $+n$ , der  $-n$  representerer den ikke-reduserende enden av substratet og  $+n$  representerer den reduserende enden.

Den substratbindende kløften i ChiB strekker seg fra -3 til +3 der kutting av substratet alltid foregår mellom subsetene -1 og +1. Subsetet -1 har en absolutt preferanse for korrekt binding av en *N*-acetyl gruppe (Horn et al., 2006a; Horn et al., 2006b). Den substratbindende kløften har et lukket "tak" som gir en tunnelformet struktur. Dette er karakteristisk for prosessive enzymer (jfr. figur 1.11). Tidligere studier har vist at aromatiske residuer nær det aktive sete er viktige for prosessivitet (Horn et al., 2006c).



**Figur 1.11:** ChiB i kompleks med et substrat. Figuren viser det lukkede taket i det aktive setet når substratet er bundet. Substratet er vist i gult og de aromatiske residuene er vist i blått (Horn et al., 2006a).

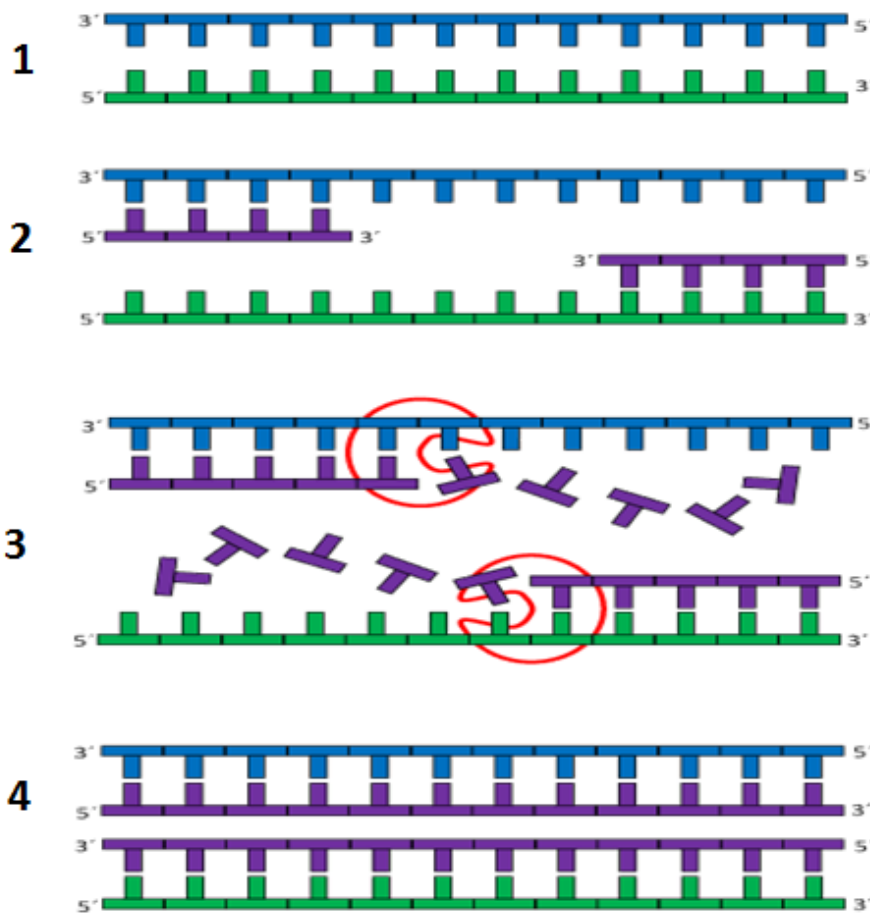
## 1.6 Seterettet mutagenese

Anvendelsesområdene til de fleste enzymene har vært preget av at enzymene er ekstremt godt tilpasset biologiske prosesser. Derfor er de ikke egnet til industrielle anvendelser. For å kunne benytte enzymer til spesifikke industrielle formål, må enzymene skreddersys etter behov ved hjelp av enzym engineering (Arnold, 2001).

Endring av strukturen til et enzym og dets egenskaper, vil føre til økt kunnskap om enzymets virkemåte (Spiller et al., 1999). Seterettet mutagenese er et viktig verktøy for dannelse av nye enzymer med ønskede egenskaper, og det er essensielt for forståelsen av hvordan enzymer virker.

Seterettet mutagenese er en teknikk som anvendes til å studere forholdet mellom struktur og funksjon ved å danne en spesifikk endring i en DNA-sekvens. Teknikken kan benyttes til å utføre punkt mutasjoner, utbytting av aminosyrer, delesjoner eller insersjoner av en eller flere aminosyrer (Carter, 1986). Seterettet mutagenese kan også brukes til å studere genuttrykk og vektor modifikasjoner (Agilent Technologies, 2012).

Metoden er basert på bruk av to syntetiske oligonukleotid primere som er komplementære til hver sin DNA-tråd i den delen av DNA-sekvensen som ønskes endret. Disse oligonukleotidene inneholder sekvens som koder for den ønskede mutasjonen. Oligonukleotidene benyttes til å danne et nytt gen med den ønskede endringen ved hjelp av polymerase chain reaction (PCR)(Carter, 1986). Figur 1.12 viser prinsippet bak PCR.



**Figur 1.12:** Skjematisk fremstilling av prinsippet bak PCR. 1) Dobbeltrådene i DNA separeres ved denaturering. 2) Primerene (farget lilla) fester seg til hver sin komplementære DNA tråd. 3) HF DNA polymerase (farget rødt) forlenger primerene. 4) Ny dobbeltrådet DNA dannes.



### **1.7 Mål med oppgaven**

Mange enzymer som hydrolyserer uløselige krystallinske polysakkarider, som for eksempel kitin, benytter en prosessiv mekanisme som reduserer antall ganger enzymet må binde til substratet. Det er antatt at en prosessiv mekanisme fører til en mer effektiv degradering av kitin.

Tidligere studier har vist at mutasjoner av aromatiske aminosyrer i det aktive setet i ChiB har en innvirkning på prosessivitet. Det er derfor interessant å se om mutasjoner i det kitinbindende domenet (ChBD) og support loop også har en effekt på prosessivitet.

Målet med oppgaven var å mutere ulike residuer i ChBD og support lopp i ChiB til alanin for så å undersøke enkelt residuenes bidrag til grad av prosessivitet og effektivitet. De konstruerte mutantenes aktivitet på kitin og kitosan ble analysert ved hjelp av High Performance Liquid Chromatography (HPLC), størrelseseksklusjonskromatografi (SEC), Nuclear magnetic resonance (NMR) og Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight (MALDI TOF) Massespektrometri (MS).



## 2. MATERIALER

### 2.1 Laboratorieutstyr

Laboratorieutstyr	Spesifikasjon	Leverandør
Amiconrør	Ultra-15, 10kDa Ultra-4, 10kDa Ultracel-30 kDa	Millipore
Autoklavteip	13 mm	VWR
Automatpipetter	Finnpipetter	ThermoLabsystems
Avtrekkskap	AV-100	Telstar
Bordrister	Swip	Edmund Bühler
Bordsentrifuge	Sigma 1-14	LABEX
Blåkorkflasker	1000 mL 500 mL 250 mL 100 mL 50 mL	VWR
C-18 kolonne	SampliQ C-18- EC	Agilent technologies
Cryorør	2 mL	Starsted
Dyrkningkolber	2 L	BD Falcon
Elektroforeseutstyr	Gelkjøringskammer Gelspenningskilde Gelkniv	Invitrogen VWR Nisahu
Eppendorfrør	1,5 mL 2,0 mL	Axygen

Laboratorieutstyr	Spesifikasjon	Leverandør
Filter	0,22 µm Ultracell®, 10 kDa 0,45 µm filter, hydrophilic low protein binding Steritopp 0,22 µm 1,2 mm	Millipore Millipore Multiscreen Millipore Whatmanfilter
Fluorometer protein	Qubit™ Fluorometer	Invitrogen
Fotoutstyr (gel)	Gelfotosystem GSF 1000 Lyskilde UV transuliminator	Bio-RAD Laboratories Kilab AS UVP, inc.
Fryser	-80 °C Ultra low -20 °C	SANYO
Frysetørker	Maxi Dry, SPD111V	Savant Speed Vac
GATC Bokser	"To pack and send your DNA samples"	GATC Biotech AG
Glasspipette	Glasspasteur pipettes, 230 mm	VWR
Glassutstyr		Schott-Duran
HPLC	Ultimate 3000 system Autoinjektor Detektor UV detektor Rør og caps	Dionex  VWR
HPLC- forkolonne	Carbo-H 4 x 3,0 mm	Phenomenex
HPLC- kolonne	Rezex RFQ-Fast Fruit H+ 7,8 x 100 mm	Phenomenex
Ismaskin	KF185A	PORKKA
Inkubator	Inkubatorskap 37 °C	Termax
Kanyler	0,9 mm x 40 mm	Becton Dickinson
Kitinkolonne		Bio Rad

Laboratorieutstyr	Spesifikasjon	Leverandør
Kyvette	1 x 1 cm	VWR
Konduktivitetsmåler	TetraCon 96-Electrode	WTW
Magnetrorer	Magnetic stirrer, standard unit	www.labworld-online.com
Merketape	13 mm	VWR
Mikrovekt	Sartorius CP-2P	VWR
MS	Ultra Flex TOF/TOF	Bruker
Nanodrop	ND-1000 Spectrophotometer	Saveen Werner
NMR	Bruker 400	Bruker
NMR-rør	5 mm, 7 lengde	Sigma- Aldrich
Nuncrør	Cellstar® tubes 50 mL 15 mL	Greiner Bio-One
Parafilm	10 cm og 5 cm bredde	VWR
PCR	Master cycler gradient	VWR
PCR-rør	0,2 mL	VWR
Petrisåler	9 cm	Heger
pH-meter	MicroFET 9270-010	Sentron
Pippettespisser	Next Generation Tip Refill 0,1-10 µL Next Generation Tip Refill 1-200 µL Next Generation Tip Refill 100-1250 µL Finntip® 5 mL Finntip® 10 mL Labtip Blue Labtip yellow	VWR   Thermoscientific  VWR

Laboratorieutstyr	Spesifikasjon	Leverandør
Risteinkubator	Multitron Standard Multitron Eco	Infors
SEC	HiLoad pumpe P-50 133 Refractive Index Detector Superfrac	GE healthcare Gilson Pharmacia
SEC-kolonner	HiLoad 26/60 Superdex, Prepgrade	GE healthcare
Sentrifuge	Avanti™ J-25 SORVALL® RC 6 Sentrifuge- 5430 R	Beckman ONEMED Eppendorf
Sentrifugerotor	JA-10 SLA 3000 5430/5430 R	Beckman ONEMED Eppendorf
Sentrifugerør	500 mL	Nalgene
Sonikator	Transonic 460/H	ELMA
Spektrofotometer DNA	ND-1000	Thermo Scientific
Sprøyter	1 mL 2 mL 50 mL	BD plastipak
Sprøytefilter	0,20 µm	Sarstedt
Sterilbenk	AV-100	Telstar
Termomikser	Thermomixer confort 1,5 mL	Eppendorf
Vakuumpumpe		Millipore
Vannbad	Eco Temp TW12	Julabo
Vekt	LC621P	Sartorius Basic
Whirlmixer	Vortex- Genie 2	Scientific industries
Qubit™ assayrør		Invitrogen

## 2.2 Kjemikalier

Kjemikalie	Leverandør
2,5-Dihydroxybezoic acid	Daltonics
4-methylumbelliferone	Sigma-Aldrich
4-methylumbelliferyl-D-N, N'-diacetylchitobiose	Sigma-Aldrich
Acetone, CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich
Acetonitril, CH <sub>3</sub> CN	Sigma-Aldrich
Agar, Bacto-agar	Merck
Ammoniumacetat, NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO	Merck
Ammoniumsulfat ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Life-Science
Ampicillin, natriumsalt, C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	Sigma-Aldrich
Bacto™ Tryptone	BD
Bacto™ Yeast extract	BD
Bovine serum albumin (BSA)	Biolabs inc.
Chitin Beads	Biolabs inc.
Coomassie® Brilliant Blue R-250	Bio-Rad
Destillert vann, dH <sub>2</sub> O (Milli-Q kvalitet)	
Deuteriumklorid, DCl	Aldrich
Deuteriumoksid, D <sub>2</sub> O	Aldrich
Dibasisk Natriumhydrogenfosfat NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
Eddiksyre, CH <sub>3</sub> COOH	Sigma-Aldrich
Etanol, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	VWR
Etanolamin, C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO	Sigma-Aldrich
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich
Glyserol, C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> Merck	Merck
Helium 6.0 Utraplus	Yara Industrial AS
Hydrogenklorid, HCl	Sigma-Aldrich

Kjemikalie	Leverandør
Isopropanol	Merck
Kaliumhydroksid, KOH	Merck
Magnesiumklorid, MgCl <sub>2</sub>	VWR
Metanol, CH <sub>3</sub> OH (high quality)	Sigma-Aldrich
Monobasisk Natriumhydrogenfosfat NaHPO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
MOPS SDS Runningbuffer	Invitrogen
Natriumcyanoboranhidrid, 95 %	Aldrich
Natriumdeuteriumoksid, NaOD	Aldrich
Natriumhydroksid, NaOH	VWR
Nitrogen, N <sub>2</sub>	AGA
NuPAGE® 10 % Bis-Tris Gel 1,0mm x 10 well	Invitrogen
NuPAGE® Sample reducing agent (10x)	Invitrogen
NuPAGE® Samplebuffer (4x)	Invitrogen
Phenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF)	Sigma
Sitronsyre	VWR
Trizma base, C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich

### 2.3 Proteiner, enzymer og substrater

Protein	Leverandør
Benchmark Ladder	Invitrogen
Biovine Serum Albumin (BSA) purified 100x, 10 mg/mL	New England BioLabs. Inc



Enzym	Leverandør
ChiB E144Q	Dyrket av masterstudent Silje Lorentzen
ChiB wt	Dyrket av Post Doc Anne Line Norberg

Substrat	Leverandør
<i>N</i> -acetyl-D-Glucosamine	Sigma-Aldrich
<i>N</i> - <i>N</i> -acetylchito-diose	Sigma-Aldrich
$\beta$ -kitin 3 $\mu$ m	Seikagaku corporation
Kitosan $F_A = 0,65$	Laget av Post Doc Anne Line Norberg

#### 2.4 Bakteriestamme og plasmid

Bakteriestamme	Leverandør
<i>E. coli</i> TOP10 superkompetente celler	Invitrogen

Plasmid	Leverandør
<i>E. coli</i> pMay2-10	Brurberg M.B. (UMB)

## 2.5 Primere

**Tabell 2.1:** Primersekvensene til de ulike mutantene der mutert kodon er markert rødt.

MUTANT	DNA TEMPLAT	PRIMER	SEKVENNS
W479A	ChiB wt	Forward	5' CGTCTGGCAGACCAAG <b>GCG</b> GGTTACATCACCTCT 3'
		Revers	5' AGAGGTGATGTAACCC <b>GCC</b> TTGGTCTGCCAGACG 3'
Y481A	ChiB wt	Forward	5' GCAGACCAAGTGGGGT <b>GCC</b> ATCACCTCTGCACCG 3'
		Revers	5' CGGTGCAGAGGTGATG <b>GCA</b> CCCCACTTGGTCTGC 3'
W252A	ChiB wt	Forward	5' ATCTGGGCTGGAGC <b>GCG</b> GAAGAGCTGACCC 3'
		Revers	5' GGGTCAGCTCTCC <b>GCG</b> CTCCAGCCCAGAT 3'
Y240A	ChiB wt	Forward	5' CGGGCCGACCTTC <b>GCC</b> AACGCGCTGCGC 3'
		Revers	5' GCGCAGCGCGTTG <b>GCG</b> AAGGTGGGCCG 3'
E144Q/W479A	E144Q mutant	Forward	5' CGTCTGGCAGACCAAG <b>GCG</b> GGTTACATCACCTCT 3'
		Revers	5' AGAGGTGATGTAACCC <b>GCC</b> TTGGTCTGCCAGACG 3'
E144Q/Y481A	E144Q mutant	Forward	5' GCAGACCAAGTGGGGT <b>GCC</b> ATCACCTCTGCACCG 3'
		Revers	5' CGGTGCAGAGGTGATG <b>GCA</b> CCCCACTTGGTCTGC 3'
E144Q/252A	E144Q mutant	Forward	5' ATCTGGGCTGGAGC <b>GCG</b> GAAGAGCTGACCC 3'
		Revers	5' GGGTCAGCTCTCC <b>GCG</b> CTCCAGCCCAGAT 3'
E144Q/Y240A	E144Q mutant	Forward	5' CGGGCCGACCTTC <b>GCC</b> AACGCGCTGCGC 3'
		Revers	5' GCGCAGCGCGTTG <b>GCG</b> AAGGTGGGCCG 3'

**Tabell 2.2:** Primere som ble benyttet til sekvensering.

PRIMER	SEKVENNS
T7	5` TAATACGACTCACTATAGGG 3`
Sp6	5` ATTTAGGTGACACTATAG 3`
ChiB wt forward 537	5` TGAAGGATTACGGCTTCGAC 3`
ChiB wt revers 1568	5`CCAGACGTAGCCTTGGTAGG 3`

## 2.6 Medier

### 2.6.1 Ferdiglaget medium

Medium	Leverandør
S.O.C ( Super optimal broth with Catabolite repression) medie  Til 1 liter medium tilsettes: 2 % Tryptone 0,5 % Yeast extract 10 mM Sodium chloride 2,5 mM Potassium chloride 10 mM Magnesium chloride 10 mM Magnesium sulfat 20 mM Glucose	Invitrogen

### 2.6.2 Selvlaget medium

Medium	Innhold
Luria-Bertani (LB) medie	10 g Bacto™ Tryptone 5 g Bacto™ Yeast Extract 10 g Natriumklorid Fylles opp til 1 L med dH <sub>2</sub> O pH-justeres til pH 7 med NaOH Autoklaveres

## 2.7 Kits

<b>Kit</b>	<b>Innhold</b>	<b>Leverandør</b>
E. Z. N. A. ® Plasmid Mini Kit I	HiBind DNA Mini kolonner Samlerør Solution I Solution II Solution III Equilibration buffer HB buffer DNA wash buffer RNase A Elution Buffer	OMEGA bio-tek
QuikChange ® Site-Directed Mutagenesis Kit	10x Reaction buffer Dpn I restriction enzyme pWhiteScript™ 4.5-kb control plasmid dNTP mix <i>Pfu Ultra</i> DNA polymerase Control primer #1 Control primer #2	Stratagene
Pellet Paint ® NF Co-Precipitant	3 M Sodium acetat pH 5,2 Pellet Paint ® Co- Precipitant	Novagen

## 2.8 Løsninger og buffere

### 2.8.1 Løsninger

Løsning	Innhold
Ampillin, 50 mg/mL	1 g Ampicillin dH <sub>2</sub> O til totalt 20 mL
Acetonitril, 80 %	400 mL 100 % Acetonitril dH <sub>2</sub> O til totalt 500 mL
Avfargingsløsning for SDS-PAGE	50 mL 10 % Eddiksyre 50 mL 10 % MeOH 400 mL dH <sub>2</sub> O
Fargeløsning for SDS-PAGE	0,25 g Coomassie Brilliant Blue R250 125 mL Metanol 25 mL 100 % Eddiksyre 100 mL dH <sub>2</sub> O
Cyanoboranhydrid, 1 M	7 mg Cyanoboranhydrid 200 µL dH <sub>2</sub> O
EDTA, 0,5 M pH 8.0	45,6 g disodium EDTA dihydrat 200 mL dH <sub>2</sub> O pH-justeres med NaOH pellets dH <sub>2</sub> O til totalt 250 mL
Eddiksyre, 20 mM	588 µL Eddiksyre dH <sub>2</sub> O til totalt 500 mL
Etanol, 20 %	100 mL 100 % Etanol dH <sub>2</sub> O til totalt 500 mL
Etanol, 30 %	150 mL 100 % Etanol dH <sub>2</sub> O til totalt 500 mL
Etanol, 70 %	350 mL 100 % Etanol dH <sub>2</sub> O til totalt 500 mL

Løsning	Innhold
Glycin, 0,3 M	5,63 g 0,3 M Glycin dH <sub>2</sub> O til totalt 250 mL
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 20 mM	50 µL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> dH <sub>2</sub> O til totalt 50 mL
HCl, 1M	21 mL konsentrert HCl dH <sub>2</sub> O til totalt 300 mL
MgCl <sub>2</sub> , 20 mM	2,1 g MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O dH <sub>2</sub> O til totalt 500 mL
Metanol, 50 %	250 mL 100 % metanol dH <sub>2</sub> O til totalt 500 mL
Metanol, 70 %	350 mL 100 % metanol dH <sub>2</sub> O til totalt 500 mL
MOPS, 1X	100 mL 20X MOPS 1900 mL dH <sub>2</sub> O
NaOH, 0,3 M	3,15 g 0,3 M NaOH dH <sub>2</sub> O til totalt 250 mL
Natriumacetat, 50 mM pH 6.1	6,8 g Natriumacetat 1000 ml dH <sub>2</sub> O pH justeres med NaOH
Natriumfosfat, 0,2 M	8,9 g 0,2 M Natriumfosfat dH <sub>2</sub> O til totalt 250 mL
Sitronsyre, 0,1 M	5,3 g 0,1 M Sitronsyre dH <sub>2</sub> O opptil 250 mL
Tris-HCl, 1 M pH 8	121,1 g Trizma base i 800 ml dH <sub>2</sub> O pH justeres med HCl (6 M) dH <sub>2</sub> O til totalt 1L
Tris-HCl, 0,1 M pH 8	50 mL 1 M Tris-HCl pH 8 dH <sub>2</sub> O til totalt 500 mL

**2.8.2 Buffere**

<b>Løsning</b>	<b>Innhold</b>
Citrat/Fosfat (Mcllvain) 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, 0,3 M pH 10.6	50 mL 0.3 M Glycin 45,5 mL 0.3 M NaOH dH <sub>2</sub> O til totalt 200 mL
Natriumfosfat buffer, 100 mM pH 6.3	10,7 g Natriumfosfat (mono) med 387,5 mL dH <sub>2</sub> O 4 g Natriumfosfat (di) med 112,5 mL dH <sub>2</sub> O dH <sub>2</sub> O til totalt 1 L
Spheroplastbuffer	30 mL 1 M Tris-HCl pH 8.0 51,3 g sukrose 300 µL 0,5 M EDTA pH 8.0 600 µL PMSF (Phenyl-methyl sulfonylfluorid, serin proteasehemmer) dH <sub>2</sub> O til totalt 300 mL

---

## 2.9 Programvare

<b>Bruksområde</b>	<b>Programvare</b>
HPLC	Chromeleon 7
MS	Flex Analysis Flex Control
Måling av DNA konsentrasjon	ND-1000
NMR	TopSpin
Rensing av protein	LP Data View
SEC	Advantec Adam View
Sekvensering	CLC DNA Workbench



## 3. METODER

### 3.1 Design av ChiB mutanter

Tidligere studier har vist at enkelte aromatiske residuer i det aktive setet i ChiB er viktige for prosessivitet. På bakgrunn av dette var det interessant og se om aromatiske residuer ved andre lokaliseringer også hadde en effekt på prosessivitet. Følgende mutanter ble dermed designet (jfr. tabell 3.1).

**Tabell 3.1:** Oversikt over ChiB mutanter som ble designet.

Enkel mutanter	Dobbel mutanter
W252A	E144Q/W252A
Y240A	E144Q/Y240A
W479A	E144Q/W479A
Y481A	E144Q/Y481A

#### 3.1.1 Oppdyrking av ChiB wt- og E144Q bakteriestammer

For å kunne designe de ønskede mutantene, ble det laget ChiB wt-plasmid for enkeltmutantene og E144Q-plasmid for dobbeltmutantene. Det ble benyttet ferdiglaget frysestock med ChiB wt og E144Q plasmid inkorporert i *Escherichia coli* TOP10 celler. Cellene ble dyrket i Luria-Bertani (LB)-medium som vil tilføre cellene de næringsstoffene de trenger for å vokse. Ampicillin vil hemme vekst av uønskede mikroorganismer.

#### Materialer:

- LB-medium
- Ampicillin 50 mg/mL
- Frysestock med ChiB wt og E144Q

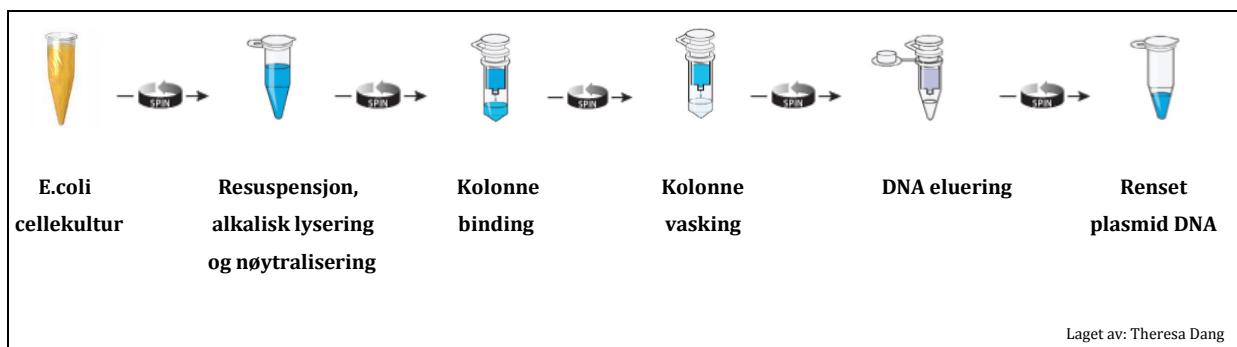
Metode:

4 mL LB-medium og 4 µL ampicillin ble inokulert med celler fra frysestocken.

Cellekulturen ble dyrket over natt i risteinkubator ved 37 °C og 255rpm. Prosedyren ble utført i sterilskapet med sterilt utstyr for å hindre kontaminering.

**3.1.2 Isolering av plasmid-DNA fra E. coli**

Plasmid-DNA ble isolert fra bakteriekulturen ved hjelp av et E. Z. N. A. Plasmid Miniprep Kit. Kittet bruker en metode som er basert på alkalisk lysering av høstede bakterieceller, etterfulgt av DNA binding til en kolonnematriks. Plasmid-DNA separeres fra andre forurensninger ved vasking av kolonnen og elueres ved bruk av buffer med lav saltkonsentrasjon (OMEGA bio-tek, 2009). En oversikt over de ulike trinnene i metoden er presentert i figur 3.1.



**Figur 3.1:** Isolering av plasmid-DNA ved hjelp av Plasmid Miniprep Kit I.

Materialer:

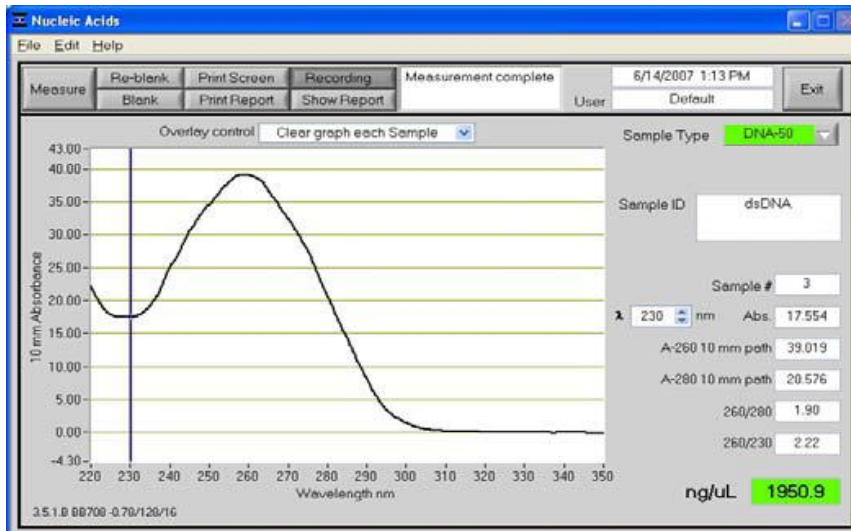
- E. Z. N. A. Plasmid Miniprep Kit I
- Cellekultur

**Metode:**

Cellekulturen ble høstet ved sentrifugering ved 10 000 x g i 1 minutt. Mediet ble fjernet og pelleten resuspendert i 250 µL Solution I/RNAase A. 250µL Solution II ble tilsatt og løsningen ble blandet forsiktig for å oppnå et klart lysat. Etter 2 minutters inkubasjon ble 350 µL Solution III tilsatt. Løsningen ble blandet godt til en hvit utfelling ble dannet. Løsningen ble sentrifugert i 10 minutter ved 13 000 x g. Supernatanten ble overført til en forhåndsbehandlet HiBind DNA minikolonne plassert i et 2 mL oppsamlingsrør. Minikolonnen hadde blitt sentrifugert med 100 µL Equilibration Buffer i 1 minutt ved 13 000 x g. Kolonnen med supernatanten ble sentrifugert i 1 minutt ved 13 000 x g og flow through ble helt av. Kolonnen ble deretter vasket med 500 µL HB Buffer og sentrifugert i 1 minutt ved 13 000 x g. Flow through ble helt av, kolonnen vasket med 750 µL DNA wash Buffer og sentrifugert i 1 minutt ved 13 000 x g. Igjen ble flow through helt av og den tomme kolonnen ble sentrifugert i 2 minutter ved 13 000 x g for å tørke kolonnematriksen. Kolonnen ble plassert i et rent eppendorfrør og 30 µL Elution Buffer ble tilsatt til kolonnen. Plasmid DNA ble tilslutt eluert ved sentrifugering i 1 minutt ved 13 000 x g. Renset plasmid ble oppbevart ved - 20 °C.

**3.1.3 Måling av DNA konsentrasjon med NanoDrop**

Konsentrasjonen til det rensede plasmidet ble målt ved bruk av et NanoDrop 1000 spektrofotometer. Dette er en enkel og rask metode som krever kun 1 µL prøve for å måle konsentrasjonen. Spektrofotometeret detekterer konsentrasjoner av dsDNA opptil 3700 ng/µL uten fortykning og måler DNA og RNA ved en bølgelengde på henholdsvis 260 nm og 280 nm. Programvaren ND-1000 benyttes til å vise prøvens spektra og konsentrasjon. En fin kurve er en indikasjon på at prøven er ren, mens en stygg kurve indikerer at prøven inneholder forurensninger (jfr. figur 3.2) (Thermo Scientific, 2008).



**Figur 3.2:** Spektra fra måling av DNA konsentrasjon med NanoDrop. Figuren viser hvordan en kurve bør se ut som tilsier at plasmidet er rent. DNA-konsentrasjonen er målt nederst til høyre. Figuren er hentet fra (Thermo Scientific, 2008).

#### Materialer:

- NanoDrop ND1000 Spektrofotometer
- Elution Buffer (fra E. Z. N. A. Plasmid Mini Kit I)
- Renset plasmid
- dH<sub>2</sub>O

#### Metode:

Programmet ble klargjort for måling av DNA konsentrasjon. Spektrofotometeret ble nullstilt med 2  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O og kalibrert med 2  $\mu$ L Elution Buffer. Deretter ble 2  $\mu$ L rensed plasmid applisert og DNA konsentrasjonen målt.

### 3.1.4 Primer design

For å utføre seterettet mutagenese behøves det to syntetiske oligonukleotid primere: En forward og en revers primer. En oligonukleotid primer benyttes til å introdusere den ønskede mutasjonen inn i DNA. Oligonukleotid primere må derfor designes individuelt med henhold til den ønskede mutasjonen. Følgende betingelser må tas i betraktning ved design av primere:

- Begge primerene som skal benyttes må inneholde den ønskede mutasjonen og passe til den samme sekvensen på motsatt tråd av plasmidet.
- Primerene bør inneholde mellom 25 og 45 baser i lengde med et smeltepunkt ( $T_m$ ) på  $\geq 78$  °C. Følgende formel er gitt for estimering av  $T_m$ :

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

- Mutasjonen bør være i midten av primeren med 10-15 baser på hver side.
- Primerene bør ha et minimum GC innhold på 40 % og bør terminere i en eller flere C eller G baser (Stratagene, 2004).

Design og bestilling av primere med ønsket mutasjon var utført av stipendiat Anne Grethe Hamre (jfr. tabell 2.1 avsnitt 2.5). Programvaren QuikChange® Primer Design fra Agilent Technologies, ble anvendt til å designe ønskede primere (Agilent Technologies, 2012). Primerne ble deretter bestilt fra Life Technologies (Life Technologies, 2013).

### 3.1.5 Seterettet mutagenese

Seterettet mutagenese er en metode som anvendes til å lage spesifikke endringer i en DNA sekvens. Metoden ble brukt i denne oppgaven til å endre på en aminosyre ved bruk av et QuikChange® II Site-Direct Mutagenesis Kit. Syntese av en mutert DNA-tråd foregår ved at DNA templatet blir først denaturert. Deretter binder syntetiske oligonukleotid primere med ønsket mutasjon komplementært til templatstråden. Til slutt forlenges primerene med *PfuUltra* DNA polymerase (Stratagene, 2004).

Materialer:

- QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit
- Primere (jfr. tabell 2.1 avsnitt 2.5)
- dsDNA templat: Renset plasmid av ChiB wt og E144Q

Metode:

Alle reaksjonene ble laget i PCR-rør. Reaksjonene ble holdt på kuldeblokk under tillagingen. Kontrollreaksjon og prøvereksjonene ble laget som beskrevet i tabell 3.2 og 3.3.

**Tabell 3.2:** Kontrollreaksjon til PCR

<b>KONTROLLREAKSJON</b>	
<b>REAGENT</b>	<b>VOLUM</b>
10x reaksjonsbuffer	5 µL
pWhitescript 4,5 kb control plasmid	2 µL
oligonucleotide control primer 1	1,25 µL
oligonucleotide control primer 2	1,25 µL
dNTP mix	1 µL
ddH <sub>2</sub> O	38,5 µL
<i>PfuUltra</i> HF DNA polymerase	1 µL
<b>Totalt</b>	<b>50 µL</b>

**Tabell 3.3:** Prøvereksjon til PCR

<b>PRØVEREAKSJON</b>	
<b>REAGENT</b>	<b>VOLUM</b>
10x reaksjonsbuffer	5 µL
dsDNA templat	2 µL (100 ng)
primer 1 (forward)	1,25 µL (125 ng)
primer 2 (revers)	1,25 µL (125 ng)
dNTP mix	1 µL
ddH <sub>2</sub> O	39,5 µL
<i>PfuUltra</i> HF DNA polymerase	1 µL
<b>Totalt</b>	<b>51 µL</b>

### 3.1.6 Polymerase chain reaction (PCR)

PCR benyttes til å amplifisere spesifikke DNA sekvenser ved bruk av en reaksjonssyklus. Denne syklusen starter først ved å varme reaksjonsløsningene opp til 110 °C for så å denaturere den doble DNA-tråden ved 95 °C. Når temperaturen er ved 55 °C, binder primerene til deres komplementære sekvenser. En ny dobbel DNA-tråd blir syntetisert ved hjelp av DNA polymerasen ved 68 °C. Syklusen gjentas for å oppnå ønsket mengde kopier av DNA-tråden (Watson et al., 2008).

#### Materialer:

- Mastercycler Gradient PCR-maskin
- Reaksjonsprøver (jfr. avsnitt 3.1.5)

#### Metode:

PCR ble utført med reaksjonssyklus som beskrevet i tabell 3.4.

**Tabell 3.4:** Reaksjonssyklus for PCR

Sekvensreaksjon	Temperatur	Tid	Antall sykluser
Heating lid	110 °C		1
Initiell denaturering	95 °C	30 sekunder	1
Denaturering	95 °C	30 sekunder	18*
Annealing	55 °C	1 minutt	
Extension	68 °C	5,5 minutt **	
Nedkjøling	10 °C		1

\* Det benyttes 18 sykluser da det utføres multiple aminosyredelesjoner og insersjoner

\*\* *ChiB*-vektoren er ca. 5,5 kb og ekstensjonen skal være til 1 minutt pr. kb.

### 3.1.7 Dpn I reaksjon

Dpn I er et restriksjonsenzym som kutter ikke-mutert «foreldre» DNA templat. Dermed selekteres nysyntetisert mutert DNA (Stratagene, 2004).

#### Materiale:

- Dpn I (fra QuickChange® II Site-directed Mutagenesis Kit)
- PCR-prøve (jfr. avsnitt 3.1.6)

#### Metode:

Til hver PCR-prøve ble det tilsatt 1 µL Dpn I. Reaksjonsblandingene ble sentrifugert i 1 minutt og inkubert ved 37 °C i 1 time.

### 3.1.8 Oppkonsentrering av plasmid med Pellet Paint

Pellet Paint® Co-Precipitant er et synlig fargestoff som er spesielt egnet til utfelling av nukleinsyrer. Den kan benyttes som en opprydningsprosess der plasmidet blir isolert fra uønskede stoffer i løsningen. Ved sentrifugering vil DNAet bli synliggjort som en rosa pellet for enklere lokalisering. Vasketrinnene kan dermed utføres uten å miste pelleten. I tillegg vil plasmidkonsentrasjonen bli høyere, noe som fører til at transformeringen blir enklere (Novagen, 2004).

#### Materialer:

- Dpn I behandlede reaksjoner (jfr. avsnitt 3.1.7)
- Pellet Paint® Co-Precipitant
- Etanol
- dH<sub>2</sub>O



#### Metode:

Dpn I behandlede reaksjoner ble overført til eppendorfrør. Til reaksjonene ble det tilsatt 2 µL pellet paint og 0,1 volum 3 M Natriumacetat. Løsningene ble blandet forsiktig. Deretter ble det tilsatt 2 volum 96 % etanol før løsningen ble blandet med en vortex. Etter to minutters inkubering ved romtemperatur, ble løsningene sentrifugert ved 16 000 x g i 5 minutter. En rosa pellet ble dannet og supernatanten ble dekantert. Pelleten ble løst i 500 µL 70 % etanol og sentrifugert ved 16 000 x g i 5 minutter. Supernatanten ble dekantert og pelleten ble resuspendert i 500 µL 96 % etanol og sentrifugert ved 16 000 x g i 5 minutter. Supernatanten ble dekantert og rørene ble inkubert ved romtemperatur til all overflødig etanol var fordampet. Pelleten ble tilslutt resuspendert i 5 µL dH<sub>2</sub>O.

#### **3.1.9 Transformering av TOP10 superkompetente celler**

TOP10 superkompetente celler er en type *E.coli* stamme som egner seg godt til oppbevaring av DNA i tillegg til at de har høy transformasjonsaktivitet. Det oppkonsentrerte DNAet ble derfor inkorporert i denne typen celler.

#### Materialer:

- SOC-medium
- TOP10 superkompetente celler
- Oppkonsentrert DNA (jfr. avsnitt 3.1.8)
- LB-ampicillin agarskåler 100 µg/mL
- Ampicillin 50 mg/mL

#### Metode:

Rør med TOP10 superkompetente celler ble tint forsiktig på is og tilsatt 5 µl oppkonsentrert DNA. Reaksjonene ble blandet forsiktig og inkubert på is i 30 minutter.

Deretter ble de varmebehandlet ved 42 °C i 30 sekunder på vannbad og inkubert på is i 2 minutter. Rørene ble tilsatt 250 µl forvarmet SOC-medium (42 °C) og inkubert i risteinkubator ved 37 °C i 1 time.

Etter endt inkubasjon ble reaksjonene platet ut på LB-ampicillin agarplater: En plate med 100 µl kontrollreaksjon og to plater med henholdsvis 50 og 100 µl prøvereksjon per mutant. Platene ble inkubert i varmeskap ved 37 °C i 16 timer.

### **3.1.10 Oppdyrking av transformanter**

Transformanter på agarskålene ble dyrket over natt som beskrevet i avsnitt 3.1.1.

### **3.1.11 Tillaging av frysestock**

Det ble laget frysestock av cellekulturene dyrket i avsnitt 3.1.10. Prosedyren ble utført i sterilskapet for å hindre kontaminering.

#### Materialer:

- Cryorør
- Cellekultur
- Autoklavert 87 % glyserol

#### Metode:

I et cryorør ble 1050 µL cellekultur og 450 µL glyserol blandet. Frysestockene ble oppbevart ved -80 °C.

### 3.1.12 Isolering av plasmider til sekvensering

Det ble benyttet E. Z. N. A. Plasmid Miniprep Kit I til isolering av plasmider. Denne metoden ble utført på samme måte som i avsnitt 3.1.2. Etter isolering av plasmider, ble DNA-konsentrasjonen bestemt med Nanodrop som beskrevet i avsnitt 3.1.3.

### 3.1.13 Tillaging av sekvenseringsreaksjoner

DNA-sekvensering benyttes til å kontrollere om det har blitt laget riktige mutanter. Dette foregår ved at det lages en sekvenseringsblanding av sekvenseringsprimer og DNA som skal sekvenseres.

#### Materialer:

- Mutert plasmid
- Elueringsbuffer (fra E. Z. N. A. Plasmid Miniprep Kit I)
- Sekvenseringsprimere (jfr. tabell 2.2 avsnitt 2.5 )

#### Metode:

I et eppendorfrør ble det tilsatt 5 pmol/ $\mu$ L primer, 400-500 ng/ $\mu$ L plasmid og elueringsbuffer til et totalt volum på 10  $\mu$ L. Det ble laget 4 sekvenseringsblandinger for hver mutant, en for hver primer. Prøvene ble merket og sendt til GATC Biotech i Tyskland for sekvensering (GATC Biotech, 2013).

### 3.1.14 Databehandling for sekvensering

Programmet CLC DNA Workbench fra CLC Bio ble benyttet til å sammenstille sekvensene som ble mottatt fra GATC Biotech. Ved å sammenligne det nylagede plasmidet med villtype kan det kontrolleres om riktig mutasjon er oppnådd. Sekvensen skal være lik i hele plasmidet bortsett fra der basene skal være endret, det vil si der hvor

muteringen har blitt utført. Dette er også en metode for å finne ut om det har blitt introdusert noen uønskede mutasjoner.

### **3.2 Produksjon av ChiB mutanter**

Det ble jobbet videre med de enkle mutantene, mens det på grunn av tidsmangel ikke ble jobbet videre med de doble. Følgende ChiB mutanter ble produsert: W479A, Y481A, W252A og Y240A.

#### **3.2.1 Overekspresjon av ChiB mutanter**

Cellene ble dyrket i LB-medium bestående av nødvendige næringsstoffer som cellene trenger for å vokse optimalt. Ampicillin ble tilsatt mediet for å hemme vekst av uønskede mikroorganismer.

##### Materialer:

- LB-medium
- Ampicillin 50 mg/mL
- Frysestock med ønsket mutant

##### Metode:

I en 2 L dyrkningskolbe ble det tilsatt 500 mL LB-medium med 50 µg/mL ampicillin. Denne ble inokulert med celler fra frysestocken. Dyrkningskolben ble inkubert i risteinkubator over natt ved 37 °C og 225 rpm. Prosedyren ble utført i sterilskapet med sterilt utstyr for å hindre kontaminering.

### 3.2.2 Tillaging av periplasmatisk ekstrakt

*E.coli* celler er gram negative og har i motsetning til gram positive celler en yttermembran. Proteinene befinner seg i periplasmatiske rommet og osmotisk sjokk metoden ble anvendt for å isolere proteinene. Lysering av den ytre cellemembranen oppnås ved å bruke spheroplastbuffer og kald dH<sub>2</sub>O. MgCl<sub>2</sub> tilsettes for stabilisering av proteinene i løsningen og PMSF for å hindre protease i å ødelegge proteinene i det periplasmatiske ekstraktet, dersom det skal oppbevares ved 4 °C over lengre tid.

#### Materialer:

- Spheroplastbuffer
- Iskald dH<sub>2</sub>O
- 20 mM MgCl<sub>2</sub>
- PMSF
- 0,2 µm sterilfilter
- Dyrket cellekultur

#### Metode:

Cellene ble høstet ved sentrifugering med en SLA 3000-rotor i 10 minutter og 8000 rpm ved 4 °C. Pelleten ble resuspendert i 50 mL spheroplastbuffer før suspensjonen ble inkubert på is i 5 minutter. Suspensjonen ble deretter sentrifugert i 10 minutter ved 4 °C og 8000 rpm. Supernatanten ble dekantert og pelleten inkubert ved romtemperatur i 10 minutter. Videre ble pelleten resuspendert i 25 mL kaldt vann før den ble inkubert på is i 45 sekunder. 1,5 mL MgCl<sub>2</sub> ble tilsatt til løsningen og sentrifugert i 10 minutter ved 4 °C og 8000 rpm. Supernatanten ble dekantert og sterilfiltrert over i en blåkorkflaske. 2 µL PMSF pr. mL periplasmatisk ekstrakt ble tilsatt og det periplasmatiske ekstraktet ble oppbevart ved 4 °C frem til rensing.

### 3.3 Rensing av ChiB mutanter

#### 3.3.1 Rensing av periplasmatisk ekstrakt på kitinkuler

Rensing på kitinkolonne er en rask og enkel kromatografisk metode som benyttes til å rense aktive kitinaser. Denne metoden er uegnet for inaktive enzymer siden de binder irreversibelt til kitin kolonnen (Synstad et al., 2008). Det periplasmatiske ekstraktet påføres kitinkolonnen ved pH 6,3 slik at proteinet kan binde optimalt til kolonnematerialet. Proteiner som ikke binder til kolonnematerialet vil bli vasket ut. Bundet protein frigjøres fra kitinkulene ved tilsetning av syre til mobilfasen slik at pH-verdien synker. Dette fører til at bindingen mellom proteinet og kolonnematerialet blir svakere og proteinet elueres ut.

#### Materialer:

- Periplasmatisk ekstrakt
- Kitinkuler i 20 % etanol, pH 6,3
- Buffer A: 100 mM natriumfosfat, pH 6,3
- Buffer B: 20 mM eddiksyre
- Vaskebuffer: 0,3 M NaOH
- 20 % etanol

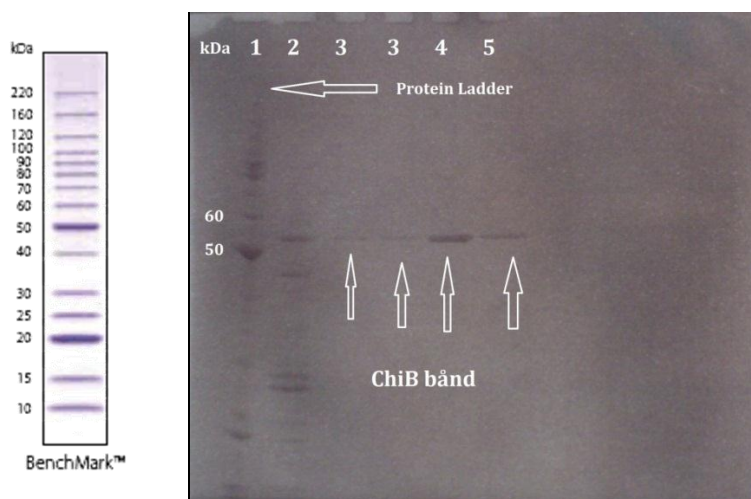
#### Metode:

Det periplasmatiske ekstraktet ble justert til buffer A med 100 mM natriumfosfat. Kolonnen ble pakket med 10 mL kitinkuler som deretter ble koblet til et BioLogic system med UV- detektor. Buffer A ble påført kolonnen med en flow på 2,5 mL/minutt til baselinjen var stabil. Videre ble ca. 50 mL periplasmatisk ekstrakt tilført kolonnen. Det periplasmatiske ekstraktet hadde et stort volum, derfor ble det renset i to omganger for å avverge overbelastning av kolonnematerialet. Buffer A ble påført kolonnen igjen til

baselinjen var stabil. Deretter ble buffer B applisert for å eluere ut proteinet og proteinfraksjonene ble samlet i et blåkorkrør. NaOH ble benyttet til å regenerere kolonnen og 20 % etanol ble avslutningsvis brukt til å vaske instrumentet.

### 3.3.2 Sodium Dodecyl Sulfate-Polyakrylamid Gel Elektroforese (SDS-PAGE)

Gelelektroforese er en vanlig metode for separering av proteiner i henhold til deres størrelse. Proteinene blir her behandlet med en sterk ionisk detergent, SDS, som fører til at proteinene blir denaturert og får en negativ ladning. Etter applisering av prøvene på en polyakrylamid gel, vil proteinene vandre med ulik hastighet gjennom gelen mot den positive elektroden ved hjelp av et elektrisk felt. Små proteiner vil ha en raskere vandringshastighet enn de store. En proteinstandard med kjente molekylvekter appliseres også på gelen for identifisering av proteinets molekylvekt (jfr. figur 3.3). En fargeløsning, Coomassie brilliant blue, benyttes for å visualisere proteinene (Watson et al., 2008). Et synlig bånd på gelen ved 58 kDa, er en indikasjon på at proteinfraksjonene applisert på gelen inneholder ChiB (jfr. figur 3.3).



**Figur 3.3:** Til venstre: BenchMark™ Protein Ladder. Figuren er hentet fra Invitrogen (2011). Til høyre: DNA-gel av Y481A med synlige ChiB bånd ved 50-60 kDa.

### Materialer:

- Proteinfraksjoner fra rensing på kitinkuler
- Proteinstandard: BenchMark Protein Ladder
- NuPAGE® 10 % Bis-Tris Gel 1,0 mm x 10 well (ferdigstøpt)
- NuPAGE® Samplebuffer (4x)
- NuPAGE® Sample reducing agent (10x)
- dH<sub>2</sub>O
- MOPS SDS Running Buffer
- SDS – fargeløsning
- SDS – avfargingsløsning

### Metode:

5 µL Samplebuffer, 2 µL Sample reducing agent, 3 µL dH<sub>2</sub>O og 10 µL proteinprøve ble blandet sammen. Prøvene ble satt i vannbad ved 70 °C i 10 minutter for denaturering. Den ferdigstøpte gelen ble satt sammen med en veggplate, dersom det ble benyttet en gel, i kjørekammeret som et indre bufferkammer. Det indre kammeret ble fylt helt opp med MOPS Running Buffer, mens det ytre kammeret ble fylt halvfullt med samme buffer. 7 µL proteinstandard (ladder) og 20 µL av proteinprøvene ble applisert i hver sine brønner. Deretter ble gelen påsatt en spenning på 200 V i 50 minutter. Etter endt separering av proteinene, ble gelen løsnet fra gelektroforesekaret og inkubert i fargeløsning på risteinkubator i 30 minutter. Deretter ble fargeløsningen fjernet og gelen inkubert i avfargingsløsning på risteinkubator over natten. Etter avfargingen, ble Gelfotosystem GSF 1000 med UV-lys benyttet for å ta et bilde av gelen.

### **3.3.3 Oppkonsentrering av ChiB mutanter**

Oppkonsentrering av proteinløsninger ble utført ved bruk av ultrasentrifugeringsfilter, Amicon Ultra- 15. Dette sentrifugefilteret separerer ChiB som har en molekylvekt



høyere enn 10 kDa fra andre forbindelser med molekylvekt mindre enn 10 kDa. ChiB vil bli værende igjen over filteret, mens løsemidler og andre komponenter vil slippes igjennom.

Materialer:

- Amiconrør (Ultra- 15, 10 kDa)
- Proteinfraksjoner fra rensing på kitinkuler
- Storage buffer: 0,1 M Tris HCl, pH 8

Metode:

Proteinfraksjoner med ChiB-bånd identifisert på SDS-PAGE (jfr. avsnitt 3.3.2), ble overført til Amiconrør. Røret ble sentrifugert ved 4 °C og 4500 rpm til det var omtrent 1,5 mL væske igjen i filteret. Eluatet ble helt av. Dette trinnet ble utført flere ganger til all proteinfraksjoner var overført til røret. Deretter ble bufferen byttet ut med storage buffer. Røret ble fylt opp med storage buffer og sentrifugert ved 4 °C og 4500 rpm til det var omtrent 1,5 mL væske igjen i filteret. Dette trinnet ble gjentatt fire ganger. Proteinløsningen i filteret ble til slutt overført til et eppendorfrør og oppbevart ved 4 °C.

### **3.3.4 Fluorimetrisk bestemmelse av proteinkonsentrasjon**

Proteinkonsentrasjonen ble målt ved hjelp av Quant-iT™ Protein Assay Kit fra Invitrogen. Det lages en arbeidsløsning bestående av Quant-iT buffer og Quant-iT reagent som fluorescerer når det binder til proteiner. Den fluorescerende intensiteten er avhengig av proteinkonsentrasjonen i prøven. Intensiteten måles ved hjelp av et Quant-iT fluorometer (Invitrogen, 2007).

Materialer:

- Quant-iT™ Protein Assay Kit
- Quant-iT fluorometer
- 0,1 M Tris HCl, pH 8

Metode:

Det ble laget en arbeidsløsning pr. prøve som inneholdt 1 µL Quant it reagent og 199 µL Quant it buffer. I et eppendorfrør ble det tilsatt 190 µL arbeidsløsning og 10 µL fortynnet proteinprøve og blandet godt. Proteinprøvene ble fortynnet 1:100 med 0,1 M Tris HCl og det ble laget 3 parallelle prøver pr. mutant. Løsningene ble deretter inkubert ved romtemperatur i 15 minutter før konsentrasjonen ble målt i et Quant it fluorometer med ferdig laget kalibreringskurve. Proteinkonsentrasjonen ble beregnet utifra et gjennomsnitt.

### **3.3.5 Kontroll av enzymaktivitet**

Det ble foretatt en aktivitetstest av periplasmatiske ekstraktet (jfr. 3.3.4) og det oppkonsentrerte proteinet (jfr. avsnitt 3.3.3), for å kontrollere at prøvene inneholdt enzymer med kitinase aktivitet. 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-N, N'-diacetylchitobiose (4-MU-(GlcNAc)<sub>2</sub>) som er et substrat, inkuberes med prøven slik at den fluoriserende enheten, 4-MU, blir frigjort fra (GlcNAc)<sub>2</sub> ved hydrolysering. 4-MU avgir fluorescens ved en bølgelengde på 460nm som er kvantiserbar (Synstad et al., 2004; Goldman et al., 2011). Ved hjelp av et fluorometer kan mengden av avgitt 4-MU bestemmes og utifra dette kan antall kutt pr. enzym pr. tidsenhet beregnes.

---

Materialer:

- Prøve: Periplasmatisk ekstrakt og rensset proteinløsning
- 100x BSA
- 0,3 M Glycine/NaOH pH 10,6
- Citrat/fosfat buffer pH 5,2
- 1,0  $\mu\text{M}$  4-MU
- 1 mg/mL 4-MU-(GlcNAc)<sub>2</sub>
- Fluorometer
- 0,1 M Tris-HCl, pH 8

Metode:

Det ble laget en arbeidsløsning bestående av 4,95 mL citrat/fosfat buffer og BSA. Prøvene ble fortynnet 1:1000 med 0,1 M Tris-HCl for å komme innenfor fluorometerets deteksjonsgrense for aktivitetsmåling. Det ble laget en blindprøve og 3 paralleller pr. enzym som skulle testes. I hvert reagensrør ble det tilsatt 87  $\mu\text{L}$  arbeidsløsning og 8  $\mu\text{L}$  4-MU-(GlcNAc)<sub>2</sub>. Rørene ble satt i vannbad med moderat risting ved 37 °C. Reaksjonene ble startet ved tilsetting av 5  $\mu\text{L}$  enzymprøve til hvert rør og 5  $\mu\text{L}$  arbeidsløsning til blindprøven. Etter 10 minutter, ble reaksjonene stoppet med 1,9 mL 0,3 M Glycine/NaOH. Enzymaktiviteten ble deretter målt ved hjelp av et fluorometer. 1,9 mL 0,3 M Glycine/NaOH ble brukt til nullstilling av fluorometeret og denne løsningen blandet med 100  $\mu\text{L}$  4-MU til kalibrering. Den spesifikke enzymaktiviteten ble til slutt beregnet etter likning 3.1

$$\left(0,002 \text{ L} \times \frac{\text{gjennomsnittlig fluorescens}}{10}\right) / 10 \text{ min.} / \text{enzymkonsentrasjon (mg/mL)}$$

*(likning 3.1)*

### 3.4 Nedbrytning av kitosan $F_A$ 0,65 med ChiB mutanter

Kitosan er et vannløselig derivat av kitin og egner seg godt til analysering av prosessivitet hos kitinaser. Det ble benyttet kitosan med acetyleringsgrad ( $F_A$ ) på 0,65 som tilsier at 65 % av kitosanpolymeren er acetykert (A), mens resten er deacetykert (D).  $F_A$  er definert som forholdet mellom den molare konsentrasjonen av acetylte enheter og den totale molare konsentrasjonen av monomere (A og D) (Sorbotten et al., 2005).

Kitosan med  $F_A$  på 0,65, ble degradert til kitooligosakkarider (KOS) av ChiB mutantene. Det var ønskelig å finne reaksjonsprøven med en nedbrytningsgrad ( $\alpha$ ) på 0,05 for å analysere enzymets prosessivitet. Ved å velge denne  $\alpha$ , vil det gi et representativt bilde av enzymets prosessivitet da det produseres mye partallsoligomere i begynnelsen av hydrolysen. Etter hvert vil alle oddetallsprodukter omdannes til dimere og monomere. Tilstedeværelse av partalloligomere tidlig i reaksjonen tyder på prosessivitet (Horn et al., 2006). Reaksjonsprøven med en ukes nedbrytning ble også valgt ut for å finne sekvensene til KOS ved bruk av MS.

#### Materialer:

- Kitosan,  $F_A = 0,65$
- Nedbrytningsbuffer: 0,08 M NaAc + 0,2 M NaCl, pH 5,5
- dH<sub>2</sub>O
- Enzym
- 1 M HCl

#### Metode:

Kitosan ble løst i 1 volum nedbrytningsbuffer og 1 volum vann til en konsentrasjon på 10 mg/ml. Løsningen ble inkubert i risteinkubator ved 37 °C og 225 rpm til alt kitosan var oppløst. Deretter ble 2,5 µg enzym/mg kitosan tilsatt til kitosanløsningen før den ble

satt tilbake igjen i risteinkubator. Det ble tatt ut 1,5 mL av denne reaksjonsløsningen til ulike tidspunkter: 0 – 5 – 10 – 15 – 20 – 30 minutter og 1 uke, der 150  $\mu$ L HCl ble brukt til å stoppe reaksjonene, etterfulgt av koking i 2 minutter. Nullprøven inneholdt kun kitosan og HCl. 500  $\mu$ L av reaksjonsprøvene ble overført til nye respektive eppendorfrør. Alle rørene ble deretter frysetørket over natt og oppbevart ved -20 °C inntil videre analyse.

### 3.4.1 Proton kjernemagnetisk resonans ( $^1\text{H}$ NMR)

$^1\text{H}$  NMR er en variant av NMR spektrometer der hydrogenkjernene er magnetiske og NMR-aktive. Når hydrogenkjernene plasseres i et sterkt magnetfelt, vil de orientere seg med eller mot det magnetfeltet. Ved tilførsel av energi i radiofrekvensområdet endrer kjernene energitilstand og kjernemagnetisk resonans dannes. Et plot av energi absorbert av prøven mot påført radiofrekvens gir et  $^1\text{H}$  NMR spekter (Hart et al., 2007). Siden  $^1\text{H}$  NMR er en rask og enkel metode, egner den seg godt til analysering av sukkerpolymerer (Liu et al., 2011; Zakariassen et al., 2009). Metoden  $^1\text{H}$  NMR ble anvendt til å bestemme grad av polymerisering (antall sukkerenheter i en polymer (DP)) og dermed også nedbrytningsgraden ( $\alpha$ ).  $\alpha$  er definert som fraksjon av glykosidbindinger som har blitt hydrolysert av enzymet (Eide et al., 2012). Før prøven kan analyseres på  $^1\text{H}$  NMR er det viktig å fjerne vannmolekylene i prøven. Dette for å oppnå et best mulig signal ved  $^1\text{H}$  NMR-analyse. Prøven frysetørkes for å fjerne vanninnholdet i prøven og deuterium benyttes som løsemiddel. Deuterium er en stabil isotop og benyttes for å skille protonsignalene i løsemiddelet fra protonsignalene i prøven.

#### Materialer:

- Frysetørket nedbrutt kitosan (jfr. avsnitt 3.4)
- $\text{D}_2\text{O}$
- NaOD

- DCl
- pH-meter
- Bruker NMR 400
- NMR-rør

#### Metode:

Prøver av nedbrutt kitosan ble løst i 500  $\mu\text{L}$   $\text{D}_2\text{O}$  før de ble pD justert til 4,2-4,5 med NaOD og DCl. Deretter ble de frysetørket. Prøvene ble igjen løst i 500  $\mu\text{L}$   $\text{D}_2\text{O}$  og pD justert til 4,2-4,5 for å være sikker på at vannmolekylene i prøvene var fjernet. Videre ble prøvene overført til rene og tørre NMR-rør. Prøvene ble analysert ved 85 °C og 400 MHz. Spektralvidden ble satt til 3595,8, pulsvinkelen til 10,5, blokkstørrelsen til 8 og antall scans til 32. Relakseringstiden ble satt til 4,563 sekunder.

#### **3.4.2 Tolkning av $^1\text{H}$ NMR-spektra**

$^1\text{H}$  NMR-spektrene ble prosessert og integrert ved hjelp av TopSpin programvare. Toppene ble integrert etter følgende ppm-verdier:

ppm-verdier til tolkning av  $^1\text{H}$  NMR-spektra: (Sorbotten et al., 2005).

A = Acetylte enheter inni sukkerkjeden eller på ikke reduserende ende: 4.6 ppm

$A\alpha$  = Acetylte  $\alpha$  - anomerer på reduserende ende: 5.19 ppm

$A\beta$  = Acetylte  $\beta$  - anomerer på reduserende ende: 4.7 – 4.8 ppm

D = Deacetylte enheter inni sukkerkjeden eller på ikke reduserende ende: 4.9 ppm

$D\alpha$  = Deacetylte  $\alpha$  - anomerer på reduserende ende: 5.43 ppm

Med integrerte  $^1\text{H}$  NMR spektre, ble polymeriseringsgraden (DP<sub>n</sub>) og spaltningsgraden ( $\alpha$ ) beregnet etter likning 3.2 og 3.3.

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

(likning 3.2)

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

(likning 3.3)

Prøven med 5 % nedbrytningsgrad og en ukes nedbrytning ble valgt ut til videre analyser.

### 3.4.3 Størrelsesekklusjonskromatografi (SEC)

SEC er en kromatografisk metode som er basert på separering av molekyler i en løsning etter deres størrelse. Denne metoden brukes ofte til separering av polymerer, derfor egner den seg godt til separering av KOS av ulik størrelse. Systemet er satt opp av 3 Superdex™ kolonner koblet etter hverandre for å få en høyere oppløsning. Den stasjonære fasen består av et porøst pakkemateriale med en bestemt porestørrelse slik at store molekyler ikke slippes igjennom. Dermed vil store molekyler elueres ut først når prøven introduseres til SEC-kolonnen. Molekyler som er mindre enn porestørrelsen, vil få ulike retensjonstider med henhold til deres størrelse. Retensjonstiden øker med minkede molekylstørrelse (Miller, 2005; Greibrokk, 1998). Prøve med  $\alpha \approx 0,05$  og med en ukes nedbrytning ble analysert på SEC.

#### Materialer:

- Frysetørket nedbrutt kitosan (jfr. avsnitt 3.4)
- Mobilfase: 0,15 M NH<sub>4</sub>Ac, pH 4,5

- Amicon ultrasentrifugeringsrør
- Sprøytefilter 22  $\mu\text{m}$

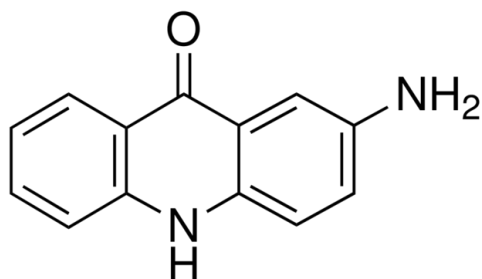
#### Metode:

Prøven ( $\alpha = 0,05$ ) ble løst i 2 mL mobilfase og overført til et ultrasentrifugeringsrør med en MWCO på 10 KDa. Prøven ble sentrifugert i 20 minutter ved 4 °C og rpm 4500 for å skille oligomerene fra polymerene som videre ble analysert hver for seg. Prøven ble deretter filtrert og injisert i injektoren. RI-detektoren ble stilt inn med sensitivitet på  $\frac{1}{4}$  for oligomerene og 8 for polymerene. Flowen ble satt til 0,8 mL/min. En fraksjonssamling ble utført ved analyse av oligomerene. Oppsamlingen startet etter 10 timer med fraksjonssamling etter hvert 4. minutt med totalt 160 fraksjonsrør. Ved analysing av 7 dagers nedbrytningsprøve, ble prøven injisert direkte inn i injektoren uten forbehandling av prøven. RI ble satt til 8 og flow til 0,8 mL/min.

#### **3.4.4 2-Aminoacridone (AMAC) derivatisering av kitooligosakkarider**

AMAC har en aromatisk struktur og er sterkt fluorescerende. Den inneholder en primær aminogruppe som reagerer med en aldehydgruppe ved den reduserende enden til et karbohydrat og reduseres til en stabil amino-derivat av natriumborohydrid ( $\text{NaBH}_4$ ) (Sigma, 2013). For å finne sekvensene til KOS, ble AMAC festet på den reduserende enden til sukkeret (jfr. figur 3.4). Dette førte til at molekylmassen til den reduserende enden økte med 210,23 g/mol. Ved MS-analyse kan den reduserende enden til alle KOS detekteres ved hjelp av ekstramassen.





**Figur 3.4** Kjemisk struktur av AMAC (Sigma, 2013).

Materialer:

- Frysetørket 1 ukes nedbrutt kitosan
- 0,1 M AMAC 17:3 DMSO: Konsentrert eddiksyre
- 1 M cyanoboranhydrid
- MeOH
- dH<sub>2</sub>O
- C - 18 kolonne
- Acetonitril

Metode:

Fra frysetørket kitosanprøve, ble det tatt ut litt sukker og blandet med 20 µL 0,1 M AMAC. Forholdet mellom sukkeret og AMAC skulle være omtrent 1:1000. Prøven ble inkubert ved romtemperatur i mørket i 2 minutter. 10 µL 1 M cyanoboranhydrid ble tilsatt prøven og reaksjonsløsningen ble inkubert i 30 minutter ved 90 °C. Prøven ble deretter frysetørket før den ble løst i 100 µL 70 % MeOH og sentrifugert i 30 minutter og 10 000 rpm for å fjerne bunnfall. Supernatanten ble dekantert og frysetørket før den ble løst i 100 µL dH<sub>2</sub>O. Videre ble prøven rensert på C-18 kolonne. Kolonnen ble koblet til en ventil og vakuummanifold med reagensrør under. Til kolonnen ble det tilsatt: 5 mL 100

% metanol, 5 mL dH<sub>2</sub>O, 5 mL 100 % acetonitril, 5 mL dH<sub>2</sub>O, 100 µL prøve og 5 mL dH<sub>2</sub>O i følgende rekkefølge. Underveis ble det det passet på at kolonnen ikke gikk tørr. Ved hjelp av vakuemet, ble væsken ført igjennom kolonnen med en dryppeshastighet på ca. 1 mL/min. 2 mL 80 % acetonitril ble tilslutt påført kolonnen for å eluere ut prøven. Eluatet ble overført til eppendorfrør og frysetørket. Prøven ble oppbevart ved -20 °C inntil videre analyse.

### **3.4.5 Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight (MALDI TOF)**

#### **Massespektrometri (MS)**

MALDI er en ioniseringsteknikk som brukes til å analysere biomolekyler og polymerer. Analytten må først løses i et matriksmateriale som absorberer ved laserens bølgelengde. Når prøven blir bombardert med laserstråler, vil matrisen absorbere energi fra laserpulseren som resulterer i ionisering av prøven (Hoffmann & Stroobant, 2007). AMAC-prøver ble analysert på MALDI-TOF-MS for å finne sekvensene til KOS og SEC-prøvene for å identifisere hydrolyseproduktene i prøven. Som matriks ble det benyttet 2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB) som absorberer UV-lys ved 337 nm. Den består av fenolgrupper som overfører protoner fra matriks til prøvemolekyler og gir full ionisering (Downard, 2004).

#### Materialer:

- DHB: 2,5-Dihydroxybenzoic acid
- EtOH
- dH<sub>2</sub>O
- MeOH
- AMAC derivatiserte prøver

- SEC uderivatiserte prøver ( $\alpha = 0,05$ )
- Ultra Flex II MALDI-TOF/TOF massepektrometer

#### Metode:

En matrix ble tillaget bestående av 15 mg DHB i 1000  $\mu\text{L}$  30 % EtOH og 70 %  $\text{H}_2\text{O}$ . Prøvene ble først løst i 50  $\mu\text{L}$  50 % MeOH. Deretter ble de blandet med DBH-matrix i forhold 1:1, før 1  $\mu\text{L}$  ble applisert på MALDI-platen og tørket.

MS-instrumentet ble kalibrert med en standard oligosakkaridmikstur med oligomerer fra 2-6. Akselerasjonspotensiale ble satt til 20 kV i reflektor modus. Programmet Flex Control 2.4 ble benyttet til analysering av prøvene. AMAC derivatiserte prøvene ble først analysert med MS1 for å identifisere KOS i prøven. Deretter ble MS2 benyttet til å fragmentere KOS. Forløperionene ble akselerert ved 8 kV og fragmentationene generert fra disse forløperne ble akselerert ved 19 kV. Til analysering av SEC prøvene, ble det kun brukt MS1 metoden. Programmet Flex Analysis 2.4 ble benyttet til å behandle rådata og fremstille masselister. Topper i SEC-kromatogrammet ble annotert ved å sammenlikne  $m/z$  fra MS1 spektrene med identifiserte  $m/z$  for uderivatiserte KOS. Sekvensering av KOS ble utført ved å sammenlikne MS2 spektrene av AMAC derivatiserte prøver med AMAC derivatiserte masselister. Masseavvik på  $\pm 0,5$  var akseptert.

### **3.5 Nedbrytning av $\beta$ -kitin med ChiB mutanter**

$\beta$ -kitin er i motsetning til kitosan en uløselig polymer. Substratet kan brytes ned til nanofibre med en bredde på 3-4 nm og minimum et par mikrometer i lengden (Fan et al., 2008). Dette medfører at substratet er mer tilgjengelig for enzymer.

$\beta$ -kitin ble brutt ned av ChiB mutantene. Reaksjonsprøvene av kitin ble deretter analysert på HPLC for bestemmelse av  $[A_2]/[A_1]$  ratio. Dette kan beskrive noe om

enzymets prosessivitet. Trimere og monomere produkter indikerer en initiell binding, mens dimere produkter primært genereres av prosessive hydrolytiske trinn. Derfor gir forholdet mellom disse produktene en indikasjon på graden av prosessivitet, der høy verdi gir stor grad av prosessivitet (Horn et al., 2012).

#### Materialer:

- $\beta$ -kitin
- 50 mM NaAc, pH 6,1
- 20 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Enzym: W252A, Y240A, W479A, Y481A og ChiB wt

#### Metode:

Til 2 mg  $\beta$ -kitin ble det tilsatt 1 mL 50mM NaAc. Løsningen ble sonikert i 20 minutter for å øke løseligheten og inkubert på thermomixer ved 37 °C og 800 rpm i ti minutter før reaksjonen ble startet for å forsikre at temperaturen var homogen i hele prøven. Reaksjonene ble startet ved tilsetning av 250  $\mu$ M enzym for mutant Y240A og 2,5  $\mu$ M enzym for de resterende mutantene inkludert WT til kitinløsningen. 50  $\mu$ L av reaksjonsløsningen ble tatt ut og stoppet med 50  $\mu$ L 20 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> til ulike reaksjonstider mellom 2 min. til et døgn. Nullprøven inneholdt kun kitinløsning og H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Det ble laget tre paralleller av hver prøve. Videre ble reaksjonsløsningene filtrert ved hjelp av et 0,45  $\mu$ m filter fra Multiscreen og vakuumpumpe for å fjerne eventuelle partikler av uløst kitin. Deretter ble prøvene overført til HPLC-vials og oppbevart ved -20 °C.

### 3.5.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

High performance liquid chromatography (HPLC) er en kromatografisk metode som benyttes til separering av ulike komponenter i en prøve. Ved bruk av HPLC kan komponenter i en mikstur identifiseres, renses og kvantifiseres. Prinsippet bak HPLC-systemet er at en høytrykkspumpe fører mobilfasen og prøveløsningen gjennom en forkolonne og en analytisk kolonne. De ulike komponentene i prøven vil ha ulike retensjonstider pga ulik grad av affinitet til den stasjonære fasen. Prøver som har blitt separert på analyse kolonnen detekteres av en UV-detektor. Signalene fra detektoren, i form av et kromatogram, registreres med en PC (Miller, 2005).

HPLC-kolonnen som ble benyttet var Rezex RFQ-Fast Fruit H<sup>+</sup>. Denne kolonnen er den stasjonære fasen og består av en negativt ladet sulfonert styrene-divinyl benzene (SDVB) som er bundet til H<sup>+</sup>. Ved analysering av monomere og dimere, vil de bli protonert av sovelsyren (mobilfasen) som deretter vil byttes ut med kationene fra kolonnematerialet. Etter en bestemt tid vil monomere og dimere elueres isokratisk.

#### 3.5.1.1 Tillaging av standarder

##### Materialer:

- A1 stockløsning: 994 µM
- A2 stockløsning: 1000 µM
- 20 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

##### Metode:

Med ferdig laget stockløsningene som utgangspunkt, ble det laget en ny stockløsning på 500 µM A2A1. Ut ifra denne stockløsningen ble det laget en standardmiks på 50 µM og 100 µM A2A1. Deretter ble 50 µL av hver standardmiks blandet med 50 µL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> før de ble overført til HPLC vials. Standardene ble oppbevart ved -20 °C.

### 3.5.1.2 HPLC - analyse

Prøver av nedbrutt  $\beta$ -kitin ble analysert på HPLC for å studere formasjonen av  $[A_1]$  og  $[A_2]$ .

#### Materialer:

- Rezex RFQ-Fast fruit H<sup>+</sup> kolonne
- Carbo-H forkolonne
- Standarder: A2A1
- Nedbrutt  $\beta$ -kitin prøver
- 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Ultimate 3000 system, HPLC instrument

#### Metode:

Konsentrasjoner av (GlcNAc) og (GlcNAc)<sub>2</sub> etter hydrolyse av  $\beta$ -kitin, ble bestemt ved hjelp av HPLC med en Rezex kolonne og UV detektor. 8  $\mu$ L prøve av nedbrutt  $\beta$ -kitin ble injisert på kolonnen. Med en flow på 1 mL/min. ble mono oligosakkaridene eluert isokratisk med 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ved 85 °C. Oligosakkaridene ble registrert ved å måle absorbansen ved 210 nm. Ved hjelp av programmet, Chromeleon 7, ble mengden av oligosakkaridene kvantifisert ved å måle topparealet. Topparealet ble så sammenliknet med topparealet fra standardprøver med kjent konsentrasjon. Gjennomsnittsverdien av de tre parallelle prøvene ble benyttet til å beregne de aktuelle parameterne.

#### Behandling av data:

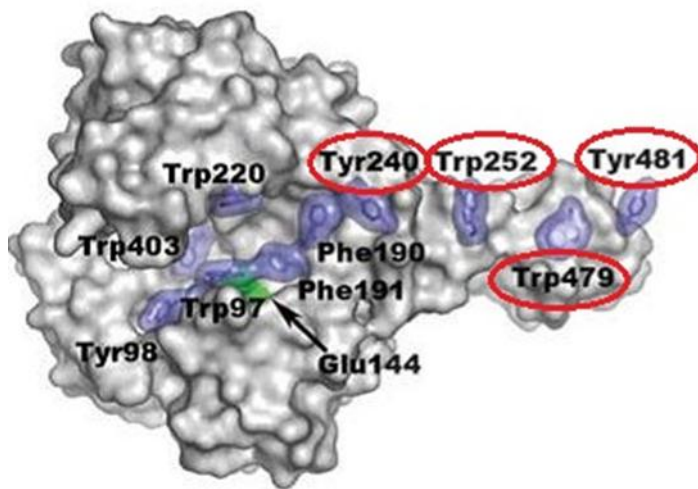
Det ble laget en standardkurve for standardprøvene som ble analysert på HPLC. Basert på denne standardkurven, ble stigningstallet til  $[A_1]$  og  $[A_2]$  beregnet som ble brukt videre til å beregne konsentrasjonene til hydrolysereaksjonene. Deretter ble det laget et plot av  $[A_2]$  mot tid for å observere nedbrytning av kitin over tid. Det ble også laget et plot av  $[A_2]/[A_1]$  mot % nedbrutt kitin for bestemmelse av prosessivitet.

## 4. RESULTATER

### 4.1 Mutasjonsanalyse

Som nevnt tidligere i ChiB er det en sti av aromatiske overflateresiduer fra det ChBD, via en support loop og inn mot det aktive setet (Aalten et al., 2000). Tidligere har det vist seg at spesielt Trp97 og Trp220 i det aktive sete (hhv. subsete +1 og +2), kraftig reduserer prosessivitet. Ved å mutere ulike residuer i ChBD og support loop til alanin, kan de enkelte residuenes bidrag til grad av prosessivitet undersøkes. Dette kan utføres ved å sammenlikne produktiv binding av substrat, for eksempel kitin eller kitosan mellom villtypen og de ulike mutantene. Siden prosessivitet er evnen til å forbli bundet til substratet etter en produktiv binding, kan det være en korrelasjon mellom bindingsfrienergi til substratet og prosessivitet. Det er derfor interessant å ha tilgang til dobbelmutanter hvor den katalytiske syren Glu144 er mutert til Gln i tillegg til de aktuelle aromatenes. Dette gjør at bindingsstudier mot enten kitin eller lange delvis deacetylerede KOS sammenliknet mot wt vil gi enkeltresiduets bidrag i bindingsfrienergien. Det ble derfor laget dobbelmutanter av alle utvalgte residuer der E144Q var den andre mutasjonen.

Det ble utført forsøk med de enkle mutantene som er beskrevet i avsnitt 4.1.1 og 4.1.2, mens det på grunn av begrenset tid ikke ble utført forsøk med de doble. En oversikt over residuene som ble studert i denne oppgaven, samt deres posisjon i ChiB er vist i figur 4.1.



**Figur 4.1:** Surface fremstilling av ChiB som viser aromatiske sidekjedene til Glu144 (grønn) og residuene (ringet rundt) som ble mutert i dette studiet. Figuren er hentet fra (Horn et al., 2006).

#### 4.1.1 Y240A og W252A

I den primære aminosyresekvensen til ChiB, befinner det seg en tyrosin i posisjon 240 og tryptofan i posisjon 252. Residu Y240 ligger til høyre for +3 subsete i det katalytiske setet. Dette vil si at den ligger utenfor det katalytiske setet som strekker seg fra -3 til +3. Det andre residuet W252 ligger til høyre for Y240 og danner en lineær sti med andre aromatiske aminosyrer i ChBD. Disse to aromatiske aminosyrene er plassert på en support loop og interagerer med ChBD. I tillegg bidrar de med å skyve polymeren gjennom det aktive setet.

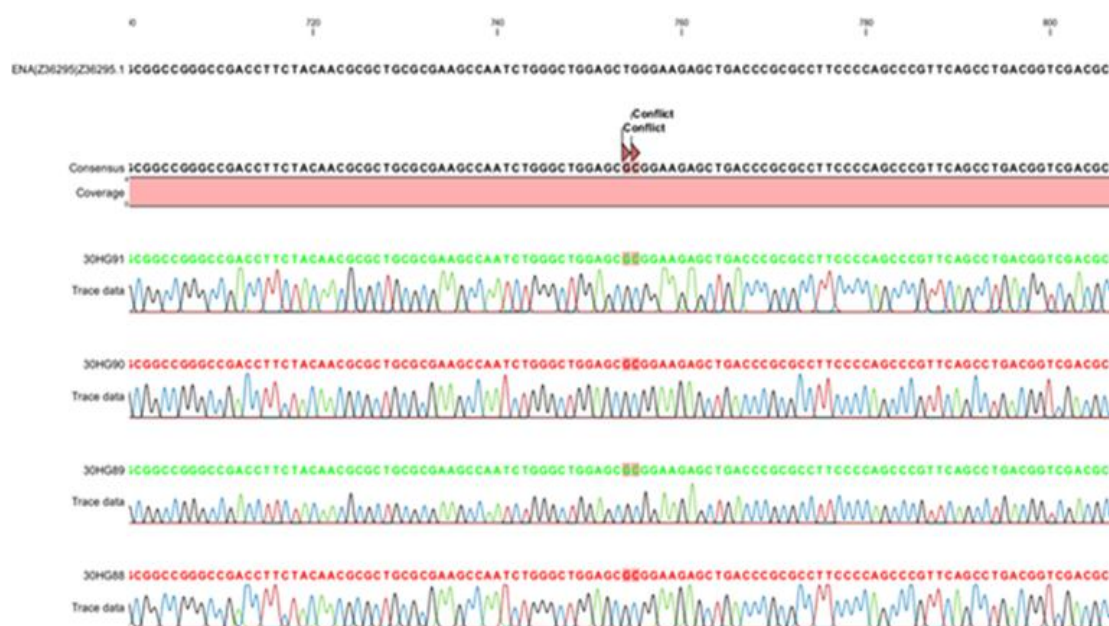


#### **4.1.2 W479A og Y481A**

Tryptofan i posisjon 479 og tyrosin i posisjon 481 er to aromatiske residuer som befinner seg på ChBD. Y481 ligger helt ytterst til høyre for ChBD, mens W479 ligger midt i mellom W252 og Y481. Begge aminosyrene ligger tilgjengelig på overflaten og er en del av den lineære stien som går inn i det aktive setet. Aminosyrene er viktige siden de bidrar til substratbinding ved å danne interaksjoner med substratet. Siden det aktive setet ligger i en kløft, vil strukturen til ChBD gjøre det enklere for substratet å binde til enzymet. I tillegg bidrar aminosyrene med å skyve polymeren gjennom det aktive setet via support loop og gjør det lettere tilgjengelig for hydrolyse.

#### **4.2 Seterettet mutagenese**

Produktene fra seterettet mutagenese ble sekvensert for å kontrollere at mutasjonen var tilstede. Resultatet av sekvenseringen ble analysert ved hjelp av programmet CLC DNA Workbench. Dette ble utført for hver mutant der resultatet av sekvenseringen av en mutant er vist i figur 4.2.

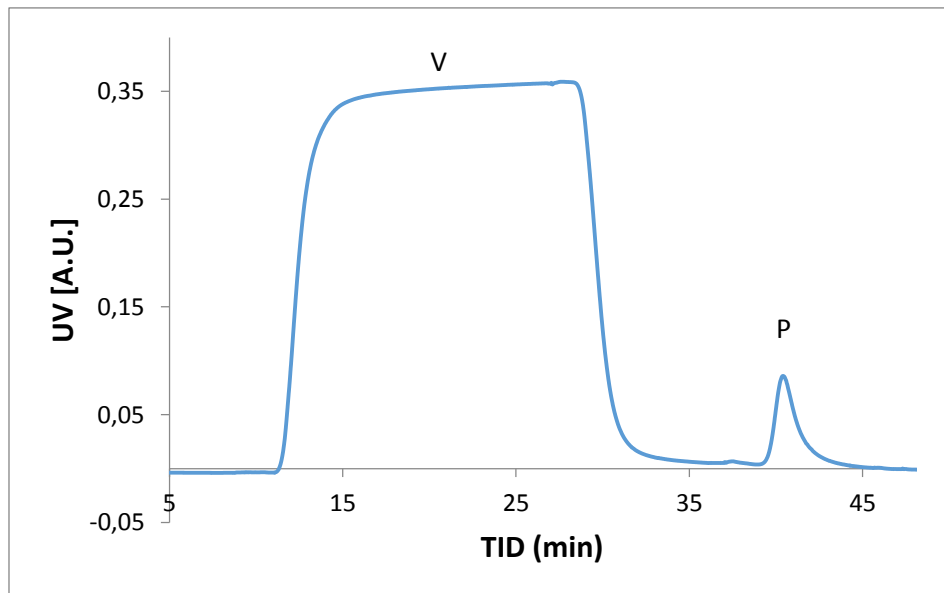


**Figur 4.2:** Figuren viser et utsnitt av sekvensering av W252A. Mutasjonen vises som "konflikt" i sekvensen til plasmidet der tryptofan har blitt mutert til alanin. Sekvensen til plasmidet er identisk med den primære sekvensen bortsett fra der mutasjonen har oppstått.

### 4.3 Rensing av ChiB mutanter

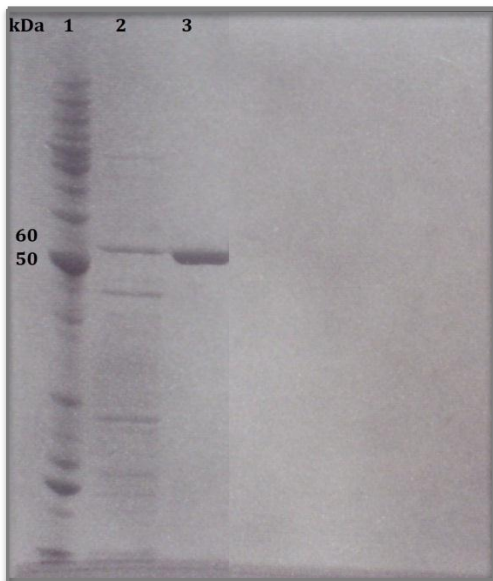
Det periplasmatiske ekstraktet med de ulike proteinene ble renset på kitinkolonne siden dette har vist seg å være en effektiv rensemethode av aktive kitinaser (Synstad et al., 2008). Resultatet fra rensing av en mutant, Y481A er vist i figur 4.3. Etter rensing på kitinkolonne ble det foretatt en SDS-PAGE analyse av proteinet som er vist i figur 4.4. Ved bruk av protein ladder kan molekylvekten til ChiB på 58 kDa benyttes til å identifisere proteinet og renheten i prøven. Resultatene for de andre mutantene: W252A, Y240A og W479A er presentert i appendix, avsnitt 8.2.

### 4.3.1 Isolering av Y481A



**Figur 4.3:** Kromatografisk resultat av rensing av Y481A på kitinkolonne. Voidtoppen er markert med V og proteintoppen med P.

Kromatogrammet viser to topper der den største toppen er en voidtopp og den minste inneholder Y418A. Voidtoppen viser at andre uønskede proteiner har blitt eluert ut før Y418A. Fraksjonene fra proteintoppen ble samlet opp og analysert på SDS-PAGE gel som vist i figur 4.4



**Figur 4.4:** SDS-PAGE gel av Y481A. Brønn 1) Protein ladder med merket bånd ved 50 og 60 kDa. Brønn 2) Periplasmatisk ekstrakt. Brønn 3) Renset protein.

Gelbildet viser at det periplasmatiske ekstraktet i brønn 2 inneholder ChiB og andre proteiner. I brønn 3 vises det tydelig et ChiB bånd som indikerer at proteinet har blitt isolert fra andre forurensninger. Dermed ble denne fraksjonen tatt vare på for videre bruk.

#### 4.3.2 Fluorimetrisk bestemmelse av proteinkonsentrasjon

Proteinfraksjonene med ChiB-bånd identifisert på SDS-PAGE, ble oppkonsentrert ved hjelp av et ultrasentrifugeringsfilter (jfr. avsnitt 3.3.3). Deretter ble proteinkonsentrasjonen for de ulike mutantene bestemt med et Quant-iT fluorometer.

Proteinkonsentrasjonen i det periplasmatiske ekstraktet ble også målt for å vise at renseprosessen og oppkonsentreringstrinnet gir et bedre proteinutbytte.

Proteinkonsentrasjonen for alle mutantene både før og etter rensing er presentert i tabell 4.1.

**Tabell 4.1:** Oversikt over mengde periplasmatisk ekstrakt og proteinkonsentrasjonen i både periplasmatisk ekstrakt og rensset protein for de ulike mutantene.

Enzym	Mengde periplasmatisk ekstrakt (mL)	Proteinkonsentrasjon i periplasmatisk ekstrakt (mg/mL)	Proteinkonsentrasjon i rensset protein (mg/mL)
W252A	150	6,1	7,4
Y240A	100	5,1	6,4
W479A	100	6,3	7,2
Y481A	94	6,4	7,7

Tabellen viser store mengder av periplasmatisk ekstrakt for alle mutantene der W252A har størst mengde og Y481A minst. Proteinkonsentrasjonen i rensset protein er omtrent like høy for alle mutantene. Det er ikke store forskjeller mellom dem, men tabellen viser at Y240A har lavest protein- konsentrasjon og Y481A høyest. Det vises også at proteinkonsentrasjonen øker for alle mutantene etter rensing av periplasmatiske ekstraktet.

#### 4.3.3 Kontroll av enzymaktivitet

Enzymaktivitet ble utført ved å inkubere de aktuelle enzymene med 4-MU-(GlcNAc)<sub>2</sub> i 10 minutter før reaksjonen ble stoppet. Mengden av avgitt 4-MU i prøven ble målt ved hjelp av et fluorometer og den spesifikke aktiviteten i både periplasmatisk ekstrakt og rensset protein ble beregnet ved hjelp av likning 3.1. Aktivitetsverdiene for de ulike mutantene er presentert i tabell 4.2.

**Tabell 4.2:** Beregnet enzymaktivitet i både periplasmatisk ekstrakt og rensset protein for de ulike mutantene.

Enzym	Spesifikk aktivitet i periplasmatisk ekstrakt (4-MU/min/mg)	Spesifikk aktivitet i rensset protein (4-MU/min/mg)
W252A	43	609
Y240A	40	384
W479A	31	288
Y481A	39	391

Enzymaktiviteten i det periplasmatiske ekstraktet er lavere enn i rensset protein. Dette gjelder for alle enzymene. Blant de aktuelle enzymene, har W252A høyest aktivitet mens W479A har lavest. Disse aktivitetsverdiene gir ikke en indikasjon på god eller dårlig enzymaktivitet. Derfor er det hensiktsmessig å sammenligne aktiviteten til enzymene i henhold til ChiB wt. Dette er vist i tabell 4.3.

**Tabell 4.3:** Beregnet spesifikk aktivitet for de ulike mutantene og deres aktivitet relativt til ChiB wt i %.

Enzym	Spesifikk aktivitet (4-MU/min/mg)	Aktivitet relativt til WT i %
ChiB wt	4760	100
W252A	609	13
Y240A	288	6
W479A	354	7
Y481A	338	8

Enzymaktivitet assay av ChiB wt ble utført av masterstudenten Hanne Wold. Verdien for wt skiller seg betydelig fra de andre mutantene. Blant mutantene er det Y240A som har lavest prosent aktivitet relativt til villtypen.

#### 4.4 Nedbrytning av kitosan $F_A$ 0,65 med ChiB mutanter

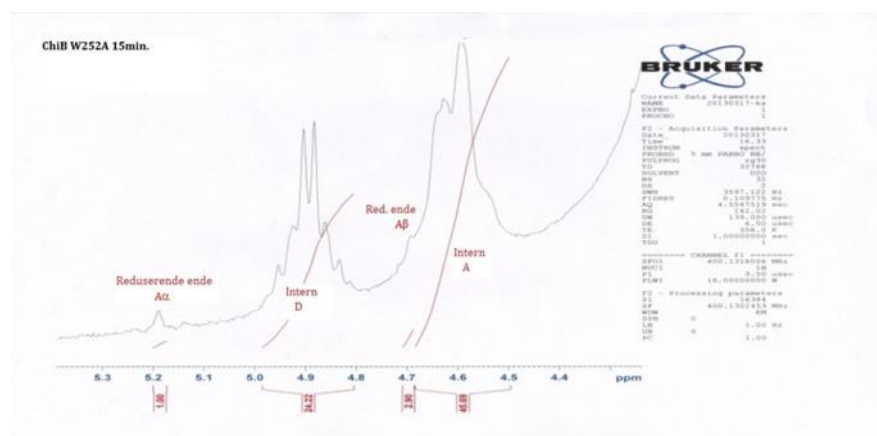
Kitosan ble brutt ned av de 4 enkle mutantene beskrevet i avsnitt 4.1.  $^1\text{H}$  NMR ble benyttet til å analysere KOS for å bestemme nedbrytningsgraden ( $\alpha$ ). Prøver med utvalgte  $\alpha$  ble videre analysert på SEC der KOS ble separert med henhold på størrelse. MS ble benyttet til å identifisere hydrolyseproduktene og sekvensene til KOS.

##### 4.4.1 $^1\text{H}$ NMR

Fra nedbrytning av kitosan, ble alle reaksjonsprøvene analysert på  $^1\text{H}$  NMR hvor  $\text{DP}_n$  ble først beregnet ved bruk av likning 3.2 for å estimere  $\alpha$  ved bruk av likning 3.3.

Reaksjonsprøven med  $\alpha \approx 0,05$  ble videre analysert på SEC.  $^1\text{H}$  NMR spekter for kitosan nedbrutt av ulike mutanter med  $\alpha \approx 0,05$ , en oversikt over beregnet  $\text{DP}_n$  og  $\alpha$  for hver mutant, samt et plot av  $\alpha$  mot tid er presentert i avsnitt 4.4.1.1 – 4.4.1.4.

##### 4.4.1.1 W252A



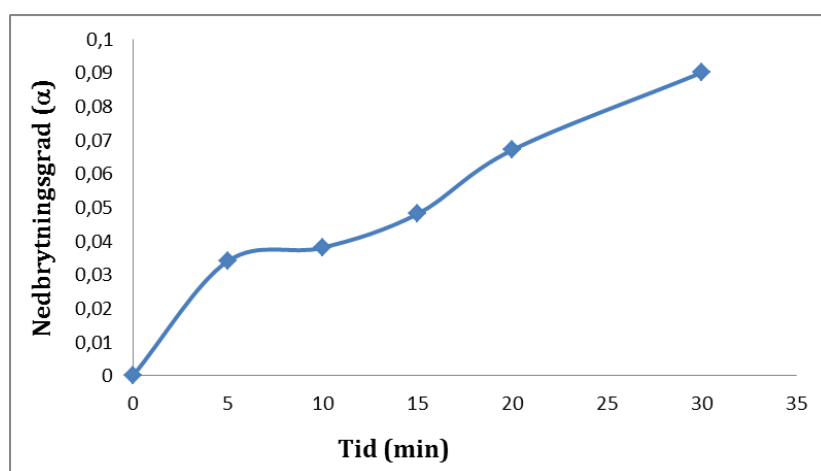
**Figur 4.5:**  $^1\text{H}$  NMR spekter for kitosan ( $F_A = 0,65$ ) nedbrutt av W252A i 15 minutter. Annotering av toppene er beskrevet i avsnitt 3.4.2.

Toppene fra  $^1\text{H}$  NMR spekteret ble integrert og  $\text{DP}_n$  og  $\alpha$  ble beregnet ved ulike reaksjonstider. Dette er presentert i tabell 4.4.

**Tabell 4.4:** Oversikt over beregnet  $\text{DP}_n$  og  $\alpha$  ved ulike reaksjonstider for W252A.

ChiB W252A		
Reaksjonstid	$\text{DP}_n$	Nedbrytningsgrad ( $\alpha$ )
0 min.	142	0
5 min.	29	0,034
10 min.	26	0,038
15 min.	21	0,048
20 min.	15	0,067
30 min.	11	0,090

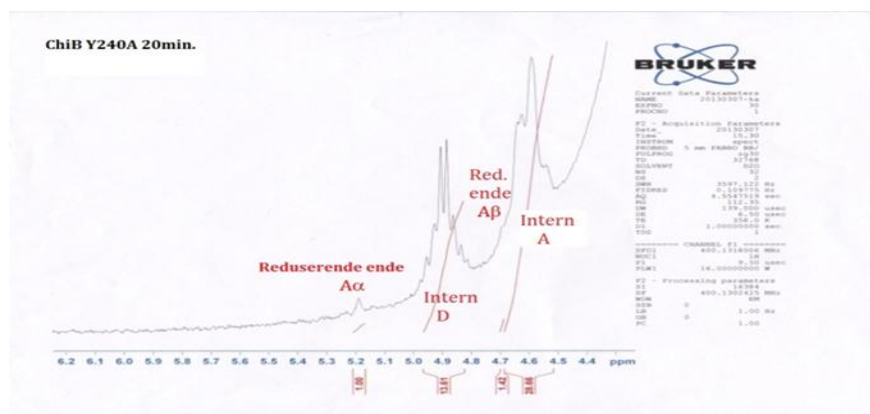
Tabellen viser at  $\text{DP}_n$  synker med økende reaksjonstid. Det samme gjør også  $\alpha$  der et plot av dette er presentert i figur 4.6. Reaksjonsprøven med  $\alpha \approx 0,05$  var oppnådd etter 15 minutter.



**Figur 4.6:** Plot av  $\alpha$  mot tid for W252A.



## 4.4.1.2 Y240A



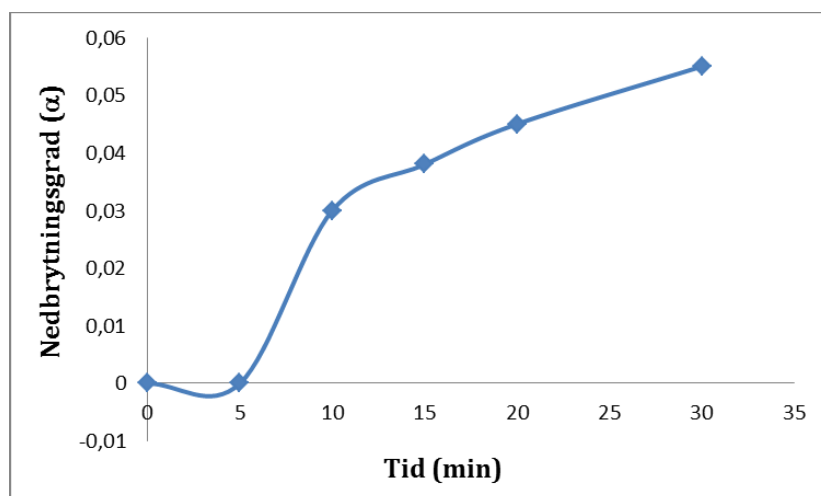
**Figur 4.7:**  $^1\text{H}$  NMR spekter for kitosan ( $F_A = 0,65$ ) nedbrutt av Y240A i 20 minutter. Annotering av toppene er beskrevet i avsnitt 3.4.2.

Toppene fra  $^1\text{H}$  NMR spekteret ble integrert og  $\text{DP}_n$  og  $\alpha$  ble beregnet ved ulike reaksjonstider. Dette er presentert i tabell 4.5.

**Tabell 4.5:** Oversikt over beregnet  $\text{DP}_n$  og  $\alpha$  ved ulike reaksjonstider for Y240A.

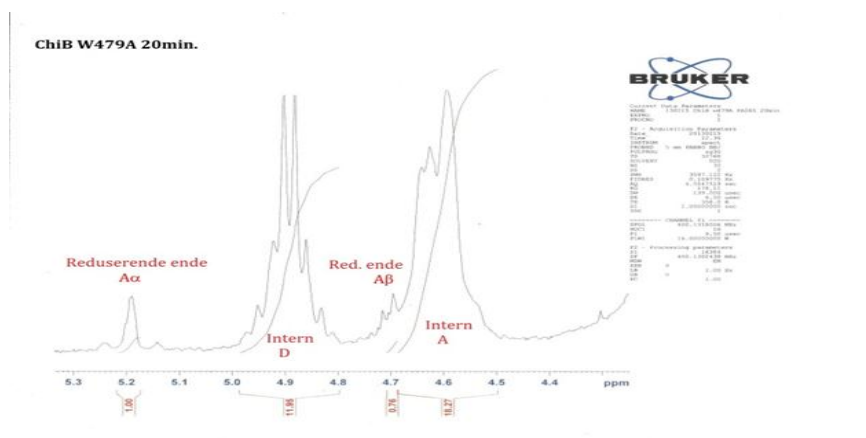
ChiB Y240A		
Reaksjonstid	$\text{DP}_n$	Nedbrytningsgrad ( $\alpha$ )
0 min.	160	0
5 min.	140	0
10 min.	42	0,030
15 min.	33	0,038
20 min.	22	0,045
30 min.	18	0,055
1 uke	3	0,333

Tabellen viser at  $\text{DP}_n$  synker og  $\alpha$  øker med økende reaksjonstid. Det samme gjør også  $\alpha$  der et plot av dette er presentert i figur 4.8. Reaksjonsprøven med  $\alpha \approx 0,05$  var oppnådd etter 20 minutter.



**Figur 4.8:** Plot av  $\alpha$  mot tid for Y240A.

#### 4.4.1.3 W479A



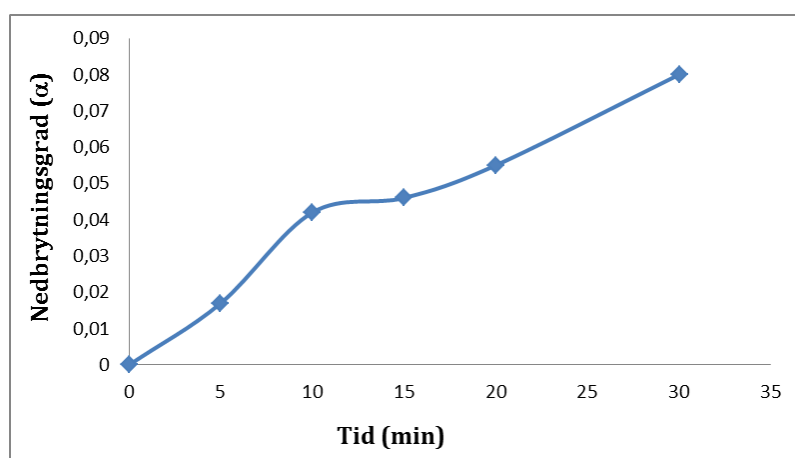
**Figur 4.9:**  $^1\text{H}$  NMR spekter for kitosan ( $F_A = 0,65$ ) nedbrutt av W479A i 20 minutter. Annotering av toppene er beskrevet i avsnitt 3.4.2.

Toppene fra  $^1\text{H}$  NMR spekteret ble integrert og  $\text{DP}_n$  og  $\alpha$  ble beregnet ved ulike reaksjonstider. Dette er presentert i tabell 4.6.

**Tabell 4.6:** Oversikt over beregnet  $DP_n$  og  $\alpha$  ved ulike reaksjonstider for W479A.

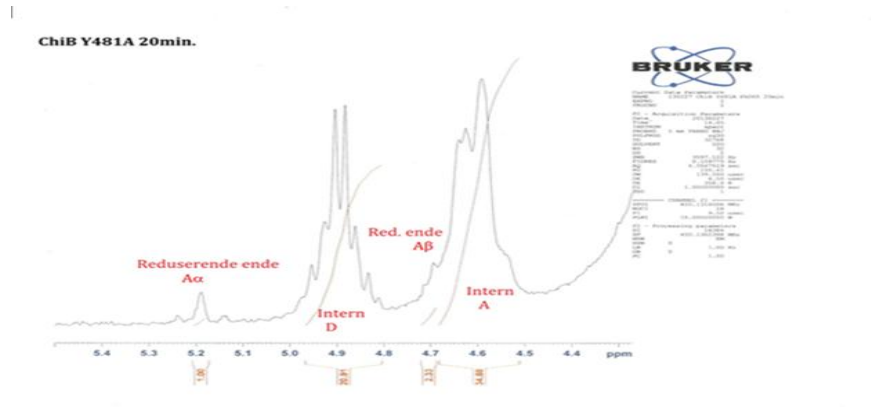
ChiB W479A		
Reaksjonstid	$DP_n$	Nedbrytningsgrad ( $\alpha$ )
0 min.	167	0
5 min.	58	0,017
10 min.	24	0,042
15 min.	22	0,046
20 min.	18	0,055
30 min.	12	0,080

Tabellen viser at  $DP_n$  synker og  $\alpha$  øker med økende reaksjonstid. Det samme gjør også  $\alpha$  der et plot av dette er presentert i figur 4.9. Reaksjonsprøven med  $\alpha \approx 0,05$  var oppnådd etter 20 minutter.



**Figur 4.10:** Plot av  $\alpha$  mot tid for W479A.

## 4.4.1.4 Y481A



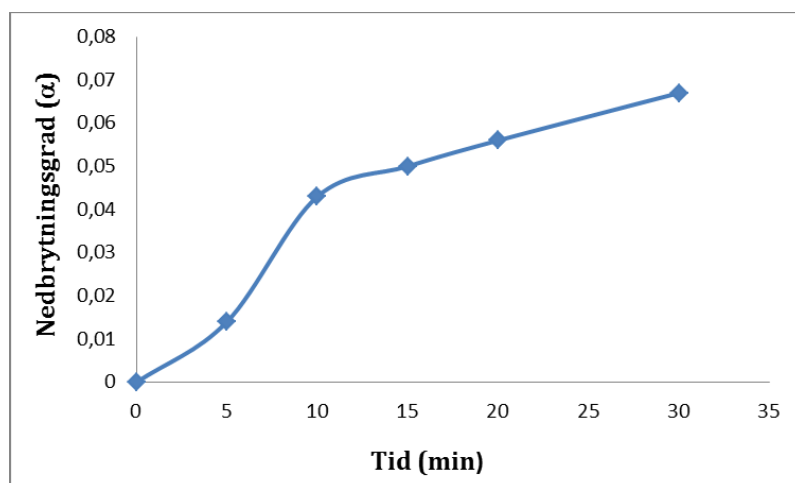
**Figur 4.11:**  $^1\text{H}$  NMR spekter for kitosan ( $F_A = 0,65$ ) nedbrutt av Y481A i 20 minutter. Annotering av toppene er beskrevet i avsnitt 3.4.2.

Toppene fra  $^1\text{H}$  NMR spekteret ble integrert og  $\text{DP}_n$  og  $\alpha$  ble beregnet ved ulike reaksjonstider. Dette er presentert i tabell 4.7.

**Tabell 4.7:** Oversikt over beregnet  $\text{DP}_n$  og  $\alpha$  ved ulike reaksjonstider for Y481A.

ChiB Y481A		
Reaksjonstid	$\text{DP}_n$	Nedbrytningsgrad ( $\alpha$ )
0 min.	169	0
5 min.	69	0,014
10 min.	23	0,043
15 min.	20	0,050
20 min.	18	0,056
30 min.	15	0,067

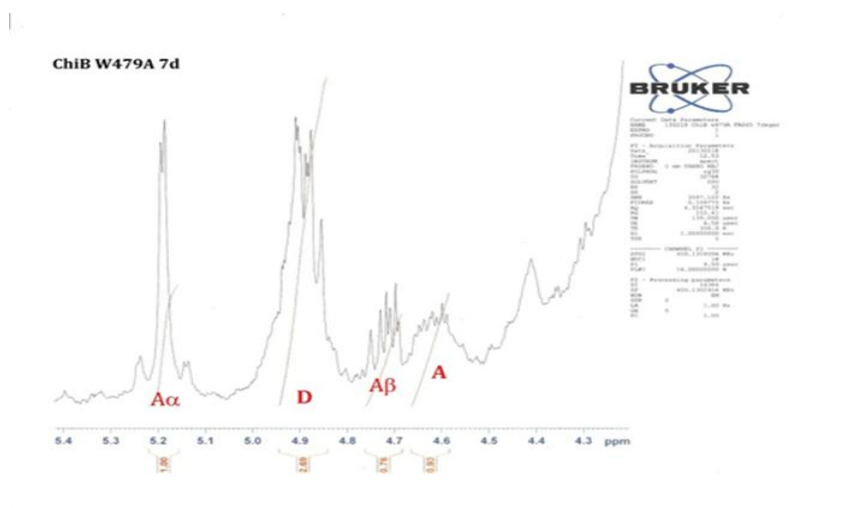
Tabellen viser at  $\text{DP}_n$  synker og  $\alpha$  øker med økende reaksjonstid. Det samme gjør også  $\alpha$  der et plot av dette er presentert i figur 4.10. Reaksjonsprøven med  $\alpha \approx 0,05$  var oppnådd etter 20 minutter.



**Figur 4.12:** Plot av  $\alpha$  mot tid for Y481A.

#### 4.4.2 7 dagers nedbrytning av kitosan $F_A = 0,65$

Reaksjonsprøven med en ukes nedbrytning ble også analysert på  $^1\text{H}$  NMR for å kontrollere at all kitosan hadde blitt brutt ned.  $^1\text{H}$  NMR spekteret for kitosan som har blitt brutt ned av de ulike mutantene er like, derfor er kun et spekter blitt presentert i figur 4.11.



**Figur 4.13:**  $^1\text{H}$  NMR spekter for kitosan ( $F_A = 0,65$ ) nedbrutt av W479A i 7 dager. Annotering av toppene er beskrevet i avsnitt 3.4.2.

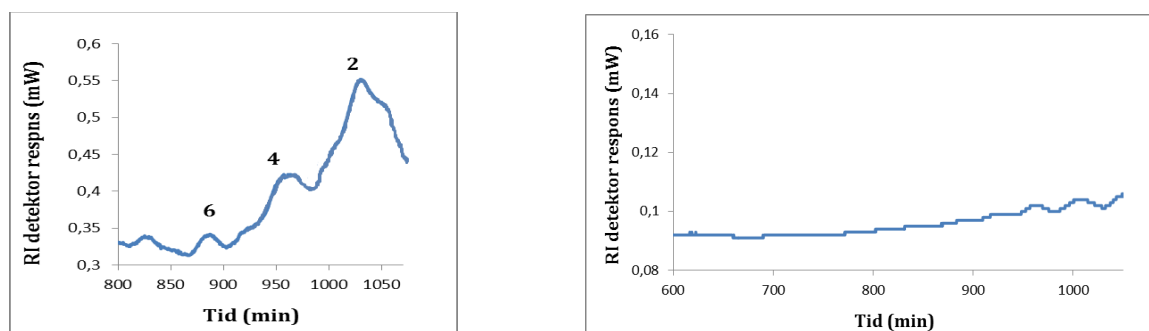
Ved nedbrytning av kitosan i 7 dager finnes det en mindre andel av acetylerede enheter i forhold til kitosan som har blitt brutt ned i 15-20 minutter. Dette vises i spekteret ved toppen merket A versus samme topp i figur 4.5-4.8. Beregning av DPn og  $\alpha$  som er presentert i tabell 4.8 viser at 33 % av kitosanpolymeren har blitt brutt ned etter 7 dager. Dette gjelder for alle mutantene som ble brukt til å bryte ned kitosan  $F_A$  0,65.

**Tabell 4.8:** Beregnet DPn og  $\alpha$  for kitosan ( $F_A = 0,65$ ) brutt ned av ulike mutanter i 7 dager.

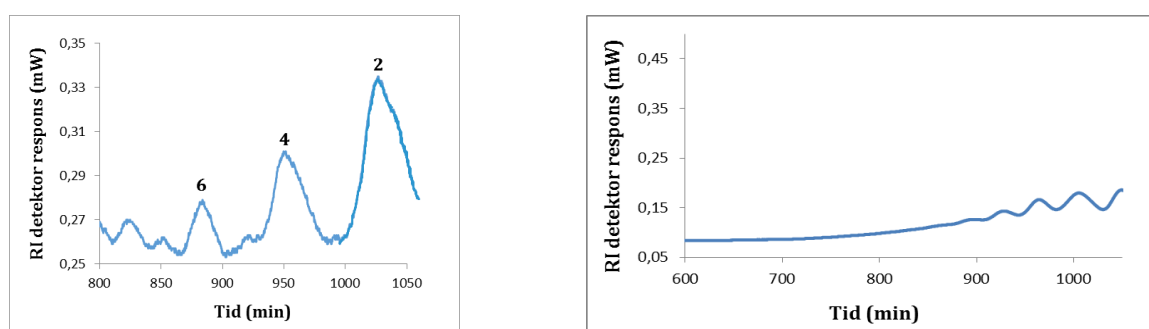
Enzym	DPn	Nedbrytningsgrad ( $\alpha$ )
W252A	3,02	0,33
Y240A	3,04	0,33
W479A	3,05	0,33
Y481A	3,05	0,33

#### 4.4.3 SEC

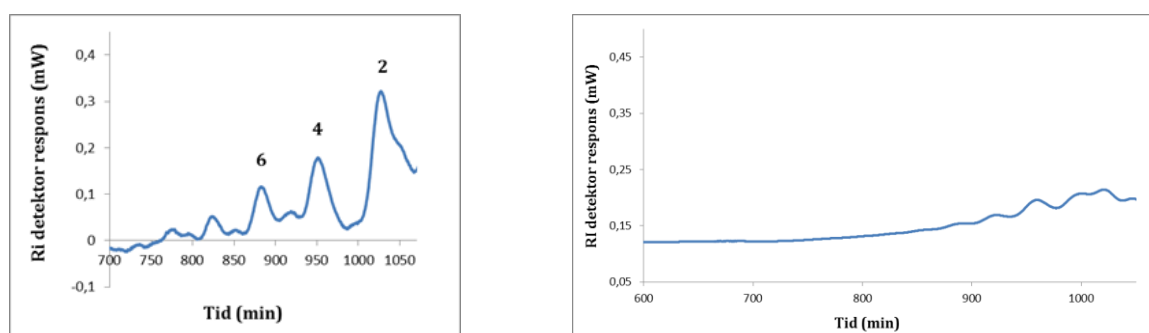
SEC separerer KOS med hensyn på størrelse og gir distribuering av partalls oligomerer dersom katalysen er prosessiv. Figurene 4.10-4.13 viser SEC-analyse av kitosan ( $F_A = 0,65$ ) hydrolysert av ChiB mutantene ved ulike tidspunkter. Figurene til venstre viser distribusjon av oligomer fraksjoner. Polymertoppen ble fjernet fra prøver med  $\alpha \approx 0,05$  før analyse, for å gi oligomeren bedre sensitiviteten. Polymertoppen vil inneholde kitosankjeder med DP større enn 40. Toppene er annotert ved hjelp av MALDI-TOF-MS (jfr. appendix avsnitt 7.2). Figurene til høyre viser 7 dagers nedbrytning av kitosan.



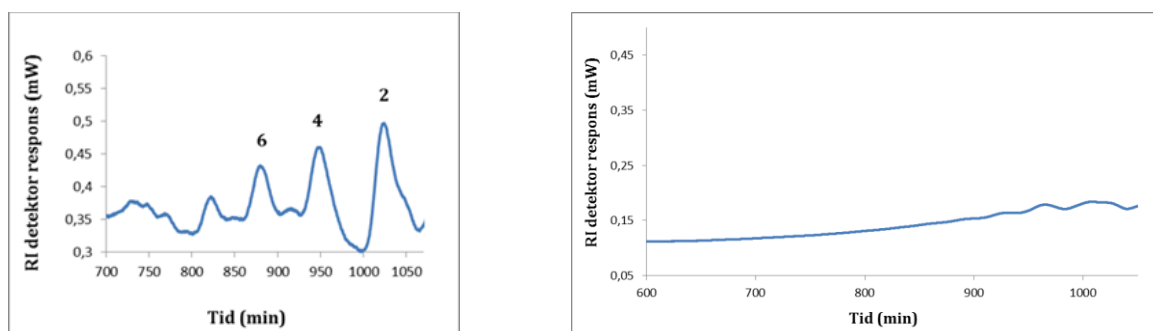
**Figur 4.14:** SEC-kromatogrammet viser oligomerfordelingen av kitosan hydrolysert av W252A i 15 min. ( $\alpha \approx 0,05$ ) til venstre og i 7 dager ( $\alpha \approx 0,33$ ) til høyre.



**Figur 4.15:** SEC-kromatogrammet viser oligomerfordelingen av kitosan hydrolysert av Y240A i 20 min. ( $\alpha \approx 0,05$ ) til venstre og i 7 dager ( $\alpha \approx 0,33$ ) til høyre.



**Figur 4.16:** SEC-kromatogrammet viser oligomerfordelingen av kitosan hydrolysert av W479A i 20 min. ( $\alpha \approx 0,05$ ) til venstre og i 7 dager ( $\alpha \approx 0,33$ ) til høyre.



**Figur 4.17:** SEC-kromatogrammet viser oligomerfordelingen av kitosan hydrolysert av Y481A i 20 min. ( $\alpha \approx 0,05$ ) til venstre og i 7 dager ( $\alpha \approx 0,33$ ) til høyre.

Figurene til venstre viser korte partallsoligomerer (DP 2-6) og tyder derfor på at katalysen er prosessiv. Figurene til høyre viser fullstendig nedbrytning av kitosan. Kitosan ( $F_A = 0,65$ ) har en maksimal  $\alpha$  på 0,33. Kromatogrammene viser ingen tydelige topper slik som de på figurene til høyre.

#### 4.4.4 MALDI-TOF-MS/MS

Sekvensene til AMAC-derivatiserte KOS ble bestemt ved hjelp MALDI-TOF-MS OG MALDI TOF-MS/MS. Monomerer, dimerer, trimerer, tetramerer, pentamerer og heksamerer ble sekvensert som vist i tabell 4.9.



**Tabell 4.9:** Identifiserte sekvenser til KOS nedbrutt av ChiB mutanter i 7 dager.

Sekvensene er presentert fra den ikke-reduserende enden (merket rødt) mot høyre.

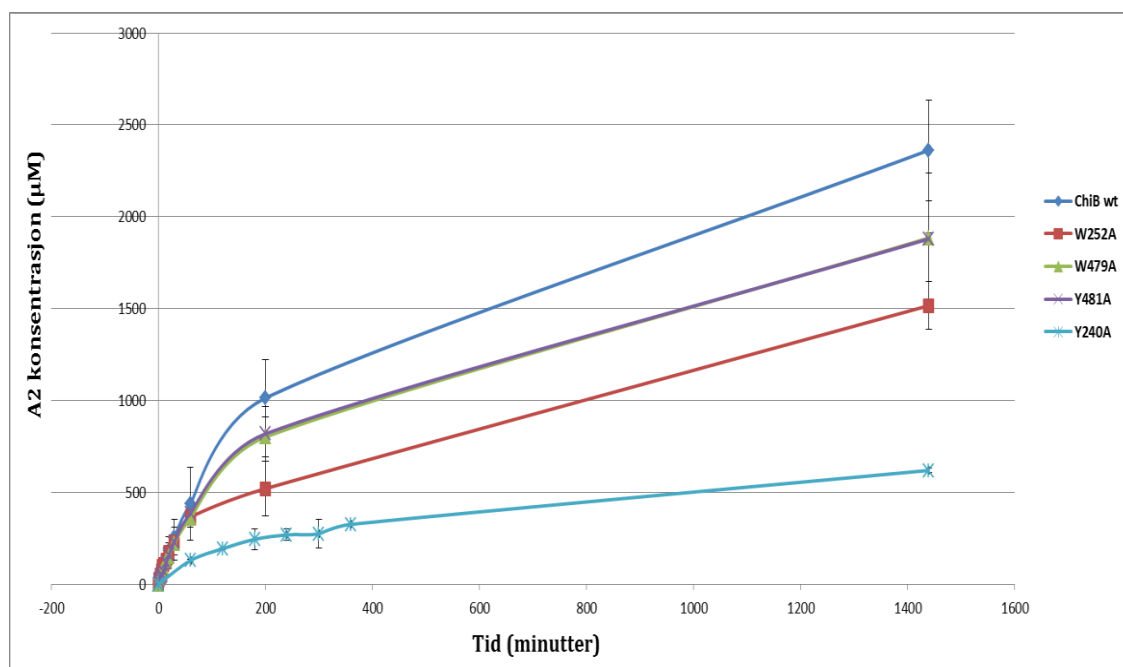
	Y240A F <sub>A</sub> 0,65			W252A F <sub>A</sub> 0,65			W479A F <sub>A</sub> 0,65			Y481A F <sub>A</sub> 0,65		
	KOS	m/z	SEKVENNS	KOS	m/z	SEKVENNS	KOS	m/z	SEKVENNS	KOS	m/z	SEKVENNS
MONOMER	A	398,17	A	A	438,16	A	A	438,16	A	A	398,17	A
										A	438,16	A
DIMER	AD	599,06	DA	AD	599,04	DA	A2	641,24	AA	AD	559,24	DA
	A2	641,21	AA	A2	641,19	AA	AD	599,23	DA	A2	601,25	AA
										A2	641,24	AA
TRIMER	D2A	760,43	DDA	D2A	760,42	DDA	A2D	802,31	DAA	A2D	762,32	ADA
	A2D	802,46	DAA	A2D	802,44	DAA			ADA	A2D	802,31	DAA
	A3	844,61	AAA	A3	844,45	AAA	A3	844,32	AAA			ADA
										A3	844,32	AAA
TETRAMER	D2A2	963,42	DDAA	D2A2	963,41	DDAA	D2A2	963,38	DADA	D2A2	963,38	DADA
			DADA	D1A3	1005,39	ADAA			DDAA			DDAA
	D1A3	1005,40	ADAA			DAAA	D1A3	1005,39	ADAA	D1A3	1005,39	ADAA
									DAAA			DAAA
							A4	1047,40	AAAA	A4	1047,40	AAAA
PENTAMER	D3A2	1124,40	DDDA	D3A2	1124,9	DDDA	D2A3	1166,46	ADADA	D2A3	1166,46	DADAA
	D2A3	1166,43	DADAA	D2A3	1166,4	DADAA			ADAAA	D1A4	1208,47	ADAAA
						DDAAA			DAADA			AADAA
									DADAA			
									DDAAA			
							D1A4	1208,5	ADAAA			
							A5	1250,5	AAAAA			
HEKSAMER	D3A3	1327,79	DADDA	D2A4	1370	DDAAA	D2A4	1369,54	DAADA	D2A4	1369,54	DAADA
	D2A4	1369,97	ADADA			ADAAA			DADAAA			DADAAA
							D3A3	1327,5	DDADA			

Sekvensering av KOS av ulike størrelse viste noe ulike produkter som ble dannet hos de forskjellige mutantene. Monomer- og trimerdannelsen er identisk hos alle mutantene. ChiB mutantene har absolutt preferanse for A i subsete -1, derfor dannes det kun to dimerer, AA og DA. For trimerer går A3- og A2D-sekvensen igjen hos alle mutantene, mens D2A-sekvensen mangler hos W479A og Y481A. For tetramerer dannes D2A3 og D1A3 hos alle mutantene i tillegg til A4-sekvensen som finnes hos W479A og Y481A. Pentamerproduktene er noe mer forskjellige hos mutantene. D2A3 går igjen hos alle mutantene, mens D3A2 dannes kun hos W252A og Y240A. Hos W479A dannes det også A5 i tillegg til D1A4 som også finnes hos Y481A. For heksamerer dannes D2A4 hos alle mutantene i tillegg til dannelse av D3A3 som kun finnes hos W252A og W479A.

#### **4.5 Nedbrytning av $\beta$ -kitin med ChiB mutanter**

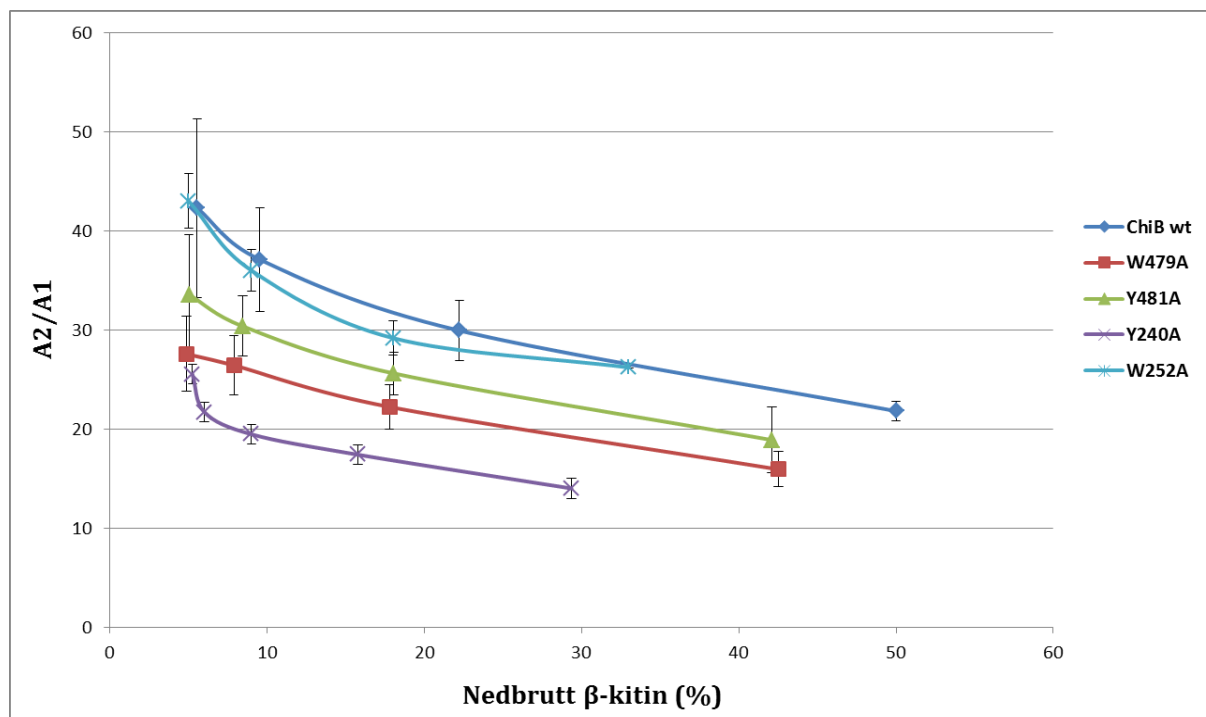
Ulike mutanter ble inkubert med sonikert  $\beta$ -kitin over en bestemt periode (jfr. avsnitt 3.5.1). HPLC ble benyttet til å analysere prøvene for å få et estimat på mutantenes effektivitet og prosessivitet. Det ble laget et plot av [A2] mot tid i minutter som er presentert i figur 4.14, for å sammenlikne mutantenes aktivitet og effektivitet i forhold til villtypen. [A2] er et gjennomsnitt av de tre parallellene som ble utført for hver mutant. "Error bars" for hvert datapunkt er standardavviket mellom de tre verdiene målt ved det aktuelle punktet. Det ble også laget et plot av [A2]/[A1] ratio mot nedbrutt  $\beta$ -kitin i % som er presentert i figur 4.15, for å sammenlikne mutantenes prosessivitet og effektivitet i forhold til villtypen. Det ble også her benyttet et gjennomsnitt av verdiene i plottet.

#### 4.5.1 HPLC - [A2] mot tid



**Figur 4.18:** Grafisk fremstilling av gjennomsnittlig [A2] fra tre paralleller av hver mutant som funksjon av tiden i minutter. Mutantene og ChiB wt er merket med ulike farger. "Error bars" i hvert datapunkt viser variasjon i verdiene.

I den initielle fasen avviker kurven til Y240A fra de andre mutantene inkludert villtypen. Den har ikke den samme bratte stigningen i starten. Etter ca. 60 minutter skiller resten av mutantene seg fra villtypen med at kurvene ikke går like høyt opp som villtypen. Dette vil si at [A2] stiger i ulik grad mellom mutantene over tid der sluttkonsentrasjonen for dimer er høyere hos villtypen enn hos mutantene. Y240A har liten økning av [A2] over tid og desidert lavest sluttkonsentrasjon av alle mutantene. "Error bars" for punktene viser noe variasjon mellom parallellene der W479A og Y481A har et standardavvik som overlapper med villtypen.

4.5.2 HPLC -  $[A_2]/[A_1]$  mot nedbrutt  $\beta$ -kitin

**Figur 4.19:** Plot av gjennomsnittlig  $[A_2]/[A_1]$  ratio fra tre paralleller av hver mutant som funksjon av nedbrutt  $\beta$ -kitin i %. Mutantene og ChiB wt er merket med ulike farger.

"Error bars" i hvert datapunkt viser variasjon i verdiene.

Ved tillaging av plottet (jfr. figur 4.15) har det ikke blitt tatt med verdiene  $> 5\%$  nedbrutt  $\beta$ -kitin siden verdiene for deteksjon av  $[A_1]$  ligger under den sikre deteksjonsgrensen for HPLC. Plottet viser at ingen av mutantene har brutt ned like mye  $\beta$ -kitin som villtypen i prosent. "Error bars" for punktene viser en stor variasjon mellom parallellene slik at W479A overlapper med Y481A som igjen overlapper med W252A og villtypen.

## 5. DISKUSJON

Den prosessive egenskapen til et enzym har vist seg å være utfordrende å kvantifisere. Primært skyldes dette at uløselige substrater som kitin, ikke er mottakelige for enkel biokjemisk analyse. Det å kunne måle prosessivitet er viktig for å kunne forstå effektiv degradering av uløselige substrater. Den prosessive mekanismen og hvordan prosessivitet påvirker effektiv nedbrytning av biomasse er kun delvis forstått. Detaljerte studier av naturlige enzymer med ulike egenskaper, samt studie av forholdet mellom struktur og funksjon kan føre til økt kunnskap om prosessivitet (Horn et al., 2012).

I denne oppgaven ble fire ChiB mutanter fra *S. marcescens* benyttet i flere ulike forsøk med kitosan og kitin som substrat. Dette førte til at mutantenes aktivitet, effektivitet og prosessivitet i forhold til ChiB wt kunne studeres.

### 5.1 Nedbrytning av 4 MU-(GlcNAc)<sub>2</sub>

Det kunstige substratet 4 MU-(GlcNAc)<sub>2</sub> binder til det aktive setet i subsetene -2 til +1 i ChiB. De konstruerte mutantene ligger utenfor dette området og hydrolyse av 4 MU-(GlcNAc)<sub>2</sub> vil derfor ikke kunne gi noe informasjon om hvilken effekt mutasjonene har. Metoden er ikke optimal for analyse av de konstruerte mutantene, men gir en indikasjon på om enzymet er aktivt eller inaktivt. Hydrolyse av det kunstige substratet reflekterer i veldig liten grad hvordan kitinaseaktiviteten er på de naturlige substratene, kitin og kitosan (Brurberg et al., 1996).

Tabell 4.3 viser unormalt lave verdier for den spesifikke enzym aktiviteten til de fire mutantene. Det var forventet at de fire mutasjonene ikke ville føre til signifikant endring i aktivitet, men tabellen viser at mutantene har ekstremt lave verdier i forhold til WT. Mutasjon ved posisjon 240 som ligger forbi subsete -3, førte til den største endringen i aktivitet, etterfulgt av mutantene Y481A og W479A som har nesten like liten

prosentvis aktivitet relativt til WT som Y240A. Dette indikerer at disse mutantene er nesten like aktive, men Y240A er minst aktiv og vil derfor være mindre effektiv enn de andre mutantene.

Effekten av de ulike mutasjonene på hydrolyse av 4 MU-(GlcNAc)<sub>2</sub> er altså uventet. Årsaken til disse resultatene har ingen åpenbar forklaring. Et alternativ kan være feil ved utførelse av metode eller instrumentelle feilkilder. Det siste er mer sannsynlig siden mutantene hadde relativt likere aktivitet på det vanskelig nedbrytbare kitin enn 4-MU-(GlcNAc)<sub>2</sub>.

## 5.2 Nedbrytning av kitosan F<sub>A</sub> 0,65 med ChiB mutanter

Degradering av det løselige substratet kitosan med ChiB wt utført av (Horn et al., 2006), produserte partalls oligomerer. SEC-kromatogrammet til ChiB wt domineres derfor av høye partallstopper og lave oddetallstopper. Forekomsten av partalls oligomerer i initialfasen er en indikasjon på prosessivitet. Alle mutantene viser det samme degraderingsmønsteret, ved at partallstoppene er høyere enn oddetallstoppene. Kromatogrammet til mutant W252A viser størst avvik fra WT. Dette kan antyde at W252A har redusert prosessivitet mot kitosan. De andre mutantene har tydelige partalls topper som viser at disse er prosessive mot kitosan.

SEC kromatogrammene for syv dagers nedbrytning skal egentlig illustrere størrelses distribusjonen ved maksimal nedbrytning for å se om mutasjonene har en effekt på effektivitet av kitosan nedbrytning og som en kontroll på enzymaktivitet. Alle har lik nedbrytningseffekt som ChiB wt. Dette er i overensstemmelse med at aromatiske aminosyrer er mindre viktige for effektiv degradering av løselig substrat i forhold til uløselig substrat (Zakariassen et al., 2009). Et lite forbehold om vi observerer  $\alpha_{\text{maks}}$  tas

siden man burde tilsette mer enzym den åttende dagen for så å analysere på NMR og SEC på nytt. SEC kromatogrammene for syv- og åtte dagers nedbrytning ville vært overlappende dersom det var maksimal nedbrytning ved syv dager.

### 5.3 Nedbrytning av $\beta$ -kitin med ChiB mutanter

Resultatene i dette studiet viser at noen av mutantene er like aktive, effektive og prosessive som ChiB wt.

Y240A viste som nevnt lav aktivitet og relativt liten effektivitet mot kitin. Mutanten viser en sluttkonsentrasjon av dimer på 619  $\mu\text{M}$  som er mye lavere enn villtypen på 2361  $\mu\text{M}$ . Sammenliknet med de andre mutantene var det denne enzymvarianten som ga lavest aktivitet, minst effektivitet og minst prosessivitet. I forhold til villtypen som degraderer kitinet 50 %, degraderer Y240A kitinet kun 29 %. Dette stemmer med tidligere studier der det har blitt vist at prosessive enzymer er mer effektive mot uløselig kitin enn mindre prosessive enzymer (Horn et al., 2006). Det kan konkluderes med at mutering av residu Y240 til alanin vil ha en stor innvirkning på enzymets prosessive egenskaper (noe som ikke var antatt) og på enzymets effektivitet mot kitin. Det er også interessant å observere at det nettopp er Y240 som viser størst effekt siden denne er plassert på supportloopen som har vist seg å undergå relativt stor bevegelse ved substratbinding (Van Aalten et al., 2000; og Van Aalten et al., 2001). Dette kan tyde på at denne regionen er viktig for å "skyve" substratet videre inn i det aktive setet ved en prosessive mekanisme.

Mot kitin viste W252A en høyere aktivitet enn Y240A, samt en høyere slutt-konsentrasjon av dimer på 1516  $\mu\text{M}$ . W252A viste seg å være like aktiv som villtypen, men ikke like effektiv. Effektiviteten er redusert der enzymet klarer kun å bryte ned 33 % av kitinet. Den prosessive egenskapen til enzymet har dermed ikke blitt i noen særlig

grad påvirket. Dette tyder på at det ikke er kun reduksjon i prosessivitet som fører til reduksjon i effektivitet mot uløselig substrat.

Y481A viste å være like aktiv som villtypen, mens effektiviteten har blitt noe redusert. Enzymet degraderer 42 % av kitinet. Dette tyder på at enzymet degraderer kitinet effektivt, noe som er forventet for prosessive enzymer. I forhold til villtypen er enzymet ikke like effektiv, men dets prosessivitet er dermed uendret. Igjen vises det også her at enzymets effektivitet ikke påvirker den prosessive mekanismen.

W479A viste også å være like aktiv som villtypen. Enzymets effektivitet er dermed ikke like høy som villtypen, men den er mest effektiv i forhold til de andre mutantene. Enzymet degraderer 43 % av kitinet som er den største prosentnedbrytningen etter villtypen. I tillegg har denne mutasjonen også ført til en liten påvirkning på enzymets prosessivitet.

I en oppsummering så ser vi at de aromatiske residuene på det kitinbindende domenet har like egenskaper og at disse er mindre viktige for prosessivitet. Videre så er aromaten nærmest det aktive setet mer viktig for prosessivitet. Til sammen er det i overensstemmelse med tidligere foreslåtte hypoteser at aromater nær den katalytiske syren er viktig for prosessivitet mens rollen til aromater på et karboydratbindende domene er å øke binding til det uløselige polysakkaridet (Horn et al., 2006a; Zakariassen et al., 2009).



## 6. OPPSUMMERING OG VIDERE ARBEID

### 6.1 Oppsummering

Resultatene for Y240A antyder at mutasjonen har ført til stor påvirkning på enzymets prosessive egenskaper mot kitin, men ikke mot kitosan. Årsaken til dette kan være kitinets utilgjengelige struktur som fører til vanskelig substratbinding i forhold til kitosan. Resultatene for W252A viser derimot reduserte prosessive egenskaper mot kitosan og ikke mot kitin. Videre har mutasjonen i Y481 ikke ført til noen endringer i prosessivitet mot verken kitin eller kitosan. Den siste mutanten, W479A fikk en liten grad av reduksjon i den prosessive mekanismen mot kitin, men ikke mot kitosan.

Resultatene i dette studiet viser at Y240A er den mutanten som har hatt størst påvirkning på prosessivitet og effektivitet. Mutantens aktivitet er også sterkt redusert i forhold til de andre mutantene som er like aktive som villtypen. Resultatene viser også at det ikke nødvendigvis er en absolutt sammenheng mellom effektivitet og prosessivitet, foruten mutant Y240. Tabell 6.1 viser ingen trend hvor prosessive enzymer er mer effektive mot kitin enn enzymer som er mindre prosessive.

**Tabell 6.1:** Oversikt over minkende grad av effektivitet og prosessivitet ved hydrolyse av kitin.

Minkende grad av effektivitet mot kitin	Minkende grad av prosessivitet mot kitin
1 WT	1 WT
2 W479A	1 Y481A
3 Y481A	1 W252A
4 W252A	2 W479A
5 Y240A	3 Y240A

## **6.2 Videre arbeid**

Fremtidige studier kan omhandle måling av bindingsaffinitet og bindingsfrienergi til kitin. Dette kan gjøres ved å utføre forsøk på de inaktive dobbelmutantene som ble konstruert under arbeidet i denne oppgaven.

## 7. REFERANSER

Agilent Technologies (2012). *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit*. Tilgjengelig fra: <http://www.chem.agilent.com/library/usermanuals/Public/200523.pdf> (Lest fra: 13.05.2013)

Agilent Technologies (2012). *QuikChange Primer Design*. Tilgjengelig fra: <https://www.genomics.agilent.com/CollectionSubpage.aspx?PageType=Tool&SubPageType=ToolQCPD&PageID=15> (Lest: 17.04.2013).

Arnold, F. H. (2001). Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature*, 409, 253-7.

Baban, J., Fjeld, S., Sakuda, S., Eijsink, V. G. & Sorlie, M. (2010). The roles of three *Serratia marcescens* chitinases in chitin conversion are reflected in different thermodynamic signatures of allosamidin binding. *J Phys Chem B*, 114, 6144-9.

Berth, G. & Dautzenberg, H. (2001). The degree of acetylation of chitosans and its effect on the chain conformation in aqueous solution.

Bruberg, 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.

Brurberg, M. B., Synstad, B., Sletner, K. S., Van Aalten, D. M., Leif, S. & Eijsink, V. G. (2000). Chitinases from *Serratia marcescens*

Carter, P. (1986). Site-directed mutagenesis. *Biochem J*, 237, 1-7.

CAZy (2006). *Glycoside Hydrolase family classification*. Tilgjengelig fra: <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html> (Lest: 12.05.2013).

Davies, G. & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3, 853-9.

Downard, K. (2004). *Mass Spectrometry, A Foundation Course*, ed. R.S.o. Chemistry.

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.

Fan, Y., Saito, T., and Isogai, A. (2008). "Preparation of Chitin Nanofibers from Squid Pen  $\beta$ -Chitin by Simple Mechanical Treatment under Acid Conditions," *Biomacromolecules*, 9(7), pp. 1919-1923.

GATC Biotech (2013). Tilgjengelig fra: <http://www.gatc-biotech.com/en/index.html> (Lest: 17.04.2013).

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.

Henrissat, B. & Davies, G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol*, 7, 637-44.

Hoffmann, E. D. & Stoobant, V. (2007). *Mass spectrometry: principles and applications*, Chichester, Wiley.

Horn, S. J., Sikorski, P., Cederkvist, J. B., Vaaje-Kolstad, G., Sorlie, M., Synstad, B., Vriend, G., Varum, K. M. & Eijsink, 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. & Eijsink, V. G. (2006b). Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. *FEBS J*, 273, 491-503.

Horn, S. J., Sorlie, M., Vaaje-Kolstad, G., Norberg, A., Synstad, B., Vårum, K. M. & Eijsink, V. G. (2006c). Comparative studies of chitinases from *Serratia marcescens* *Biocatalysis and biotransformation*.

Horn, S. J., Sorlie, M., Varum, K. M., Valjamae, P. & Eijsink, V. G. (2012). Measuring processivity. *Methods Enzymol*, 510, 69-95.

Invitrogen (2007) *Qubit® Fluorometer*. Tilgjengelig fra: [http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/cell\\_tissue\\_analysis/Qubit-all-file-types.Par.27078.File.dat/Qubit\\_UserManual.pdf](http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/cell_tissue_analysis/Qubit-all-file-types.Par.27078.File.dat/Qubit_UserManual.pdf) (Lest dato: 19.04.2013)

Invitrogen (2011). *Protein Standards & Ladders*. Tilgjengelig fra: <http://www.b2b.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Protein-Expression-and-Analysis/Protein-Gel-Electrophoresis/Protein-Standards.html> (Lest dato: 17.04.2013).

Life Technologies (2013). Tilgjengelig fra: <http://www.lifetechnologies.com/global/en/home.html> (Lest: 17.04.2013).

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)(2) from Chitin. *International Journal of Molecular Sciences*, 12 (9): 5828-43.

Mathews, C. K., Ahern, K. G. & Van Holde, K. E. (2000). *Biochemistry*, San Francisco, Calif., Benjamin/Cummings.

Miller, J. M. (2005). *Chromatography - Concepts and Contrasts*. 2 utg. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

Miller, J. M. (2005). *Chromatography: concepts and contrasts*, Hoboken, N.J., Wiley.

Novagen (2004). *Pellet Paint® NF Co-Precipitant*. Tilgjengelig fra: [http://www.emdmillipore.com/life-science-research/pellet-paint-nf-co-precipitant/EMD\\_BIO-70748/p\\_6Ieb.s1002gAAAEjzhl9.zLX](http://www.emdmillipore.com/life-science-research/pellet-paint-nf-co-precipitant/EMD_BIO-70748/p_6Ieb.s1002gAAAEjzhl9.zLX) (Lest: 17.04.2013)

OMEGA bio-tek. (2009). *E. Z. N. A ® Plasmid Mini Kit I product manual*. Tilgjengelig fra: <http://www.omegabiotek.com/files/resource/Handbook/53126500.pdf> (Lest: 17.04.2013).

Rouvinen, J., Bergfors, T., Teeri, T., Knowles, J. K. & Jones, T. A. 1990. Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science*, 249, 380-6.

Rye, C. S. & Withers, S. G. (2000). Glycosidase mechanisms. *Curr Opin Chem Biol*, 4, 573-80.

Sigma-Aldrich. (2013) *2-Aminoacridone*. Tilgjengelig fra: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/06627?lang=en&region=NO> (Lest: 23.04.2013)

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, 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.

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 J*, 272, 538-49.

Sorlie, M., Zakariassen, H., Norberg, A. & Eijsink, V. G. (2012). Processivity and substrate-binding in family 18 chitinases. *Biocatalysis and biotransformation*, 30 (3): 12.

Spiller, B., Gershenson, A., Arnold, F. H. & Stevens, R. C. (1999). A structural view of evolutionary divergence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 12305-10.

Stratagene (2004). *QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit. Instruction Manual*. Tilgjengelig fra:

<http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Stratagene%20Quikchange%20mutagenesis.pdf> (Lest fra: 17.04.2013).

Synstad, B., Gåseidnes, S., Aalten, D. M. F. v., Vriend, G., Nielsen, J. E., and Eijsink, V. G. H., (2004). "Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase," *European Journal of Biochemistry*, 271(2), pp. 253-262.

Synowiecki, J. & Al-Khateeb, N. A. (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 43, 145-71.

Synstad, B., Vaaje-Kolstad, G., Cederkvist, F. H., Saua, S. F., Horn, S. J., Eijsink, V. G., and Sorlie, M. (2008). "Expression and characterization of endochitinase C from *Serratia marcescens* BJL200 and its purification by a one-step general chitinase purification method," *Biosci Biotechnol Biochem*, 72(3), pp. 715-723.

Thermo Scientific (2008). *NanoDrop 1000 Spectrophotometer. V3.7 User's Manual*.

Tilgjengelig fra: <http://www.nanodrop.com/Library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf> (Lest fra: 17.04.2013).

Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., Sorlie, M. & Eijsink, V. G. (2013). The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens* - a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *FEBS J*.

Van Aalten, D. M., Synstad, B., Brurberg, M. B., Hough, E., Riise, B. W., Eijsink, V. G., and Wierenga, R. K. (2000). "Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1.9-Å resolution," *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(11), pp. 5842-5847.

Van Aalten, D. M., Komander, D., Synstad, B., Gaseidnes, S., Peter, M. G. & Eijsink, V. G. (2001). Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 8979-84.

Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., Losick, R. (2008). *Molecular Biology of the Gene*. Cold Spring Harbor, N.Y., CSHL Press. XXXII, 841 s. : ill.

Wierenga, R. K. (2001). The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Lett*, 492, 193-8.

Wikipedia (2008). Datei:Chitosan Synthese.svg Tilgjengelig fra: [http://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Chitosan\\_Synthese.svg](http://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Chitosan_Synthese.svg) (Lest fra: 12.05.2013).

Yip, V. L. & Withers, S. G. (2004). Nature's many mechanisms for the degradation of oligosaccharides. *Org Biomol Chem*, 2, 2707-13.

Zakariassen, H., Aam, B. B., Horn, S. J., Varum, K. M., Sorlie, 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., Aam, B. B., Horn, S. J., Varum, K. M., Sorlie, 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. *J Biol Chem*, 284, 10610-7.





---

## 8. APPENDIX

### 8.1 Sekvenser

Nukleotidsekvensen til ChiB wt (jfr. 8.1.1) og aminosyresekvensen til ChiB wt (jfr. 8.1.2) ble benyttet i forbindelse med design av ChiB mutanter.

#### 8.1.1 Nukleotidsekvens

>ENA|Z36295|Z36295.1 *S.marcescens* (BJL200) chiB gene for chitinase : Location:175..1674

```
ATGTCCACACGCAAAGCCGTTATTGGGTATTATTTTATTCCAACCAACCAAATCAATAAC
TACACCGAGACCGATACGTCCGTCGTGCCATTCCTCCGGTTTCCAACATTACGCCGGCCAAA
GCCAAACAGCTGACGCACATCAACTTCTCGTTCCTGGATATCAACAGCAATCTGGAATGC
GCCTGGGATCCGGCCACCAACGACGCCAAGGCGCGCGATGTGGTCAACCGTCTGACCGCG
CTCAAAGCGCACAACCCAGCCTGCGCATCATGTTCTCCATCGGCGGCTGGTACTACTCC
AACGATCTGGGCGTGTGCGACGCCAACTATGTCAACGCGGTGAAAACCCGGCGTCCGCG
GCCAAGTTCGCCCAATCCTGCGTGCATCATGAAGGATTACGGCTTCGACGGTGTGGAC
ATCGACTGGGAGTACCCGCAAGCGGCGGAAGTGGACGGCTTCATCGCCGCGTGCAGGAG
ATCCGCACCTTGCTGAACCAAGCAACCATCACAGACGGCCGCCAGGCGTTGCCGTACCAG
TTGACCATCGCCGGCGCCGGCGCCCTTCTTCTGTGCGCGCTATTACAGCAAGCTGGCG
CAGATCGTGCGCCGCTCGATTACATCAACCTGATGACCTACGATCTGGCCGGCCCTGG
GAGAAGGTAACCAACCACCAGGCGGCGCTGTTCCGGCAGCGGCCGGGCGGACCTTCTAC
AACGCGCTGCGCGAAGCCAATCTGGGCTGGAGCTGGGAAGAGCTGACCCGCGCCTTCCCC
AGCCCGTTCAGCCTGACGGTCGACGCCGCCGTGCAGCAACACCTGATGATGGAAGGCGTG
CCGAGCGCCAAAATCGTCATGGGCGTGCCCTTCTATGGCCGCGCCTTCAAGGGCGTCAGC
GGCGGCAACGGTGGGCAATACAGCAGCCACAGCACGCCGGGCGAAGATCCGTATCCGAGC
ACCGACTACTGGCTGGTGGGCTGCGAAGAGTGCCTGCGCGACAAGGATCCGCGCATCGCC
TCCTATCGCCAGTTGGAGCAGATGCTGCAGGGCAACTACGGCTATCAGCGGTTGTGGAAC
GACAAGACAAAACCCCTTATCTGTATCATGCGCAGAACGGGCTGTTTCGTACCTATGAC
GATGCCGAGAGCTTCAAATACAAAGCGAAGTACATCAAGCAGCAGCAGCTGGGCGGCGTG
ATGTTCTGGCATCTGGGGCAAGACAACCGCAACGGCGATCTGCTGGCCGCGCTGGATCGC
TATTTCAACGCCGCGGACTACGACGACAGCCAGCTGGATATGGGCACCGGGCTGCGCTAC
ACCGCGCTCGGCCCCGGCAACCTGCCTATCATGACCGCGCCGGCTATGTGCCGGGCACC
ACTTACGCGCAGGGCGCGCTGGTGTCTACCAGGGCTACGTCTGGCAGACCAAGTGGGGT
TACATCACCTCTGCACCGGGTTCAGACAGCGCCTGGCTGAAGGTGGGCCGCGTAGCGTAA
```

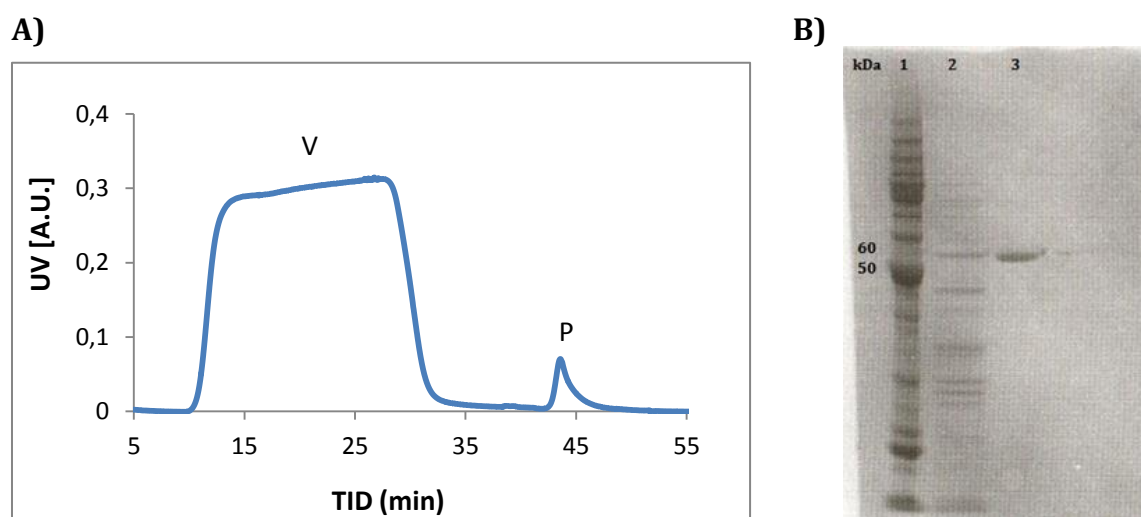
### 8.1.2 Aminosyresekvens:

MSTRKAVIGYYFIPTNQINNYTETDTSVVPFVSNITPAKAKQLTHINFSFLDINSNLECAWDPATNDAKARDVVNR  
 LTALKAHNPSLRIMFSIGGWYYSNDLGVSHANYVNAVKTPASRAKFAQSCVRIMKDYGFDGVDIDWEYPQAAEVD  
 GFIAALQEIRTLNQQTTITDGRQALPYQLTIAGAGGAFFLSRYYSKLAQIVAPLDYINLMTYDLAGPWEKVTNHQAA  
 LFGDAAGPTFYNALREANLGWSWEELTRAFSPFSLTVDAAVQQHLMMEGVPSAKIVMGVPPFYGRAFKGVSGGN  
 GGQYSSHSTPGEDPYPSTDYWLVGCEECVRDKDPRIASRQLEQMLQGNYGQRLWNDKTKTPYLYHAQNGLFVT  
 YDDAESFKYKAKYIKQQQLGGVMFWHLGQDNRNGDLLAALDRYFNAADYDDSQLDMGTGLRYTGVGPGNLPIMT  
 APAYVPGTTYAQALVSYQGYVWQTKWGYITSAPGSDSAWLKVG RVA

## 8.2 Rensing av ChiB mutanter

Det periplasmatiske ekstraktet med de ulike proteinene ble rensset på kitinkolonne. Figurene fra avsnitt 8.2.1-8.2.3 viser resultater fra isolering av mutantene: Y240A, W252A og Y481A, samt SDS-PAGE analyse av proteinene.

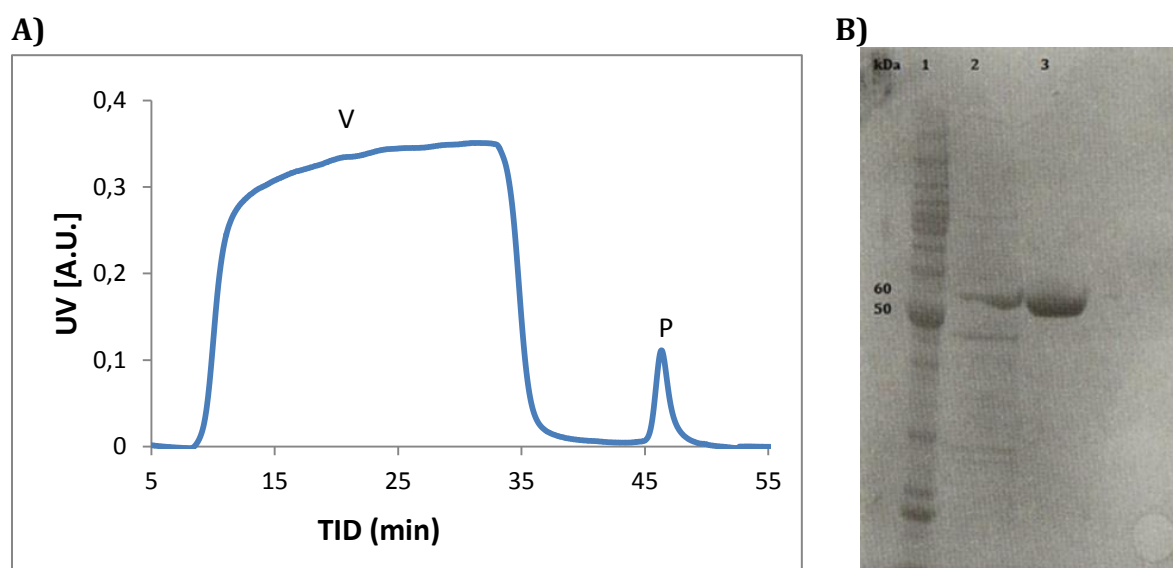
### 8.2.1 Isolering av Y240A



**Figur 8.1:** A) Kromatografisk resultat av rensing av Y240A på kitinkolonne. Voidtoppen er markert med V og proteintoppen med P. Protein ble eluert ut i den minste toppen.

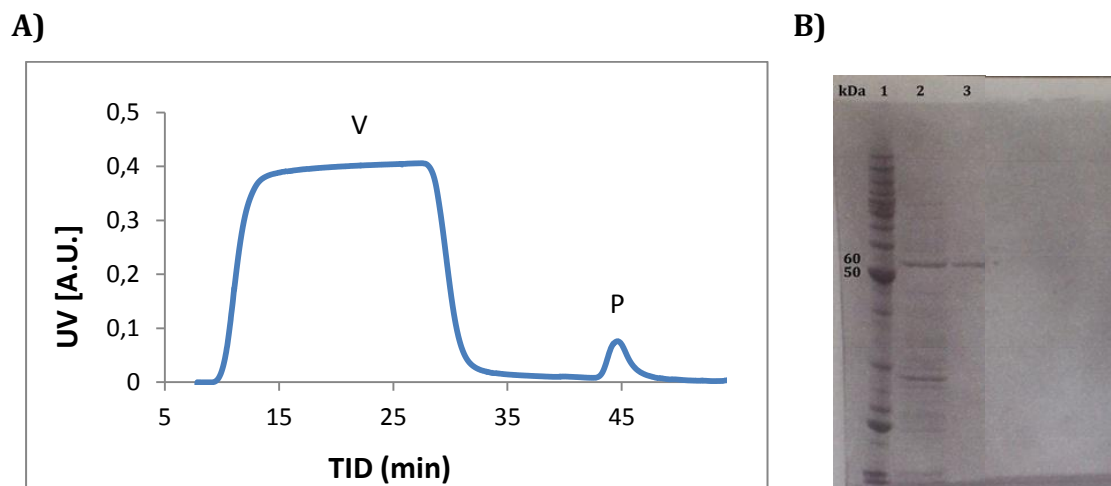
B) SDS-PAGE gel av W252A. Brønn 1) Protein ladder, brønn 2) periplasmatiske ekstrakt og brønn 3) rensset protein. Gelbildet viser ChiB og andre proteiner i brønn 2 og kun ChiB i brønn 3.

### 8.2.2 Isolering av W252A



**Figur 8.2:** A) Kromatografisk resultat av rensing av W252A på kitinkolonne. Voidtoppen er markert med V og proteintoppen med P. Proteinet ble eluert ut i den minste toppen. B) SDS-PAGE gel av W252A. Brønn 1) Protein ladder, brønn 2) periplasmatiske ekstrakt og brønn 3) rensert protein. Gelbildet viser ChiB og andre proteiner i brønn 2 og kun ChiB i brønn 3.

### 8.2.3 Isolering av W479A



**Figur 8.3:** A) Kromatografisk resultat av rensing av W252A på kitinkolonne. Voidtoppen er markert med V og proteintoppen med P. Proteinet ble eluert ut i den minste toppen. B) SDS-PAGE gel av W252A. Brønn 1) Protein ladder, brønn 2) periplasmatiske ekstrakt og brønn 3) rensset protein. Gelbildet viser ChiB og andre proteiner i brønn 2 og kun ChiB i brønn 3.

### 8.3 MALDI-TOF-MS/MS

Fraksjonene som ble samlet på under SEC – analyse av prøver med  $\alpha \approx 0,05$ , ble analysert videre på MALDI-TOF-MS. Dette for å vise hva de forskjellige fraksjonene inneholdt. Annotering av SEC – topper ble utført ved å sammenlikne  $m/z$  i MS-spekteret med identifiserte  $m/z$  for uderivatiserte KOS. Tabell 7.1 viser hvilke produkter som befant seg i de ulike toppene fra SEC – kromatogrammet for W479A. Denne tabellen ble også brukt til annotering av toppene i SEC-kromatogrammene til de andre mutantene. Dette er fordi retensjonstiden for de identifiserte hydrolyseproduktene er også lik for de andre mutantene.

**Tabell 8.1:** Oversikt over hydrolyseproduktene fra nedbrytning av kitosan ( $F_A = 0,65$ ) med W479A etter angitte minutter.

	Tid (min)	KOS	m/z
<b>DIMER</b>	1000-1060	A2	447,62
		A2	563,06
<b>TETRAMER</b>	940-990	D2A2	767,85
		D1A3	809,86
		A4	850,92
<b>HEKSAMER</b>	870-900	D3A3	1132,74
		D2A4	1173,96
		D2A4	1174,95
		D2A4	1190,9
		D1A5	1217,14

