

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Instituttet for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap ved Universitetet for Miljø- og Biovitenskap (UMB) under veiledning av professor Morten Sørli. Studiet har vært en del av et større forskningsprosjekt ved Bioorganisk gruppe i samarbeid med Protein Engineering and Proteomics (PEP) gruppa.

Jeg vil først og fremst takke veilederen min, professor Morten Sørli, for god hjelp, veiledning og oppfølging under arbeidet. I tillegg vil jeg takke Anne Grethe Hamre, Anne Line Norberg og Kristine B. Eide for all hjelp og gode råd på laben.

En stor takk til mine studievenninner Silje Benedicte Lorentzen, Hanne Hillestad Wold og dere andre, for å ha gjort dette til et spennende og ikke minst kjekt år på laben. Tilslutt vil jeg takke familie, venner og kjæreste.

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	VII
Abstract.....	IX
Forkortelser	XI
1. Introduksjon	1
1.1 Karbohydrater	1
1.2 Kitin og kitosan.....	2
1.2.1 Kitin	2
1.2.2 Strukturen til kitin	2
1.2.3 Kitosan	3
1.2.3 Anvendelser av kitin og kitosan	4
1.3 Glykosylhydrolaser	5
1.3.1 Klassifisering	5
1.3.2 Struktur.....	5
1.3.3 Reaksjonsmekanismer til familie 18 og 19 glykosylhydrolaser	7
1.3.4 Prosessivitet	9
1.4 Kitinaser: familie 18 av glykosyl hydrolasene	10
1.4.1 Struktur.....	10
1.4.2 Mekanisemen til familie 18 glykosylhydrolaser	12
1.4.3 Serratia kitinaser	14
1.4.4 ChiA	14
1.5 Seterettet mutagenese	16
1.6 Mål med oppgaven.....	18
2. Materialer	19
2.1 Laboratorieutstyr	19
2.2 Kjemikalier	22
2.3 Proteiner og substrater	23
2.4 Bakteriestamme	23
2.5 Plasmid	24
2.6 Kits	24
2.7 Programvare.....	25
3. Metoder	27
3.1. Design av mutanter	27
3.1.2 Design av primere	27
3.1.3 Oppdyrking av bakteriestamme	28
3.1.4 Isolering av plasmid fra <i>E.Coli</i> kultur.....	28
3.1.5 DNA konsentrasjon (NanoDrop 1000).....	30
3.1.6 Seterettet mutagenese.....	30
3.1.7 Polymerase chain reaction (PCR).....	31
3.1.8 Utfelling av plasmid.....	32
3.1.9 Transformering av TOP10 superkompetente <i>E.Coli</i> celler.....	33
3.1.10 Oppdyrking av transformanter.....	34
3.1.11 Tillaging av frysestock.....	34
3.1.12 Sekvensering av plasmid	35
3.2 Produksjon av ChiA mutanter.....	36
3.2.1 Overekspresjon av ChiA.....	36
3.2.2 Periplasmatisk Ekstrakt	36
3.2.3 Rensing av aktive mutanter på kitinkolonne	37
3.2.4 Sodium Dodecyl Sulfate-Polyakrylamid Gel Elektroforese (SDS-PAGE).....	38
3.2.5 Oppkonsentrering av proteinløsning med amiconrør	40

3.2.6 Fluorimetrisk bestemmelse av proteinkonsentrasjon ved hjelp av Bradfordmetoden	41
3.2.7 Kontroll av enzymaktivitet.....	42
3.3 Fremstilling av Kitosan	43
3.3.1 ¹ H NMR-analyse for bestemmelse av acetyleringsgrad (F _A) av kitosan	44
3.4 Nedbrytning av kitosan.....	46
3.4.1 Oppløsning av kitosan	46
3.4.2 Degradering av Kitosan (F _A =0,65) med ChiA mutanter	47
3.5 Kjernemagnetisk resonans (NMR).....	47
3.5.1 Prøveopparbeidelse ¹ H NMR.....	47
3.5.2 Analyse av nedbrutt kitosan ved hjelp av ¹ H NMR	48
3.5.3 Tolkning av ¹ H NMR spekter	49
3.6 Størrelses eksklusjonskromatografi (SEC)	51
3.7 Massespektrometri (MS)	52
3.7.1 Annotering av topper fra SEC kromatogram ved hjelp av MALDI-TOF MS.....	53
3.7.2 Tolkning av MS-spekter ved annotering av topper	53
3.7.3 2-Aminoacridone (AMAC) derivatisering av kitooligosakkarider	53
3.7.4 Rensing av AMAC-derivatiserte kitooligosakkarider på C-18 kolonne	54
3.7.5 Analyse av AMAC-derivatiserte kitooligosakkarider ved hjelp av MALDI-TOF-TOF massespektrometri	55
3.7.6 Tolkning av MS-spektre for AMAC-derivatiserte prøver	56
3.8 Enzymatisk Hydrolyse av β-kitin.....	57
3.8.1 Substratforsøk	57
3.8.2 Tillaging av Standard	57
3.8.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	58
3.8.4 Bearbeiding av HPLC data	59
4. Resultater	61
4.1 Valg av seterettede mutanter.....	61
4.1.2 Mutasjonsanalyse	62
4.2 Seterettet mutagenese	64
4.2.1 Sekvensering	64
4.3 Rensing av aktive mutanter på kitinkolonne	66
4.3.1 Isolering av ChiA T276A.....	66
4.3.2 Fluorimetrisk bestemmelse av protein konsentrasjon.....	68
4.3.3 Aktivitetstest	68
4.4 Fremstilling av kitosan	70
4.5 Nedbrytning av kitosan F_A=0,65	71
4.5.1 ¹ H NMR.....	71
4.5.2 Oppsummering.....	78
4.6.1 R172A	79
4.6.2 E473A	80
4.6.3 T276A	80
4.7 Massespektrometriske analyser av kitooligosakkarider (MS)	82
4.7.1 Subsetepreferanser for ChiA villtype, R172A og T276A	82
4.8 Nedbrytning av β-kitin	83
4.8.1 HPLC av nedbrutt β- kitin	84
4.8.2 Oppsummering av alle HPLC resultatene	89
5. Diskusjon	92
5.1 Nedbrytning av kitosan med en F_A= 0,65	93
5.1.1 ¹ H NMR-analyse av nedbrytningsprodukter	93
5.1.2 Size exclusion chromatography; Oligomer-distribusjon.....	94
5.1.3 Sekvensering	95
5.2 Nedbrytning av β-kitin	95

6. Oppsummering og videre arbeid.....	98
6.1 ChiA R172A.....	98
6.1.1 Videre arbeid med ChiA R172A.....	98
6.2 ChiA T276A.....	98
6.2.1 Videre arbeid med ChiA T276A.....	98
6.3 ChiA E473A.....	99
6.3.1 Videre arbeid med ChiA E473A.....	99
6.4 Videre arbeid med polare residuer i ChiA.....	99
7. Referanser	100
8. Vedlegg	106
8.1 Vedlegg A.....	107
8.2 Vedlegg B.....	109
8.2.1 Isolering av ChiA R172A.....	109
8.2.2 Isolering av ChiA E473A.....	111
8.3 Vedlegg C.....	113
8.4 Vedlegg D	115
8.4.1 Ukesnedbrytning- ChiA R172A.....	115
8.4.2 Ukesnedbrytning- E473A.....	116
8.5 Vedlegg E.....	117
8.5.1 Polymertopp- R172A.....	117
8.5.2 Polymertopp E473A.....	117
8.6 Vedlegg F	118
8.6.1 Utregning av % teoretisk nedbrytning av β -kitin.....	118
8.6.2 HPLC resultater fra nedbrytning av β -kitin	118

Sammendrag

Denne oppgaven er skrevet som en del av et større forskningsprosjekt hvor det overordnede målet er å utvikle enzymer som mest mulig effektivt degraderer den uløselige biopolymeren kitin, og dets vannløselige analoge kitosan (delvis deacetylerert kitin) til oligosakkarider av en gitt lengde. Aromatiske residuer har blitt studert i tidligere studier, og har vist seg å være viktige for både enzymets spesifisitet og substrat posisjonering. I denne oppgaven var målet å studere sterkt interagerende polare residuer i det aktive setet i kitinase A, og hvilken effekt disse har for enzymets spesifisitet og substrat posisjonering.

Kitin er et uløselig lineært homopolysakkarid som består av repeterte β -(1-4)-koblede N-acetyl-D glukosamine enheter (GlcNAc eller A), og er en vanlig bestanddel i eksoskjelettet hos leddyr, insekter, krepsdyr, og en fundamental komponent i celleveggen i sopp.

I den første delen av oppgaven, ble kitinase A mutanter laget ved seteretettet mutagenese. Tre aktive og tre inaktive mutanter ble laget; R172A, E473A, T276A, E315Q/R172A, E315Q/E473A og E315Q/T276A. Mutantene ble isolert, rensset og tilslutt ble DNA-konsentrasjonene målt.

I den andre delen av oppgaven ble kitosan med en acetyleringsgrad lik 0,65 brukt til å studere de aktive mutantene sin aktivitet mot det løselige substratet. Dette ble gjort gjennom ^1H NMR spektroskopi og størrelses eksklusjonskromatografi. Videre ble MALDI-TOF-TOF MS/MS brukt til å studere subsetepreferanser (acetylerert eller deacetylerert) av derivatiserte kitooligosakkarider. R172A viste absolutt preferanse for en acetylerert enhet i subsete -1, mens ingen andre klare preferanser ble identifisert. T276A viste sterk preferanse for en acetylerert enhet i subsete -1, -3 og -4. Det var ingen klare preferanser for acetylerert eller deacetylerert enhet i subsete -2. Kitinase A villtype fra tidligere studier viser sterk preferanse for en acetylerert enhet i subsete -4 og -2, og en absolutt preferanse for en acetylerert enhet i subsete -1.

I den tredje delen av oppgaven ble nedbrytning av β -kitin studert ved hjelp av "*High pressure Liquid Chromatography*". Forholdet mellom dimer og monomer ble bestemt, og kan gi informasjon om enzymets prosessive mekanisme. Mutasjon av R i posisjon 172 og E i posisjon 473 påvirket ikke enzymets prosessive aktivitet mot β -kitin i stor grad ved sammenlikning med kitinase A villtype. T i posisjon 276 reduserte enzymets prosessive aktivitet ved sammenlikning med kitinase A villtype.

Resultatene indikerer at noen polare aminosyrer i det aktive setet er viktige for enzymets prosessive mekanisme, mens andre er viktige for posisjonering av substratet i det aktive setet.

Abstract

This master thesis was written as a part of a bigger research project where the overall goal is to develop enzymes that efficiently degrade the insoluble biopolymer chitin, and its water soluble analogue chitosan into oligosaccharides with a fixed length. Aromatic residues in the catalytic domain in chinases have been studied earlier, and have proven to be important for both substrate positioning and the enzymes processive activity. In this study strong interacting polar residues in the catalytic site of chinase A were studied. The goal was to get a better understanding of how the strong interacting polar residues affect the enzymes processivity and positioning of the substrate in the catalytic site.

Chitin is an insoluble polysaccharide built up of repeating β -(1-4)-linked N-acetyl-D glucosamine units (GlcNAc or A). The polysaccharide is a structural component in the exoskeleton of arthropods, insects and crustaceans, and is also found in the cell wall of most fungi.

In the first part of the study Chinase A mutants were constructed by site directed mutagenesis. Three active mutants and three inactive mutants were made; R172A, E473A, T276A, E315Q/R172A, E315Q/E473A and E315Q/T276A. The mutants were isolated, purified and DNA concentrations were measured.

In the second part of the study the active mutants were used to study the degradation of chitosan with a degree of acetylation=0,65 through the use of ^1H NMR spectroscopy and Size exclusion chromatography. Furthermore MALDI-TOF-TOF MS/MS was used to sequence the fully degraded chitosan products. The subsite preferences showed that R172A had absolute preference for an acetylated unit in subsite -1 while no other preferences were obvious. T276A showed a strong preference for a acetylated unit in subsite -1, -3 and -4. There were no obvious preferences in subsite -2. Chinase A wild type has a strong preference for acetylated units in subsite -4 and -2, while it also has an absolute preferences for an acetylated unit in subsite -1.

The third part of the study was used to study the degradation of β -chitin, through high-pressure liquid chromatography. The dimer/monomer ratio was determined, and used to study the processive mechanism compared to Chinase A. The mutations of R in position 172A and

E in position 473A didn't affect the degree of processivity to a high extent. T in position 276 reduced the processive mechanism compared to Chinese A wild type.

The results can indicate that some polar amino acids are important for the enzymes processive manner, while some are important for the positioning of the substrate.

Forkortelser

Forkortelse	Definisjon
µg	Mikrogram
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
4-MU	4-metylumbelliferyl
4-MU-(GlcNAc) ₂	4-metylumbelliferyl-β-D-N,N'-diacetylchitobiose
α	Spaltningsgrad
AMAC	2-amacridone
Ala (A)	Alanin
Arg (R)	Arginin
BSA	Bovin Serum Albumine
CBP	Kitinbindende protein
ChiA	Kitinase A
ChiB	Kitinase B
ChiC	Kitinase C
Da	Dalton
dH ₂ O	Destillert vann
DHB	2,5-dihydrobenzoic acid
DMSO	Dimetyl Sulfoxid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
DP	Polymeriseringsgrad
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
F _A	Acetyleringsgrad
GlcN	D-glukosamin
GlcNAc	N-acetyl-D-glukosamine
Glu (E)	Glutamat
Glu (Q)	Glutamin
HPLC	High Performance Liquid chromatography

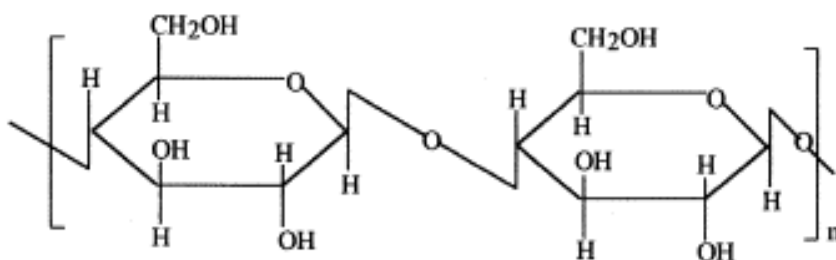
kb	Kilobaser
kDa	KiloDalton
KOS	Kitooligosakkarider
LB	Lysogeny broth
Leu (L)	Leucin
M	Molar (mol/L)
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
ml	Milliliter
mM	Millimolar (millimol/L)
MOPS	3-(N-morfolin) propansvovelsyre
MS	Massespetrometri
MS/MS	Tandem massespektrometri
MW	Molekylvekt
MWCO	Molecular Weight Cut Off
<i>m/z</i>	Masse/ladning
nm	Nanometer
NMR	Kjernemagnetisk resonans
Phe (F)	Fenylalanin
PMSF	Phenyl-methyl sulfonylfluorid
rpm	Rotasjon per minutt
RNA	Ribonukleinsyre
SEC	Størrelses eksklusjonskromatografi
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyakrylamide Gel Elektroforese
TOF	Time-of-flight
Trp (W)	Tryptofan
Thr (T)	Treonin
Å	Ångstrøm

1. Introduksjon

1.1 Karbohydrater

Karbohydrater er molekyler med den generelle kjemiske formel $(CH_2O)_n$. På bakgrunn av molekylstørrelse blir karbohydrater delt inn i monosakkarider, oligosakkarider og polysakkarider (Hu 2010). Det finnes utallige måter å sette sammen karbohydrater på, hvor den enkleste karbohydrateten er monosakkarid. Oligosakkarider og polysakkarider består av glykosidbindinger mellom monosakkaridene. Glykosidbindingene er metastabile, og dermed hydrolyseres bindingene *in vivo* (Mathews et al. 2000). Oligosakkarider er bygget opp av to eller flere monosakkarider, men sjeldent mer enn ti (Ebersbach et al. 2010). Polysakkarider er bygget opp på lignende måte som oligosakkarider, men kan bestå av ti til flere tusen monosakkarider bundet sammen.

Karbohydrater spiller en viktig rolle i mange ulike biologiske systemer som levende organismer drar nytte av (Mathews et al. 2000). Polysakkarider og oligosakkarider blir benyttet til alt fra lagring og struktur til å spille en viktig rolle i avanserte signaliseringsprosesser (Davies, Gi & Henrissat, B 1995). Ved fotosyntese benytter planter CO_2 fra atmosfæren og omgjør det til karbohydrater (glukose) og oksygen. Planter oppbevarer glukose som stivelse eller cellulose (se figur 1.1)(Mathews et al. 2000).



Figur 1.1: Kjemisk struktur av cellulose (Kumar & Majeti 2000)

1.2 Kitin og kitosan

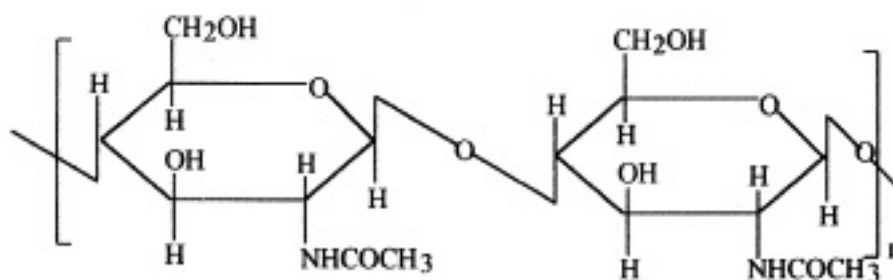
Enzymatisk degradering av kitin og kitosan er av stor interesse både økonomisk og biologisk, og vil bli beskrevet i de neste avsnittene (Zakariassen et al. 2009b).

1.2.1 Kitin

Ordet *Kitin* er det greske ordet for panserskjorte, og ble først oppdaget i 1811 av Henri Braconnot (Hartl et al. 2012). Bortsett fra cellulose, er kitin den bipolymeren det finnes mest av i naturen, og er derfor betydningsfull både biologisk og økonomisk. Polymeren er funnet i lavere organismer, slik som i eksoskjelettet hos leddyr, insekter og krepsdyr (hummer og reker). Kitin er en fundamental komponent i celleveggen i sopp, bløtdyr, og nebbet til blekkspruter (Li et al. 2013; Zakariassen et al. 2010).

1.2.2 Strukturen til kitin

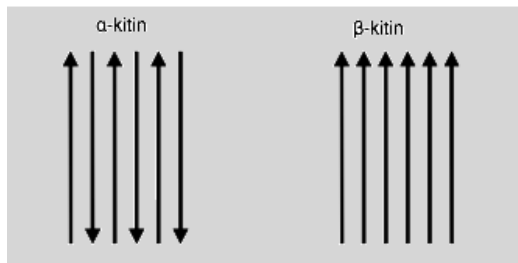
Kitin er et uløselig lineært homopolysakkarid som består av repeterte β -(1-4)-koblede N-acetyl-D glukosaminheter (GlcNAc), hvor annenhver er rotert 180° i forhold til neste (se figur 1.2) (Eide et al. 2012). Kitin sin kjemiske struktur ligner cellulose, hvor acetamidgruppen på karbon 2 er en hydroksylgruppe hos cellulose (Kurita 2006b).



Figur 1.2: Kjemisk struktur av kitin (Kumar & Majeti 2000)

I naturen finnes hovedsakelig to forskjellige krystallinske former for kitin; α og β -kitin. α -kitin er den vanligste og mest stabile formen, hvor kitinkjedene er ordnet antiparallelt i forhold til hverandre (se figur 1.3) (Rudall & Kenchington 1973). Kitinkjedene er pakket tett

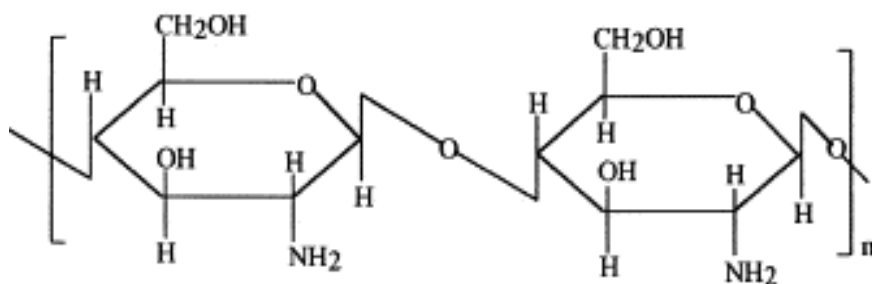
sammen av intramolekylære hydrogenbindinger, og er grunnen til at denne formen er fullstendig uløselig i vann (Kurita 2006a). I β -kitin er kitinkjedene ordnet parallelt i forhold til hverandre (se figur 1.3), og er mindre tettpakket enn α -kitin på grunn av mindre sterke intramolekylære hydrogenbindinger (Horn et al. 2006c; Kurita 2006a).



Figur 1.3: Posisjoneringen av kitinkjedene i α og β -kitin.

1.2.3 Kitosan

Kitosan er en organisk forbindelse som lages ved deacetylering av kitin, og er dermed en vannløselig analog av kitin (se figur 1.4). Ved deacetylering svekkes eller brytes de inter- eller intramolekylære hydrogenbindingene uten å ødelegge hydroksylbindingene. En betegnelse på ulike former for kitosan er graden av N-deacetylering (F_A), og polymeren er løselig i vann med en acetyleringsgrad på ca 65 % og lavere ($F_A=0,6,5$ og lavere) (Kumar & Majeti 2000).



Figur 1.4: Kjemisk struktur av kitosan (Kumar & Majeti 2000)

1.2.3 Anvendelser av kitin og kitosan

Kitin har ikke like stort anvendelsesområde som kitosan som skyldes blant annet den dårlige løseligheten i vann. Likevel har kitin flere anvendelsesområder ettersom polymeren er et naturlig, biologisk nedbrytbart, og antibakterielt stoff (Kuk et al. 2005).

Kitin sin delvise deacetylte og vannløselige analog kitosan brukes i matindustrien, i farmasøytisk industri, i vannrensningssystemer og som et antimikrobielt tilsetningsstoff (Sørli et al. 2012). Innen landbruk har kitin er stort potensial ved at det forhindrer soppangrep, virus og bakterieinfeksjoner som bedrer kvaliteten av avlinger (El Hadrami et al. 2010). Kitosan er en effektiv hemostatisk agent som forbedrer sårheling (Brandenberg et al. 1984), og i kosmetikkindustrien benyttes kitosan som en ”fukthetsgiver” i for eksempel kremer (Kumar & Majeti 2000).

1.3 Glykosylhydrolaser

Karbohydrater i form av mono-, di-, oligo- og polysakkarider, spiller en unik rolle i naturen, og antall mulige kombinasjoner å sette sammen disse karbohydratene på er divergerende. Som nevnt før, bidrar karbohydrater i mange ulike biologiske prosesser, og dette er årsaken til at det er mange ulike enzymer som hydrolyserer sakkaridbindingene (Davies, G. & Henrissat, B. 1995). Glykosylhydrolaser, også kalt glykosidaser hydrolyserer glykosidbindingene mellom to eller flere karbohydrater, eller mellom en karbohydrat og en ikke-karbohydrat gruppe (Davies, G. & Henrissat, B. 1995).

1.3.1 Klassifisering

Glykosylhydrolaser blir klassifisert basert på likheter i aminosyresekvensen til enzymene. Prinsippet bak denne klassifiseringsmetoden er at relasjon mellom sekvens og struktur kan inneholde informasjon om struktur og mekanisme. ”The Carbohydrate-Active Enzyme database” (CAZy) er en database som inneholder karbohydrataktive enzymer, og tar utgangspunkt i klassifiseringsmetoden nevnt over. (Henrissat & Davies 1997).

1.3.2 Struktur

Det katalytiske domenet består som oftest av flere domener, et katalytisk domene og et eller flere ikke-katalytiske domener. De katalytiske domeneene er substratbindende, men har også mange ukjente funksjoner (Davies, G. & Henrissat, B. 1995). Subsetene i glykosidaser er merket fra $-n$ til $+n$, hvor $-n$ representerer den ikke-reduserende enden og $+n$ den reduserende enden av sukkeret. Hydrolyse av glykosidbindingen skjer alltid mellom subsetene -1 og $+1$, mens setene over og under stabiliserer de eventuelle konformasjonsendringene i substratet (Davies et al. 1997).

Enzymer med kitinolytisk aktivitet kan deles inn i to ulike typer på bakgrunn av hvor enzymet binder seg på substratet: endokitinaser og eksokitinaser. Endokitinaser binder tilfeldig ved interne områder på substratet, og har ofte en relativt åpen substratbindingskløft. Eksokitinaser hydrolyserer kitin fra den reduserende eller ikke-reduserende enden, og har oftere en dypere substratbindende kløft enn endokitinaser (Bruberg et al. 2000; Norberg et al. 2011a).

Den samlede topologien til det aktive setet til glykosylhydrolaser kan deles inn i tre kategorier uavhengig av den katalytiske mekanismen til enzymet (Davies, G. & Henrissat, B. 1995). De

tre topologiene som har blitt klassifisert er; 1) Lomme eller krater, 2) Kløft eller grop, og 3) Tunnel (se figur 1.5)

1) Lomme/Krater

Lomme/krater (se figur 1.5) er optimal for substrater med mange tilgjengelige ender på overflaten, og tilhører enzymer med eksoaktivitet. Enzymer som benytter seg av denne type topologi er lite effektive på fibrøse substrater som cellulose (Davies, G. & Henrissat, B. 1995)

2) Kløft/grop

På grunn av den åpne strukturen ved kløft- eller groptopologi (se figur 1.5), tillates tilfeldig binding av sukkerenheter i substrater. Denne topologien er ofte funnet hos enzymer med endoaktivitet (Davies, G. & Henrissat, B. 1995).

3) Tunnel

Topologien til et tunnelformet aktivt sete tillater enzymet å forbli bundet til substratet under hydrolyse, noe som karakteriserer prosessive enzymer (se figur 1.5) (Davies, G. & Henrissat, B. 1995).

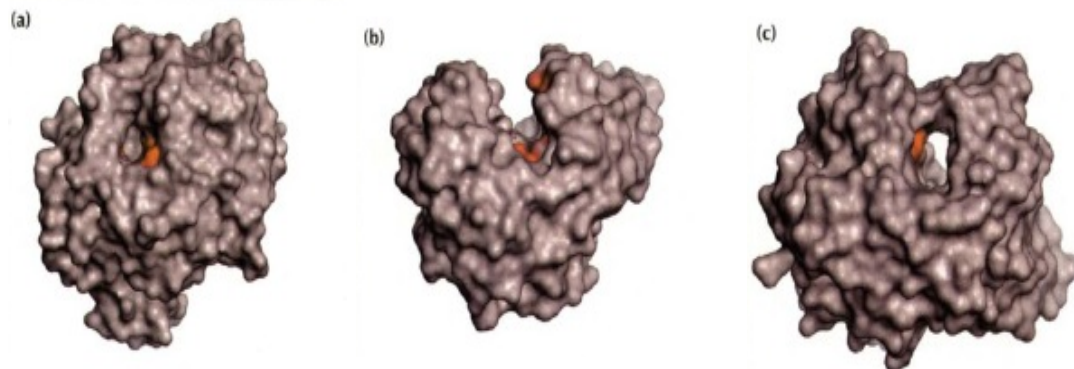


Fig 1.5: Topologien til det aktive setet i glykosylhydrolaser; a) Lomme/Krater, b) Kløft/grop, c) Tunnel (Davies, G. & Henrissat, B. 1995).

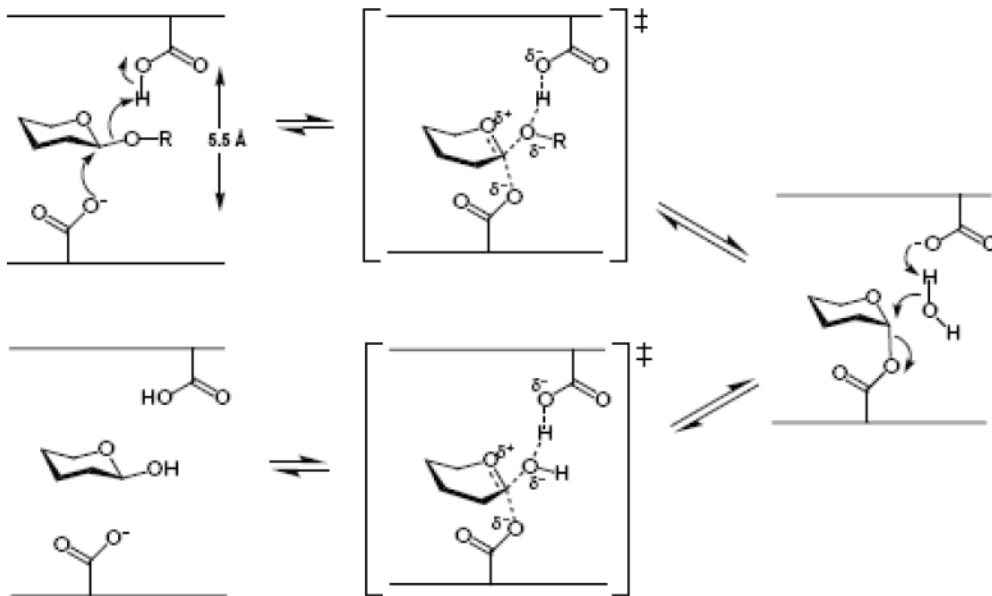
1.3.3 Reaksjonsmekanismer til familie 18 og 19 glykosylhydrolaser

Glykosylhydrolaser har to generelle mekanismer for hydrolyse av glykosidbindinger som resulterer i en bevarende eller en inverterende konfigurasjonsendring av den anomeriske karbonet i substratet (Rye & Withers 2000). Hydrolyse av glykosidbindingene krever tilstedeværelsen av to sure aminosyrer (Asp eller Glu) i det aktive setet; en protondonor og en nukleofil/base (Van Den & Lambertur). De katalytiske gruppene er posisjonert $\sim 5,5$ Å fra hverandre i en bevarende mekanisme og ~ 10 Å fra hverandre i en inverterende mekanisme. På grunn av store avstander ved en inverterende mekanisme deltar et vannmolekyl i reaksjonen (se avsnitt 1.3.3.2). Posisjonen til protondonoren er identisk i begge mekanismene, hvilket vil si at den er i hydrogenbindende avstand fra glykosidoksygenet (Davies, G. & Henrissat, B. 1995).

1.3.3.1 Bevarende mekanisme

En bevarende hydrolyse foretas ved en dobbel forskyvningsmekanisme, som resulterer i at konfigurasjonen av det anomere karbonet opprettholdes. To aminosyrer tar del i katalysen i det aktive setet; en nukleofil og en base (Bravman et al. 2001). Den katalytiske basen ligger nær det anomere karbonet, og den relative avstanden mellom de katalytiske residuene er $\sim 5,5$ Å (Davies, G. & Henrissat, B. 1995)

I det første trinnet blir glykosidoksygenet protonert av den ene syrekatalysatoren (AH), samtidig som bindingen brytes. Ved nukleofil assistanse fra den andre karboksylsyren dannes et kovalent substratenzym-intermediat via et oksokarbeniumion. I det neste steget deprotonerer det residuet som tidligere fungerte som en syrekatalysator et vannmolekyl, og den innkommende nukleofilen angriper det anomere karbonet og sparker ut den utgående gruppen. Den stereokjemiske konfigurasjonen opprettholdes siden vannmolekylet angriper karbonet fra samme side som den utgående gruppen var bundet (se figur 1.6) (Davies, G. & Henrissat, B. 1995; Rye & Withers 2000).

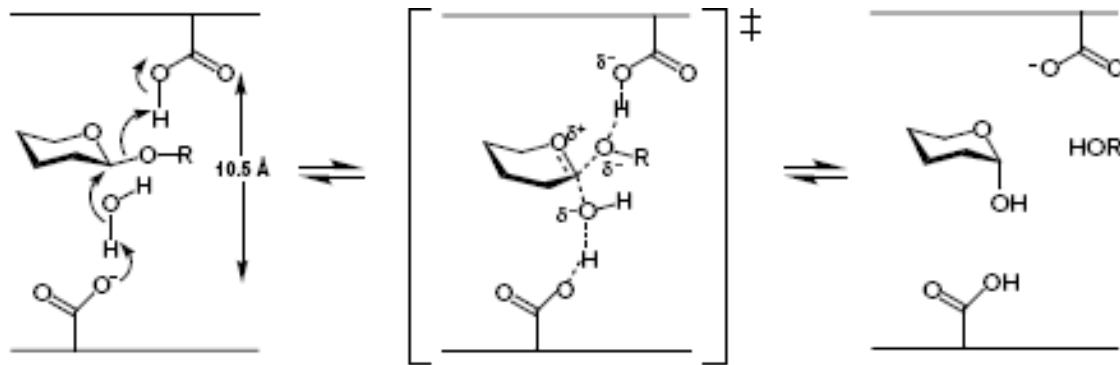


Figur 1.6: Bevarende mekanisme for glykosylhydrolaser (Rye & Withers 2000).

1.3.3.2 Inverterende mekanisme

En inverterende mekanisme foretas ved en enkel forskyvningsmekanisme, noe som resulterer i motsatt stereokjemisk konfigurasjon av det anomere karbonet. I en slik mekanisme sparkes den utgående gruppen ut, samtidig som vannmolekylet angriper det anomere karbonet (Davies, G. & Henrissat, B. 1995; Rye & Withers 2000).

To karboksylsyrer er aktive under en inverterende mekanisme hvor den ene fungerer som en syre og den andre fungerer som en base. Som nevnt over er det større avstand mellom de sure aminosyrene ved en inverterende mekanisme. Vannmolekylet kommer fra motsatte side av den katalytiske syren. Basen aktiverer vannmolekylet ved å ta til seg et proton, og det resulterende hydroksidionet angriper det anomere karbonet på sukkerkjeden (se figur 1.7) (Rye & Withers 2000).



Figur 1.7: Inverterende mekanisme for glykosylhydrolaser (Rye & Withers 2000).

1.3.4 Prosessivitet

Prosessivitet defineres som evnen til å forbli bundet til substratet mellom påfølgende hydrolytiske reaksjoner i degrading av et polysakkarid. Assosieringen med kitinpolymeren er det hastighetsbestemmende trinnet i hydrolysen, og dermed vil prosessiv mekanisme redusere antall ganger enzymet må utføre den energetisk ugunstige prosessen som det å måtte assosiere seg med polysakkariden (Horn et al. 2006a; Zakariassen et al. 2010).

Prosessive enzymer har ofte lange, dype og tunnel-lignende aktive seter med konserverte aromatiske residuer som interagerer med substratet (Payne et al. 2012). Av den grunn ”lukkes” substratet inni det aktive setet i ulik grad under hydrolysen. Videre kan enzymer deles inn i to grupper basert på evnen de har til å ”lukke” substratet i det aktive setet; gruppe én og gruppe to. Gruppe én er enzymer som delvis ”lukker” substratet i det aktive setet, mens gruppe to er enzymer som ”lukker” substratet fullstendig i det aktive setet. Den sistnevnte ”lukker” substratet enten ved at enzymet har en asymmetrisk struktur, eller ved at den omringer substratet som en slags ring og holder substratet på plass. Fullstendig inneslutning av substratet fører til at enzymet og substratet er topologisk bundet sammen, og er en følgende forklaring på hvorfor slike enzymer som oftest viser til høyere grad av prosessivitet. Det er fortsatt uklart hvor mye denne ”inneslutningen” har å si for prosessivitet, ettersom to enzymer med samme struktur i det aktive setet viser ulik prosessiv aktivitet (Breyer & Matthews 2001). Enzymer i gruppe én som delvis lukker substratet i det aktive setet, kompenseres ofte med å ha en stor overflate som interagerer med substratet. Enzymet kan da binde med moderat affinitet ved multiple posisjoner langs polymerkjeden, noe som gjør det lettere for substratet å gli gjennom det aktive setet under katalysen. Dette har vist seg å være fordelaktig

ettersom innelukkede substrater med få, men sterke bindinger til det aktive setet, kan resulterer i at enzymet "henger fast" på substratet (Breyer & Matthews 2001; Sørli et al. 2012).

1.4 Kitinaser: familie 18 av glykosylhydrolasene

I 1969 utførte Jaime Monreal og Elwyn T. Reese banebrytende studier som konkluderte med at *Serratia marcescens* var den mikroorganismen av totalt 100 som degraderte kitin mest effektivt (Monreal & Reese 1969). På grunn av dette har det kitinolytiske maskineriet fra *S. marcescens* blitt benyttet som et modellsystem for enzymatisk nedbrytning av kitin (Vaaje-Kolstad et al. 2013).

Glykosylhydrolaser som degraderer kitin (har kitinolytisk aktivitet) kalles kitinaser, som nevnt i avsnitt 1.3. De tilhører familie 18 og 19 av glykosylhydrolasene. Familie 18 kitinaser finnes i ulike prokaryote og eukaryote organismer, mens familie 19 kitinaser er funnet i høyere plantearter og i gram-positive bakterier. Organismer som inneholder kitin er avhengig av enzymer slik som kitinaser til å bryte ned kitin i løpet av sin normale livssyklus. Enkelte planter produserer kitinaser som en del av deres forsvarssystem mot patogene sopp, og i tillegg har mange sopp et kitinolytisk maskineri brukt til å konvertere kitin til komponenter som videre kan brukes som en energikilde (Gooday 1999).

Kitinaser kan brukes til å omgjøre materialer som inneholder kitin til nyttbare komponenter, og er derfor av stor interesse innen bioteknologien (Brurberg et al. 2000). Inhibering av kitinaser som tilhører glykosylhydrolase familie 18 er et målområde innen utviklingen av medisiner mot allergi og inflammatoriske sykdommer (Sørli et al. 2012).

1.4.1 Struktur

Glykosylhydrolaser består ofte av av flere domener, et katalytisk domene og et eller flere ikke-katalytiske domener (Davies, G. & Henrissat, B. 1995). Familie 18 glykosylhydrolaser er klassifisert i subfamilie A, B og C på bakgrunn av likhetstrekk i aminosyresekvensen i det katalytiske domenet. Det katalytiske domenet i familie 18 glykosylhydrolaser består av en $(\beta/\alpha)_8$ barrel-struktur ("tønne") som er bygget opp av åtte parallelle β -bånd som danner en sheet, omringet av åtte α -helikser. Korte loops kobler sammen heliksene og båndene (se figur 1.8) (Wierenga 2001).



Figur 1.8: Viser TIM-barrel ovenfra (langs aksen til tønne) med innsyn på det katalytiske setet. Åtte α -helikser vises i rødt og åtte β -bånd i grønt (Wierenga 2001).

S. marcescens produserer tre GH familie 18 kitinaser: kitinase A (ChiA), kitinase B (ChiB) og kitinase C (ChiC). Det katalytiske domenet i ChiA, ChiB og ChiC inneholder et konservert motiv, DXXDXDXE og er lokalisert på β -strand nummer fire (Vaaje-Kolstad et al. 2013). Glutamat residue (E) i dette sekvensmotivet er den katalytiske syren/basen som tar del i katalysen (van Aalten et al. 2001b).

TIM-tønna i subfamilie A glykosylhydrolaser består av en insersjon av et lite $\alpha + \beta$ domene, som er manglende i subfamilie B og C glykosylhydrolaser. Krystallstrukturen av ChiA og ChiB som tilhører subfamilie A, avslørte en dyp substratbindende kløft som delvis er forårsaket av denne insersjonen. ChiC som tilhører subfamilie B mangler denne insersjonen, og er grunnen til at den substratbindende kløften er mer åpen som kan muligens forklare ChiC sin endoaktivitet (se avsnitt 1.3.2) (Payne et al. 2012; Suzuki et al. 2002).

Sett bort ifra likhetene mellom det substratbindende domenet i ChiA og ChiB, degraderer de kitin i motsatt retning. ChiA degraderer kitin fra den reduserende enden, og ChiB degraderer fra den ikke-reduserende enden. ChiA, ChiB og ChiC har i tillegg et kitinbindende domene som forlenger den substratbindende kløften i motsatt retning. (Horn et al. 2006c; Vaaje-Kolstad et al. 2013).

Strukturen av det aktive setet hos kitinaser (ChiA, ChiB og ChiC) er relativt ulike, men deler også mange av de samme karakteristika, slik som solventeksponerte aminosyreresiduer. Tryptofan er involvert i bindingen mellom karbohydrater og glykosyl hydrolaser. Dersom sidekjeden til det aromatiske residuet og sukkerkjeden ligger co-planart, vil π -elektronene fra

de aromatiske residuene danne flere CH- π interaksjoner med sukkeret som resulterer i ”hydrophobic stacking”. Sammenlignet med hydrogenbindinger er ”hydrophobic stacking”-interaksjoner ikke-spesifikke og involverer et stort interaksjonsareal som er grunnen til at denne type interaksjon tenkes å fremme prosessivitet. En slik mekanisme forklarer også hvordan prosessive enzymer forblir bundet til substratet under hydrolyse, samtidig som det bundne substratet kan posisjoneres for en ny produktiv binding etter på. ”Hydrophobic stacking” reduserer energien under glidning gjennom det aktive setet og fungerer som en slags ”væskekappe” som substratet kan gli gjennom på (Varrot et al. 2003).

Til nå har ikke sterkt interagerende polare aminosyrers rolle i prosessivitet blitt studert.

1.4.2 Mekanismen til familie 18 glykosylhydrolaser

Familie 18 glykosylhydrolaser hydrolyserer kitin gjennom en substrat-assistert mekanisme som bevarer den stereokjemiske konfigurasjonen til det anomeriske karbonet (se avsnitt 1.3.3.1) (Terwisscha van Scheltinga et al. 1995; Tews et al. 1997). Tidligere forskning har vist at familie 18 kitinaser initierer katalyse ved forvrenging av kitin-substratet i -1 subsete vedsiden av glykosidbindingen (Payne et al. 2012; Tews et al. 1997).

Asp-140, Asp-142 og Glu-144 er konserverte aminosyrer i de fleste familie 18 kitinaser, og deltar i ulike steg under katalysen. Enzymet binder substratet i -1 subsete som nevnt over, og dette fører til en konformasjonsendring av pyranose-ringen fra stolkonformasjon til båt- eller en ”skjev” båt konfigurasjon. En rotasjon av Asp-142 mot Glu-144, medfører muligheter til å danne hydrogenbindinger mellom hydrogenet som tilhører acetamido-gruppen, Asp-142 og Glu-144. Hydrolyse av oxazoliniumion-intermediatet fører til protonering fra Glu-144, og en rotasjon i Asp-142 som tilbakestillter aminosyren til sin opprinnelige posisjon, hvor den deler et proton med Asp-140 (se figur 1.9) (van Aalten et al. 2001a).

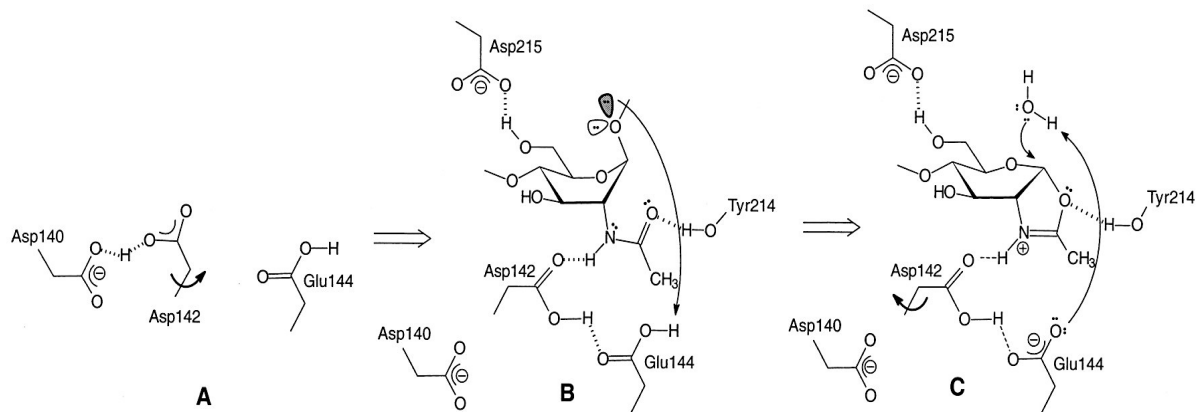
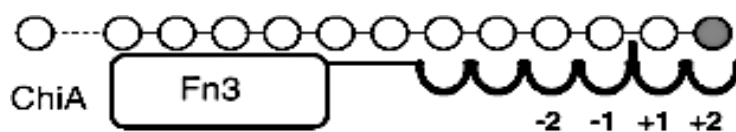


Fig 1.9: Substratassistert hydrolyse av kitin av ChiB og andre kitinaser fra familie 18. A) Enzymet før binding til substrat. B) Oxazolineion-intermediat dannelse ved binding til substrat. C) Bidrag fra vannmolekyl til hydrolyse av oxazolineion (van Aalten et al. 2001)

Ved prosessiv hydrolyse av kitin vil produktiv binding forekomme annenhver sukkerenhet. Grunnen til dette er at sukkerenhetene i kitin er rotert 180° i forhold til hverandre (se avsnitt 1.2.2), og enzymet forflytter seg to sukkerenheter frem til ny produktiv binding dannes. Ved initiell binding kan det første hydrolyseproduktet gi partalls- eller oddetallsprodukter, mens videre hydrolyse kun vil gi dimerer (Payne et al. 2012). Dermed vil dimer/monomer ratioen være høy, og kan brukes som en indikasjon på prosessivitet.



Figur 1.10: Figuren viser subsetene, det kitinbindende domenet, og antatt orientering av polymer substratet i ChiA (Horn et al. 2006b).

Hydrolyse av det løselige substratet kitosan gir et annerledes produktmønster enn ved degradering av kitin, og gir et kvalitativt mål for prosessivitet. Enzym-substrat komplekser som dannes ved prosessiv degradering kan være non-produktiv da sukkeret bundet i -1 subsete kan mangle en N-acetyl gruppe. Kitosankjeden vil da forflytte seg to enheter bortover

frem til ny produktivbinding dannes, og er grunnen til at lange partalls-oligomere dannes ved degradering av kitosan. Deler av komplekset dannet under prosessiv degradering kan komme av ikke-produktiv binding (Sørbotten et al. 2005).

1.4.3 Serratia kitinaser

S. marcescens er en gram-negativ jordbakterie som er klassifisert under Enterobacteriaceae (Hejazi & Falkner 1997), og er en av de mest effektive kitin degraderende bakteriene (Monreal & Reese 1969). Ved inkubasjon av *S. marcescens* med kitin produseres det tre familie 18 kitinaser (ChiA, ChiB og ChiC), lytisk polysakkarid monoyksygenase (CBP21), og en familie 20 kitobiase som degraderer endeproduktet kitobiose dannet av kitinasene (se figur 1.11) (Horn et al. 2006c). Det kitinolytiske maskineriet av *S.marcescens* er av stor interesse fordi det er den bakterien som har best karakterisert kitinolytisk maskineri (Payne et al. 2012; Vaaje-Kolstad et al. 2013).

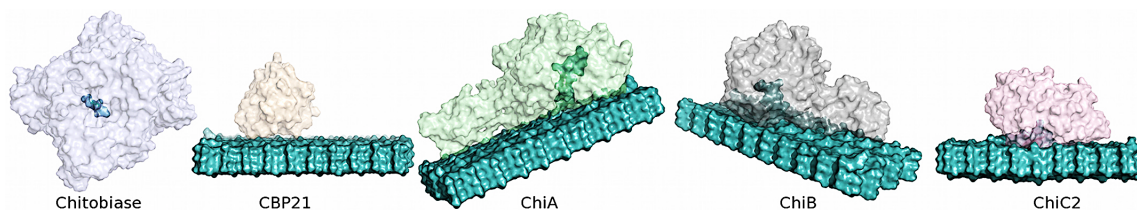


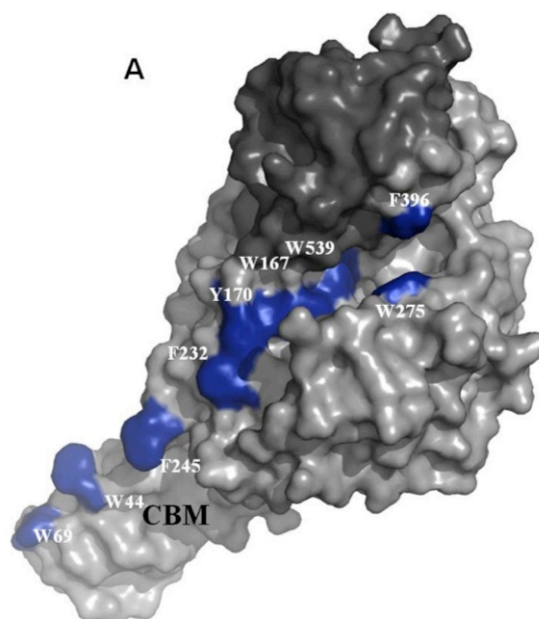
Fig 1.11: Oversikt av de ulike enzymene *S. marcescens* produserer. Familie 18 prosessive ChiA og ChiB og ikke-prosessive ChiC produseres. I tillegg til familie 20 kitobiase og CBP21. Enzymene vises sammen med substratet, som er farget turkis (Payne et al. 2012).

1.4.4 ChiA

ChiA er et prosessivt eksoenzym fra *S. marcescens* og hydrolyserer kitin fra den reduserendeenden. ChiA har seks substratbindende subsetter som går fra -4 til +2, og kløften er åpen fra begge sider. Av den grunn kan kitinkjeder entre den substratbindende kløften fra begge ender (Brurberg et al. 1996). Binding av lengre polymerkjeder skjer på den ikke-reduserende siden av det aktive setet (se figur 1.10). Det kitinbindende domenet (FnIII,

Fibronectin type 3 liknende domene) forlenger den substratbindende kløften mot den ikke-reduserende enden (Bruberg et al. 2000; Perrakis et al. 1994).

Aromatiske residuer i det aktive setet har vist seg å spille en fundamental rolle i kitinasers prosessive mekanisme (Horn et al. 2006a; Zakariassen et al. 2009a). Mutasjonen av disse reduserer enzymets prosessive aktivitet. Trp167 (-3 subsete) i ChiA har vist seg å være det viktigste residuet for prosessivitet (se figur 1.12) (Zakariassen et al. 2009a).

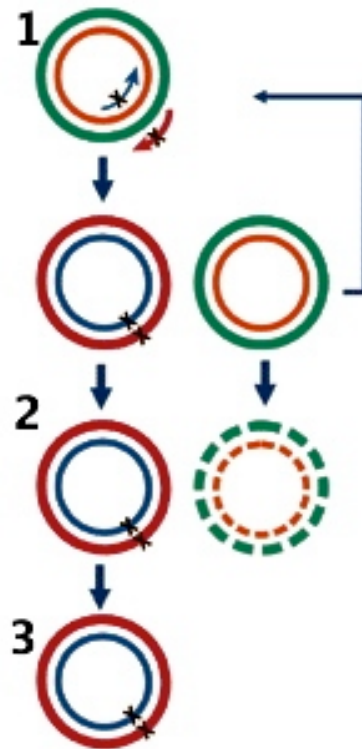


Figur 1.12: Figuren viser ChiA sin substratbindende kløft med aromatiske residuer som antas å være viktige for prosessiv mekanisme. Det kitinbindende domene (CBM) på den ikke reduserende enden er merket.

1.5 Seterettet mutagenese

Mutasjoner er ansvarlig for mye av diversiteten i naturen. Nukleotidsekvensen av et klonet DNA fragment kan forandres gjennom seterettet mutagenese. Ved bruk av syntetiske oligonukleotider som er komplementære med enkelttrådet DNA, men som inneholder ønsket mutasjon er det mulig å generere et nytt DNA templat med aktuell mutasjon. I tillegg til punktmutasjoner kan seterettet mutagenese brukes til å konstruere multiple mutasjoner, insersjoner og delesjoner (Tortora et al.).

In vitro seterettet mutagenese er en teknikk som kan brukes til å manipulere egenskapen til et spesifikt gen. Prosedyren baserer seg på bruk av en supercoilet dobbeltrådet DNA (dsDNA) vektor med genet av interesse innsatt. I tillegg er det nødvendig med to syntetiske oligonukleotid primerer med den ønskede mutasjonene. Begge primerene er komplementære til motsatte sider av vektoren, og forlenges ved bruk av en polymerase gjennom en syklus med vekslende temperaturer som er optimale for polymerasens aktivitet. Forlengelsen av oligonukleotid primerene genererer et mutert plasmid med ”staggered nicks”. ”Staggered nicks” betyr at endene mellom DNAet og plasmid vektoren er komplementære. Endestykkene har identisk nukleotidsekvens og kan betegnes ”sticky” fordi de kan binde til komplementære deler av andre DNA fragmenter. Ved endt PCR reaksjon behandles produktet med et restriksjonsenzym som kutter det ikke muterte ”foreldre” DNA templatet. Plasmidene med den ønskede mutasjonen transformeres deretter inn i ønskede celler (Agilent Technologies 2005).



Figur 1.11: Trinn 1-3 viser de ulike stegene forklart over ved seterettet mutagenese. 1) PCR syklus (denaturere, anneal og forlengelse av oligonukleotid primer), 2) Restriksjons enzymer som kutter det ikke-muterte "foreldre" DNA, 3) Transformering inn i ønskede celler (Agilent Technologies 2005).

1.6 Mål med oppgaven

Hovedmålet med oppgaven har vært å studere polare aminosyrer i det katalytiske setet i ChiA. Krystallstrukturer av det aktive setet i ChiA viser at de polare aminosyrene interagerer med substratet, og derfor kan det antas at de påvirker grad av prosessivitet og substratposisjonering.

Grad av prosessivitet og substratposisjonering ble bestemt for ChiA mutantene E473A, R172A og T276A. I tillegg ble det laget tre inaktive mutanter av ChiA; E315Q/E473A, E315Q/R172A og E315Q/T276A. Mutantene ble studert gjennom ulike analysemetoder med både kitin og kitosan, og tilslutt sammenlignet med ChiA villtypen.

2. Materialer

Utstyr, kjemikalier og instrumenter brukt i denne oppgaven kan leses om i denne seksjonen.

2.1 Laborieutstyr

Laborieutstyr	Spesifikasjon	Leverandør
Amiconrør	Ultra-15, 10 kDa Ultra-4, 10 kDa Ultracel-30 kDa	Millipore " "
Autoklavteip	13 mm	VWR
Automatpipetter	Finnpipetter	Thermo Scientific Thermolabsystems
Avtrekkskap	AV-100	Telstar
Bordrister	Swip	Edmund Bühler
Bordsentrifuge	Sigma 1-14	LABEX
Blåkorkrør	Cellstar [®] tubes 15 ml 50 ml	Greiner Bio-One " "
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
Dialysemembran	Vol/lengde: 2,0 ml/cm Vol/lengde: 8,0 ml/cm	Spectrum Lab, Inc. "
Dyrkningkolber	2 L	BD Falcon
Elektroforeseutstyr	Gelkjøringskammer Gelspenningskilde	Invitrogen VWR

2. Materialer

	Gelkniv	Nisahu
Eppendorfrør	1,5 ml 2,0 ml	Axygen "
Filter	0,22 µm Ultracell [®] , 10 kDa 0,45 µm Multiscreen Steritopp 0,22 µm 1,2 mm	Millipore " " " Whatmanfilter
Fluorometer	DyNA Quant 200	Hoefer
Fotoutstyr (gel)	Gelfotosystem GSF 1000 Lyskilde UV transuliminator	Bio-RAD Laboratories Kilab AS UVP, inc.
Frysetørker	Maxi Dry, SPD111V	Savant Speed Vac
GATC Bokser	"Til å sende DNA"	GATC Biotech AG
Glassutstyr		Schott-Duran
HPLC	Ultimate 3000 system Autoinjektor Detektor UV/VIS detektor Rør og vials	Dionex " " " VWR
HPLC- forkolonne	Carbo-H 4 x 3,0 mm	Phenomenex
HPLC- kolonne	Rezex RFO-Fast Fruit H+ 7,8 x 100 mm	Phenomenex
Inkubator	Inkubatorskap 37 °C	Termax
Kanyler	0,9 mm x 40 mm	Becton Dickinson
Kyvette	1 x 1 cm	VWR
Konduktivetsmåler	TetraCon 96-Electrode	WTW
Magnetrorer	Magnetic stirrer, standard unit	VWR
Merketape	13 mm	VWR
Mikrovekt	Sartorius CP-2P	VWR
MS	Ultra Flex TOF/TOF	Bruker
Nanodrop	ND-1000 Spectrophotometer	Saveen Werner

NMR	Bruker avance 400	Bruker
NMR-rør	5 mm, 7 lengde	Sigma- Aldrich
Nuncrør	50 ml 15 ml	Greiner "
Parafilm	10 cm og 5 cm bredde	VWR
PCR-rør	0,2 ml	VWR
Petriskåler	9 cm	Heger
pH-meter	MicroFET 9270-010	Sentron
Pipettespisser	"Next Generation Tip Refill"	VWR
Risteinkubator	Multitron Standard Multitron Eco	Infors "
SEC	HiLoad pumpe P-50 133 Refractive Index Detector Superfrac	GE healthcare Gilson Pharmacia
SEC-kolonner	HiLoad 26/60Superdex, Pregrade	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
Sprøyter	1 ml 2 ml 50 ml	BD plastipak " "
Sprøytefilter	0,20 µm	Sarstedt
Termomikser	Thermomixer comfort 1,5 ml	Eppendorf
Vannbad	Eco Temp TW12	Julabo
Vekt	LC621P	Sartorius Basic
Whirlmixer	Vortex- Genie 2	Scientific industries

2.2 Kjemikalier

Kjemikalium	Leverandør
2,5-Dihydroxybezoic acid	Bruker Daltonics
4-methylumbelliferone	Sigma-Aldrich
4-methylumbelliferyl-D-N,N'- diacetylchitobiose	Sigma-Aldrich
Acetone, CH ₃ COCH ₃	Sigma-Aldrich
Acetonitril, CH ₃ CN	Sigma-Aldrich
Agar, Bacto-agar	Merck
Ammoniumacetat, NH ₄ CH ₃ COO	Merck
Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Life-Science
Ampicillin, C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	Sigma-Aldrich
Bacto™ Tryptone	BD
Bacto™ Yeast extract	BD
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad
Coomassie® Brilliant Blue R-250	Bio-Rad
Destillert vann, dH ₂ O (Milli-Q kvalitet)	
Deuteriumklorid, DCl	Aldrich
Deuteriumoksid, D ₂ O	Aldrich
Dibasisk Natriumhydrogenfosfat, NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich
Eddiksyre, CH ₃ COOH	Sigma-Aldrich
Etanol, C ₂ H ₅ OH	VWR
Etanolamin, C ₂ H ₇ NO	Sigma-Aldrich
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich
Glyserol, C ₃ H ₅ O ₃	Merck
Helium 6.0 Utraplus	Yara Industrial AS
Hydrogenklorid, HCl	Sigma-Aldrich
Isopropanol, C ₃ H ₈ O	Merk
Kaliumhydroksid, KOH	Merk
Kitinkuler	NEB

Magnesiumklorid, MgCl ₂	VWR
Metanol, CH ₃ OH (high quality)	Sigma-Aldrich
Monobasisk Natriumhydrogenfosfat, NaHPO ₄	Sigma-Aldrich
MOPS SDS Runningbuffer	Invitrogen
Natriumcyanoboranhidrid, NaBH ₃ CN	Aldrich
Natriumdeuteriumoksid, NaOD	Aldrich
Natriumhydroksid, NaOH	VWR
Nitrogen, N ₂	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), C ₇ H ₇ FO ₂ S	Sigma
Sitronsyre, C ₆ H ₈ O ₇	VWR
Trizma base, C ₄ H ₁₁ NO ₃	Sigma-Aldrich

2.3 Proteiner og substrater

	Spesifikasjoner	Leverandør
BenchMark Protein Ladder		Invitrogen
Purified Bovine Serum Albumin (BSA) 100 x, 10 mg/mL		New England Biolabs
Kitinase	<i>Kitinase A</i>	
Substrat	Kitosan F _A =0,65	
Kitin	β-Kitin, 3 μm	Seikagaku corporation

2.4 Bakteriestamme

Stamme	Spesifikasjon	Leverandør
<i>E.Coli</i>	TOP10 superkompetente celler	Invitrogen

2.5 Plasmid

E. Coli , pMay-20

2.6 Kits

Kit	Innehold	Leverandør
E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I	Solution I/RNAase	Omega BIO-TEK
	Solution II (Sodium Hydroxide)	"
	Solution II (Sodium Hydroxide)	"
	Solution III (Guanidine HCl, Acetic Acid)	"
	HiBind™ DNA Mini Columns	"
	Equilibration Buffer (Sodium Hydroxide)	"
	HB Buffer (Guanidine HCl, isopropanol)	"
	DNA Wash Buffer	"
	Elution buffer	"
2 ml Collection Tubes	"	
QuikChange II Site Directed Mutagenesis Kit	10x reaksjonsbuffer	Stratagene
	DpnI restriksjons enzym	"
	dNTP miks	"
	PfuUltra HF DNA polymerase	"
	pWhitescript 4.5-kb control plasmid (5 ng/ µl)	
	Oligonukleotid kontroll primer 1	
	Oligonukleotid kontroll primer 2	
Pellet paint kit	Pellet paint	Novagen

	0,3 M NaAc	"
--	------------	---

2.7 Programvare

Instrument	Programvare	Leverandør
MS	FlexAnalysis 2.4	Bruker Daltonics
	FlexControl 2.4	"
HPLC	Chromeleon	Dionex
SEC	Advantec Adamview	KGS systemer
NMR	Bruker TOPSPIN 3.1	Bruker Daltonics
Spektrofotometer	Nano Drop 1000	Thermo Scientific
PC (sekvensering)	CLC DNA Workbench 6	CLCbio

3. Metoder

3.1. Design av mutanter

På bakgrunn av tidligere forskning er det interessant og se på polare residuer i det aktive setet hos kitinase A (ChiA). Mutantene som ble laget i denne oppgaven var; T276A, R172A, E473A og E315Q, og ble bestemt på forhånd av Morten Sørli, Sigrid Gåseidnes og Vincent Eijsink. Mutasjonene er beskrevet i mer detalj i seksjon 4.1.

3.1.2 Design av primere

For å kunne lage de ønskede mutasjonene i villtypeplasmidet var det nødvendig med to primere med riktig mutasjonssekvens. Primerne er komplementære, og vil gi den ønskede mutasjonen i villtypeplasmidet. I denne oppgaven ble primerne designet ved bruk av *Quick Change Primer Design*, som er en programvare tilgjengelig på *Agilent Technologies* sin nettside (*Agilent Technologies* 2005). Primerne ble bestilt fra invitrogen, og vises i tabell 3.1.

Tabell 3.1: Mutageneseprimere. Mutasjonene er merket med gul for å se hvor i *ChiA*-genet mutasjonene har foregått. Se vedlegg A for mer detaljer.

Mutant	DNA templat	Primer	Sekvens
R172A	ChiA villtype	Forward Reverse	5'- GGGGCGTTTACGGGGGCCAATTTACCGTTCG-3' 5'- CGACGGTGAATTGGCCCTAAACGCCCC-3'
E473A	"	Forward Reverse	5'- CAAAGGCACCTGGGCGAA CGG CATCGTGG-3' 5'- CCACGATGCCGTTCCGCCAGGTGCCTTG-3'
T276A	"	Forward Reverse	5'- TCGGCGGCTGGGCGCTGTCCGAC-3' 5'- GTCGGACAGCGCCAGCCGCCGA-3'
E315Q	"	Forward Reverse	5'- GGATATCGACTGGCAGTTCCCGGGCGG-3' 5'- CCGCCGGGAACTGCCAGTCGATATCC-3'
E315Q/R172A	ChiA E315Q	Forward Reverse	5'- GGGGCGTTTACGGGGGCCAATTTACCGTTCG-3' 5'- CGACGGTGAATTGGCCCTAAACGCCCC-3'
E315Q/E473A	ChiA E315Q	Forward Reverse	5'- CAAAGGCACCTGGGCGAA CGG CATCGTGG-3' 5'- CCACGATGCCGTTCCGCCAGGT GCC TTG-3'
E315Q/T276A	ChiA E315Q	Forward Reverse	5'- TCGGCGGCTGGGCGCTGTCCGAC-3' 5'- GTCGGACAGCGCCAGCCGCCGA-3'

3.1.3 Oppdyrking av bakteriestamme

For å lage mutantene som skulle karakteriseres i denne oppgaven var det nødvendig å dyrke *Escherichia coli* celler som inneholder ChiA villtype plasmid. ChiA villtype plasmidet ble videre brukt til å sette inn ønsket mutasjon, ved seterettet mutagenese.

Materialer:

- Luria Broth medium (LB-medium)
 - 10 g Bacto Tryptone
 - 5 g Bacto yeast extract
 - 10 g NaCl
 - fyll opp med dH₂O til 1 L.
- Ampicillin (50 mg/ml)
- ChiA frysestock

Metode:

5 ml LB-medium med en ampicillin konsentrasjon på 0,05 mg/ml ble inokulert med en TOP10 *E. Coli* bakteriestamme fra -80 °C frysestock. Dyrking av kulturen ble utført i et avtrekkskap med sterilt utstyr for å hindre kontaminering fra omgivelsene. Dyrkningsrørene ble plassert i risteinkubator ved 37 °C og 225 rpm over natten (~12-16 timer)

3.1.4 Isolering av plasmid fra *E. Coli* kultur

For å kunne lage ønsket mutant ved hjelp av seterettet mutagenese var det nødvendig å isolere ChiA villtypeplasmidet. Villtype plasmidet ble isolert fra bakteriekulturen ved hjelp av et *E.Z.N.A Plasmid DNA Mini Kit I*. Isolering av plasmid fra bakteriekulturen ble gjort ved bruk av en "HiBind™ Mini Column" gjennom tre enkle steg; Binde, vaske og eluere.

Materialer:

- *E.Z.N.A Plasmid DNA Mini Kit I*
- *E. Coli* Cellekultur

Metode:

1,5 ml cellekultur ble overført fra dyrkningsrøret til et eppendorfrør. Cellene ble pelletert ved å sentrifugere ved 10 000 x g i 1 minutt ved romtemperatur. Videre ble mediet dekantert. Pelleten ble resuspendert i 250 µL *Solution I/RNAase A* og vortexet til all pellet var oppløst og ingen synlige klumper var tilstede. 250 µL *Solution II* ble tilsatt og blandet forsiktig ved å vende på røret frem til et lyst og klart lysat ble dannet. Videre ble 350 µL *Solution III* tilsatt og løsningen ble blandet umiddelbart ved å vende på røret. Dette forårsaket dannelse av et hvitt bunnfall. Blandingen ble sentrifugert ved 13 000 x g i 10 minutter ved romtemperatur. I mellomtiden ble en "*HiBind™ Mini Column*" preparert ved å tilsette 100 µl "*Equilibration Buffer*". Kolonnen ble plassert i et 2 ml oppsamlingsrør og kondisjonert ved sentrifugering i 1 minutt ved 13 000 x g. Videre ble "flow-through" helt av og supernatanten ble overført til den tomme kolonnen. Under dette steget var det viktig å være nøye med at ikke noe av pelleten fulgte med. Kolonnen ble deretter sentrifugert ved 13 000 x g i 1 minutt. Flow-through ble helt av og 500 µl "*Buffer HB*" ble tilsatt for å vaske kolonnen og ble igjen sentrifugert i 1 minutt ved 13 000 x g. Flow through ble helt av og 700 µl "*DNA wash buffer*" ble tilsatt og sentrifugert ved 13 000 x g i 1 minutt. Den tomme kolonnen ble sentrifugert i 2 minutter ved 13 000 x g for å tørke kolonnematriksen. Kolonnen ble plassert i et nytt 2 ml oppsamlingsrør og 30 µl "*Elution Buffer*" ble tilsatt. Kolonnen med tilsatt "*Elution Buffer*" ble sentrifugert i 1 minutt ved 13 000 x g for å eluere DNA. Det rensede plasmidet ble oppbevart ved -20 °.

3.1.5 DNA konsentrasjon (NanoDrop 1000)

ND1000 er et spektrofotometer som måler DNA konsentrasjon, og ble benyttet til å måle det isolerte plasmidet. Spektrofotometeret måler DNA/RNA ved en bølgelengde på 260 nm (*NanoDrop 1000 Spectrophotometer* 2010)

Materialer:

- ND1000 Spektrofotometer
- Renset ChiA plasmid
- Elution Buffer (*E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I* (Omega Bio-Tek))

Metode:

1 µl dH₂O ble benyttet til å vaske poden, og deretter ble instrumentet kalibrert med 1 µl *Elution Buffer*. Tilslutt ble 2 µl rensed ChiA plasmid applisert på poden, og DNA konsentrasjonen ble lest av.

3.1.6 Seterettet mutagenese

Et kit fra Agilent Technologies som heter *QuickChange II Site Directed Mutagenesis* ble brukt til å utføre enkle punktmutasjoner i ChiA villtype plasmidet. Manualen som fulget med kitet ble brukt, men med små endringer underveis. TOP10 superkompetente celler ble brukt til å transformere det ønskede plasmidet, og er celler med høy transformasjonseffektivitet (se avsnitt 1.5 for mer detaljer).

Materialer:

- 10 x reaksjonsbuffer
- dsDNA templat (pMay-20, *E. Coli*)
- primere (vises i tabell 3.1)
- dNTP miks
- ddH₂O
- *Pfu*Ultra HF DNA polymerase

Metode:

Følgende PCR miks ble laget for hver reaksjon. De ulike løsningene ble tilsatt i gitt rekkefølge:

- 5 µl reaksjonsbuffer
- 75-100 ng templat
- 1,3 µl primer 1
- 1,3 µl primer 2
- 1 µl dNTP miks
- ddH₂O til et totalt volum lik 50 µl
- 1 µl *pfuUltra* HF DNA polymerase

I tillegg ble en kontrollreaksjon laget, og følgende PCR miks ble laget i gitt rekkefølge:

- 5 µl 10 x reaksjonsbuffer
- 2 µl pWhitescript 4,5 kb kontroll plasmid
- 1,25 µl oligonukleotid kontroll primer 1
- 1,25 µl oligonukleotid kontroll primer 2
- 1 µl dNTP miks
- 38,5 µl ddH₂O
- 1 µl *PfuUltra* HF DNA polymerase

3.1.7 Polymerase chain reaction (PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) er en metode brukt for å oppamplifisere spesifikke DNA sekvenser. For å oppamplifisere DNAet ble en tretrinns temperatursyklus foretatt.

Dobbeltrådet mål DNA denatureres ved 95 °C i det første steget, noe som resulterer i to enkelttrådede DNA. Deretter undergår det enkelttrådede DNAet steg nummer to, som er hybridisering. Under dette steget senkes temperaturen til 55 °C, og primerne kan basepare med deres komplementære sekvenser. I steg tre økes temperaturen til 68 °C, polymerasen

3. Metoder

fester seg til primeren, og DNA-tråden forlenges i begge retninger (dsDNA)(Fossum & Dissen). Tabell 3.2 viser reaksjonssyklusen som ble benyttet.

Tabell 3.2: Reaksjonssyklusen benyttet ved PCR

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

Elongeringstiden ble satt til 5,5 minutt siden vektoren med ChiA-genet er 5553 bp (1 minutt per kb). Det ble benyttet 18 sykluser da det utføres multiple aminosyre delesjoner og insersjoner. Ved endt PCR ble 1 µl *Dpn I* tilsatt PCR reaksjonen. Løsningen ble spunnet ned i 1 minutt og deretter inkubert ved 37 °C i 1 time.

3.1.8 Utfelling av plasmid

Ved endt PCR ble plasmidet oppkonsentrert og felt ut ved å bruk av *Pellet Paint Kit* fra Novagen. Det er lønnsomt å utføre et ”opprydning” steg for å fjerne primere og andre reaktanter fra løsningen, samtidig som mål DNA oppkonsentreres. Prosedyren er rask og enkel, hvor primere mindre enn 50 nt i lengde fjernes, og DNA bevares kvantitativt (Muir et al. 2009). Oppkonsentrering og utfelling av plasmid gjør det enklere å lokalisere pelleten, og bidrar til maksimal gjenoppretting av nukleinsyrene.

Materialer:

- *Pellet Paint kit*
- 96 % etanol
- 70 % etanol
- dH₂O

Metode:

2 µl Pellet Paint og 0,1 volum 3 M NaAc ble overført til DNA løsningen, og blandet forsiktig. Videre ble 2 volum 96 % etanol tilsatt, og løsningen ble blandet lett med vortex. Reaksjonen ble inkubert ved romtemperatur i 2 minutter. Videre ble reaksjonen sentrifugert ved 16 000 x g i 5 minutter, og ved endt sentrifugering var en rosa pellet synlig i bunnen av røret. Supernatanten ble fjernet, og 500 µl 70 % etanol ble tilsatt før prøven ble sentrifugert igjen. Supernatanten ble på ny fjernet og pelleten ble rensset ved å tilsette 500 µl 96 % etanol. Prøven ble sentrifugert en siste gang, og supenatanten ble fjernet. Tilslutt ble pelleten resuspendert i 5 µl dH₂O.

3.1.9 Transformering av TOP10 superkompetente *E.Coli* celler

Transformeringen av plasmid over i TOP10 celler ble gjort for å oppamplifisere det ønskede plasmidet. TOP10 celler egner seg godt til oppbevaring av DNA, i tillegg til at gir det utmerkete kolonier ved oppdyrking.

Materialer:

- TOP10 superkompetente celler
- Plasmid
- SOC medium (Novagen)
- LB agarplater med 100 µg/ml ampicillin
 - 10 g Bacto Trypton
 - 5 g Bacto yeast extract
 - 10 g NaCl
 - 15 g Agar
 - fullt opp med ca 1 L dH₂O

Metode:

TOP10 cellene oppbevares ved -80 °C og ble tint på is før bruk. Det ble brukt et rør med TOP10 celler per PCR reaksjon. Det utfelte plasmidet fra steget over ble overført til TOP10

superkompetente celler. Løsningen ble blandet forsiktig og inkubert på is i 30 minutter. Reaksjonene ble deretter varmebehandlet ved 42 °C i 30 sekunder for å lysere celleveggen. Videre ble reaksjonen plassert på is i 2 minutter for å lukke celleveggen igjen. Det ble tilsatt 250 µl forvarmet (42 °C) SOC medium før transformasjonsreaksjonene ble plassert i en risteinkubator ved 37 °C og 200 rpm i 1 time.

Etter endt inkubasjonstid ble det platet ut henholdsvis 50 og 100 µl cellekultur på to agarplater. LB-agarplatene inneholdt 100 µg/ml ampicillin slik at bare bakterier som var ampicillin-resistente vil overleve. LB- agarplater med cellekultur ble inkubert over natt (~16 timer) ved 37 °C. Den resterende cellekulturløsningen ble tilsatt 0,5 µl 50 mg/ml ampicillin og plassert i risteinkubatoren ved 37 °C O/N.

3.1.10 Oppdyrking av transformanter

Transformerte celler ble oppdyrket for å videre kunne isolere det muterte plasmidet.

Materialer:

- Transformerte celler
- LB-medium
- 50 mg/ml ampicillin

Metode:

Fra agarplatene med transformanter ble enkeltkolonier inokulert i 5 ml LB-medium og 5 µl 50 mg/ml ampicillin. Cellekulturene ble dyrket opp i risteinkubator ved 37 °C og 200 rpm i 12-16 timer.

3.1.11 Tillaging av frysestock

For å kunne oppbevare de transformerte cellene over lengre tid ble det laget glycerol-frysestocker av de ulike cellekulturene.

Materialer:

- Cellekultur

- 87 % glyserol

Metode:

1050 µl cellekultur ble overført til et cryorør sammen med 450 µl 87 % glyserol.

Cellekultur/glyserol blandingene ble oppbevart ved -80 °C.

3.1.12 Sekvensering av plasmid

Plasmidet med eventuell mutasjon ble isolert fra bakteriekulturen ved hjelp av *E.Z.N.A Plasmid DNA Mini Kit I*. Isolering av plasmid fra bakteriekulturen ble gjort på samme måte som beskrevet i avsnitt 3.1.4. DNA konsentrasjonen ble målt spektrofotometrisk ved hjelp av ND 1000, som beskrevet i avsnitt 3.1.5. Produktet fra seterettet mutagenese ble sendt til sekvensering for å sjekke at plasmidet inneholdt ønskete mutasjon. Det ble laget fire rør per mutert plasmid, hvor det totale volumet skulle være 5 µl og ha en konsentrasjon på mellom 400-500 ng. Primerne som ble brukt var rev_1574, fw_1378, SP6, seq770 og seq779 (vises i tabell 3.3). Sekvenseringsmiksen ble merket med en strekkode og sendt til GATC Biotech i Constance, Tyskland for sekvensering.

Tabell 3.3: Sekvenseringsprimere brukt for sekvensering av *ChiA* mutanter.

Sekvenseringsprimere	Sekvens
Rev_1574	AAGCCACCTTGTCGATCTTG
Fw_1378	CGTGGATATCGACTGGGAGT
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG
Seq 770_rev	GCACAATGCCACCTGCATTTGATAACGG
Seq 779_fw	CCGTTATCAAATGCAGGTGGCATTGTGC

CLC DNA Workbench er en programvare som ble benyttet for å sjekke om mutasjonen var tilstede, og i riktig posisjon i plasmidet. Det muterte *ChiA* plasmidet ble sammenlignet med *ChiA* villtypen, og eventuelle mutasjoner var merket med ”conflict” dersom det var avvik i aminosyresekvensen.

3.2 Produksjon av ChiA mutanter

3.2.1 Overekspresjon av ChiA

Overekspresjon av ChiA ble gjort ved å benytte bakterier fra frysestocken til å lage en storkultur som sto over natt. Videre ble det laget periplasmatiske ekstrakt av cellene, noe som videre ble rensset på en kitinkuler.

Materialer:

- LB medium
- Ampicillin 50 mg/ml stock
- Frysestock av ønsket kitinase

Metode:

Dyrking av de ulike bakteriekulturene ble utført i LAF-benk med sterilt utstyr.

I en 2 L dyrkningskolbe ble 500 ml LB-mediet tilsatt sammen med 500 µl ampicillin (50mg/ml). Sistnevnt ble tilsatt for å hindre vekst av uønskede bakterier. Ved bruk av en steril tannpirker ble ”avskrap” fra ønsket frysestock overført til den tillagete storkulturen og plassert i risteinkubator over natt (16 timer) ved 37 °C og 200 rpm.

3.2.2 Periplasmatiske Ekstrakt

TOP10 *E. Coli* celler er Gram-negative. Første trinn i renseprosedyren var å isolere det periplasmatiske ekstraktet som inneholdt det ønskede proteinet. Lyseringen av cellene (ytterste cellemembran/vegg) ble gjort ved å benytte spheroplastbuffer og sterilt kaldt vann.

Materialer:

- Sentrifuge
 - JA10, 500 ml sentrifugerør
- Cellekultur
- Spheroplastbuffer
 - 30 ml 1 M Tris/HCl, pH 8

- 51,3 g sukrose
- 300 μ l 0,5 M EDTA
- 600 μ l PMSF

- Sterilt dH₂O
- 1,25 ml 20mM MgCl₂
- 300 μ l PMSF
- Sterilfilter 0,22 μ m
- 10 ml sprøyte

Metode:

De aktuelle bakteriekulturene ble høstet ved å fordele cellekulturen i ca 6 stk 500 ml sentrifugerør. Disse ble sentrifugert i en JA10-rotor i 10 minutter ved 8000 rpm.

Supernatanten ble helt av, og pelleten ble resuspendert i 50 ml spheroplastbuffer ved hjelp av en 10 ml sprøyte. Sukkerkonsentrasjonen vil da bli høyere inni cellen enn utenfor som vil føre til at cellene får osmotisk sjokk når det senere tilsettes kaldt dH₂O. Løsningen ble sentrifugert på samme måte som over, supernatanten ble igjen helt av og pelleten ble oppvarmet til romtemperatur (~10 minutter). Deretter ble pelleten resuspendert i 25 ml iskaldt dH₂O og løsningen ble inkubert på is i 45 sekunder. Videre ble 1,25 ml 20 mM MgCl₂ tilsatt for å stabilisere proteinene, og deretter spunnet ned igjen. De periplasmatiske proteinene befinner seg i supernatanten, som ble filtrert gjennom et 0,22 μ m filter. Tilslutt ble PMSF tilsatt, som er en proteasehemmer som forhindrer spalting av proteinene. I tillegg bedres lagringstiden før rensing. Det periplasmatiske ekstraktet ble lagret ved 4 °C frem til rensing.

3.2.3 Rensing av aktive mutanter på kitinkolonne

Mutantene E473A, R172A, T276A og E315Q ble rensert i ett trinn på en kitinkolonne. ChiA separeres fra andre proteiner og komponenter i det periplasmatiske ekstraktet ved å binde seg til kitin-kulene. Ved å justere det periplasmatiske ekstraktet til pH 6,3, vil ChiA bindes ettersom enzymet har høy affinitet til kitin-kulene. ChiA løsrives fra kitin-kulene og elueres ut i buffer B på grunn av endring i pH.

Materialer:

- Periplasmatisk ekstrakt
- NEB kitinkuler
- 20 % etanol
- Buffer A
 - 100 mM natriumfosfatbuffer, pH= 6,3
- Buffer B
 - 20 mM eddiksyre
- Vaskebuffer
 - 0,3 M NaOH

Metode:

Kolonnen ble pakket med 10 ml kolonnemateriale (NEB kitinkuler), 3 x kolonnevolum med 20 % etanol og 3 x kolonnevolum med buffer A. Buffer A ble tilsatt med en flow lik 2,5 ml/min frem til baselinjen var stabil. Det periplasmatiske ekstraktet ble justert til buffer A og applisert på kolonnen med samme flow som over. Proteinene festet til kolonne-materialet mens de andre komponentene eluerte ut i voidtoppen (v_0). Ved isokratisk eluering med buffer B elueres proteinet ut, og vises som en separat topp i kromatogramet.

Kolonnen ble regenerert 25 ml 0,3 M NaOH og 25 ml 20 % etanol med en flow lik 2,5 ml/min.

3.2.4 Sodium Dodecyl Sulfate-Polyakrylamid Gel Elektroforese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE er en metode som separerer proteiner etter deres elektroforetiske mobilitet (størrelse) i en polyakrylamid gel. Dette er en rask og enkel teknikk, og ble benyttet for å kontrollere at fraksjonene fra rensingen var rene nok til videre oppkonsentrering. Proteinene blir denaturert ved varmebehandling med den negativt ladede detergenten sodium dodecyl sulfat (SDS), og deretter blir prøven applisert på gelen. SDS består av en hydrofob og en hydrofil del. SDS sin hydrofobe del binder seg til proteinets hydrofobe gruppe, mens den hydrofile delen orienterer seg mot vann. Dette fører til at proteinet denaturerer og får en

negativ totalladning, og de vil vandre gjennom polyakrylamidgelen mot anoden.

Polyakrylamidgeler er bygget opp som en matriks bestående av porer. De minste fragmentene vil vandre lengst gjennom gelen, og de største fragmentene vil bruke lenger tid. Mengde SDS som binder til peptidkjedene er proporsjonal med polypeptidets molekylvekt, og derfor vil sterke bånd som vises ved forventet molekylvekt indikere mengde og tilstedeværelse av ønsket protein.

Materialer:

- Protein løsning til analysering
- Proteinstandard
 - Bench Mark Ladder
- NuPAGE® 10% Bis-Tris Gel 1,0 med mer x 10 well (ferdig laget)
- NuPAGE® Samplebuffer (4x)
- NuPAGE® Sample reducing agent (10x)
- MOPS SDS Running Buffer
- SDS fargeløsning
 - 0,1 % Coomassie Brilliant Blue
 - 10 % metanol
 - 10 % eddiksyre
- SDS avfargingsløsning
 - 10 % metanol
 - 10 % eddiksyre

Metode:

5 µl NuPAGE® Samplebuffer (4x), 2 µl NuPAGE® Sample reducing agent (10x), 3 µl dH₂O og 10 µl proteinløsning ble blandet og denaturert ved 70 °C i 10 minutter.

Gelen (NuPAGE® 10 % Bis Tris Gel 1,0 med mer x 10 well) var ferdig støpet, og ble satt sammen med en veggplate i kjørekammeret. Dette utgjorde det indre bufferkammeret, og ble

fylt til randen med MOPS SDS Running buffer. Det ytre kammeret ble fylt halvfullt med samme buffer. 3 µl proteinstandard (ladder) og ca. 20 µl proteinprøve ble applisert i hver sin brønn på gelen. Gelen ble kjørt i 50 minutter ved 200 V. Ved endt separering av proteinene, ble gelen inkubert i coomassie fargeløsning på risteinkubator i 30 minutter. Gelen ble deretter avfarget ved hjelp av avfargingsløsning, også på risteinkubator. Ved endt avfarging ble et bilde av gelen tatt ved hjelp av Gelfotosystem GSF 1000.

3.2.5 Oppkonsentrering av proteinløsning med amiconrør

Dersom proteinet var rent ble elautet fra kitinkolonnen rensingen oppkonsentrert ved hjelp av amiconrør. Amiconrør benytter seg av en ultrafiltreringsmembran, som fungerer ved hjelp av hydrostatisk trykk til å tvinge væske gjennom en semi-permeabel membran. Suspenderte stoff og oppløste stoffer av høy molekylvekt blir igjen over filteret, mens vann og andre stoffer med lavere molekylvekt går gjennom membranen (Nesse ; Rosen et al. 2009). Størrelsen på porene i membranen bestemmer hvor store eller små forbindelsene er som går gjennom. Ultrafiltreringsmembran kan brukes til å skille ut kolloider, rense makromolekylære forbindelser, bytte buffer samt oppkonsentrere og avsalte prøver. Ultrafiltreringsmembranene som ble benyttet slipper gjennom forbindelser med molekylvekt mindre enn 10 000 Da, og siden molekylvekten til ChiA er større enn 10 000 Da vil enzymet forbli igjen i løsemiddelet over membranen. Dette er en rask og enkel teknikk som ekskluderer alle proteiner og løsemiddeler som ikke er av interesse, samtidig som proteinet av interesse blir oppkonsentrert og byttet buffer på.

Materialer:

- Amiconrør
 - Ultra-15, 10 kDa
- Proteineluat fra rensing
- Storagebuffer
 - 100 mM Tris-HCl, pH 8,0

Metode:

Proteineluatet ble overført til et amiconrør (Ultra-15, 10 kDa) og sentrifugert ved 4 °C og 4500 rpm frem til det var 1,5 ml løsningen igjen over filteret. Amiconrøret ble fylt opp med

storage buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0), og igjen sentrifugert ved 4 °C og 4500 rpm til det var 1,5 ml væske igjen over filteret. Dette trinnet ble gjentatt totalt 4 ganger for å bytte buffer. Eluatet ble tatt vare på, for å forsikre seg at proteinet ikke hadde gått gjennom filteret. Proteinløsningen ble overført til et nytt rør og oppbevart ved 4 °C.

3.2.6 Fluorimetrisk bestemmelse av proteinkonsentrasjon ved hjelp av Bradfordmetoden

Bio-Rad Protein Assay er en enkel kolorimetrisk metode som brukes til å bestemme protein konsentrasjonen i en løsning. Metoden er basert på bindingen av "*Coomassie brilliant blue G-250*" til proteinet. Det syrlige fargestoffet binder seg til basiske og aromatiske aminosyrer, spesielt arginin. Bindingen fører til et fareskifte som leses av fluorometrisk ved 595 nm. (Bio-Rad ; Bradford 1976).

Materialer:

- Bio-Rad Protein Assay dye reagent
- Storage buffer
 - 100 mM Tris HCl
- Kyvette
 - 1 x 1 cm
- Vortex

Metode:

Spektrofotometeret var kalibrert på forhånd med en lineær range på 1,25-10 µg/ml av Anne Cathrine Bunæs. Det ble laget 3 paralleller av hver mutant, hvor 10 µl enzym ble tilsatt 790 µl storage buffer (100 mM Tris HCl). Videre ble 200 µl Bio-Rad protein Assay dye reagent tilsatt alle prøvene, i tillegg til en blank prøve. Prøvene ble ristet og videre inkubert i 5 minutter ved romtemperatur. Absorbansen øker over tid, og derfor ble alle prøvene inkubert med samme tid (5 minutter) Absorbansen på fluorometren ble stilt inn på 595 nm. Kyvetten ble vasket med dH₂O før blankprøven (800 µl storage buffer + 200 µl Bio-Rad reagent dye) ble analysert. Parallell 1, 2 og 3 ble analysert i gitt rekkefølge og verdiene ble lest av.

3.2.7 Kontroll av enzymaktivitet

For å kunne sjekke om det rensede og oppkonsentrerte enzym var aktivt, ble det foretatt et enzymassay. Ved å bruke et kunstig fluorescerende stoff som heter 4-methylumbelliferyl- β -D-N, N'-diacetylchitobiose (4-MU-(GlcNAc)₂) kan enzymaktiviteten bestemmes spektrofotometrisk. Når enzymet hydrolyserer det kunstige substratet, vil bindingen mellom sukkerenhetene og den fluoriserende gruppen brytes. Den frie fluoriserende gruppen absorberer lys ved en gitt bølgelengde og avgir fluorescence. Fluorescensen detekteres og gjøres om til konsentrasjon av hydrolysert produkt som gjør det mulig å bestemme enzymets aktivitet.

Materialer:

- ChiA variant
- 100 x Bovint serum albumin (BSA)
- 0,2 M Natriumkarbonat
 - 2,12 g NaCO₃ løst i 100 ml dH₂O
- Citrat/fosfat buffer, pH 5,2
 - 23,3 ml 0,1 M sitronsyre
 - 26,7 ml 0,2 M Natriumfosfat
 - Fortynnes til 100 ml
- 1,0 μ M 4-MU
- 1 mg/ml 4-MU (GlcNAc)₂
- Fluorometer

Metode:

4,95 ml Citrat/fosfat buffer og 50 μ l 100 x BSA ble blandet sammen i en 15 ml blåkorkflaske. Deretter ble en blindprøve og tre paralleller for hver enzymprøve laget med 87 μ l citrate/fosfat blanding og 8 μ l 1 mg/ml-4-MU-(GlcNAc)₂. Rørene ble satt på vannbad ved 37 °C og risting. Reaksjonsblandningene ble tilsatt enzym slik at totalvolumet var 100 μ l.

Reaksjonene ble stoppet etter 10 minutter ved å tilsette 1,9 ml 0,2 M natriumkarbonat. Et fluorometer ble benyttet til bestemmelse av konsentrasjonen til 4-MU-(GlcNAc)₂.

Fluorometeret ble kalibrert ved å tilsette 1,9 ml 0,2 M natriumkarbonat. Videre ble 100 µl 1,0 µM 4-MU tilsatt kyvetten, og fluorometeret ble kalibrert. Prosedyren ble utført 2 ganger, for å sjekke at fluorometret var stabilt. Prøven ble tilsatt og verdiene ble lest av, og den spesifikke enzymaktiviteten kunne beregnes etter følgende formel:

$$\left(\text{vol (l)} \times \frac{\text{Gjn. snitt fluorescens}}{10} \right) / \text{Tid (min)} / \text{enzymvolum} \times \text{mg /ml}$$

likning 3.1

3.3 Fremstilling av Kitosan

Kitosan fremstilles av kitin gjennom homogen eller heterogen, delvis eller fullstendig N-deacetylering. Kitosan har ulik sammensetning av acetylerede sukker residuer, som betegnes som acetyleringsgrad (F_A) (Quintero-Villegas et al. 2013). Kitosan ble fremstilt ved homogen N-deacetylering av kitin.

Materialer:

- Kitin
- 40 % w/w NaOH
 - 80 g NaOH pellets
 - 120 g milliQ- dH₂O
- Konsentrert HCl
- pH papir
- Nitrogengass (N₂)

3. Metoder

- Dialysemembran
- Whatman filter (1,2 μm)
- Millipore filter (0,8 μm)

Metode:

4,0 g kitin ble veid ut og tilsatt 100 g kald 40 % w/w NaOH for desterifisering av N-acetyl bindingene. Løsningen ble oppbevart kaldt (4°C) slik at deacetyleringen ikke skulle starte før man ønsket det. 300 g is ble tilsatt under kraftig røring med glassstav, og deretter satt på magnetrøring til all is var oppløst/homogen løsning. Videre ble løsningen sentrifugert ved 10000 rpm i 15 minutter ved 4 °C. Supernatanten ble overført videre til en blåkorkflaske og behandlet med nitrogengass (N_2) i 10 minutter for å fjerne O_2 . Løsningene ble satt på vannbad ved 25 °C i 48 timer. Deacetyleringsprosessen ble stoppet ved å tilsette 280 g (70g/g Kitin) prefryst is under stadig omrøring. Kaldt, konsentrert HCl ble tilsatt under sakte omrøring til $\text{pH} \approx 7$. pH papir ble benyttet underveis for å stadig kontrollere pH. Prøven ble hele tiden oppbevart på is. Videre ble pH justert til 4,5 med 1 M HCl. Dialysemembranene ble rensset og sjekket for hull i MQ- H_2O , og løsningen ble ved hjelp av trakt overført til dialyse membranene (fylt opp ca 2/3). Neste steg var å foreta selve dialysen i MQ- H_2O . Vannet ble byttet 2 ganger i døgnet de første 2 dagene, og videre bare 1 gang i døgnet. Samtidig som vannet ble byttet, ble konduktiviteten (ledningsevnen) målt. Ved en konduktivitet $\approx 3 \mu\text{S}$, var dialysen av løsningen ferdig. Kitosan løsningen ble overført fra dialysemembranen til et begerglass, og pH ble justert til 4,5 med 1 M HCl . Tilslutt ble kitosanløsningen vakuumbfiltrert gjennom Whatman filter (1,2 μm) og membranfilter (0,8 μm), før den ble frysetørket.

3.3.1 ^1H NMR-analyse for bestemmelse av acetyleringsgrad (F_A) av kitosan

For å bestemme F_A i kitosanløsningen laget av kitin, ble ^1H NMR brukt. F_A betegner den molare konsentrasjonen acetylerede enheter (A) dividert på den totale konsentrasjonen monomerer (A + D). Dette ble gjort for å kontrollere om kitosanen kunne benyttes som substrat i videre forsøk.

Materialer:

- D_2O

- NaNO₂ (10 mg/mL)
- 1 M DCl
- NaOD
- NMR-rør

Metode:

20 mg kitosan ble veid ut og løst i 2 ml D₂O. Kitosanløsningen ble videre satt til risting i inkubatorskap ved 37 °C over natt. Ved endt tid, ble 30 µl NaNO₂ (10 mg/mL) og 150 µl 1 M DCl tilsatt kitosanløsningen. Prøven ble dekket med sølvpapir og satt til risting i inkubatorskap i 2 timer ved 37 °C. Deretter ble pD justert til 4,5 med NaOD. Tilslutt ble 700 µl kitosanløsning overført til et NMR-rør, analysert ved ¹H NMR, og F_A ble bestemt ved bruk av likning 3.2.

$$F_A = (A + A\alpha + A\beta) / (A + A\alpha + A\beta + D + D\alpha)$$

Likning 3.2

A: Definert som acetylerede enheter inni sukkerkjeden eller på ikke-reduserende ende

A α : Definert som acetylerede α - anomerer på reduserende ende

A β : Definert som acetylerede β - anomerer på reduserende ende.

D: Definert som deacetylerede enheter inni sukkerkjeden eller på ikke- reduserende ende.

D α : Definert som deacetylerede α - anomerer på reduserende ende.

3.4 Nedbrytning av kitosan

Kitooligosakkarider (KOS) fremstilles enzymatisk eller kjemisk fra kitosan; lineær heteropolymer av β (1 \rightarrow 4) linkede N-acetyl-D- glucosamine (GlcNAc), og det deacetylerede motstykke D- glucosamine (GlcN) . Kitosan kan hydrolyseres til KOS av kitinaser eller kitosanaser. Hydrolytiske enzymer er ulike ved at de de kløyver kitosanen i ulike områder, som bestemmes av sekvensen i heteropolymeren av GlcNAc og GlcN. Ulike sammensetninger av kitosan (F_A), og ulike hydrolytiske enzymer med ulik sekvensspesifisitet vil gi KOS i ulike lengder og sekvenser (Quintero-Villegas et al. 2013).

Kitosan er løselig i vann med en acetyleringsgrad på ca 65 % og lavere ($F_A=0,65$ og lavere) (Kumar & Majeti 2000), og ble degradert til KOS av ulik lengde ved hjelp av de tre ulike ChiA mutantene; T276A, R172A og E473A. Degraderingsproduktene ble analysert ved hjelp av ^1H NMR, SEC og MS

3.4.1 Oppløsning av kitosan

Materialer:

- Kitosan ($F_A=0,65$)
- dH_2O
- Nedbrytningsbuffer pH 5,5
 - 0,008M NaAc + 0,2 M NaCl

Metode:

150 mg kitosan med en $F_A=0,65$ ble veid ut. For å få kitosanen mindre kompakt og mer tilgjengelig for løsemiddelet, ble det revet godt fra hverandre før det ble plassert i en 15 ml blåkorkflaske. Prøven ble tilsatt dH_2O og nedbrytningsbuffer til en konsentrasjon på 10 mg/ml. Løsningen ble plassert i risteinkubator ved 37 °C og 225 rpm over natten til alt kitosanet var løst.

3.4.2 Degradering av Kitosan ($F_A=0,65$) med ChiA mutanter

Materialer:

- ChiA mutant
- Løst kitosan (se avsnitt 3.6.1)
- 1 M HCl
- Varmeplate
- Begerglass

Metode:

Den aktuelle ChiA mutanten ble tilsatt kitosan løsningen til en konsentrasjon på 2,5 μg enzym pr mg løst kitosan, og plassert i risteinkubator ved 37 °C og 225 rpm. Uttak på 1,5 ml ble gjort ved ulike tidspunkt mellom 2,5- 60 minutter. Resterende reaksjonsløsning ble inkubert i 1 uke. Reaksjonene ble stoppet ved å tilsette 150 μl 1 M HCl, og deretter kokt i 2 minutter. Prøvene ble fordelt i 3 ulike eppendorfrør; 500 μl til ^1H NMR, 800 μl til SEC og 200 μl til MS. For å fjerne løsemiddelet ble prøvene tørket i SpeedVac over natten. Alle prøver ble oppbevart ved -20 °C inntil videre analyser ble utført.

3.5 Kjernemagnetisk resonans (NMR)

Kjernemagnetisk resonans, eller "*nuclear magnetic resonance*" (NMR) spektroskopi er et instrument som brukes til å bestemme strukturen til organiske molekyler i en løsning.

3.5.1 Prøveopparbeidelse ^1H NMR

Ved ^1H NMR analyse ble prøvene løst i en inert løsning, som i dette tilfellet var D_2O . D_2O inneholder ingen ^1H atomer og vil ikke påvirke NMR-spekteret. Grunnen til at vi justerer pH til 4,5 er for å unngå schiff base reaksjon.

Materialer:

- DCl
- NaOD

3. Metoder

- D₂O
- pH-meter
- Frysetørker
- 5 mm NMR rør

Metode:

Kitosan prøven ble frysetørket, og løst i 500 µl D₂O. Videre ble prøvene pD-justert til 4,5 ved å benytte en 100 x fortykning av DCl og NaOD. Prøvene ble frysetørket igjen, og prosedyren ble gjentatt som over. Dette ble repetert for å forsikre seg om at all H₂O var fjernet fra prøvene. Tilslutt ble prøvene løst i D₂O og overført til 5 mm NMR-rør.

3.5.2 Analyse av nedbrutt kitosan ved hjelp av ¹H NMR

¹H NMR spektroskopi ble benyttet til å bestemme F_A. Grad av polymerisering (DP_n) i kitosanløsningen kunne videre brukes til å beregne spaltningsgraden ($\alpha = 1/DP_n$) i kitosanløsningen. α defineres som antall glykosidbindinger som er brutt.

Materialer:

- NMR
 - Bruker avance 400
- NMR-rør med nedbrutt kitosan
- 6 M HCl
- Aceton

Metode:

Prøvene ble analysert ved hjelp av ¹H NMR. Prøvene ble analysert ved 85 °C og 400 MHz. Spektralvidden ble satt til 3595,8, pulsvinkelen til 10,50, antall scans til 32, og blokkstørrelsen til 8. Relakseringstiden ble satt til 4,563 sekunder. Ved endt analyse ble NMR-rørene vasket med 6 M HCl, og deretter aceton for å fjerne vann.

3.5.3 Tolkning av ^1H NMR specter

^1H NMR spektrene ble integrert ved hjelp av TOPSPIN 1.3 programvare fra Bruker Daltonics. DP_n og α ble bestemt ved bruk av likning 3.3 og 3.4.

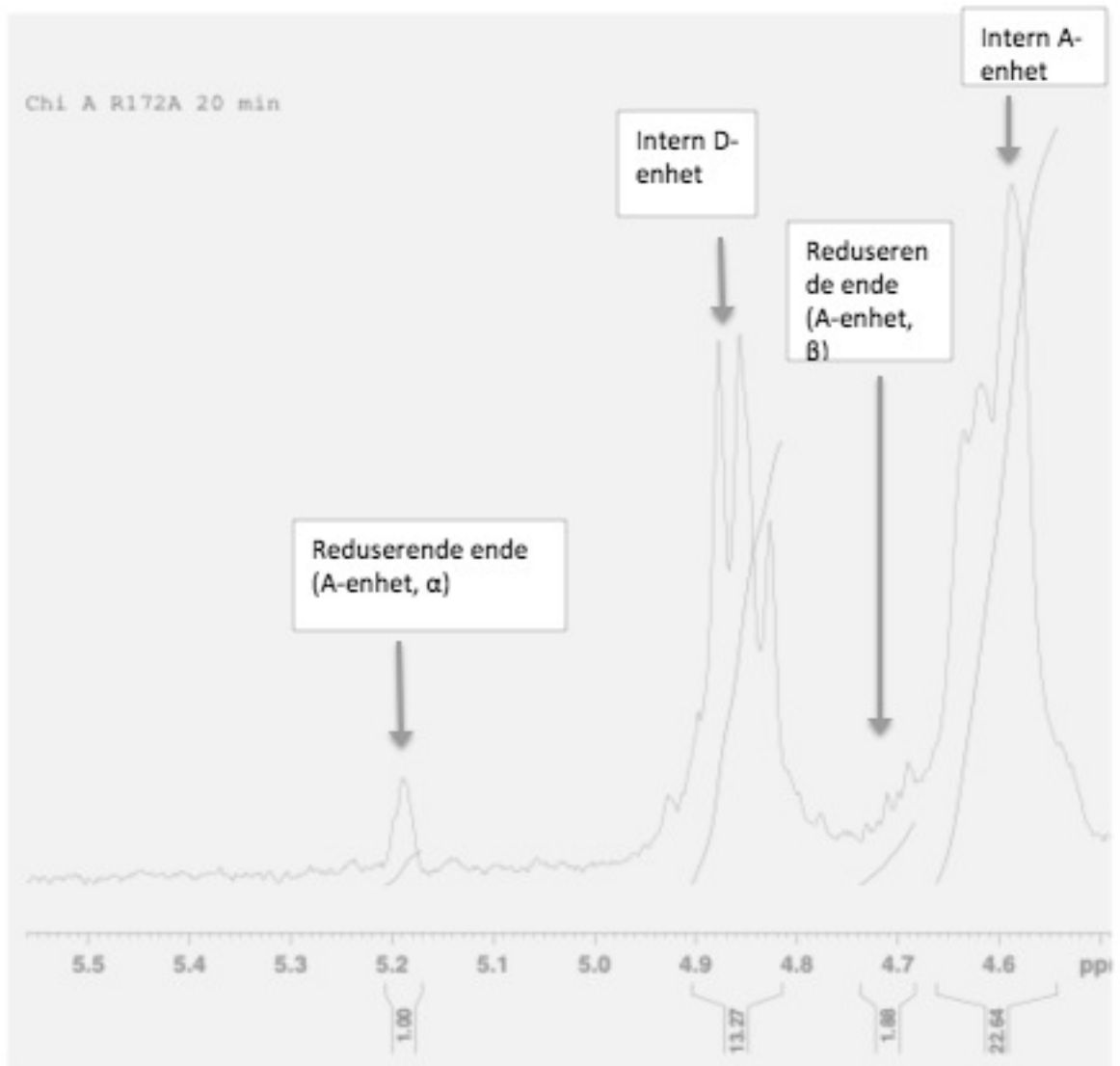
$$DP_n = \frac{(A\alpha + A\beta + A + D)}{(A\alpha + A\beta)}$$

Likning 3.3

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

Likning 3.4

Nedbrytningsgraden forteller oss noe om forholdet mellom spaltet og uspaltet kitosan. I denne oppgaven er det interessant å se på $\alpha = 0,05$ og $\alpha = 0,33$. En $\alpha = 0,05$ betyr at 5 % av glykosidbindingene er kuttet. En $\alpha = 0,33$ er maksimal nedbrytning.



Figur 3.1: Spekteret viser ved hvilken ppm de ulike toppene vises i spekteret. Den reduserende enden til α -anomeren av en acetyllert enhet gir resonans ved 5,19 ppm. β -anomeren fra samme enhet gir resonans ved 4,7-48 ppm. D enhet inne i og ved ikke reduserende ende gir resonans ved 4,9 ppm. A enhet inne i og ved ikke reduserende ender gir resonans ved 4,6 ppm.

3.6 Størrelses eksklusjonskromatografi (SEC)

SEC er en kromatografisk separeringsteknikk som separerer stoffer etter størrelse, og i noen tilfeller etter molekylvekt. Stasjonærfasen er inert, og består av porer med ønsket størrelse. Når prøveløsningen går gjennom kolonnen vil de største molekylene ikke penetrere porene, og derfor ikke bli holdt igjen av kolonnen. Mindre molekyler vil trenge inn i porene og retarderes. På denne måten kan en prøve som inneholder komponenter av ulik størrelse separeres. De ulike komponentene detekteres av en RI-detektor som er koplet til en datamaskin, og resultatet presenteres i et kromatogram. Kitosanprøvene med en α lik 0,05 og 0,33 ble analysert ved hjelp av SEC.

Materialer:

- Degradert kitosan
- 0,15 M NH₄Ac pH 4,5
- Amicon rør
- Sprøyte
 - 2 ml
- Sprøytefilter
 - 0,22 μ m
- Kanyler
 - 0,9 mm x 40 mm

Metode:

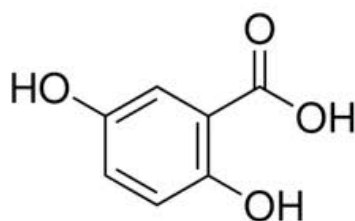
Mobilfasen ble degasset med helium 6.0 i 10 minutter før prøven ble injisert. Frysetørkede prøver av hydrolysert kitosan med en α tilnærmet lik 0,05 ble løst i 2 ml 0,15 M NH₄Ac pH 4,6, og overført til et Amicon ultrasentrifugeringsrør med en MWCO på 10 000 Da for å separere oligomere fra polymere. Ved en α tilnærmet lik 0,05 er andelen oligomere i prøven svært lav i forhold til andel polymere. Prøven separeres derfor før analysen, for å unngå at den store andelen polymere interfererer med deteksjonen av oligomerene. I kitosanprøven med en α lik 0,33 er alle polymerne brutt ned, og prøven separeres derfor ikke før SEC-analysen. Prøver som var klare til injeksjon ble filtrert gjennom et 0,22 μ m sprøytefilter før injeksjon. RI-detektoren ble stillet inn på $\frac{1}{4}$ eller 1, avhengig av antatt mengde kitosan i

prøven. RI- detektoren var videre koblet til en datamaskin som presenterte resultatene i form av et kromatogram. Fraksjoner på 4 ml ble samlet og analysert ved hjelp av MS.

3.7 Massespektrometri (MS)

MS er en teknikk som brukes for påvisning av forbindelser basert på molekylvekt og struktur. Ved å analysere en prøve ved MS er det mulig å identifisere og kvantifisere forbindelser med et høyt nivå av kvalitativ sikkerhet (Hoffmann & Stroobant 2011).

”Matrix- assisted laser desorption ionization”, også kalt MALDI er en ”myk” ioniseringsmetode som ble introdusert i 1988 av Karas Hillenkamp. MALDI kan brukes til å analysere DNA, proteiner, peptider og store organiske molekyler som polymere. MALDI gjennomføres i to steg. I det første steget blir analytten løst i et løsningsmiddel som inneholder organiske molekyler kalt matriks. I denne oppgaven ble 2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB) (fig 3.2) brukt, og har en gitt absorpsjons ved bestråling med laser. I det neste steget absorberer matriksen energi fra laseren, og overfører energien til analyttene i prøven. Analytten blir ionisert og kan sendes videre inn i masseanalysatoren (Hoffmann & Stroobant 2011)



Figur 3.2: : Kjemisk struktur til 2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB)(Sigma Aldrich 2013)

”Time-of-flight”, også kalt TOF massespektrometer separerer ioner ved å måle masse over ladning (m/z) basert på tiden de bruker på å ”fly” fra ionekilden til detektoren. Flight tuben er normalt sett 1-2 meter i lengde, og separasjonen buker verken elektriske eller magnetiske felt. Ionene separeres i en ”field-free region” før de treffer detektoren (Hoffmann & Stroobant 2011).

3.7.1 Annotering av topper fra SEC kromatogram ved hjelp av MALDI-TOF MS

Toppene i SEC-kromatogrammene ble annotert ved bruk av MALDI-TOF-MS. DHB ble brukt som matriks (figur 3.2), og absorberer UV-lys ved 337 nm (Downard 2004).

Materialer:

- DHB matriks
- EtOH
- H₂O
- Uderivatisert KOS
- Kitoooligosakkaridstandard, (GlcNAc)₂-(GlcNAc)₆

Metode:

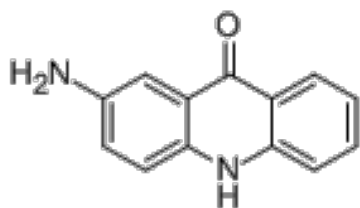
Matriksen ble laget ved å tilsette 15 mg DHB i 1000 µl 30% EtOH 70% H₂O. Prøven ble fortynnet 1:1, hvor 1 µl prøve ble blandet med 1 µl matriks. Deretter ble 1 µl prøve spottet på MALDI-plata, og satt til tork. En kitoooligosakkaridstandard bestående av (GlcNAc)₂-(GlcNAc)₆ ble benyttet til å kalibrere MS-instrumentet før analyse av prøvene. Prøven ble videre montert på en "target frame" og satt inn i MS-instrumentet.

3.7.2 Tolkning av MS-spekter ved annotering av topper

Dataprogrammet som ble benyttet for identifisering av kitoooligosakkarider var FlexControl 2.4, og data behandling ble utført i FlexAnalysis 2.4. Toppene i SEC- kromatogrammet ble annotert ved å sammenligne masselister fra MS-spekter og masselister for uderivatiserte oligosakkarider.

3.7.3 2-Aminoacridone (AMAC) derivatisering av kitoooligosakkarider

2-Aminoacridone er et fluoriserende reagent som kan brukes til å merke reduserende sukker, oligosakkarider og glykoproteiner (se figur 3.3). Kitoooligosakkaridene ble merket med AMAC i den reduserende enden som gir den en ekstra masse på 194,1 g/mol. Sekvenseringen ble gjennomført ved bruk av MALDI-TOF-TOF MS-MS. Ekstramassen gjør det mulig å identifisere de reduserende endene til kitoooligosakkaridene.



Figur 3.3: Kjemisk struktur til 2-aminoacridone (Sigma Aldrich 2013).

Materialer:

- Kitoooligosakkarider som skal sekvenseres
- DMSO : konsentrert eddiksyre (17:3)
- 0,1 M AMAC
 - 2 mg AMAC i 20 μ L v/v 17:3 DMSO: konsentrert eddiksyre
- 1 M Cyanoboranhidrid
- dH₂O
- 70 % MeOH

Metode:

20 μ l 0,1 M AMAC i DMSO : Eddiksyre (17:3) ble tilsatt kitoooligosakkaridprøven. AMAC er lysømfintlig, og prøven ble derfor oppbevart mørkt. Deretter ble prøven tilsatt 10 μ l 1 M cyanoboranhidrid for å stabilisere bindingen mellom AMAC og den reduserende enden av sukkeret. Reaksjonsløsningen ble satt i vannbad ved 90 °C i 30 minutter. Reaksjonen ble stoppet ved å fjerne løsemiddelet ved å tørke prøven over natten i en vakuumsentrifuge. Prøven ble deretter løst i 100 μ l 70 % MeOH og satt i fryseren over natten. Videre ble prøven sentrifugert i 30 minutter ved 10 000 rpm for å fjerne eventuelt bunnfall, og supernatanten ble overført til et nytt eppendorfrør. Prøven ble tørket og oppbevart ved -20 °C inntil videre opparbeidelse.

3.7.4 Rensing av AMAC-derivatiserte kitoooligosakkarider på C-18 kolonne

AMAC-derivatiserte kitoooligosakkaridene ble separert ved bruk av en C-18 kolonne. Metoden baserer seg på omvendt fase kromatografi, hvor stasjonærfasen er upolar og mobilfasen er polar. I dette tilfellet vil polare kitoooligosakkarider med AMAC festet i den

reducerende enden binde til C-18 kolonna, mens uønskede komponenter i prøveløsningen elueres ut. Tilslutt brukes en mobilfase som løsriver AMAC-derivatiserte kitooligosakkarider fra kolonnen, og gir en ren prøveløsning.

Materialer:

- Derivatiserte kitooligosakkarider
- MeOH
- Acetonitril
- dH₂O

Metode:

C-18 kolonna ble koblet til en vakuummanifold med reagensrør for oppsamling av eluatet. 5 ml 100 % MeOH, 5 ml dH₂O, 5 ml 100 % acetonitril og 5 µl dH₂O ble tilsatt for å vaske kolonnen og gjøre den klar til prøven. Videre ble 100 µl prøve tilsatt, 5 ml dH₂O, og tilslutt ble kitooligosakkaridene eluert ut med 80 % acetonitril.

3.7.5 Analyse av AMAC-derivatiserte kitooligosakkarider ved hjelp av MALDI-TOF-TOF MS/MS

Sekvensering av KOS ble gjort ved MALDI-TOF-TOF MS/MS. 2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB) ble benyttet som matriks (figur 3.3).

Materialer:

- MS matriks
 - 8,47 mg DHB 2,5-Dihydroxybenzoic acid
 - 170 µL EtOH
 - 395 µL H₂O
- AMAC-derivatiserte kitooligosakkaridprøve ved sekvensering
- EtOH
- H₂O
- MeOH

- Kitoooligosakkaridstandard, (GlcNAc)₂-(GlcNAc)₆

Metode:

MS matriksen ble laget på samme måte som i avsnitt 3.7.1, og ble sonikert i 15 minutter. AMAC-derivatiserte kitoooligosakkarider ble blandet med matriks (1:1), hvor 1 µl prøveløsning og 1 µl matriks ble spottet på MALDI-platen og satt til tørk. En kitoooligosakkaridstandard bestående av (GlcNAc)₂-(GlcNAc)₆ ble benyttet til å kalibrere MS-instrumentet før analyse av prøvene. Prøven ble videre montert på en "target frame" og satt inn i MS instrumentet.

3.7.6 Tolkning av MS-spektre for AMAC-derivatiserte prøver

Ved å bruke masselistene fra MS/MS-spektrene, kalkulert ved FlexAnalysis 2.4 ble fragmentene funnet og sammenliknet med masselister for AMAC-derivatiserte kitoooligosakkarider. Det var mulig å sekvensere de ulike nedbrytningsproduktene ved å sammenlikne MS/MS-spekte og AMAC-derivatiserte masselister. Det var rom for avvik opptil ± 0,5.

3.8 Enzymatisk Hydrolyse av β -kitin

Hydrolyse av β -kitin er en metode brukt til å måle forholdet mellom $(\text{GlcNac})_2/(\text{GlcNac})$ som er et mål på enzymets prosessivitet.

3.8.1 Substratforsøk

Materialer:

- β -kitin 3 μm
- 50 mM NaAc pH 6,1
- 20 mM H_2SO_4
- ChiA mutant

Metode:

β -kitinet ble løst til 2 mg/ml i 50 mM NaAc pH=6,1, og deretter sonikert i 20 minutter.

Substratløsningen ble tilsatt enzym slik at konsentrasjonen av enzym var 100 nM.

Reaksjonsløsningen ble inkubert ved 37 °C og 800 rpm over et bestemt tidsintervall. Det ble tatt utdrag på 75 μl fra reaksjonsløsningen etter ; 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 60, 200, 300, og 24 timer. Reaksjonene ble stoppet ved å tilsette 75 μl 20 mM H_2SO_4 . Før prøvene kunne analyseres ved bruk av HPLC var det nødvendig å filtrere bort partikler i prøvene for å unngå at instrumentet kunne gå tett. Ved bruk av et 0,45 μm Multiscreen filter fra Millipore og en vakuumpumpe ble alle prøvene filtrert før analyse.

3.8.2 Tillaging av Standard

Materialer:

- A1 stockløsning: 994 μM
- A2 stockløsning: 1000 μM
- 20 mM H_2SO_4

Metode:

Ut i fra de to aktuelle stockløsningene som hadde blitt laget tidligere, ble det laget en ny stockløsning på 500 μM A2A1. Med utgangspunkt i den nye A2A1 stockløsningen ble en standardmiks på 200 μM A2A1 og en standardmiks på 400 μM A2A1 laget. 75 μl standardmiks ble deretter blandet med 75 μl H_2SO_4 , og videre overført til HPLC-rør. Standardene ble oppbevart ved $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

3.8.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC er en kromatografisk separasjons metode, som består av ulike separasjonsprinsipper. Ionebytterkromatografi er en metode som brukes til å separere ioner og noen polare molekyler. Det underliggende prinsippet bak en slik separasjonsmetode er at ulike stoffer har ulik affinitet til den stasjonærefasen i kolonnen. På basis av dette vil noen komponenter binde sterkere til kolonnematerialet enn andre, og dermed vil komponenter som analyseres elueres ut ved ulik tid og kan kvantifiseres hver for seg (Miller 2009)

Kolonnen som ble brukt var Rezex-Fast Fruit H⁺ som består av negativt ladd sulfonert styrene-divinyl benzene (SDVB) med en ladet H⁺ bundet til seg. (GlcNAc) og (GlcNAc)₂ som analyseres blir positivt ladet ved at svovelsyren donerer fra seg H⁺. Dimerere og monomere kan dermed bytte plass med H⁺ fra kolonnematerialet og elueres isokratisk etter en bestemt tid.

Materialer:

- Kolonne: Rezex RFO-Fast Fruit H⁺ 7,8 x 100 mm
- Forkolonne: Carbo-H 4 x 3,0 mm
- mobilfase
 - 5 mM H_2SO_4
- Standard
 - 200 og 400 μM A2A1

Metode:

8 μl prøve ble injisert på kolonnen ved hjelp av en autoinjektor. Kitoooligosakkaridene (GlcNAc)₂ og (GlcNAc) ble separert ved isokratisk eluering ved $85\text{ }^\circ\text{C}$ med 5 mM H_2SO_4 og

en flow på 1 ml/min. En UV-detektor detekterte toppene ved 195 nm og de ulike toppene ble bearbeidet ved hjelp av programvaren Chromeleon. Konsentrasjonen av dimerer og monomerer ble bestemt ved hjelp av en ekstern standard med kjent konsentrasjon.

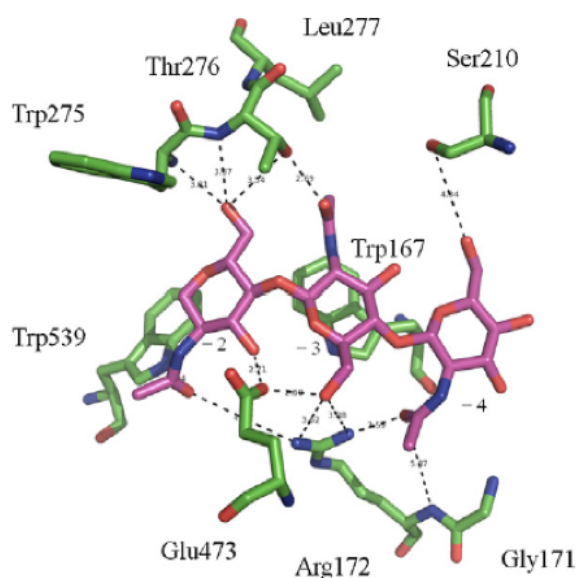
3.8.4 Bearbeiding av HPLC data

Kvantitativ analyse av de ulike sakkaridene ble gjort ved å måle arealet under hver topp i programvaren Chromeleon. Arealene ble sammenlignet med arealene fra standardprøvene med kjent konsentrasjon for å bestemme [A1] og [A2]. Grad av prosessivitet ble bestemt ved å plote % nedbrutt β -kitin mot A2/A1. De ulike enzym variantene kunne deretter sammenlignes med ChiA villtypen.

4. Resultater

4.1 Valg av seterettede mutanter

Kitinaser har konserverte aromatiske residiuer som går fra det kitin bindende domenet til det aktive setet, og har vist seg å interagere med substratet ved binding. Aromatiske residiuer antas å ha stor betydning ved binding og posisjonering av substratet, og i tillegg antas de å være kritiske for prosessivitet aktivitet (Sorlie et al. 2012). Det aktive setet består også av ikke-aromatiske residiuer, som er posisjonert i veggen i det aktive setet. Disse ikke-aromatiske, men polare residiuene antas å ha betydning for binding og posisjonering av substratet i ChiA. I dette arbeidet har tre mutanter blitt laget hvor polare residiuer som er observert å interagere med substratet har blitt endret til alanin: E473, R172 og T276. I tillegg ble det laget 3 inaktive mutanter i ChiA; E315Q/T276A, E315Q/R172A og E315Q/E473A. I figur 4.1 vises de ulike aminosyrene som ble mutert, og hvordan de interagerer med substratet.



Figur 4.1: Presentasjon av en oligomer som interagerer med enzymet i det aktive setet (Norberg et al. 2011b). Residuene som ble mutert i denne oppgaven var Thr276, Glu473 og Arg172, og antas å være viktige ved posisjonering av substratet, og påvirke enzymets prosessive aktivitet.

4.1.2 Mutasjonsanalyse

I subsete -4, -3 og -2 er det viktige intermolekylære interaksjoner mellom spesifikke residuer og substratet. I de neste avsnittene beskrives de ulike residuene som ble mutert, og tenkelige effekter disse mutasjonene kan ha på prosessiv aktivitet og substrat-posisjonering i det aktive setet. I figur 4.2 og 4.3 vises aminosyren som ble mutert; E473 er merket gult, R172 er merket grønt og T276 er merket rødt.

4.1.2.1 R172A og E473A

Arginin (Arg/R) og Glutamat (Glu/E) er i posisjon 172 og 473, hver seg i aminosyresekvensen til ChiA. Arg172 ligger i veggen som danner et slags ”overheng” over den substratbindende kløften. Arg172 interagerer med Gly171 med karbonyl-oksygenet i subsete -3 (se figur 4.1). I tillegg dannes det hydrogenbindinger til O₆, som delvis er fra Arg172 og Glu 473. Glu473 ligger i hydrogenbindende avstand fra Arg172, og ligger i veggen over den substratbindende kløften.

Videre er Arg172 og Glu473 interessante å se på, fordi de interagerer flere steder (-2, -3 og -4) på GlcNAc. De kan danne elektrostatisk-dipol interaksjoner med substrate (Norberg et al. 2011b). Arg og Glu ble mutert til den nøytrale, upolare aminosyren alanin (Ala/A), som antas å svekke de intermolekylære interaksjonene mellom de polare residuene og substratet.

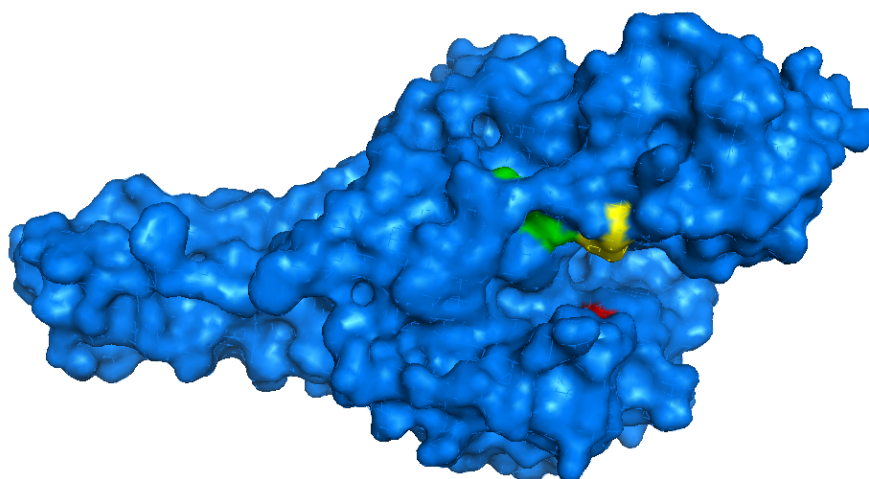
4.1.2.2 T276A

Treonin (Thr/T) er i posisjon 276 i aminosyresekvensen til ChiA. Residuet ligger i den motsatte veggen i det aktive setet hos ChiA i forhold til Arg172 og Glu473 (se figur 4.1). I subsete -3 danner Thr276 hydrogenbindinger med karbonyl-oksygenet til substratet, samtidig som Thr 276 danner hydrofobiske interaksjoner mellom metyl-gruppen fra N-acetyl med Leu277 og His229 (Norberg et al. 2011b). Thr 276 ble mutert til den nøytrale og upolare aminosyren alanin. Dette vil svekke dipol-dipol interaksjonen mellom Trp 275 og substratet.

4.1.2.3 E315Q

Glu315 i aminosyresekvensen til ChiA, og er den katalytiske syren. Residuet ble mutert til glutamin som inaktiverer enzymet. Denne mutanten ble brukt til å videre lage dobbelmutanter

av hver mutasjon over. Dette ble gjort for å analysere relasjonen mellom bindingsstyrke til substrat og prosessivitet. Ved å slå av den katalytiske syren, kan bindingsaffiniteten et substrat (for eksempel (GlcNAc)₆) måles ved bruk av isotermisk titeringskalorimetri for de ulike residuene. E315Q/E473A, E315Q/R172A og E315Q/T276A ble laget, men ble ikke utført forsøk med videre på grunn av manglende tid.



Figur 4.2: Presentasjon av residuene som ble mutert i ChiA. R172 og E473 er posisjonert i taket i det aktive setet, mens T276 ligger i veggen på motsatt side. R172 er farget grønt, E473 er farget gult, og T276 er farget rødt. Det antas at disse residuene er viktige for posisjonering av substratet, og viktige for enzymets prosessivitet.

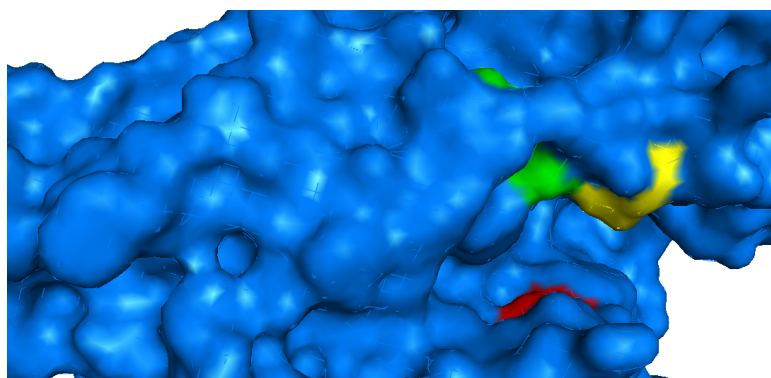


Fig 4.3: Presentasjon som viser posisjonen til de ulike aminosyrene som ble mutert i denne oppgaven. Illustrasjonen viser at aminosyrene ligger i veggene i det aktive setet, både veggen over og under. R172 er markert grønt, E473 er merket gult og T276 er merket rødt.

4.2 Seterettet mutagenese

I denne oppgaven ble 4 residuer mutert ved hjelp av *QuickChange II Site Directed Mutagenesis* kit fra Agilent. Det ble utført enkle punktmutasjoner, og kan leses om i mutasjonsanalyse delen (4.1.2)

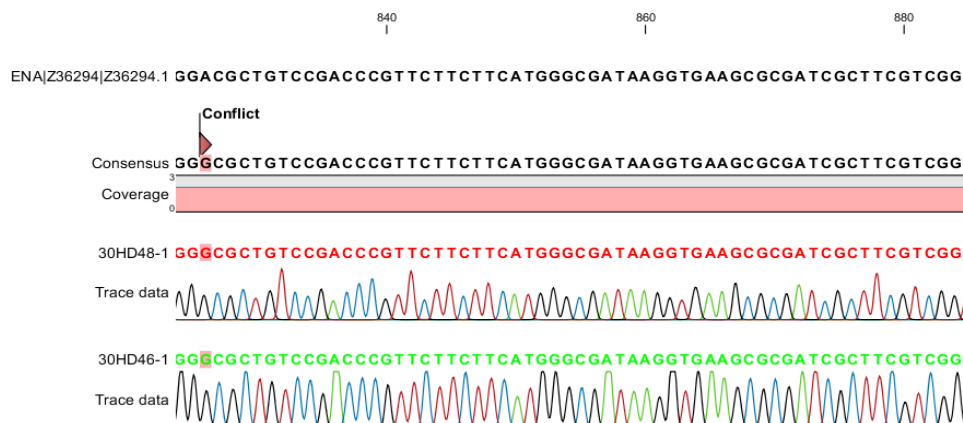
Tabell 4.1: Tabell som viser aminosyren, posisjonen, hvilken aminosyre den er blitt mutert til og hvilket subsete den ligger i.

Aminosyre	posisjon	Mutert til (aa)	subsete
R	172	A (alanin)	-3
E	473	A (alanin)	-3
T	276	A(alanin)	-3
E	315	Q (glumaminsyre)	-

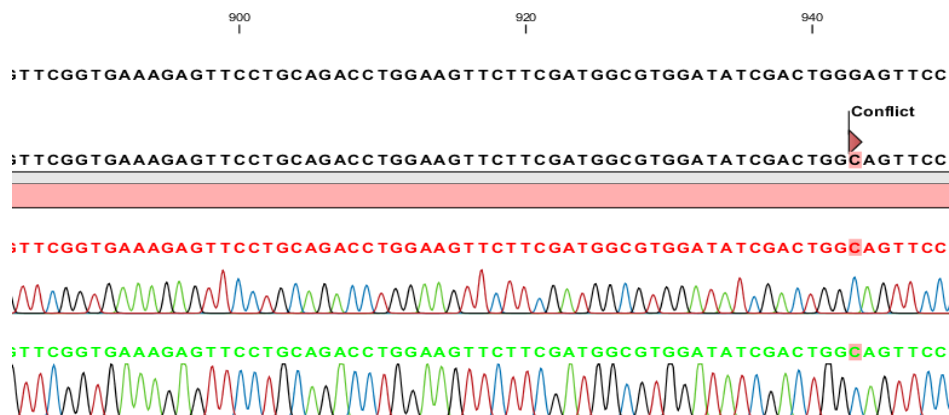
4.2.1 Sekvensering

Plasmidet ble sendt til GATC Biotech i Constance, Tyskland for å sjekke at det aktuelle plasmidet inneholdt den riktige mutasjonen. Resultatet ble analysert i et program som heter CLC DNA Workbench. Det muterte plasmidet ble sammenlignet med villtype sekvensen, og en eventuell mutasjon vil vises som ”conflict” i den muterte sekvensen. Et eksempel på hvordan mutasjonene ble bekreftet, og vises i figur 4.4 og 4.5. Det har kun blitt tatt med et eksempel av T276A mutant.

I figur 4.4 vises aminosyresekvensen til villtype plasmidet i ChiA øverst, og det muterte plasmidet til E315Q/T276A nedenfor med et residue merket med ”conflict”. Kodonet [ACG] vises øverst og samsvarer med aminosyren treonin, og var aminosyren som skulle muteres til alanin. Dette kodonet er blitt byttet ut med [GCG] som er riktig kodon for alanin. I figur 4.5 vises resten av av aminosyresekvensen til det muterte ChiA villtypeplasmidet. Her vises det at glutamat (E) er blitt mutert til glutamin (Q).



Figur 4.4: Aminosyresekvensen til *ChiA* villtype sammenlignet med mutert plasmid til E315Q/T276A. Residuet merket med "conflict" viser at treonin(Thr) er blitt mutert til alanin.



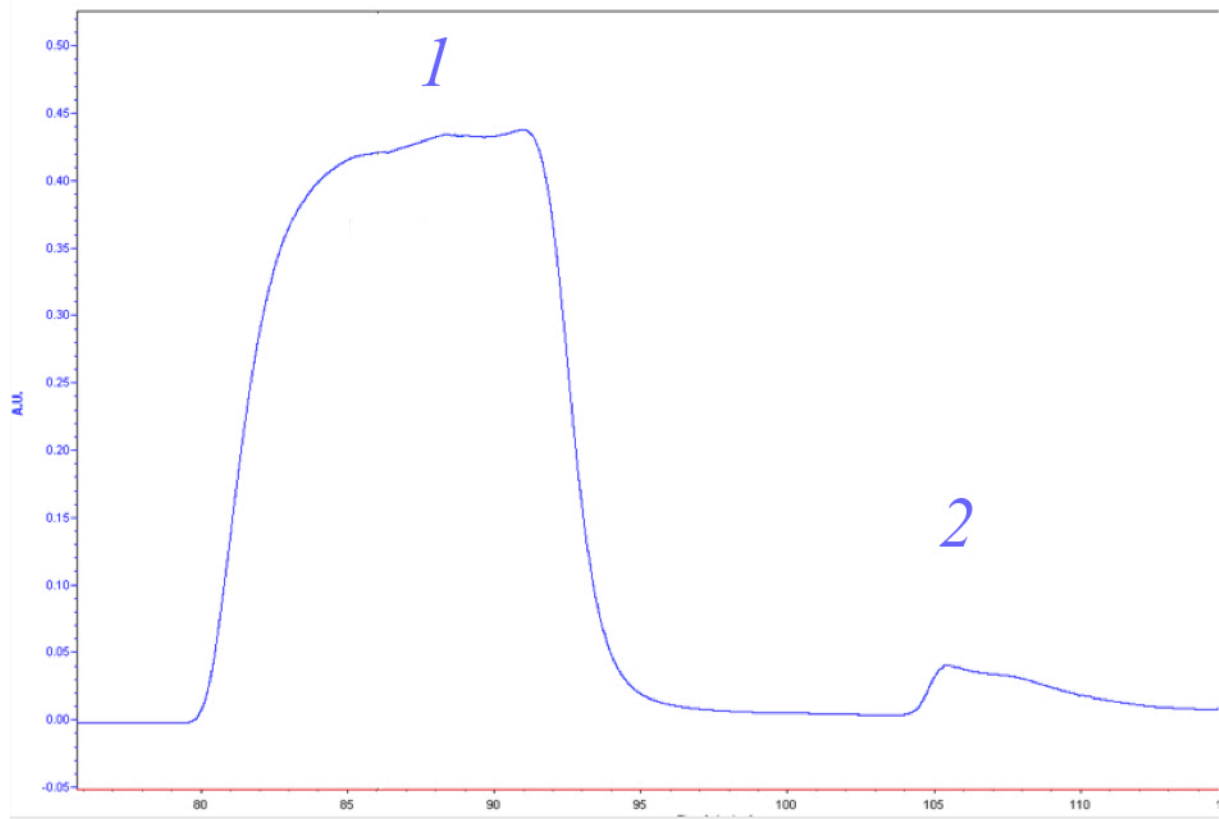
Figur 4.5: Aminosyresekvensen til *ChiA* villtype sammenlignet med mutert plasmid til E315Q/T276A. Residuet merket "conflict" viser at glutamat(E) er blitt mutert til glutamin (Q).

4.3 Rensing av aktive mutanter på kitinkolonne

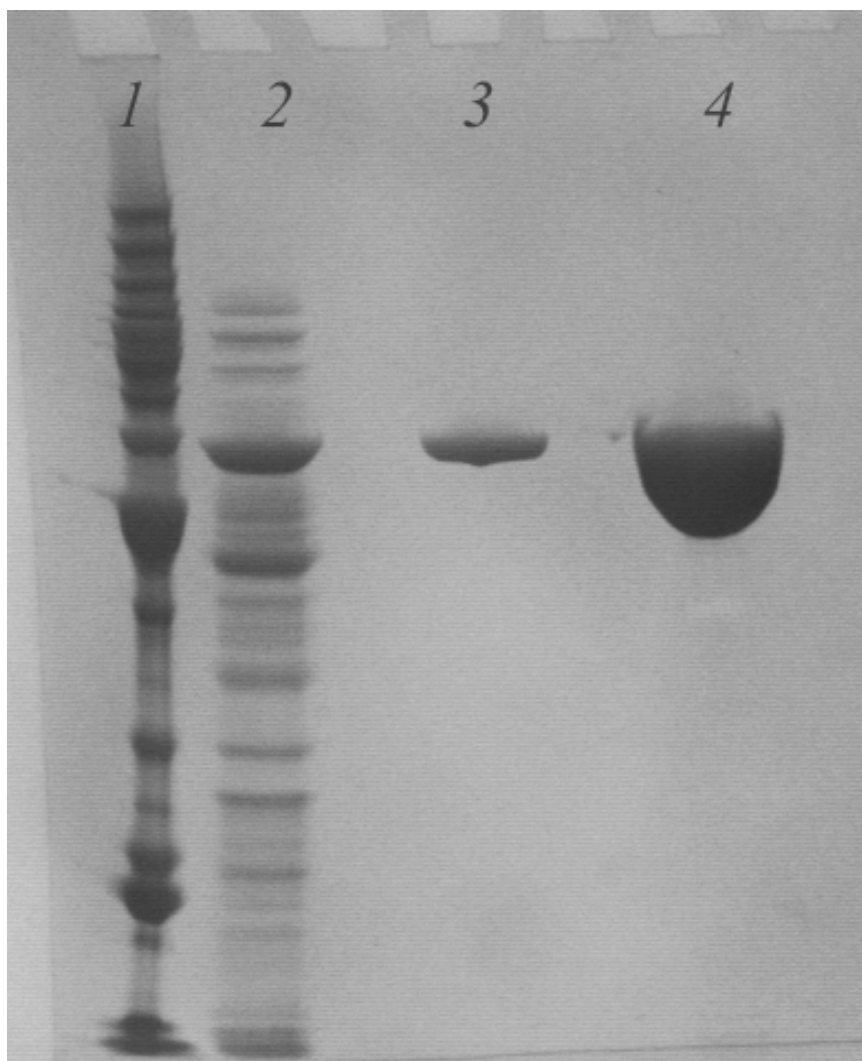
Det periplasmatiske ekstraktet som inneholdt enzymet av interesse ble renset på en kitinkolonne. I avsnitt 4.3.1 vises kromatogrammet og SDS-gelen for mutant T276A. I vedlegg B vises kromatogrammene og SDS-gelbildene for R172A og E473A.

4.3.1 Isolering av ChiA T276A

Kromatogrammet viser to tydelige topper (se figur 4.6). Den første toppen, V_0 , er voidtoppen. Voidtoppen som inneholder alle proteiner som ikke fester seg til kolonnematerialet, og som i dette tilfelle ikke er av interesse. ChiA T276A eluerte ut i den siste toppen. Eluatet ble samlet opp og analysert på SDS-PAGE gel for å kontrollere om proteinet av interesse var tilstede, og om separasjon fra andre proteiner i løsningen var vellykket (fig 4.7).



Figur 4.6: Kromatogrammet for rensing av T276A ved hjelp av Kitinkuler. Proteinene elueres ut i toppen merket 2. Voidtoppen er merket 1, her elueres alle andre proteiner.



Figur 4.7: SDS PAGE gel som viser isolering av ChiA T276A.

(1 = ladder, 2= periplastmatisk ekstrakt, 3= rensset protein og 3= oppkonsentrert protein).

I figur 4.7 viser brønn nr. 2 periplasmatisk ekstrakt for mutant T276A før rensing. Det er tydelig at proteinet er tilstede, fordi det er et sterk og klart bånd ved riktig størrelse (58 kDa). Brønn nr. 3 viser et klart og sterkt bånd ved riktig størrelse (58 kDa), som tyder på at rensingen var vellykket. Den samme brønnen viser ingen andre bånd, som tydeliggjør at alle andre proteiner ble ekskludert under rensingen. Brønn nr. 4 viser oppkonsentrert enzym.

4.3.2 Fluorometrisk bestemmelse av protein konsentrasjon

Proteinkonsentrasjonen ble bestemt ved å bruke Bradfordmetoden. Konsentrasjonen ble målt for å finne utbytte av protein etter rensing på kitinkuler. I tabell 4.2 vises proteinkonsentrasjonen av de ulike mutantene. ChiA villtypen og mutant R172A gav størst utbytte, mens E473A gav minst utbytte.

Tabell 4.2: Resultatet av målt proteinkonsentrasjon til ChiA villtype og ulike de ChiA mutantene.

Mutant	Konsentrasjon (mg/mL)	Volum (ml)
R172A	3,40	2
E473A	0,208	3
T276A	0,9152	2
Chi A villtype	5,15	3

* Konsentrasjon til ChiA villtype er hentet fra Hanne Hillestad Wold sin masteroppgave.

4.3.3 Aktivitetstest

En aktivitetstest ble utført for å kunne bestemme om de tillagede mutantene var aktive. Det lineære området ligger mellom 0-5000 nm, og derfor ble mutantene fortynnet i bufferløsning. Mutantene E473A og T276A ble fortynnet 1000 ganger. Mens R172A og Chi A villtype ble fortynnet 10 000 ganger for å ligge i det lineære området. Det ble laget 3 paralleller av hver mutant, og gjennomsnittet ble regnet ut. Gjennomsnittsaktiviteten ble videre bruk til å regne ut spesifikk aktivitet for hver mutant (se likning 3.1).

Tabell 4.3 viser den spesifikke aktiviteten til de ulike mutantene i tillegg til aktiviteten oppgitt i prosent i forhold til ChiA villtype. Aktiviteten varierer i stor grad mellom mutantene. E473A og R172A er klart mer aktiv i forhold til T276A. E473A er hele 93 % like aktiv som ChiA villtypen, R172A er 82 % mens T276A er minst aktiv med kun 7 % aktivitet i forhold til ChiA villtype

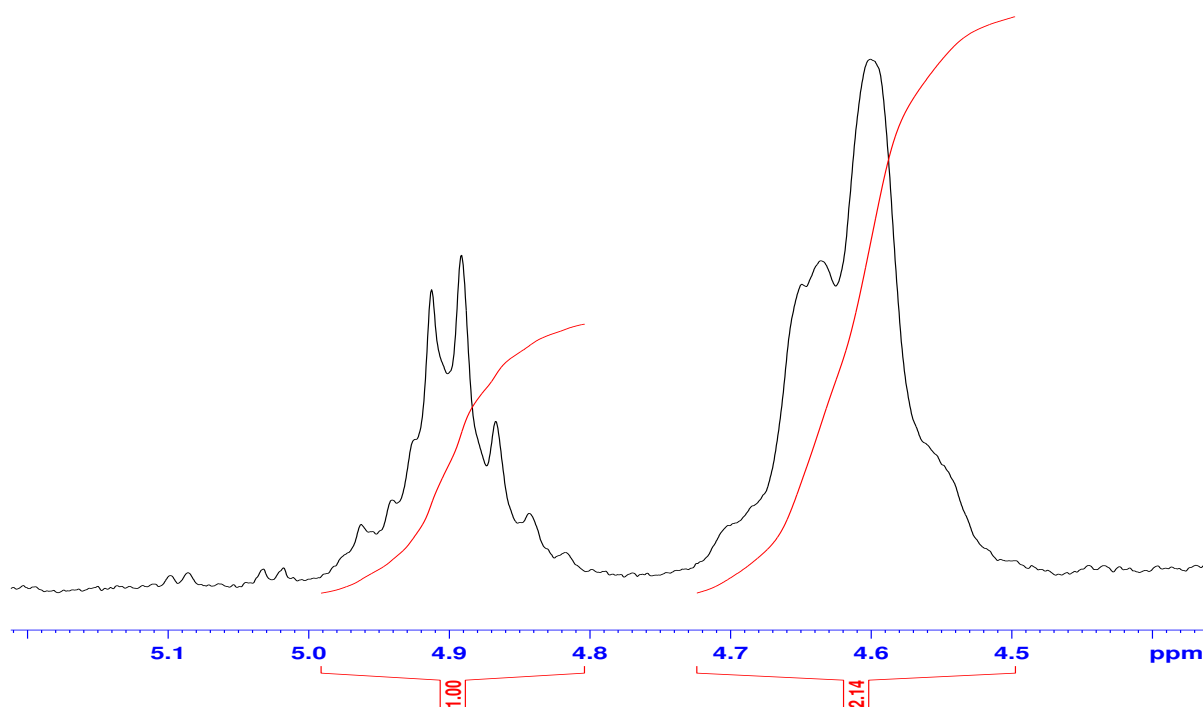
Tabell 4.3: Beregnet aktivitet for de ulike enzymvariantene når de ble testet mot 4-MU-(GlcNAc)₂. Det ble laget 3 paralleller for hver mutant, og gjennomsnittsfuouiscens ble brukt til å beregne spesifikk aktivitet. Relativ aktivitet beregnet i % relativt til ChiA villtypen.

Mutant	Gj. snitt fluorescense	Spesifikk aktivitet (nm/min/mg)	Aktivitet relativt til villtype i %
R172A	2235	26200	82
E473A	1462	28110	93
T276A	4987	2179	7
Chi A villtype*	3898	30275	100

*Resultatene til ChiA villtype er hentet fra Hanne Hillestad Wold sin oppgave.

4.4 Fremstilling av kitosan

Kitosan ble fremstilt fra β -kitin ved homogen deacetylering. Homogen deacetylering av kitin gir en tilfeldig fordeling av N-acetyl enheter. Det var nødvendig å bestemme acetyleringsgraden (F_A) for å kunne arbeide og gjøre fremtidige forsøk med sukkeret. ^1H NMR spekteret i figur 4.8 vises nedenfor, og ved hjelp av likning 3.3 og 3.4 ble acetyleringsgraden bestemt.



Figur 4.8: ^1H NMR spekteret viser fremstilt kitosan ved homogen deacetylering av β -kitin fra krabbe. Estimert verdi $F_A = 0,68$. F_A verdien ble estimert ved bruk av likning 3.3 og 3.4.

For å kunne estimere acetyleringsgraden ble acetylerede α -anomerer og acetylerede β -anomerer på reduserende ende lagt sammen med acetyleret enhet, inni eller på ikke-reduserende ende. Deretter ble det dividert på det totale antallet reduserende og ikke-reduserende ender, som ga en estimert F_A -verdi lik 0,68. F_A -verdien var noe under ønsket verdi ($F_A = 0,70$), og ble derfor ikke brukt videre (forklares mer i detalj i avsnitt 4.5).

4.5 Nedbrytning av kitosan $F_A=0,65$

Nedbrytning av kitosan med en $F_A=0,65$ ble utført med de ulike variantene av enzym som ble laget i denne oppgaven. Opprinnelig skulle den selvlagede kitosanen (se over) brukes, men siden acetyleringsgraden var noe under ønsket verdi ($F_A=0,70$) ble forsøkene utført med kitosan med en $F_A=0,65$ som Anne Line Norberg hadde laget. I tillegg ble noen av forsøkene utført før det ble laget eget kitosan, og dermed ville ikke resultatene vært sammenlignbare. Målet med dette forsøket var å få en prøve med en $\alpha=0,05$ siden sammenlikning av andel partallsoligomere med oddetallsoligomere bestemt ved size-exclusion chromatography (SEC) gir en kvalitativ indikasjon på grad av prosessivitet (Horn et al. 2006d). Grad av nedbrutt kitosan blir bestemt ved hjelp av ^1H NMR (Sørbotten et al. 2005)

4.5.1 ^1H NMR

Nedbrytning av kitosan med en $F_A=0,65$ ble utført for å finne prøven som inneholdt KOS med en $\alpha=0,05$. Fra hver nedbrytningreaksjon av kitosan (en for hver mutant ble) et utakk tatt også etter 7 dager. Dette ble utført for å oppnå maksimal nedbrytning av kitosanet.

Spaltningsgraden ble funnet ved å beregne reduserende ender i forhold til interne enheter ved bruk av likning 3.3 og 3.4 i avsnitt 3.5.3.

4.5.1.1 R172A

I figur 4.9 vises ^1H NMR spekteret for R172A som gav en $\alpha \approx 0,05$ ved degradering av kitosan med en $F_A=0,65$. I tabell 4.4 vises DP_n og α fra alle tidspunktene i degraderingsforløpet. I vedlegg D (avsnitt 8.4.1) vises ^1H NMR spekteret for 7 dagers nedbrytning av kitosan med mutant R172A.

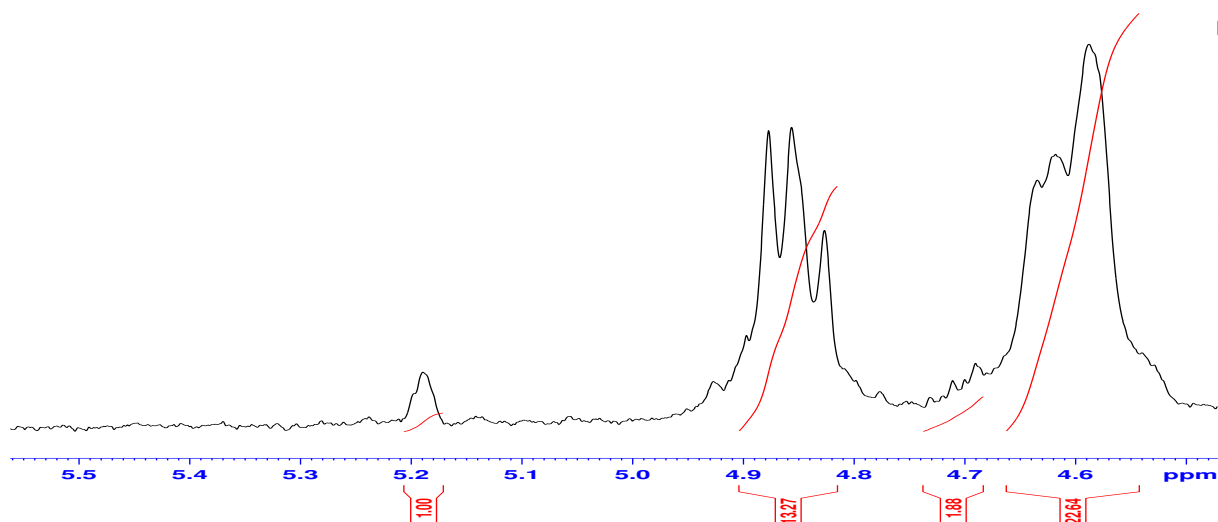


Fig 4.9: Spekteret viser nedbrytning av kitosan med en $F_A=0,65$ med mutant R172A i 15 minutter. Den reduserende enden til α -anomeren av en acetyllert enhet gir resonans ved 5,19 ppm, β -anomeren fra samme enhet gir resonans ved 4,7-4,8 ppm. A og D- enheter inne i, og ved ikke reduserende ender gir resonans ved 4,9 og 4,6 ppm.

Tabell 4.4: Resultatene av DP_n og α ved de ulike tidspunktene i nedbrytningsreaksjonen med mutant R172A. Substratet som ble brukt i nedbrytningsforsøket var kitosan med en $F_A=0,65$. Verdien merket med gult (α), er prøven som ble tatt videre til SEC analyse.

Mutant	Nedbrytningstid (min)	DP_n	α
R172A	0	77	0,013
	2,5	91	0,011
	5	59	0,017
	7,5	50	0,02
	10	21	0,048
	15	18	0,056
	20	14	0,07

	30	12	0,08
	60	9,	0,11
	7 dager	3	0,38

I tabell 4.4 vises de ulike tidsintervallene som nedbrytningsassayet ble stoppet ved, og hvilken DP_n og α som ble beregnet ved det tidspunktet. 15 minutters-prøven gav en $\alpha \approx 0,05$, og ble analysert videre ved bruk av SEC. R172A er noe treg de første 7,5 minuttene, men bruker fortsatt relativt kort tid på å spalte 5 % av glykosid-bindingene. 7 dagers prøven gav en $\alpha = 0,38$ (38%) som er høyere enn ChiA villtype (Horn et al. 2006b). I figur 4.10 presenteres data fra tabell 4.4 utenom 7 dagers prøven.

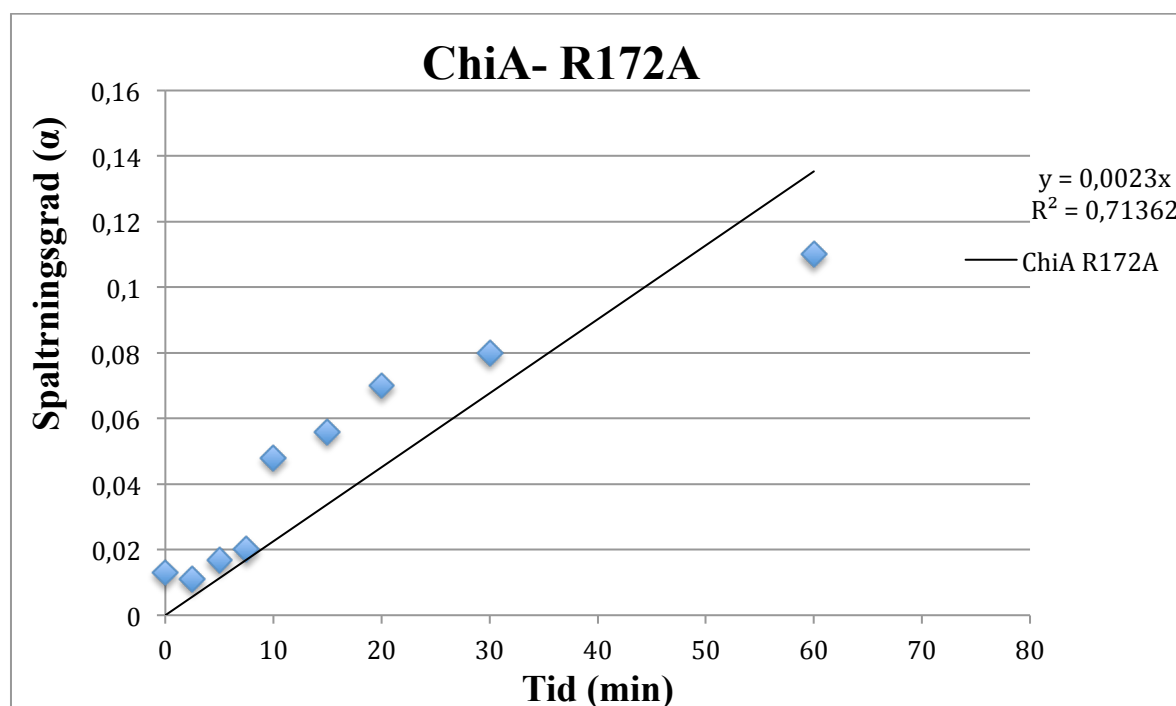
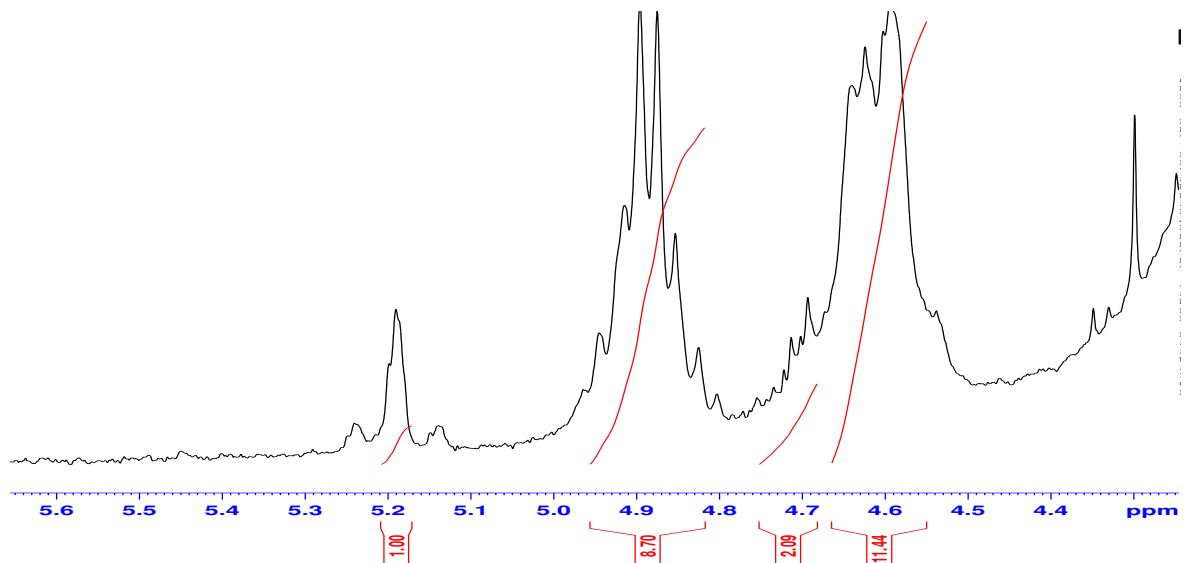


Fig 4.10: Figuren viser de første 60 minuttene i nedbrytningsassayet med kitosan ($F_A=0,65$) og ChiA R172A. Mutanten er relativt treg de første 7,5 minuttene.

4.5.1.2 E473A

I figur 4.11 vises ^1H NMR spekteret for E473A som gav en $\alpha \approx 0,05$ ved degradering av kitosan med en $F_A = 0,65$. I tabell 4.4 vises DP_n og α fra alle tidspunktene i degraderingsforløpet. I vedlegg D (avsnitt 8.4.2) vises ^1H NMR spekteret for 7 dagers nedbrytning av kitosan med mutant E473A.

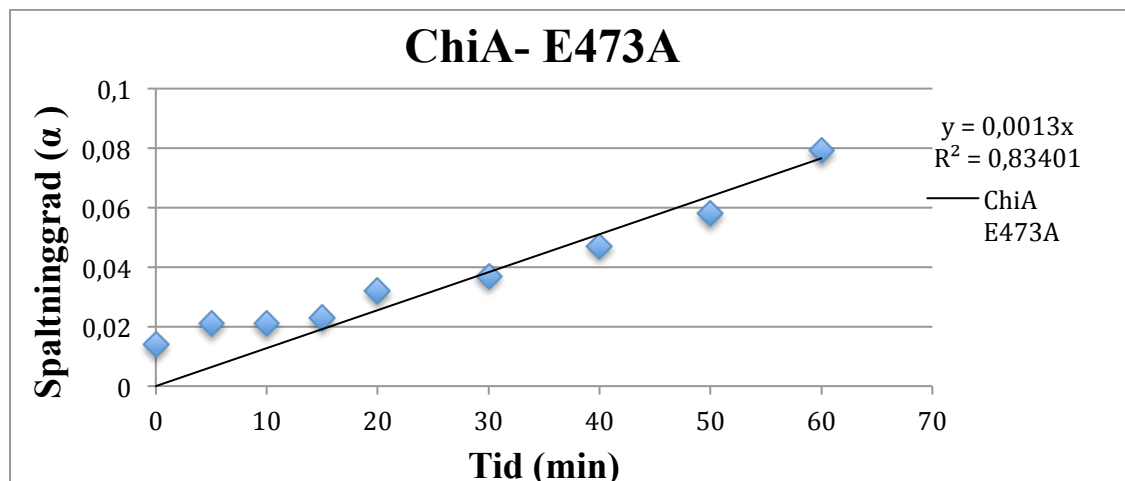


Figur 4.11: Spekteret viser nedbrytning av kitosan med en $F_A = 0,65$ med mutant E473A i 40 minutter. Den reduserende enden til α -anomeren av en acetyllert enhet gir resonans ved 5,19 ppm, β -anomeren fra samme enhet gir resonans ved 4,7-4,8 ppm. A og D- enheter inne i, og ved ikke reduserende ender gir resonans ved 4,9 og 4,6 ppm.

Tabell 4.5: Resultatene av DP_n og α ved de ulike tidpunktene i nedbrytningsreaksjonen med mutant E473A. Substratet som ble brukt i nedbrytningsforsøket var kitosan med en $F_A=0,65$. Verdien merket med gult (α), er prøven som ble tatt videre til SEC analyse.

Mutant	Nedbrytningstid(min)	DP_n	α
E473A	0	70,39	0,014
	5	45,53	0,021
	10	46,43	0,021
	15	42,85	0,023
	20	30,84	0,032
	30	27,02	0,037
	40	21,14	0,047
	50	17,24	0,058
	60	12,65	0,079
	7 dager	3,10	0,32

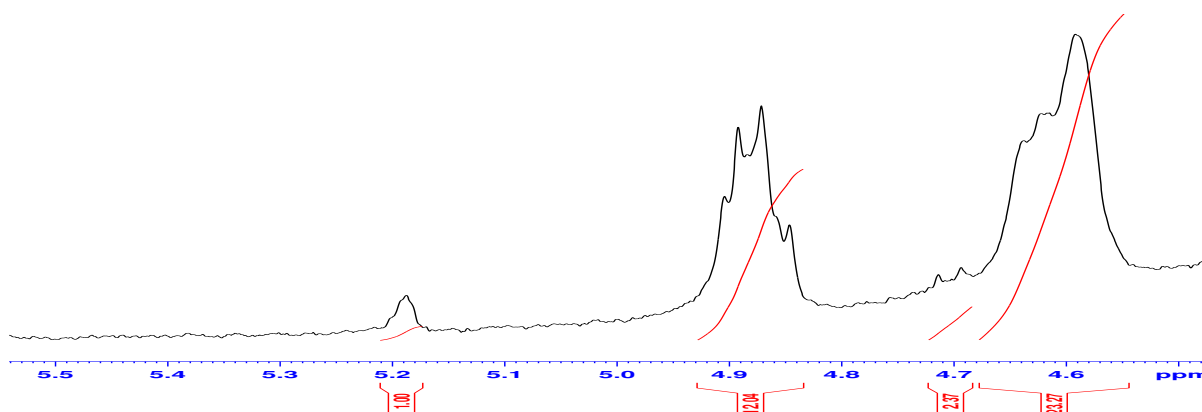
I tabell 4.5 vises resultater fra nedbrytningsassayet av kitosan ($F_A=0,65$) med mutant E473A. Tidsintervallene skiller seg litt fra tabell 4.4 fordi R172A brukte lenger tid til å degradere kitosan enn de andre mutantene. DP_n og α er beregnet, og α -verdien merket gult gav en $\alpha \approx 0,05$. E473A brukte 40 minutter på å bryte ned 5 % av glykosidbindingene, og er den mutantene som brukte lengst tid i forhold til de andre mutantene. 40 minuttersprøven ble analysert videre ved bruk av SEC, og vises i figur 4.17. 7 dagers prøven gav en $\alpha=0,32$, og er noe lavere enn ChiA villtype samt de andre mutantene. I figur 4.12 presenteres data fra tabell 4.5.



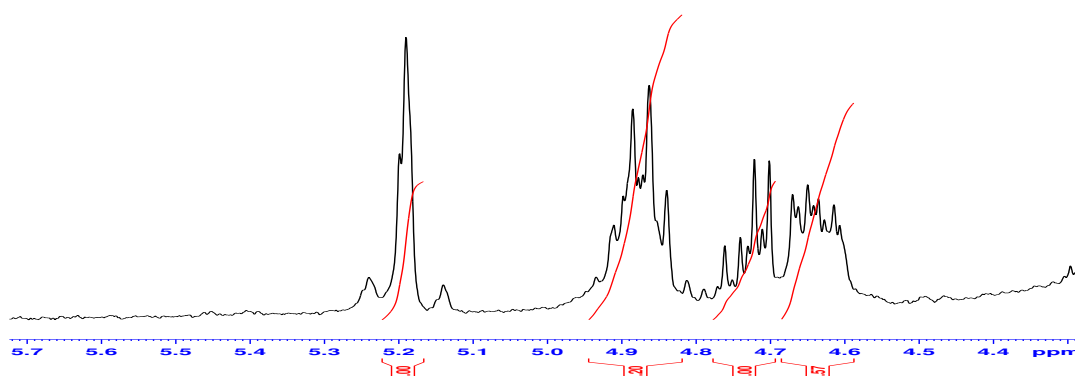
Figur 4.12: Figuren viser tiden ChiA E473A bruker på å degradere kitosan med en $F_A=0,65$. E473A bruker 40 minutt på å oppnå en α på 0,05, og er dermed det enzymet som bruker lengst tid av alle mutantene.

4.5.1.3 T276A

I figur 4.13 vises ^1H NMR spekteret for T276A som gav en $\alpha \approx 0,05$ ved degradering av kitosan med en $F_A=0,65$, og figur 4.14 viser spekteret til 7 dagers-prøven med en $\alpha \approx 0,33$. I tabell 4.6 vises DP_n og α fra alle tidspunktene i degraderings-forløpet.



Figur 4.13: Spekteret viser nedbrytning av kitosan ($F_A = 0,65$) med mutant T276A i 7,5 minutter. Med en konsentrasjon på $2,5 \mu\text{g}$ pr mg kitosan. Den reduserende enden til α -anomeren av en acetyllert enhet gir resonans ved 5,19 ppm, β -anomeren fra samme enhet gir resonans ved 4,7-4,8 ppm. A og D- enheter inne i, og ved ikke reduserende ender gir resonans ved 4,9 og 4,6 ppm. Uttak ved 7,5 minutter gav en $\alpha=0,085$.

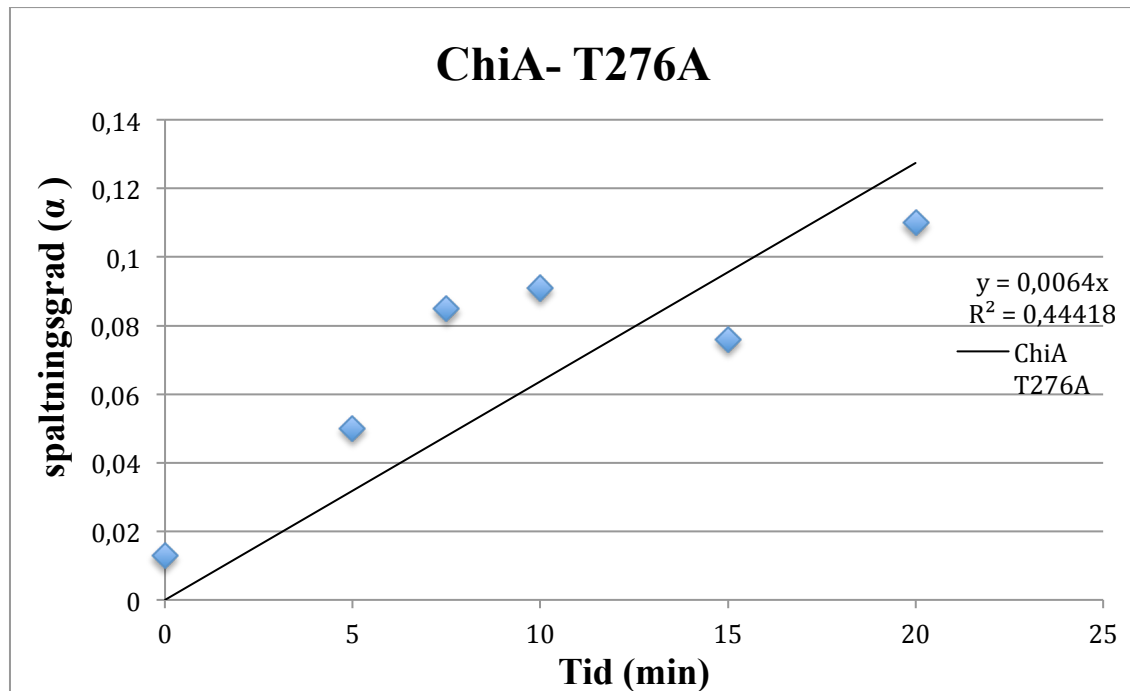


Figur 4.14: Spekteret viser nedbrytning av kitosan ($F_A=0,65$) med mutant T276A over 7 dager. Den reduserende enden til α -anomerer av en acetyllert enhet gir resonans ved 5,19 ppm, β -anomerer fra samme enhet gir resonans ved 4,7-4,8 ppm. A og D- enheter inne i, og ved ikke reduserende ender gir resonans ved 4,9 og 4,6 ppm. 7 dagers prøven for T276A gav en $\alpha = 0,34$.

Tabell 4.6: Resultatene av DP_n og α ved de ulike tidpunktene i nedbrytningsreaksjonen med mutant T276A. Substratet som ble brukt i nedbrytningsforsøket var kitosan med en $F_A=0,65$. Verdien merket med gult (α), er prøven som ble tatt videre til SEC analyse

Mutant	Nedbrytningstid (min)	Dpn	α
T276A	0	77,38	0,0129
	5	18,2	0,05
	7,5	11,6	0,085
	10	10,98	0,091
	15	13,08	0,076
	20	8,7	0,11
	7 dager	2,885	0,34

I tabell 4.6 presenteres DP_n og α beregnet ved bruk av likning 3.2 og 3.3. T276A var den mutanten som degraderte kitosan ($F_A=0,65$) raskest, og gav en α noe høyere enn ønsket. 5 minutters-prøven gav en eksakt $\alpha=0,05$, og ble opprinnelig brukt videre. Men ettersom resultatet gitt ved SEC-analyse ikke var gode ble 7,5 minutters-prøven brukt videre. I figur 4.15 vises dataen grafisk fra tabell 4.6.



Figur 4.15: Figuren viser tiden ChiA T276A bruker på å degradere kitosan med en $F_A=0,65$. T276A bruker 7,5 minutt på å oppnå en $\alpha \approx 0,05$, som er relativt raskt i forhold til de andre mutantene.

4.5.2 Oppsummering

I figur 4.10, 4.12 og 4.15 vises α plottet mot tid for de ulike mutantene. Stigningstallet sier noe om hvor aktivt mutantene degraderer kitosan, og er derfor betegnet som aktivitet i tabell 4.7. T276A er mest aktiv ved degradering av kitosan, og E473A er minst aktiv. Men mutantene er fortsatt like effektive som villtype, i og med at de når max $\alpha \approx 0,33$.

Tabell 4.7: Aktiviteten (α/min) vises i tabellen. T276A er mest effektiv ved degradering av kitosan, og E473A er minst effektiv.

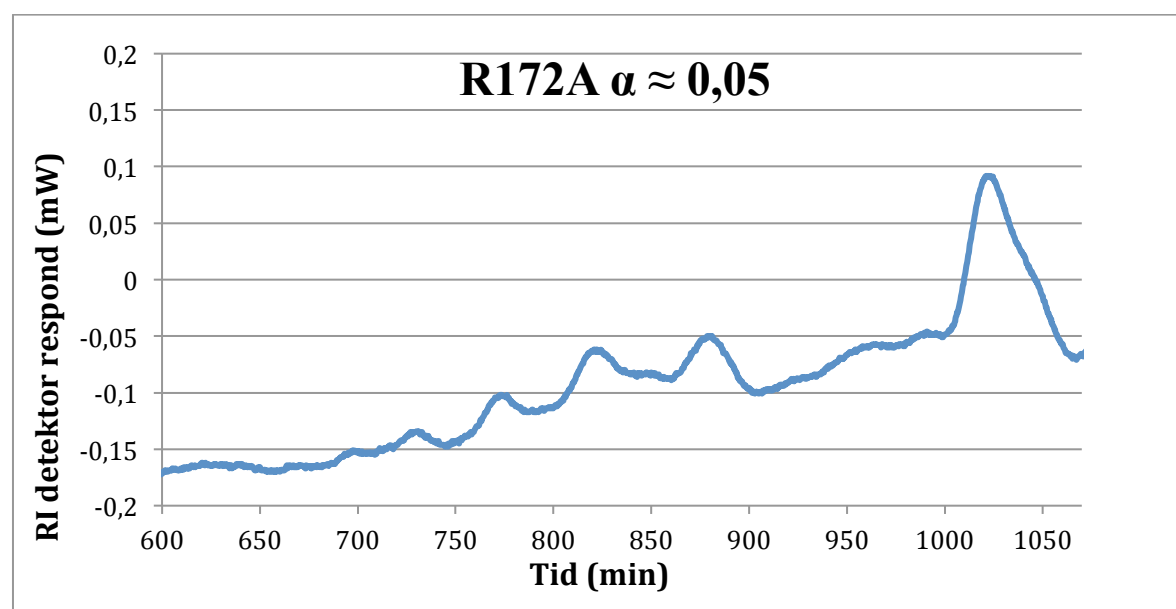
Mutant	Aktivitet (α/min)
R172A	0,0023
E473A	0,0013
T276A	0,0064

4.6 Størrelses eksklusjonskromatografi (SEC)

For å kunne analysere kvalitativt og kvantitativt ble nedbrytningsproduktene (analysert ved hjelp av ^1H NMR) videre analysert med SEC. Både oligomer og polymer- fraksjonene ble analysert for å studere hvilke oligomere som dannes og i hvor stor mengde i forhold til hverandre.

4.6.1 R172A

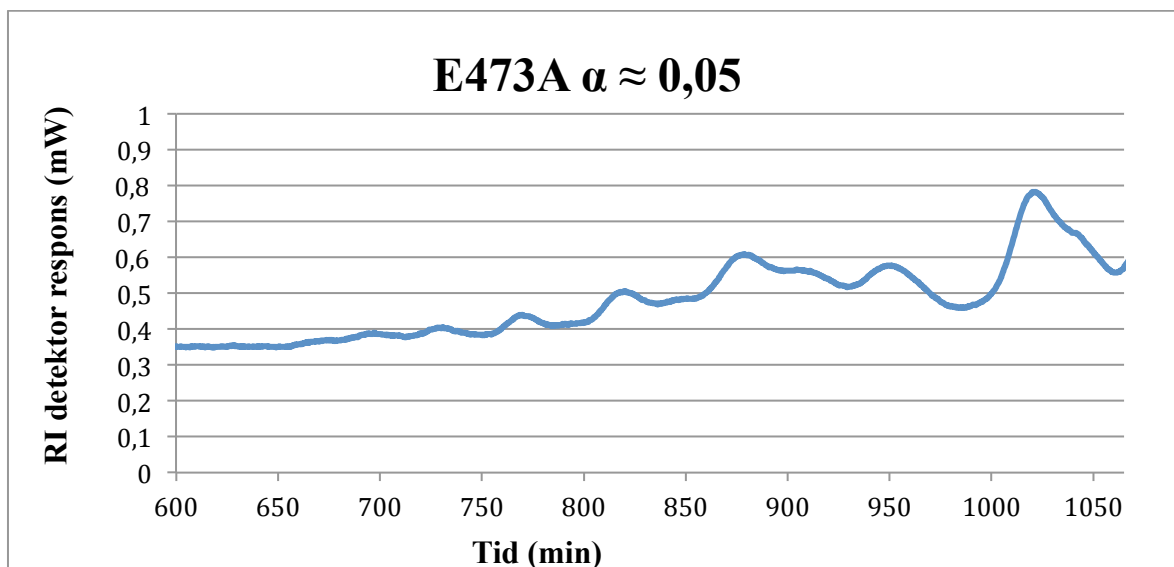
Nedenfor vises kromatogrammet for enzym R172A etter nedbrytning av kitosan i 15 minutter ($\alpha \approx 0,05$). Kromatogrammet viser partallet oligomertopper som elueres ut i den initiale tidelige fasen av separasjonen. Oddetallstopper er nærmest fraværende, og voidtoppen vises ikke fordi den ble kjørt i en separat analyse (se vedlegg E). Kromatogrammet viser at R172A følger det typiske produkt-mønsteret til prosessive ChiA villtype. Imidlertid er det tydelig at partallsproduktene er noe ulike ChiA villtype, som kan være et indikasjon på nedsatt prosessivitet (Horn et al. 2006b).



Figur 4.16: Kromatogrammet viser fordelingen av oligomer fraksjonene av kitosan ($F_A = 0,65$) hydrolysert av Chi A mutant R172A etter 15 minutter. Den beregnede $\alpha \approx 0,05$. Polymer fraksjonen (voidtoppen) vises i vedlegg E (avsnitt 8.5.1).

4.6.2 E473A

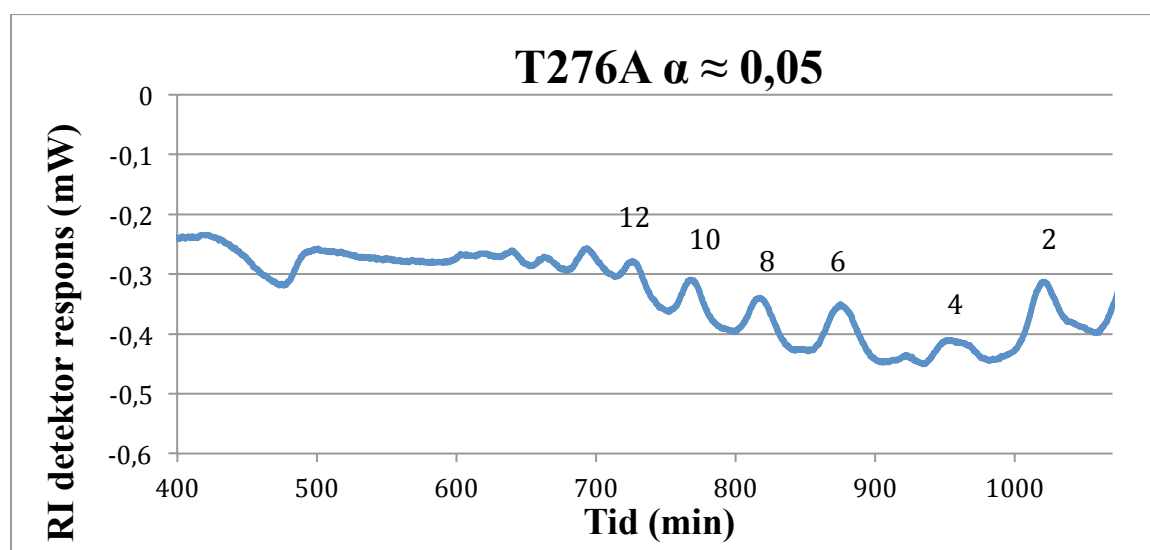
I figur 4.17 vises kromatogrammet for mutant E473A ved degradering av kitosan ($F_A=0,65$) med en $\alpha \approx 0,05$. Syv dagers nedbrytningsdata presenteres i vedlegg E. Kromatogrammet viser en relativt lavere dominans av partallsprodukter ved sammenligning med ChiA villtype (Horn et al. 2006b), noe som kan tyde på nedsatt prosessivitet mot kitosan.



Figur 4.17: Kromatogrammet viser fordelingen av oligomer fraksjonene av kitosan ($F_A=0,65$). Hydrolysen er utført med ChiA E473A etter 40 minutter. Den beregnede $\alpha \approx 0,05$. Polymerfraksjonen (voidtoppen) vises i vedlegg E (avsnitt 8.5.2).

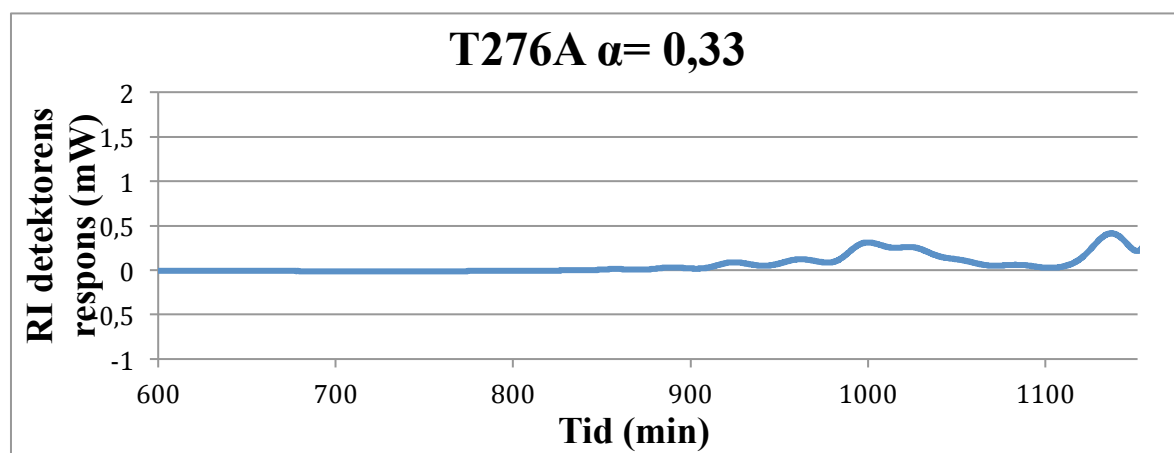
4.6.3 T276A

Figur 4.18 viser kromatogrammet for T276A ved degradering av kitosan ($F_A=0,65$) med en $\alpha \approx 0,05$. I figur 4.19 vises kromatogrammet for T276A etter syv dager med en $\alpha \approx 0,33$. Figur 4.18 viser at T276A har et produktmønster mest likt ChiA villtype (Horn et al. 2006b), og har tydelige partallsprodukter. Oddetallstopper er nærmest fraværende, noe som tyder på prosessiv degradering av kitosanen. 7,5 minutters-prøven ble videre annotert for å kunne bekrefte at det var partallsprodukter i de synlige toppene. Syv-dagers nedbrytningsproduktene ble videre sekvensert for å studere subsetepreferanser.



Figur 4.18: Kromatogrammet viser fordelingen av oligomere ved degradering av kitosan ($F_A = 0,65$) med ChiA T276A etter 7,5 minutter. Toppene ble annotert ved hjelp av MALDI-TOF-MS, og viser et karakteristisk prosessivt produkt-mønster. Lange partallet polymerkjeder elueres ut tidlig, og korte dimer-produkter elueres ut tilslutt.

T276A viser som nevnt over et typisk produktmønster for prosessive enzymer, som innebærer at det er dominans av partallstopper. 12-mer var den lengste kitooligosakkariden som ble identifisert, og elueres ut tidlig under separeringen (SEC).



Figur 4.19: Kromatogrammet viser resultatet fra ukensnedbrytning av kitosan ($F_A = 0,65$) med ChiA T276A. Ved 1H NMR analyse ble $\alpha = 0,33$.

4.7 Massespektrometriske analyser av kitooligosakkarider (MS)

Annontering av toppene i de ulike SEC-kromatogrammene ble gjort ved MALDI-TOF-MS, og vises i figur 4.18. Sekvensering av kitooligosakkarider ble utført ved hjelp av MALDI-TOF og MALDI-TOF-TOF massespektrometri. Oligosakkaridene ble derivatisert før sekvensering med 2-aminoacridone (AMAC) i den reduserende enden. E473A ble ikke sekvensert på grunn av tidsmangel. Se vedlegg C for mer detaljer.

4.7.1 Subsetepreferanser for ChiA villtype, R172A og T276A

Tabell 4.8 viser subsetepreferanser til ChiA villtype. Enzymet har en klar preferanse for en acetylertenhet (**A**) i subsete -4 og -2, og en absolutt preferanse for **A** i -1 subsete. Det observeres også preferanse for en deacetylertenhet (**D**) i subsete -3. R172A har kun absolutt preferanse for **A** i -1 subsete. Det observeres ingen klare subsetepreferanser i de andre subsetene. T276A har en klar preferanse for **A** i subsete -1, -3 og -4. I subsete -2 observeres ingen klare preferanser.

Tabell 4.8: Resultat fra sekvensbestemmelse av kitoooligosakkarider med en DP=5 ved degradering av kitosan ($F_A=0,65$) til en $\alpha=0,33$ (maks) med ChiA villtype, ChiA R172A og ChiA T276A. Den reduserende enden er merket rød.

Mutant	m/z	Kitoooligosakkarid	Sekvens
ChiA villtype*	1166,285	D2A3	DADA AADA
R172A*	1166,22	D2A3	DDAA DAAD DADA ADAD ADDA
	1208,28	D1A4	AAAD ADAA
	1124,21	D3A2	DDAD
T276A	1168,687	D1A4	DAAA AAAD
	1372,456	A5	AAAA

* Resultater hentet fra Anne Line Norberg (Norberg et al. 2011c)

4.8 Nedbrytning av β -kitin

Ved å inkubere enzym med substrat (β -kitin) over ulike tidsperioder, og deretter analysere prøvene ved hjelp av HPLC kunne forholdet mellom $(\text{GlcNAc})_2$ og GlcNAc (A2/A1) bestemmes. Dette er en mye brukt metode som gir et mål på prosessivitet. Hvor mye som teoretisk sett var mulig for ChiA og bryte ned (100%) ble beregnet (se vedlegg F, avsnitt 8.6.1), og plottet mot A2/A1.

4.8.1 HPLC av nedbrutt β -kitin

Ved degradering av β -kitin med de ulike mutantene var dimer/monomer ratioen generelt lavere enn hos ChiA villtype. Av den grunn kan det antas at mutasjonene har en effekt på prosessiviteten. I de neste avsnittene presenteres resultater for de ulike mutantene, i tillegg til ChiA villtype. Standardavviket ble beregnet for alle HPLC-resultatene, og vises i vedlegg F avsnitt 8.6.2. ChiA villtype brøt ned mer kitin enn det som faktisk var teoretisk mulig. Dette kan ha kommet av; unøyaktig utveiling av β -kitin (mer enn 2 mg), eller at for lite buffer ble tilsatt (for høy konsentrasjon). Dette ble tatt i betraktning, og resultater fra Silje Benedicte Lorentzen ble brukt i stedet for. Dersom det hadde vært mer tid ville dette forsøket blitt gjort på ny. Data innhentet fra startfasen i nedbrytningsforsøket er ikke tatt med fordi det ligger relativt mye usikkerhet i disse tallene. Alle detaljer vises som nevnt over, i vedlegg F avsnitt 8.6.2

4.8.1.1 R172A

I tabell 4.9 vises HPLC-resultatene for nedbrytning av β -kitin med enzym R172A. I startfasen er forholdet mellom dimer og monomer høy, samtidig som % nedbrutt kitin er lav.

Dimer/monomer forholdet minker etter hvert som kitinet blir brutt ned. R172A greier å bryte ned all kitinet, og forholdet mellom dimer og monomer ved 100 % nedbrutt er 9.

Tabell 4.9: Tabellen viser HPLC resultater fra nedbrytning av β -kitin med enzym R172A. Gjn.snitt av A2/A1 mot % nedbrutt β -kitin vises. Standardavvik vises i vedlegg F, avsnitt 8.6.2.

Gjennomsnitt A2/A1	% Nedbrutt β -kitin
70	7
66	13
65	14
45	24
24	54
20	48
9	106*

* 106 % nedbrutt er teoretisk ikke mulig, og kan komme av unøyaktighet i prøveopparbeidelsen.

Avviket er såpass lite at dette regnes som gyldig.

I figur 4.20 vises en grafisk fremstilling av verdiene i tabell 4.9. Standardavvik er plottet i hvert punkt i grafen.

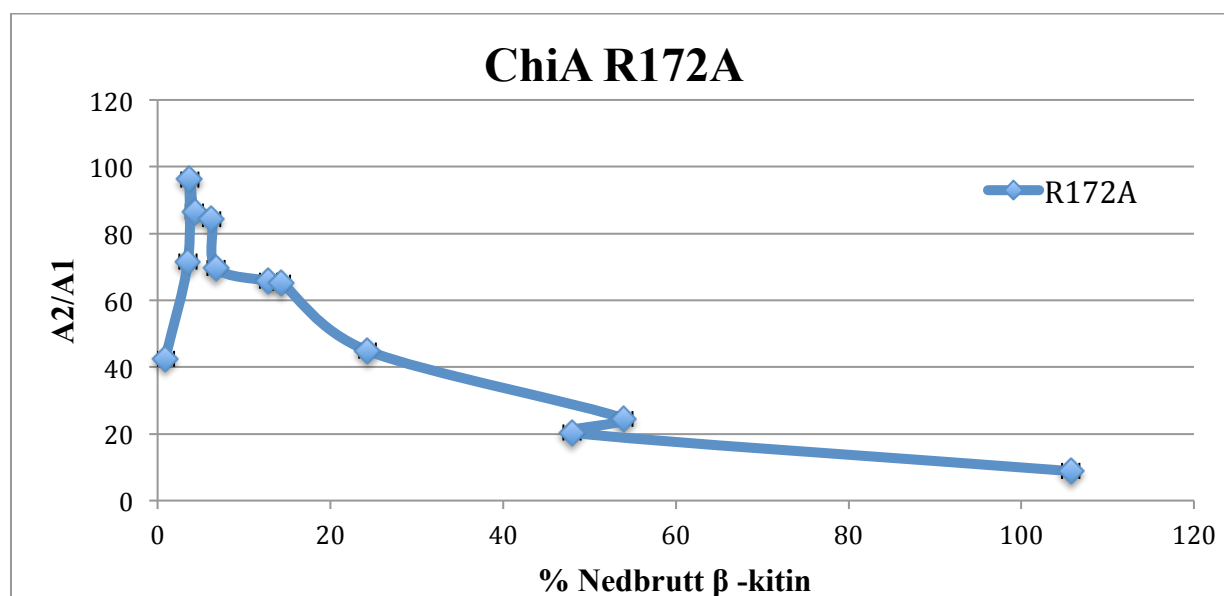


Fig 4.20: Grafisk fremstilling av nedbrytning-assayet av β -kitin med enzym R172A. Grafen viser A2/A1 plottet mot % nedbrutt β -kitin, og standardavvik innsatt i hvert punkt (se vedlegg F, avsnitt 8.6.2 for mer detaljer)

4.8.1.2 T276A

Tabell 4.10 viser resultatene av nedbrytning av β -kitin med enzym T276A. Forholdet mellom dimer og monomer er noe høyt i starten, samtidig som % nedbrutt kitin er lavt.

Dimer/monomer forholdet synker i samme takt som % nedbrutt kitin øker. T276A greier ikke å bryte ned 100 % av β -kitinet, og når kun 88 %. Ved 88 % er dimer/monomer forholdet 10.

Tabell 4.10: Tabellen viser HPLC resultater fra nedbrytning av β -kitin med enzym T276A. Gjennomsnitt av A2/A1 er plottet mot % nedbrutt β -kitin. Standardavvik vises i vedlegg F avsnitt 8.6.2.

Gjennomsnitt A2/A1	% Nedbrutt β -kitin
51	4
51	5
48	7
42	13
26	24
22	36
10	88

I figur 4.21 vises en grafisk fremstilling av tabell 4.10, og standardavvik er plottet i hvert punkt i grafen. Detaljer vises i vedlegg F, avsnitt 8.6.2.

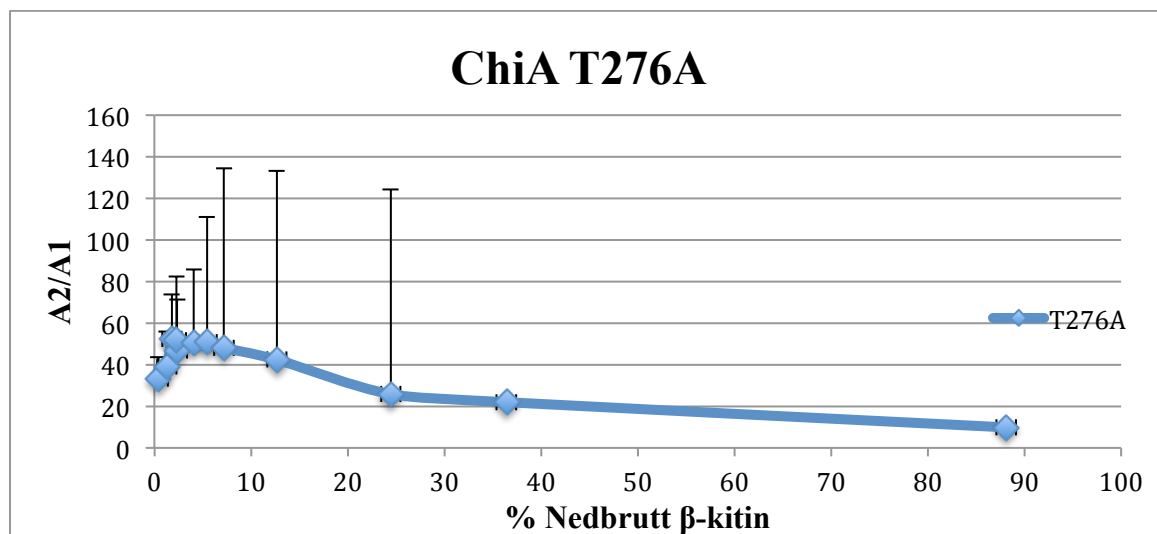


Fig 4.21: Grafisk fremstilling av nedbrytningsassay av β -kitin med enzym T276A. Grafen viser A2/A1 plottet mot % nedbrutt β -kitin, og standardavvik innsatt i hvert punkt (se vedlegg F, avsnitt 8.6.2 for mer detaljer).

4.8.1.3 E473A

I tabell 4.11 vises HPLC-resultatene for nedbryning av β -kitin med enzym E473A. Forholdet mellom dimer og monomer er 55 i starten, og igjen er % nedbrutt kitin lavt. Dimer/monomer ratioen synker på samme tid som % nedbrutt kitin øker. E473A bryter ned 96 % av all kitinet, og forhold mellom dimer og monomer er 7 ved slutten av reaksjonen.

Tabell 4.11: Tabellen viser HPLC resultater fra nedbrytning av β -kitin med enzym E473A. Gjennomsnittet av A2/A1 er plottet mot % nedbrutt β -kitin. Standardavviket vises i vedlegg F, avsnitt 8.6.2.

Gjennomsnitt A2/A1	% Nedbrutt β -kitin
55	13
48	12
40	22
27	26
16	59
13	75
7	96

I figur 4.22 vises en grafisk fremstilling av tabell 4.11, og standardavvik er plottet i hvert punkt i grafen. Se vedlegg F, avsnitt 8.6.2 for mer detaljer.

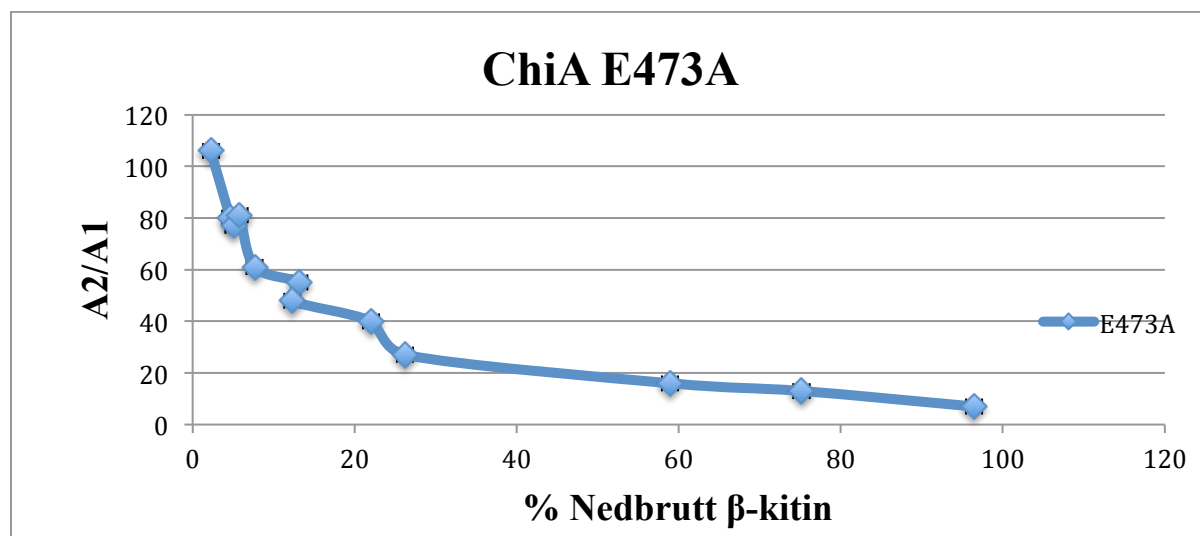


Fig 4.22: : Grafisk fremstilling av nedbrytningsassaety av β -kitin med enzym E473A. Grafen viser A2/A1 plottet mot % nedbrutt β -kitin, og standardavvik innsatt i hvert punkt (se vedlegg F, avsnitt 8.6.2 for mer detaljer).

4.8.1.4 ChiA Villtype

Resultatene av nedbrytnings assayet av β -kitin med ChiA villtype vises i tabell 4.12, og er hentet fra Silje Benedicte Lorentzen sin oppgave. Forholdet mellom dimer og monomer er 27 i starten, med 30 % kitin brutt ned. Dimer/monomer forholdet synker gradvis, samtidig som % nedbrutt kitin øker. Ved reaksjonsslutt er forholdet mellom dimer og monomer lav (4), og enzymet brytter ned 98 % av det som er teoretisk mulig.

Tabell 4.12: Tabellen viser HPLC resultater fra nedbrytning av β -kitin med enzym ChiA villtype. Gjennomsnitt av A2/A1 mot % nedbrutt β -kitin.

Gjennomsnitt A2/A1	% Nedbrutt β -kitin
27	30
24	35
14	60
9	86
8	90
4	98

* Resultater hentet fra Silje Benedicte Lorentzen

I figur 4.23 vises en grafisk fremstilling av tabell 4.12

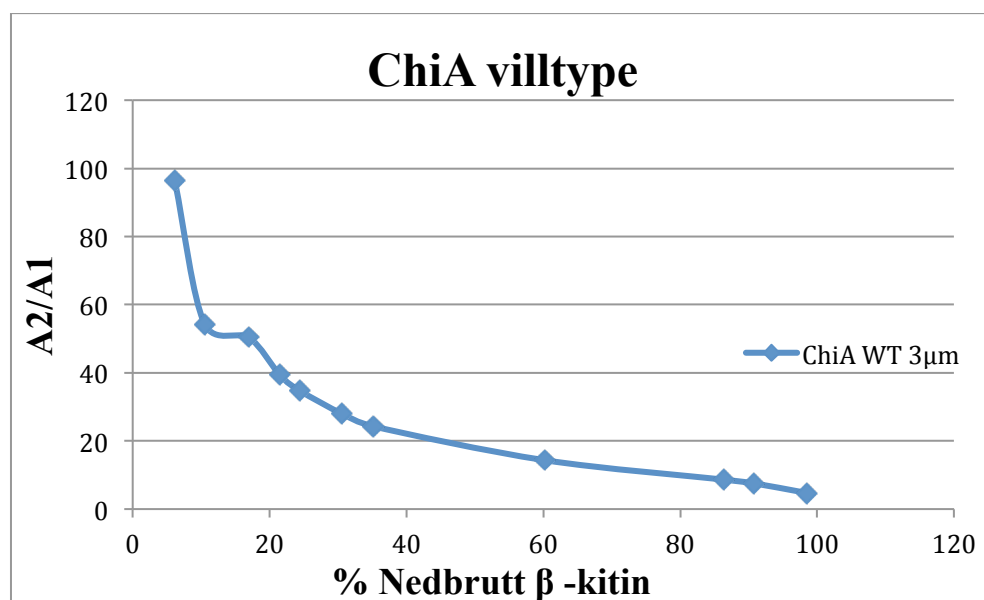
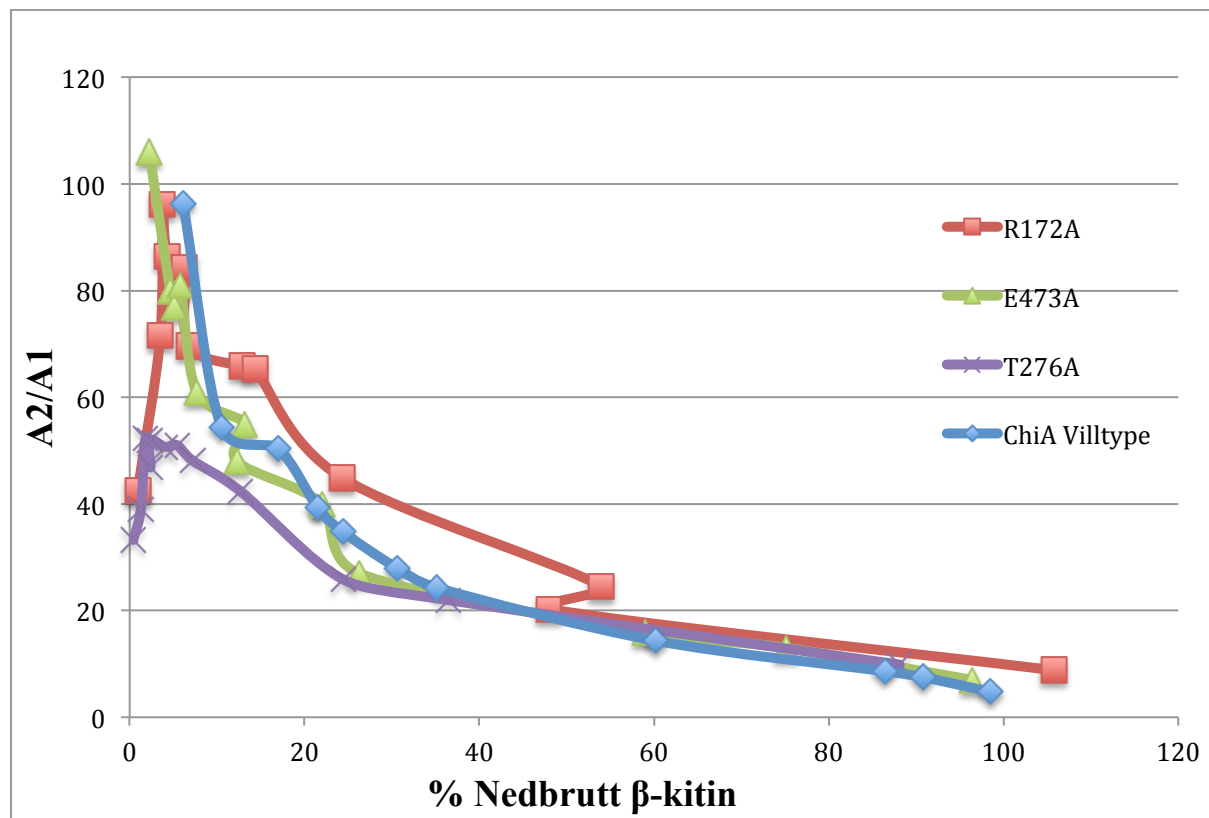


Fig 4.23: : Grafisk fremstilling av nedbrytnings-assay av β -kitin med ChiA villtype. Grafen viser A2/A1 plottet mot % nedbrutt β -kitin, og standardavvik innsatt i hvert punkt.

4.8.2 Oppsummering av alle HPLC resultatene

Figur 4.24 viser en samlet graf for alle nedbrytningsforsøkene. A2/A1 er plottet mot % nedbrutt β -kitin, og er som nevnt over er et mål på prosessivitet.

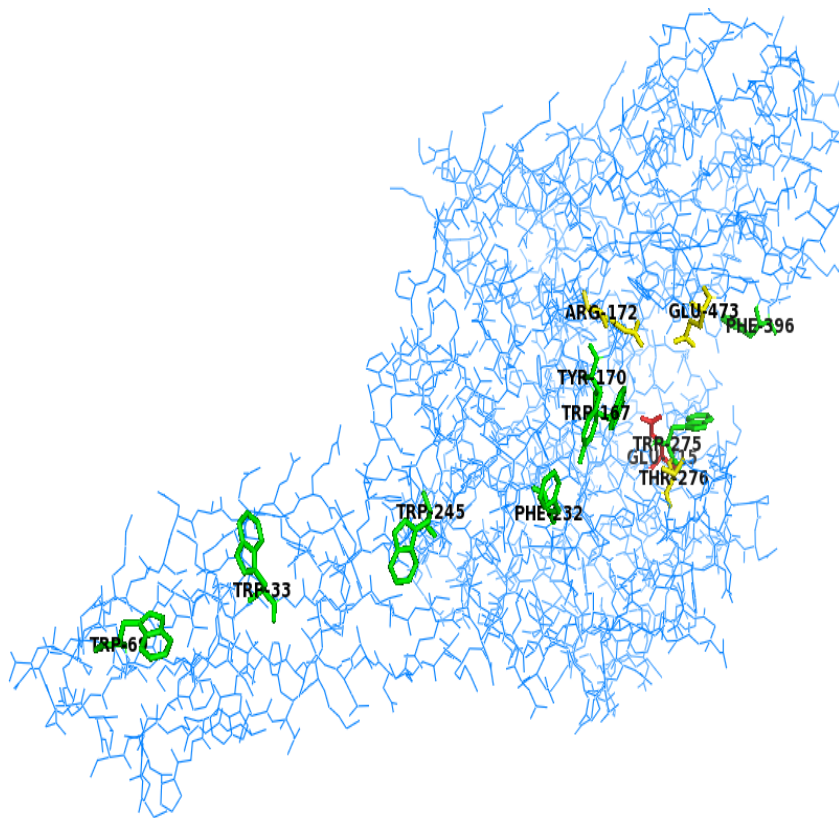
Alle mutantene er relativt effektive mot β -kitin, og bryter ned omtrent 100 %. T276A var minst effektiv mot β -kitin, og R172A var mest effektiv. T276A hadde det minste forholdet mellom dimer og monomer gjennom assayet, og R172A hadde det høyeste forholdet gjennom assayet.



Figur 4.24: Grafisk fremstilling av nedbrytnings-assay av β -kitin med ChiA mutanter og villtype. Grafen viser A2/A1 plottet mot % nedbrutt β -kitin

5. Diskusjon

I dette kapittelet blir resultatene fra dette studiet diskutert opp mot oppgavens problemstilling. Formålet med denne oppgaven var som tidligere nevnt, å studere effekten av sterkt interagerende polare aminosyrer i ChiA. Det overordnede målet var å studere effekten spesifikke polare residuer hadde på enzymets prosessive-mekanisme, og hvordan substratet posisjonerte seg i det aktive setet. I figur 5.1 vises overfladiske aromatiske residuer (merket grønt), som antas å være viktige for enzymets prosessivitet. I samme figur vises mutasjonene av de polare residuene (merket gult) som ble laget i denne oppgaven.



Figur 5.1: Figuren viser aromatiske residuer (grønn) som ligger på overflaten av ChiA. Disse antas å være viktig for enzymets prosessivitet, samt posisjonering av substratet i det aktive setet. Det antas at sterkt interagerende polare residuer (gul) slik som; R172, E473 og T276 er viktige på samme grunnlag som de aromatiske, og er derfor studert i denne oppgaven. Den katalytiske syren E315 er merket rødt.

5.1 Nedbrytning av kitosan med en $F_A = 0,65$

Prosessivitet hos familie 18 kitinaser kan studeres ved å analysere degraderingen av kitosan, som er en delvis deacetyleret polymerkjede. Prosessive enzymer som handler på kitosan gir et karakteristisk produktmønster som er dominert av oligomere, og som består av partalls sukkerenheter (Horn et al. 2006b). Analyse av degraderingen av kitosan ble foretatt gjennom ^1H NMR, SEC og MS.

5.1.1 ^1H NMR-analyse av nedbrytningsprodukter

Forløpet av degraderingsprosessen av kitosan kan bestemmes gjennom ^1H NMR ved å bestemme α , altså hvor mange kutt enzymet har utført etter en viss tidsperiode. Som forklart i metodedelene ble α funnet ved å overvåke økningen i resonans av antall reduserendeender i forhold til resonansen fra interne protoner i et ^1H NMR spekter.

ChiA T276A gav en $\alpha \approx 0,05$ etter 7,5 minutter, og var dermed den raskeste til å degradere kitosan. ChiA E473A gav en $\alpha \approx 0,05$ etter 40 min, og var den tregeste av mutantene til å bryte ned kitosan. Det er interessant å se at ChiA T276A er minst effektiv ved degradering av β -kitin (se avsnitt 4.8.2). Lignende resultater ble presentert av Zakariassen et al. i (Zakariassen et al. 2009a) hvor ikkeprosessive mutantene degraderte kitosan raskere enn villtype samtidig som de var mindre effektive i kitinnedbrytning. Dette diskuteres videre under avsnitt 5.2.

I tabell 4.3 vises resultatene fra aktivitetstesten. Aktivitetstesten ble utført med et kunstig substrat ((GlcNAc)₂-4MU), og benyttes til å bestemme om enzymet er aktivt. Det er viktig å presisere at disse verdiene ikke nødvendigvis avgjør hvor aktivt et enzymet er mot naturlige substrater som kitin og kitosan. Resultatene fra aktivitetstesten viser at E473A var den mutantene som var mest aktiv i forhold til ChiA villtype, og T276A var minst aktiv. Ved degradering av kitosan var mutantene som var minst aktive i henhold til aktivitetstesten mest aktive, og E473A som var minst aktiv ved degradering av kitosan var mest aktiv i henhold til resultatene fra aktivitetstesten. På en annen side stemmer verdiene fra aktivitetstesten med resultatene fra nedbrytning av β -kitin.

Det som er sentralt å trekke ut fra denne delen av oppgaven, er at alle mutantene kunne bryte ned kitosan effektivt. Forsøket burde bli gjentatt for å se om det faktisk var unøyaktighet ved

databehandling som forårsaket dette, eller en systematisk feil ved prøveprepparing av kitosan. Videre bearbeidelse gjennom analyse ved bruk av SEC og MS diskuteres videre i de neste avsnittene.

5.1.2 Size exclusion chromatography; Oligomer-distribusjon

For å kunne studere distribusjonen av oligomere som dannes ved $\alpha=0,05$ for hver mutant, ble en analyse utført ved bruk av SEC. Prosessiv degradering kan dekretes ved å se karakteristiske partalletoligomere som dominerer over oddetallet oligomere. Dersom enzymet er prosessivt vil enzymet bevege seg langs polymerkjeden og kutte annenhver sukkerenhet på grunn av sukkerkjedens 180° vridning (som forklart i 1.4.2).

Figur 4.16, 4.17 og 4.18 presenterer kromatogrammene for henholsvis mutantene; R172A, E473A og T276A med en $\alpha \approx 0,05$. I Horn et al. 2006 (figur 5) vises kromatogrammet for ChiA villtype ved ulike grad av α . I denne oppgaven ble reaksjonene med en $\alpha=0,05$ benyttet til å studere oligomer distribusjonen. Kromatogrammene sammenlignes med kromatogrammene i Horn et al. 2006 med en $\alpha=0,08$.

Omsetning i nærvær av kitosan for mutantene gav SEC-kromatogram med dominans av partallet oligomere i den initielle fasen, slik som observert hos ChiA villtype (Horn et al. 2006c; Sørbotten et al. 2005; Zakariassen et al. 2009a). Oddetallsprodukter er relativt fraværende. Alle mutantene viser en redusert prosessiv aktivitet mot kitosan ved sammenligning med ChiA villtype.

Verdien som kalles α_{\max} ved nedbrytning av kitosan gjenspeiler hvor stor andel av glykosidbindingene i kitosanet som kan brytes ned av de enkelte enzymene, I Horn et al rapporteres denne til å være 0.33, det vil si at 33 % av glykosidbindingene har blitt brutt (Horn et al. 2006c). For ChiA-E473A, ChiA-R172A og ChiA-T276A var disse verdiene hhv. 0,32, 0,38 og 0,34, hvilket viser at mutasjonene ikke i større grad har påvirket enzymets evne til å bryte ned kitosan.

5.1.3 Sekvensering

ChiA villtype har blitt sekvensert tidligere (Norberg et al. 2011b), og benyttet i denne oppgaven for å kunne sammenligne subsepreferanser opp mot ChiA mutanter. Som nevnt i resultatdelen ble ikke E473A sekvensert på grunn av tidsmangel.

Tabell 4.8 gir innsikt i mulig A-/D-preferanser i ulike subse. Mutasjon av R i posisjon 172 gjør at enzymet mister mye av sin kontroll ved posisjonering av substratet før hydrolyse på lik linje som man har sett for W167 (Norberg et al. 2011b). Mutasjon av T i posisjon 276 fører ikke til et slikt tap i kontroll ved posisjonering, faktisk styrkes preferansen for en acetyleret enhet i subse -3.

5.2 Nedbrytning av β -kitin

Forholdet mellom A2 og A1 ble studert ved hjelp av HPLC, og er god metode brukt til å få innsikt i enzymets prosessive aktivitet. Sammenlikning av forholdet mellom A2 og A1 for villtype mot de ulike mutantene gir et mer kvantitativt mål for reduksjon/økning i prosessivitet enn bruk av SEC analyser av kitosannedbrytning (Horn et al. 2006e). Dermed var det interessant å se om mutasjoner av de polare residuene faktisk reduserte enzymets prosessivitet.

I tabell 4.9-4.12 vises A2/A1 mot prosent nedbrutt β -kitin for alle mutantene, i tillegg til ChiA villtype. Tabellene viser hele forløpet fra 5 % nedbrutt til endepunktet for kitinnedbrytning.

Forlengt inkubasjonstid av β -kitin med hver mutant viser små variasjoner i hvor effektivt de kan bryte ned β -kitin. R172A og E373A var omtrent like effektive som ChiA villtypen, mens T276A var minst effektiv. Videre er det interessant å se at mutasjonen av R172 og E473 ikke påvirker prosessiviteten i like stor grad som mutasjonen i T276. Dette er som nevnt før i tråd med tidligere observasjoner (Zakariassen et al. 2009a).

Det ser ut til at T276 ikke påvirker posisjoneringen av substratet, men grad av prosessivitet mens det er motsatte for R172. I videre arbeid vil det være interessant å se om det samme gjelder for E473 også. Resultatene antyder at noen polare residuer er viktige for posisjonering av substrat mens andre er viktig for prosessivitet.

I en tidligere forskning gjort av Uchiyama et al. 2001 ble ulike aromatiske residuer mutert til alanin, og to av dem var posisjonert i det katalytiske domenet til ChiA. Det ene residuet som ble mutert var F232, og ligger nærmere det katalytiske setet i forhold til de andre aromatene som ble mutert. Mutasjonen av F232 resulterte i lavere hydrolyseaktivitet enn noen av de andre mutantene. Derimot påvirket ikke denne mutasjonen bindingsstyrken til substratet (Uchiyama et al. 2001).

Det som er interessant med forsøkene til Uchiyama et al. 2001 i forhold til denne oppgaven, er at T276 ligger også nærmest det katalytiske setet, og hydrolyse av β -kitin er redusert i større grad enn hos de andre mutantene. Det kan antas at residuer som ligger nærme det katalytiske setet påvirker enzymets prosessivitet i større grad enn residuer lengre unna. Det er uvisst om polare residuer er like delaktige i ChiA sin prosessive mekanisme. Men ettersom dette forsøket viste lignende resultater som i Uchiyama et al. 2001, er dette ikke utenkelig. For å få mer innsikt i denne teorien, kunne det vært lurt å mutere flere polare residuer nær det katalytiske setet, samtidig utføre ITC forsøk for å analysere bindingsstyrken de ulike mutasjonene har til substratet. Dersom flere forsøk hadde blitt utført hadde det vært interessant for å se om bindingsstyrken til de polare residuene er assosiert med prosessiviteten.

6. Oppsummering og videre arbeid

6.1 ChiA R172A

Ved nedbrytning av β -kitin viser mutanten høy effektivitet og prosessivitet og differerer ikke stort fra ChiA villtype. Subsetepreferansen i R172A viser store avvik fra ChiA villtype. Mutasjon av det polare residuet R til alanin i posisjon 172 i ChiA kan antas å påvirke substratposisjonering i stor grad og prosessivitet i liten grad.

6.1.1 Videre arbeid med ChiA R172A

R172A er blitt sett på både i denne oppgaven, i tillegg til ved tidligere forskning. Resultatene er reproducerbare, og dermed er konklusjonen i avsnitt 6.1 valid. Ved videre arbeid kunne det vært hensiktsmessig å utføre bindingsstyrkeforsøk (ITC) med dobbelmutanten E315Q/R172A som allerede er konstruert, som kunne gitt mer informasjon om hvor sterkt R172A binder til substratet.

6.2 ChiA T276A

T276A viser via nedbrytningsforsøket med β -kitin en betydelig reduksjon i prosessiv aktivitet. Den reduserte prosessive aktiviteten mot β -kitin kan kanskje forklares at residuer nærliggende det kataytisk setet er viktige for enzymets prosessivitet. T276 har mer interaksjon mot -2 sukkeret enn for eksempel R172. Videre tyder den reduserte aktiviteten på (GlcNAc)₂-4MU substratet at T276 faktisk har viktige interaksjoner mot -2 sukkeret i forhold til R172 og E473 (Ved produktiv binding binder (GlcNAc)₂-4MU fra -2 til +1).

Det kan antas at T276A har betydning for prosessiv mekanisme, og lite betydning for posisjonering av substratet i det aktive setet.

6.2.1 Videre arbeid med ChiA T276A

ChiA T276A skiller seg klart mest fra ChiA villtype ved enkelte av forsøkene. Dermed kan det være hensiktsmessig å gjøre forsøkene på ny, for å kontrollere at resultatene er reproducerbare. Bindingsstyrkeforsøk (ITC) med dobbelmutanten E315Q/T276A som

allerede er konstruert kunne vært nyttig for å se hvor sterkt T276A binder til substratet i forhold til de to andre mutantene.

6.3 ChiA E473A

E473A er tilnærmet like effektiv som ChiA villtype ved nedbrytning av β -kitin. På bakgrunn av alle forsøkene utført med E473A, har ikke mutasjonen av dette polare residuet noe å si for prosessivitet. Det er uvist om den påvirker posisjonering, ettersom nedbrytningsproduktene ikke ble sekvensert.

6.3.1 Videre arbeid med ChiA E473A

Det hadde vært interessant å utføre AMAC-derivatisering E473A, for å se om subsele preferansen hadde vært lik R172A. Grunnen til at det sammenlignes med R172A, er fordi disse har vist seg å oppføre seg relativt likt gjennom alle forsøkene. Dersom mutanten hadde hatt samme A/D preferanse som R172A, kunne disse to mutantene sammenlignes sammen opp mot T276A og selvfølgelig ChiA villtype. I tillegg burde bindingsstyrke forsøket (ITC) utføres med dobbelmutanten E315Q/E473A som er konstruert i forbindelse med i denne oppgaven. Det kunne vært interessant å se hvor mye dette residuet er med på å binde substratet.

6.4 Videre arbeid med polare residuer i ChiA

Denne oppgaven har vist at polare residuer ikke påvirker ChiA sin prosessivitet like mye som aromatiske residuer. Men det er som nevnt over, et mønster som går igjen etter hvor residuene ligger i det katalytiske setet. Dette er fortsatt bare en teori, og hadde vært interessant å studere mer. Det hadde også vært interessant å mutert for eksempel L277 for å se om de gav samme resultat som T276A. Flere polare residuer må muteres i det katalytiske setet, samtidig som det kunne vært interessant å mutere enkelte polare residuer utenfor det katalytiske setet. På bakgrunn av dette vil videre forskning kunne bestemme rollen til de polare residuene i ChiA med tanke på dens prosessive mekanisme.

7. Referanser

- Agilent Technologies*. (2005). Tilgjengelig fra:
<https://http://www.genomics.agilent.com/CollectionSubpage.aspx?PageType=Product&SubPageType=ProductData&PageID=384> (lest 04.03.2013).
- Bio-Rad. *Bio-Rad Protein Assay*: Bio-Rad Laboratories. Tilgjengelig fra:
http://labs.fhcr.org/fero/Protocols/BioRad_Bradford.pdf (lest 14.04.2013).
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analtical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brandenberg, G., Leibrock, L. G., Shuman, R., Malette, W. G. & Quigley, H. (1984). Chitosan: A New Topical Hemostatic Agent for Diffuse Capillary Bleeding in Brain Tissue. *Neurosurgery*, 15 (1): 9-13.
- Bravman, T., Mechaly, A., Shulami, S., Belakhov, V., Baasov, T., Shoham, G. & Shoham, Y. (2001). Glutamic acid 160 is the acid-base catalyst of L-xylosidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6: a family 39 glycoside hydrolase. *FEBS Letters* 495: 115-119.
- Breyer, W. A. & Matthews, B. W. (2001). A structural basis for processivity. *Protein Sci.*, 10: 1699-1711.
- Bruberg, B. M., Synstad, B., Klemsdal, S., Van Alten, M. F. D., Sundheim, L. & Eijsink, G. H. V. (2000). *Chitinases from Serratia marcescens*. Ås, Norway.
- Brurberg, M. B., Nes, I. F. & Eijsink, V. G. (1996). Comparative studies of chitinases A and B from *Serratia marcescens*. *Microbiology*, 142 (Pt 7): 1581-9.
- Brurberg, M. B., Synstad, B., Klemsdal, S. S., Van Aalten, D. M., Sundheim, L. & Eijsink, V. G. H. (2000). Chitinases from *Serratia marcescens* *Recent Research Developments in Microbiology*.
- Davies, G. & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3 (9).
- Davies, G. & Henrissat, B. (1995). Structures and Mechanisms of Glycosyl Hydrolases. *Structure*, 3 (9): 853-859.
- Davies, G. J., Wilson, K. S. & Henrissat, B. (1997). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem J*, 321 (Pt 2): 557-9.
- Downard, K. (2004). *Mass spectrometry: A Foundation Course*: RSC publishing.

- Ebersbach, T., Jorgensen, J. B., Heegaard, P. M., Lahtinen, S. J., Ouwehand, A. C., Poulsen, M., Frokiaer, H. & Licht, T. R. (2010). Certain dietary carbohydrates promote *Listeria* infection in a guinea pig model, while others prevent it. *Int J Food Microbiol*, 140 (2-3): 218-24.
- 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.
- El Hadrami, A., Adam, L. R., El Hadrami, I. & Daayf, F. (2010). Chitosan in plant protection. *Mar Drugs*, 8 (4): 968-87.
- Fossum, S. & Dissen, E. *polymerasekjedereaksjon*: Store norske leksikon. Tilgjengelig fra: http://snl.no/sml_artikkel/polymerasekjedereaksjon (lest 12.04.2013).
- Gooday, G. W. (1999). Aggressive and defensive roles for chitinases. I: Jolles, P. & Muzzarelli, R. A. A. (red.) *Chitin and Chitinases*, s. 157-169. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag.
- Hartl, L., Zach, S. & Seidl-Seiboth, V. (2012). Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol*, 93 (2): 533-43.
- Hejazi, A. & Falkiner, F. R. (1997). *Serratia marcescens*. *J Med Microbiol*, 46 (11): 903-12.
- Henrissat, B. & Davies, G. J. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr.Opin.Struct.Biol.*, 7 (5): 637-644.
- Hoffmann, D. E. & Stroobant, V. (2011). *Mass Spectrometry: principles and applications*. 3 utg.: John Wiley & Sons.
- Horn, S. J., Sikorski, P., Cederkvist, J. B., Vaaje-Kolstad, G., Sørli, M., Synstad, B., Vriend, G., Vårum, K. M. & Eijsink, V. G. H. (2006a). Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A*, 103 (48): 18089-18094.
- 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 (3): 491-503.
- Horn, S. J., Sørbotten, A., Synstad, B., Sikorski, P., Sørli, M., Vårum, K. M. & Eijsink, V. G. H. (2006c). Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. *FEBS J*, 273 (3): 491-503.
- Horn, S. J., Sørbotten, A., Synstad, B., Sikorski, P., Sørli, M., Vårum, K. M. & Eijsink, V. G. H. (2006d). Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. *FEBS Journal*, 273 (3): 491-503.

- Horn, S. J., Sørli, M., Vaaje-Kolstad, G., Norberg, A. L., Synstad, B., Vårum, K. M. & Eijsink, V. G. H. (2006e). Comparative studies of chitinases A, B and C from *Serratia marcescens* *Biocatal.Biotransfor.*, 24 (1-2): 39-53.
- Hu, F. B. (2010). Are refined carbohydrates worse than saturated fat? *Am J Clin Nutr*, 91 (6): 1541-2.
- Kuk, J. H., Jung, W. J., Jo, G. H., Kim, Y. C., Kim, K. Y. & Park, R. D. (2005). Production of N-acetyl-beta-D-glucosamine from chitin by *Aeromonas* sp. GJ-18 crude enzyme. *Appl Microbiol Biotechnol*, 68 (3): 384-9.
- Kumar, R. & Majeti, N. V. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46 (1): 1-27.
- Kurita, K. (2006a). Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology*, 8 (3): 203-226.
- Kurita, K. (2006b). Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. *Mar. Biotechnol.*, 8 (3): 203-226.
- Li, X., Min, M., Du, N., Gu, Y., Hode, T., Naylor, M., Chen, D., Nordquist, R. E. & Chen, W. R. (2013). Chitin, chitosan, and glycated chitosan regulate immune responses: the novel adjuvants for cancer vaccine. *Clin Dev Immunol*, 2013: 387023.
- Mathews, K. C., van Holde, K. E. & Ahren, G. K. (2000). *Biochemistry*. 3 utg.: Addison-Wesley 1186 s.
- Miller, M. J. (2009). *Chromatography: concepts and contrasts*. 2 utg. Canada: John Wiley & Sons, Inc. 490 s.
- Monreal, J. & Reese, E. T. (1969). Chitinase of *Serratia marcescens* *Can. J. Microbiol.*, 15 (7): 689-696.
- Muir, J. G., Rose, R., Rosella, O., Liels, K., Barrett, J. S., Shepherd, S. J. & Gibson, P. R. (2009). Measurement of short-chain carbohydrates in common Australian vegetables and fruits by high-performance liquid chromatography (HPLC). *J Agric Food Chem*, 57 (2): 554-65.
- NanoDrop 1000 Spectrophotometer*. (2010). Thermo Scientific. Tilgjengelig fra: <http://www.nanodrop.com> (lest 06.05).
- Nesse, N. *membranseparasjon*: Store norske leksikon. Tilgjengelig fra: <http://snl.no/membranseparasjon> (lest 14.04.2013).

- Norberg, A. L., Dybvik, A. I., Zakariassen, H., Mormann, M., Peter-Katalinic, J., Eijsink, V. G. & Sorlie, M. (2011a). Substrate positioning in chitinase A, a processive chito-biohydrolase from *Serratia marcescens*. *FEBS Lett*, 585 (14): 2339-44.
- Norberg, A. L., Dybvik, A. I., Zakariassen, H., Mormann, M., Peter-Katalinic, J., Eijsink, V. G. H. & Sorlie, M. (2011b). Substrate positioning in chitinase A, a processive chito-biohydrolase from *Serratia marcescens*. *Febs Letters*, 585 (14): 2339-2344.
- Norberg, A. L., Dybvik, A. I., Zakariassen, H., Mormann, M., Peter-Katalinic, J., Eijsink, V. G. H. & Sørli, M. (2011c). Substrate positioning in chitinase A, a processive chito-biohydrolase from *Serratia marcescens*. *FEBS Letters*, 585: 2339-2344.
- Payne, C. M., Baban, J., Horn, S. J., Backe, P. H., Arvai, A. S., Dalhus, B., BJORAS, M., Eijsink, V. G., Sorlie, M., Beckham, G. T., et al. (2012). Hallmarks of processivity in glycoside hydrolases from crystallographic and computational studies of the *Serratia marcescens* chitinases. *J Biol Chem*, 287 (43): 36322-30.
- Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A. B., Chet, I., Wilson, K. S. & Vorgias, C. E. (1994). Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. *Structure.*, 2 (12): 1169-1180.
- Quintero-Villegas, M. I., Aam, B. B., Rupnow, J., Sorlie, M., Eijsink, V. G. & Hutkins, R. W. (2013). Adherence Inhibition of Enteropathogenic *Escherichia coli* by Chitooligosaccharides with Specific Degrees of Acetylation and Polymerization. *J Agric Food Chem*.
- Rosen, J., Miguet, L. & Perez, S. (2009). Shape: automatic conformation prediction of carbohydrates using a genetic algorithm. *J Cheminform*, 1 (1): 16.
- Rudall, K. M. & Kenchington, W. (1973). The Chitin System. *Biological Reviews*, 48 (4).
- Rye, C. S. & Withers, S. G. (2000). Glycosidase mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4 (5): 573-580.
- Sigma Aldrich*. (2013). Tilgjengelig fra:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/85707?lang=en®ion=NO>
(lest 09.05).
- Sorlie, M., Zakariassen, H., Norberg, A. L. & Eijsink, V. G. H. (2012). Processivity and substrate-binding in family 18 chitinases. *Biocatalysis and Biotransformation*, 30 (3): 353-365.
- Suzuki, K., Sugawara, N., Suzuki, M., Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N. & Watanabe, T. (2002). Chitinases A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: enzymatic properties and synergism on chitin degradation. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66 (5): 1075-83.

- Sørbotten, A., Horn, S. J., Eijsink, V. G. H. & Vårum, K. M. (2005). Degradation of chitosans with chitinase B from *Serratia marcescens*. Production of chito-oligosaccharides and insight into enzyme processivity. *FEBS J.*, 272 (2): 538-549.
- Sørli, M., Zakariassen, H., Norberg, A. L. & Eijsink, V. G. H. (2012). Processivity and substrate-binding in family 18 chitinases. *Biocatal.Biotransfor.*, 30 (3): 1-13.
- Terwisscha van Scheltinga, A. C., Armand, S., Kalk, K. H., Isogai, A., Henrissat, B. & Dijkstra, B. W. (1995). Stereochemistry of chitin hydrolysis by a plant chitinase/lysozyme and X-ray structure of a complex with allosamidin: evidence for substrate assisted catalysis. *Biochemistry*, 34 (48): 15619-15623.
- Tews, I., Terwisscha van Scheltinga, A. C., Perrakis, A., Wilson, K. S. & Dijkstra, B. W. (1997). Substrate-assisted catalysis unifies two families of chitinolytic enzymes. *J. Am. Chem. Soc.*, 119 (34): 7954-7959.
- Tortora, J. G., Funke, R. B. & Case, L. C. *Microbiology: An introduction*. 10 utg.: Pearson.
- Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N., Nonaka, T., Sugiyama, J. & Watanabe, T. (2001). Roles of the exposed aromatic residues in crystalline chitin hydrolysis by chitinase a from *Serratia marcescens* 2170. *J. Biol. Chem.*, 276 (44): 41343-41349.
- Van Den, B. & Lambertur, A. M. Bifidobacterium glycoside hydrolases and (potential) prebiotics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9 (4): 401-407.
- van Aalten, D. M. F., Komander, D., Synstad, B., Gaseidnes, S., Peter, M. G. & Eijsink, V. G. H. (2001a). Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (16): 8979-8984.
- van Aalten, D. M. F., Komander, D., Synstad, B., Gåseidnes, S., Peter, M. G. & Eijsink, V. G. H. (2001b). Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 98 (16): 8979-8984.
- Varrot, A., Frandsen, T. P., von Ossowski, I., Boyer, V., Cottaz, S., Driguez, H., Schulein, M. & Davies, G. J. (2003). Structural Basis for Ligand Binding and Processivity in Cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens*. *Structure*, 11 (7): 855-864.
- 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.*
- Wierenga, R. K. (2001). The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Lett*, 492 (3): 193-8.
- Zakariassen, H., Aam, B. B., Horn, S. J., Varum, K. M., Sorlie, M. & Eijsink, V. G. H. (2009a). Aromatic Residues in the Catalytic Center of Chitinase A from *Serratia*

marcescens Affect Processivity, Enzyme Activity, and Biomass Converting Efficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (16): 10610-10617.

Zakariassen, H., Aam, B. B., Horn, S. J., Vårum, K. M., Sørli, M. & Eijsink, V. G. H. (2009b). Aromatic residues in the catalytic center of chitinase A from *Serratia marcescens* affect processivity, enzyme activity, and biomass converting efficiency. *J. Biol.Chem.*, 284 (16): 10610-10617.

Zakariassen, H., Eijsink, V. G. H. & Sørli, M. (2010). Signatures of activation parameters reveal substrate-dependent rate determining steps in polysaccharide turnover by a family 18 chitinase. *Carbohydr.Polym.*, 81 (1): 14-20.

8. Vedlegg

Vedlegg A: Data fra Sekvensering

Vedlegg B: Rensing av aktive mutanter på kitinkolonne (E473A og R172A), og

SDS-gelbilder for E473A og R172A

Vedlegg C: Data fra Sekvensering

Vedlegg D: ^1H NMR spekter

Vedlegg E: Data fra SEC-analyse

Vedlegg F: Data fra HPLC

8.1 Vedlegg A

Nukleotidsekvensen til ChiA vises i figur 8.1. Områdene som ble mutert i denne oppgaven er merket gult; CGC (Argining) er i posisjon 172, ACG (Treonin) er i posisjon 276, GAG (Glutamat) er i posisjon 315 (katalytisk syre), og GAG (Glutamat) i posisjon 473.

DNA-sekvens ChiA

>ENA|Z36294|Z36294.1 S.marcescens (BJL200) chiA gene for chitinase :

Location:452..2143

```

ATGCGCAAATTTAATAAACCGCTGTTGGCGCTGTTGATCGGCAGCACGCTGTGTTCCGCG
GCGCAGGCCCGCCGCGCCGGGCAAGCCGACCATCGCCTGGGGCAACACCAAGTTCGCCATC
GTTGAAGTTGACCAGGCGGCTACCGCTTATAATAGTTTGGTGAAGGTAAAAAATGCCGCC
GATGTTTTTCGGTCTCCTGGAATTTATGGAATGGCGACACCGGTACGACGGCAAAAGTTTTA
TTAAATGGCAAAGAGGCGTGGAGCGGCCCGTCAACCGGTTCTTCCGGTACGGCGAATTTT
AAAGTCAATAAAGGCGGCCGTTATCAAATGCAGGTGGCATTGTGCAATGCCGACGGCTGC
AGCGCCAGCGATGCCACCGAAATTTGTGGTGGCCGACACCGACGGCAGCCATTTGGCGCCG
TTGAAAGAGCCGCTGCTGGAAAAGAATAAACCGTATAAACAGAACTCCGGCAAAGTGGTC
GGTTCTTATTTTCGTCGAGTGGGGCGTTTTACGGGCGCAATTTACCGTGCACAAGATCCCG
GCGCAGAACCTGACCCACCTGCTGTACGGCTTTATCCCGATCTGCGGTGGCAACGGCATC
AACGACAGCCTGAAAGAGATCGAAGGCAGCTTCCAGGCGCTGCAGCGCTCCTGCCAGGGC
CGCGAGGACTTCAAAGTCTCGATCCACGATCCGTTTCGCCGCGCTGCAAAAAGCGCAGAAG
GGCGTTACCGCCTGGGATGACCCCTACAAGGGCAACTTCGGCCAGCTGATGGCGCTGAAA
CAGGCGCATCCTGACCTGAAAATTTCTGCCGTCGATCGGCGGCTGGACGCTGTCCGACCCG
TTCTTCTTCATGGGCGATAAAGGTGAAGCGCGATCGCTTCGTCGGTTCGGTGAAAGAGTTC
CTGCAGACCTGGAAGTTCTTCGATGGCGTGGATATCGACTGGGAGTTCCCGGGCGGCAAAA
GGCGCAACCCGAACCTGGGCAGCCCGCAGGACGGGGAAACCTATGTGCTGCTGATGAAG
GAGCTGCGGGCGATGCTGGATCAGCTGTCCGGCGGAAACCGGCCGAAATATGAACTGACC
TCTGCCATCAGCGCCGGAAGGACAAGATCGACAAGGTGGCTTACAACGTTGCGCAGAAC
TCGATGGATCACATCTTCTGATGAGCTACGACTTCTATGGCGCCTTCGATCTGAAGAAC
CTGGGGCATCAGACCCGCGCTGAATGCGCCGGCCTGGAAGCCGGACACCGCTTACACCACG
GTGAACGGCGTCAATGCGCTGCTGGCGCAGGGCGTCAAGCCGGGCAAGATCGTGGTCCGGC
ACCGCCATGTATGGCCGCGGCTGGACCGGGGTGAACGGCTACCAGAACAACATTCGGTTC
ACTGGTACCGCCACCGGGCCGGTCAAAGGCACCTGGGAGAACGGCATCGTGGACTACCGC
CAAATCGCCGGCCAGTTTCATGAGCGGCGAGTGGCAGTATACCTACGACGCCACGGCGGAA
GCGCCTTACGTGTTCAAACCTTCCACCGGCGATCTGATCACCTTCGACGATGCCCGCTCG
GTGCAGGCCAAAGGCAAGTACGTGCTGGATAAGCAGCTGGGCGGCTGTTCTCCTGGGAG
ATCGACGCGGATAACGGCGATATTCTCAACAGCATGAACGCCAGCCTGGGCAACAGCGCC
GGCGTTCAATAA

```

Figur 8.1: Nukleotidsekvensen til ChiA villtype. De markerte områdene viser hvor i genet det har skjedd en mutasjon

Aminosyresekvens ChiA

Aminosyresekvensen til ChiA villtype vises i figur 8.2. Aminosyrene som ble mutert ved seterettet mutagenese er merket gult.

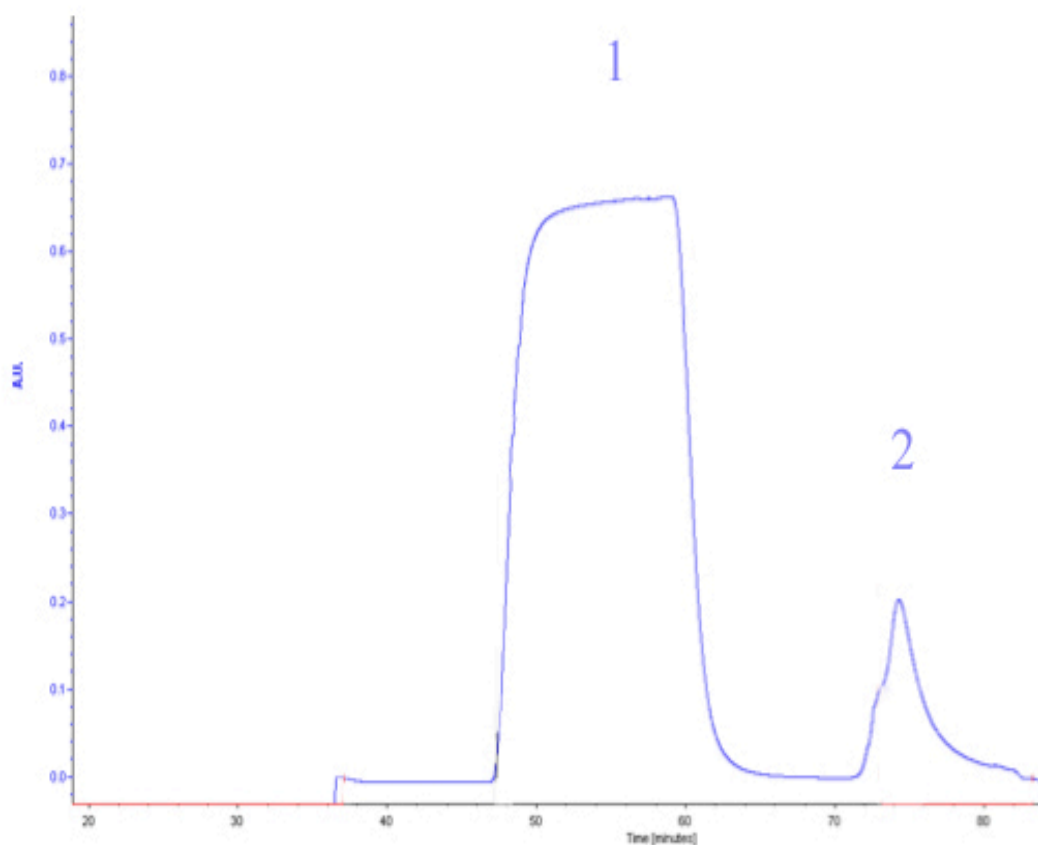
MRKFNKPLLALLIGSTLCSAAQAAAPGKPTIAWGNTKFAIVEVDQAATAYNSLVKVK
NAADVSVSWNLWNGDTGTTAKVLLNGKEAWSGPSTGSSGTANFKVKNKGGRYQMQ
VALCNADGCSASDATEIVVADTDGSHLAPLKEPLLEKNKPYKQNSGKVVGSYFVEW
GVYGRNFTVDKIPAQNLTHLLYGFIPICGGNGINDSLKEIEGSFQALQRSCQGREDFK
VSIHDPFAALQKAQKGVTAWDDPYKGNFGQLMALKQAHPDLKILPSIGGWILSDPFF
FMGDKVKRDRFVGSVKEFLQTWKFFDGVDIDWEFPGGKGANPNLGSPQDGETYVLL
MKELRAMLDQLSAETGRKYELTSAISAGKDKIDKVAYNVAQNSMDHIFLMSYDFYG
AFDLKNLGHQTALNAPAWKPDYAYTTVNGVNALLAQGVKPGKIVVGTAMYGRGW
TGVNGYQNNIPFTGTATGPVKGTWENGIVDYRQIAGQFMSGEWQYTYDATAEAPYV
FKPSTGDLITFDDARSVQAKGKYVLDKQLGGLFSWEIDADNGDILNSMNASLGNSAG
VQ*

Figur 8.2: Aminosyresekvensen til ChiA villtype. Aminosyrene som ble mutert i denne oppgaven er merket gult.

8.2 Vedlegg B

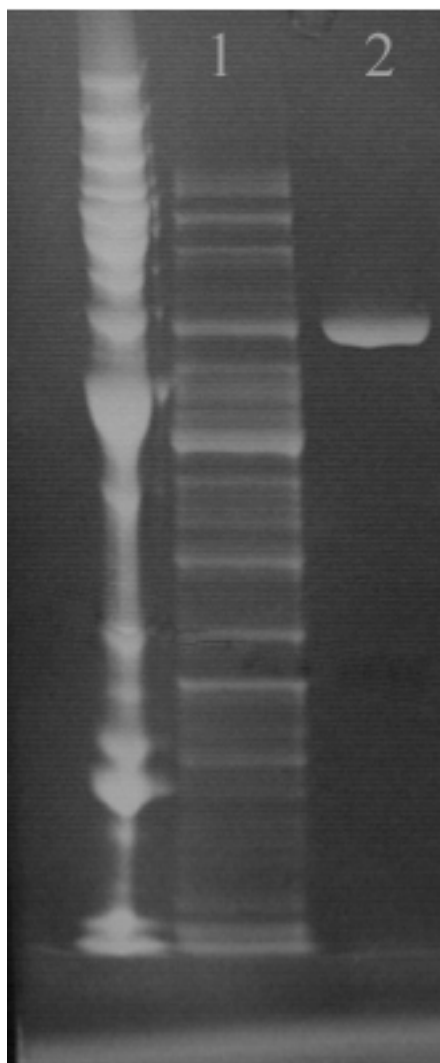
8.2.1 Isolering av ChiA R172A

Kromatogrammet i figur 8.3 viser rensingen av ChiA R172A ved hjelp av kitinkuler. Topp 1 er voidtoppen. ChiA R172A eluerte ut i den siste toppen (2). Eluatet ble samlet opp og analysert på SDS-PAGE gel for å kontrollere om proteinet av interesse var tilstede, og om separasjon fra andre proteiner i løsningen var vellykket.



Figur 8.3: Kromatogrammet for rensing av R172A ved hjelp av Kitinkuler. Proteinene elueres ut i toppen merket 2. Voidtoppen er merket 1, her elueres alle andre proteiner.

I figur 8.4 vises SDS-gelbildet av isoleringen av R172A. Brønnen merket 1 inneholder periplasmatiske ekstrakt, og brønnen merket 2 inneholder det rensede proteinet.

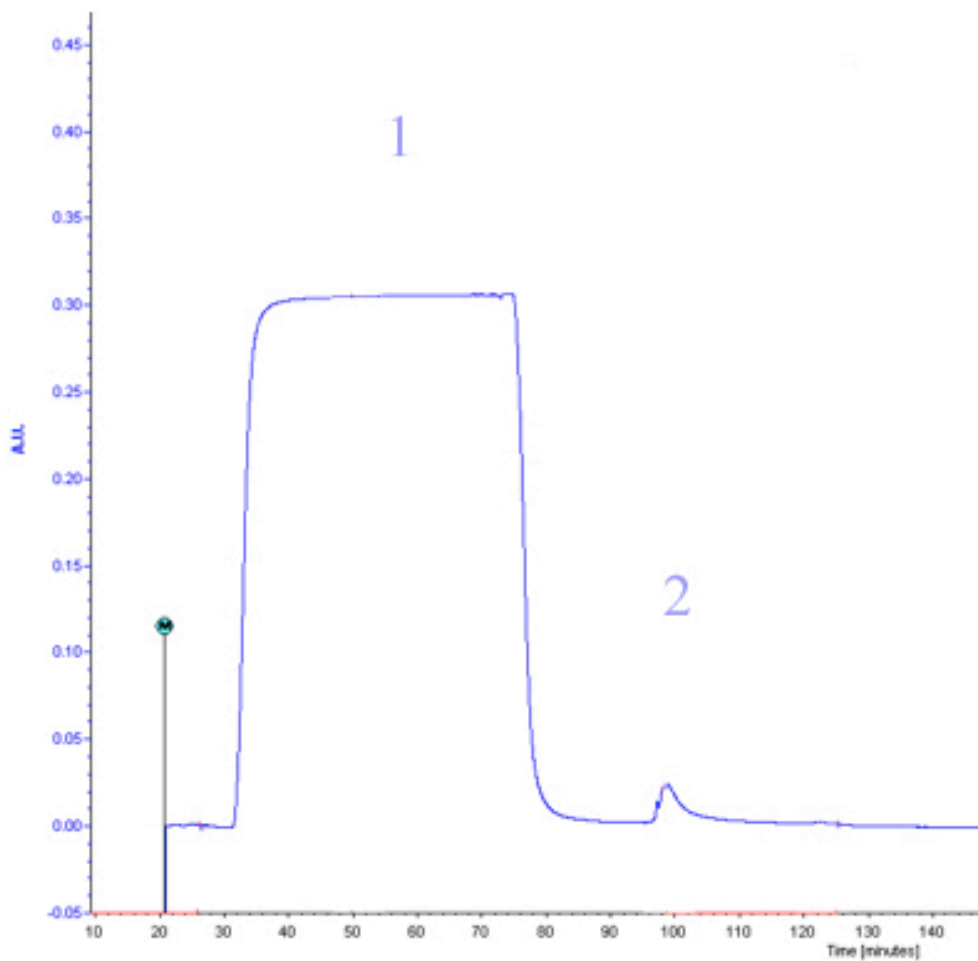


Figur 8.4: SDS PAGE gel som viser isolering av *ChiA R172A*.

(1 = ladder, 2= periplastmatisk ekstrakt, 2= rensset og oppkonsentrert protein)

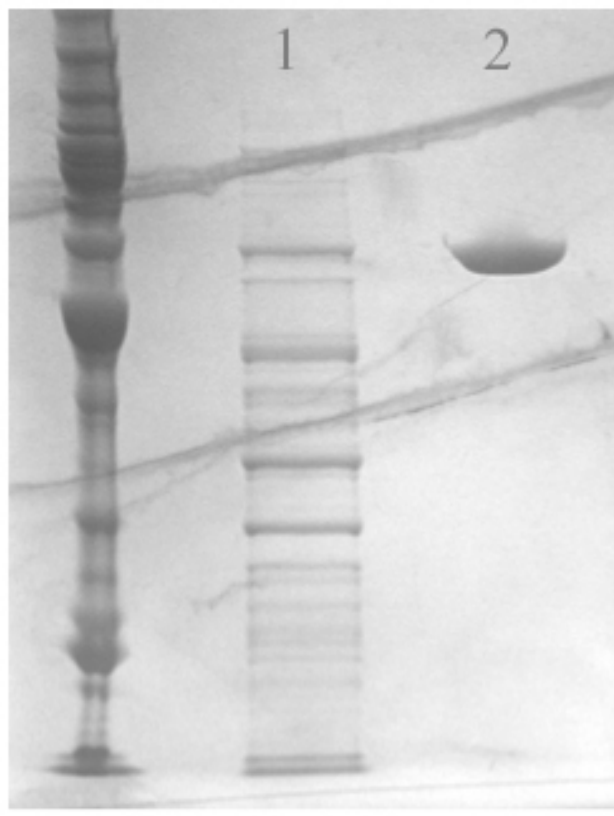
8.2.2 Isolering av ChiA E473A

Kromatogrammet i figur 8.5 viser rensingen av ChiA E473A ved hjelp av kitinkuler. Topp 1 er voidtoppen. ChiA E473A eluerte ut i den siste toppen (2). Eluatet ble samlet opp og analysert på SDS-PAGE gel for å kontrollere om proteinet av interesse var tilstede, og om separasjon fra andre proteiner i løsningen var vellykket.



Figur 8.5: Kromatogrammet for rensing av E473A ved hjelp av Kitinkuler. Proteinet elueres ut i toppen merket 2. Voidtoppen er merket 1, her elueres alle andre proteiner.

I figur 8.6 vises SDS-gelbildet av isoleringen av E473A. Brønnen merket 1 inneholder periplasmatiske ekstrakt, og brønnen merket 2 inneholder det rensede proteinet.



Figur 8.6: SDS PAGE gel som viser isolering av ChiA E473A.
(1 = ladder, 2= periplastmatisk ekstrakt, 2= rensset og oppkonsentrert protein)

8.3 Vedlegg C

I tabell 8.1 og 8.2 vises sekvenserte monomere, dimere, trimere, tetramere, pentamere og heksamere for henholdsvis ChiA T276A og ChiA R172A

Tabell 8.1 : Sekvenserte dimere, trimere, tetramere, pentamere og heksamere fra nedbrytning av kitosan ($F_A=0,65$) etter 7 dagers inkubasjon med ChiA-T276A

	KOS	m/z	SEKvens
Monomer	A	438,317	A
Dimer	A2	601,12	AA
Trimer	A2D	802,546	DAA
			ADA
	A3	844,496	AAA
Tetramer	A4	1007,507	AAAA
Pentamer	D1A4	1168,687	DAAAA
			AAADA
	A5	1210,631	AAAAA
Heksamer	D1A5	1372,456	ADAAAA
			DAAAAA
			AADAAA

Tabell 8.2 : Sekvenserte dimere, trimere, tetramere, pentamere og heksamere fra nedbrytning av kitosan ($F_A=0,65$) etter 7 dagers inkubasjon med ChiA-R172A*.

	1			2		
	KOS	m/z	SEKvens	KOS	m/z	SEKvens
Monomer	A		A	A		A
Dimer	DA	599,11	DA	DA	599,14	DA
	AA	760,35	AA	AA	641,31	AA
Trimer	D2A			D2A	760,37	DDA
	A2D	802,34	DAA	A2D		
			ADA			
	A3		AAA	A3	844,34	AAA
Tetramer	D2A2	963,24	DADA	D2A2	963,26	DDAA

8. Vedlegg

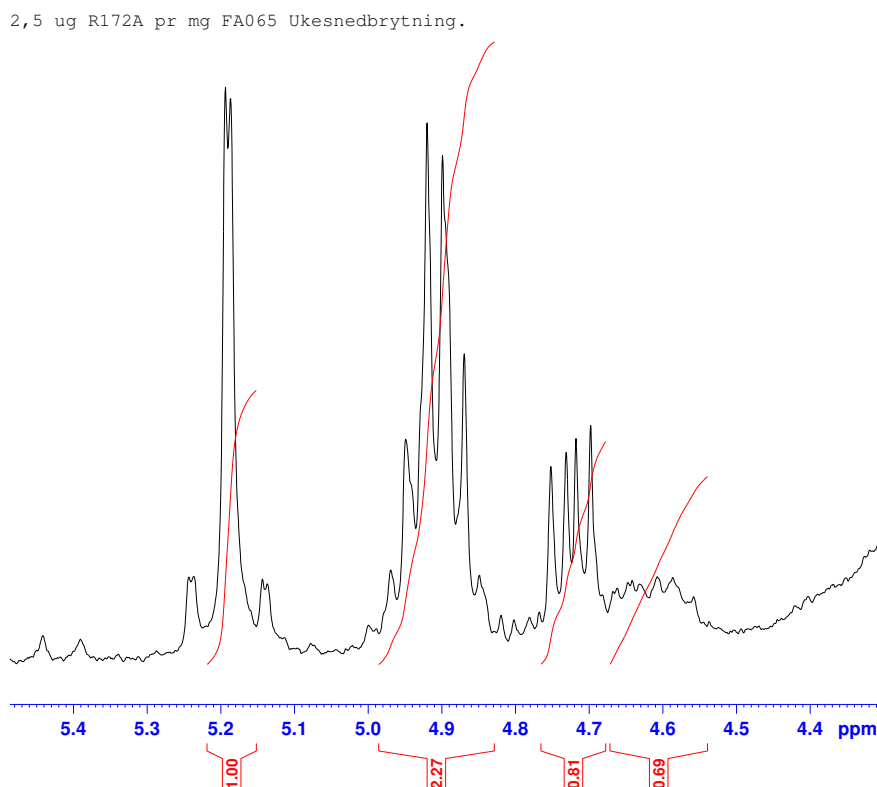
			DDAA			DADA
						ADDA
	D3A1	921,27	DDDA	D3A1	921,31	DDDA
	D1A3	1005,224	DAAA	D1A3	1005,25	ADAA
			ADAA			AADA
			AADA			DAAA
	A4	1007,17	AAAA	A4	1007,22	AAAA
Pentamer	D3A2	1124,21	DADDA	D3A2		
			DDADA			
	D2A3	1166,32	DDAAA	D2A3	1166,26	DDAAA
			ADADA			DAADA
			ADDA			DADAA
	D1A4	1208,26	DAAA	D1A4	1208,3	DAAA
Heksamer	D4A2	1285,43				
	D3A3	1327,49		D3A3		

* Resultater hentet fra Anne Line Norberg

8.4 Vedlegg D

I figur 8.7 og 8.8 vises ^1H NMR spekterene fra ukensnedbrytning av kitosan ($F_A=0,65$) med ChiA R172A og ChiA E473A. ChiA R172A gav en $\alpha=0,38$, og ChiA E473A gav en $\alpha=0,32$.

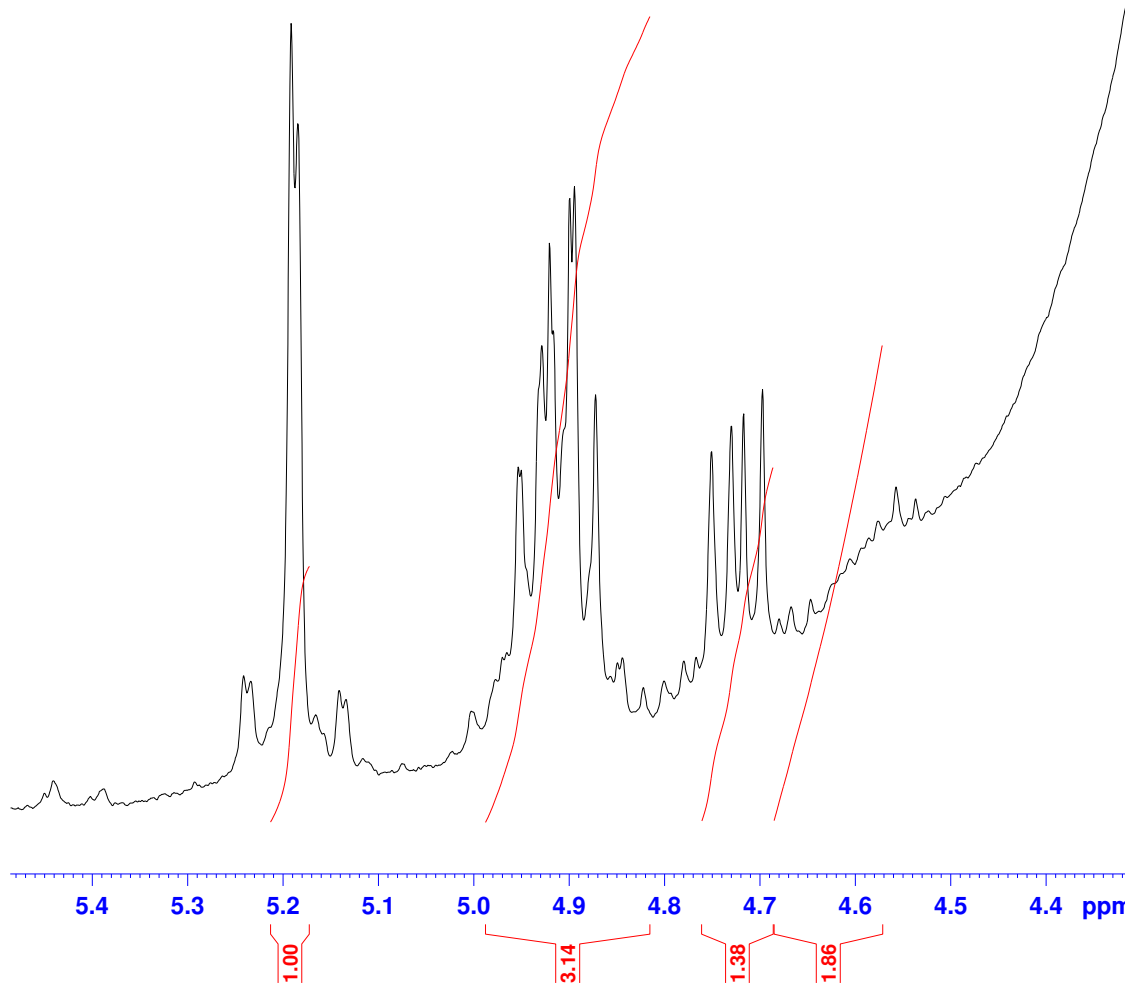
8.4.1 Ukesnedbrytning- ChiA R172A



Figur 8.7: : Spekeret viser nedbrytning av kitosan ($F_A=0,65$) med mutant R172A over 7 dager. Den reduserende enden til α -anomeren av en acetyllert enhet gir resonans ved 5,19 ppm, β -anomeren fra samme enhet gir resonans ved 4,7-4,8 ppm. A og D- enheter inne i, og ved ikke reduserende ender gir resonans ved 4,9 og 4,6 ppm. 7 dagers prøven for R172A gav en $\alpha=0,38$.

8.4.2 Ukesnedbrytning- E473A

2,5 ug E473A pr mg FA065 Ukesnedbrytning.

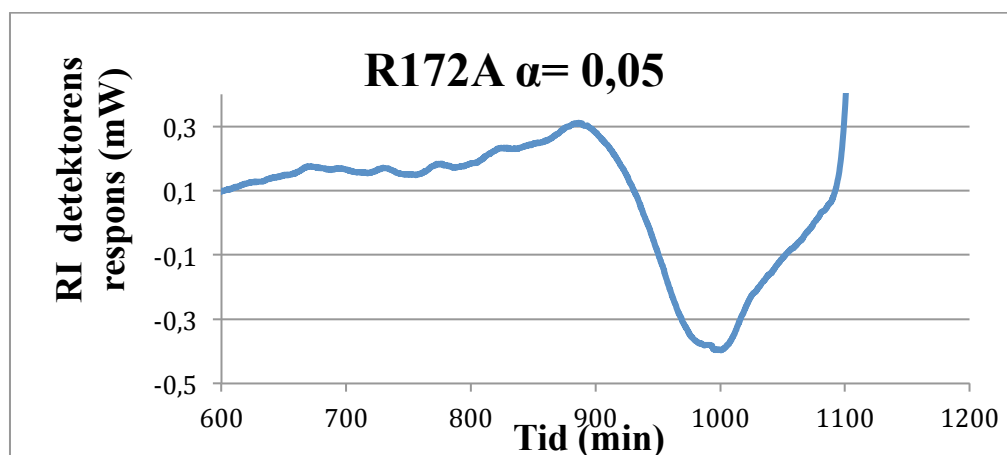


Figur 8.8 Spekteret viser nedbrytning av kitosan ($F_A=0,65$) med mutant E473A over 7 dager. Den reduserende enden til α -anomerer av en acetyleret enhet gir resonans ved 5,19 ppm, β -anomerer fra samme enhet gir resonans ved 4,7-4,8 ppm. A og D-enheter inne i, og ved ikke reduserende ender gir resonans ved 4,9 og 4,6 ppm. 7 dagers prøven for E473A gav en $\alpha=0,32$.

8.5 Vedlegg E

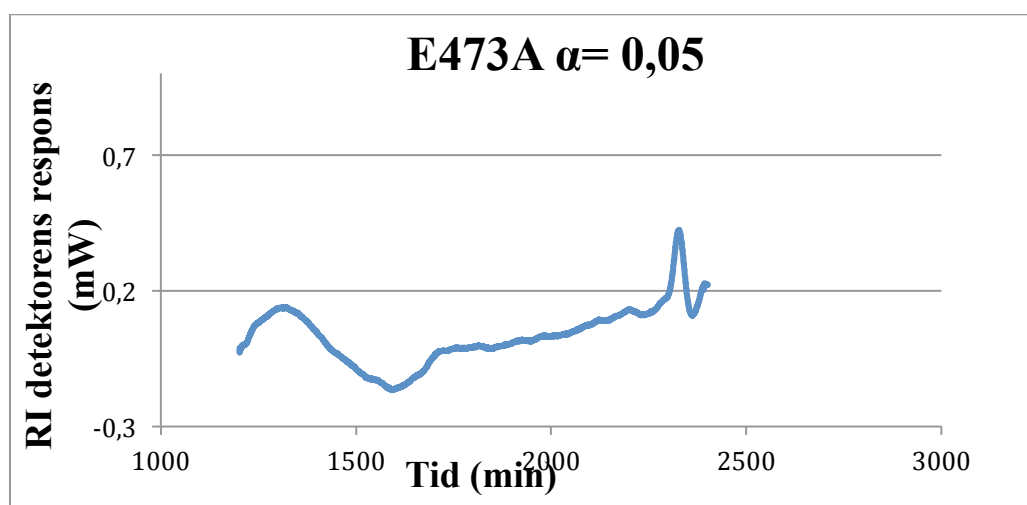
Polymerfraksjonen ble kjørt ved separate SEC-analyser vises i figur 8.7 og 8.8.

8.5.1 Polymertopp- R172A



Figur 8.7: Kromatogrammet viser nedbrytning av kitosan med en $F_A=0,65$ med ChiA R172A. Dette er polymertoppen (voidtoppen) som ble analysert ved hjelp av SEC.

8.5.2 Polymertopp E473A



Figur 8.8: Kromatogrammet viser nedbrytning av kitosan med en $F_A=0,65$ med ChiA E473A. Dette er polymertoppen (voidtoppen) som ble analysert ved hjelp av SEC.

8.6 Vedlegg F

8.6.1 Utregning av % teoretisk nedbrytning av β -kitin

Frengangsmåten og utregningen av hvor mye kitin ChiA teoretisk sett kan bryte ned (100%).

Molekylvekten til β -kitin er 424,4003 g/mol. Ved fullstendig hydrolyse (100% nedbrutt) av β -kitin er det mulig å bryte ned 4710 μ M, og er merket gult i utregningen.

$$\text{MW Kitin} = 424,4003 \text{ g/mol}$$

$$0,002\text{g} / 424,4003 \text{ g/mol} = 4,71 \times 10^{-6} \text{ mol}$$

$$4,71 \times 10^{-6} / 1,00 \times 10^{-3} \text{ L} = 4,71 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$$

$$4,71 \times 10^{-3} \text{ mol/L} \times 1000 = 4,71 \text{ mM}$$

$$4,71 \text{ mM} \times 1000 = 4710 \mu\text{M}$$

4710 μ M = 100% nedbrutt teoretisk.

8.6.2 HPLC resultater fra nedbrytning av β -kitin

Tabell 8.3: Bearbeidet data for ChiA mutanter, som viser Gjennomsnitt A2/A1 mot % teoretisk mulig å bryte ned. (100 % = 4710 μ m). Tid, Gjennomsnitts konsentrasjon av A2/A1, gjennomsnitt nedbrutt kitin og standardavvik vises for T276A, R172A og E473A.

Mutant	Tid (min)	Gj.snitt [A2]/[A1] (μ M)	Gj.snitt nedbrutt ktin (μ M)	Standardavvik
T276A	0	0	0	0
	2	33	0	11,26
	4	39	1	2,03
	6	52	2	13,11
	8	47	2	12,02
	10	52	2	12,14
	15	51	4	6,56
	20	51	5	3,65
	30	48	7	2,54

	60	42	13	2,00
	200	26	24	2,71
	300	22	36	0,59
	24 timer	10	88	0,44
R172A	0	0	0	0
	2	42	1	11,58
	4	71	4	20,55
	6	96	4	19,22
	8	86	4	11,04
	10	84	6	13,94
	15	70	7	1,90
	20	66	13	3,09
	30	65	14	6,92
	60	45	24	5,90
	200	24	54	1,81
	300	20	48	0,64
	24 timer	9	106	1,24
E473A	0	0	0	0
	2	106	2	70,66
	4	80	5	8,04
	6	77	5	3,76
	8	81	6	18,52
	10	61	8	5,21
	15	55	13	7,72
	20	48	12	8,84
	30	40	22	6,07
	60	27	26	6,19
	200	16	59	1,98
	300	13	75	1,85
	24 timer	7	96	1,19