Polare residuers roller i Kitinase B fra Serratia Marcescens for prosessivitet, effektivitet, aktivitet og substratposisjonering.

Role of polar residues in Chitinase B from Serratia Marcescens for processivity, efficiency, activity and substrate positioning.

Silje Benedicte Lorentzen

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP
Institutt for
Masteroppgave 30/60 stp. 2008

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap ved Universitetet for miljø- og biovitenskap (UMB). Studiet har vært del av et større forskningsprosjekt under Bioorganisk forskningsgruppe i samarbeid med Protein Engineering and Proteomics (PEP) gruppa.

Jeg vil rette en stor takk til min hovedveileder professor Morten Sørlie for god veiledning, oppmuntring og kunnskap under hele prosessen. Jeg vil også takke mine medveiledere på labben, Anne Grethe Hamre, Anne Line Norberg og Kristine B. Eide. Takk for gode råd og oppmuntrende ord. Deres hjelp har vært uvurderlig dette året!

Jeg vil også rette en stor takk til mine kjære studievenninner Hanne Hillestad Wold og Nicole Reppert. Dere har gjort dette året på labben til ett av de beste årene på studiet! Mange fine stunder på og utenfor labben med mye latter.

Til slutt vil jeg takke familien min for stort engasjement og oppmuntring hele veien. Og sist men ikke minst en stor takk til min kjære!

Innhold

Sammendrag VI
1. Introduksjon 1
1.1 Karbohydrater 1
1.2 Kitin og kitosan 2
1.2.1 Kitin 2
1.2.2 Kitin struktur 2
1.2.3 Kitosan 4
1.2.4 Andvendelser av kitin og kitosan 5
1.3 Kitooligosakkarider 5
1.4 Glykosyl hydrolaser 6
1.4.1 Struktur 6
1.4.2 Mekanisme 8
1.5 Prosessivitet 10
1.6 Kitinaser 11
1.6.1 Substrat assistert katalyse 11
1.6.2 Kitinaser fra *Serratia marcescens* 13
1.6.3 ChiA 15
1.6.4 ChiC 16
1.6.5 ChiB 17
1.6.6 Prosessivitet hos kitinaser 18
1.7 Seterettet Mutagenese 20
1.8 Mål med oppgaven 21
2 Materialer 22
2.1 Laboratorieutstyr og instrumenter 22
2.1.1 Laboratorieutstyr 22
2.1.2 Programvare til dataanalyse 25
2.2 Kjemikalier 26
2.3 Proteiner og substrater 27
2.4 Medier 28
2.4.1 Selvlagede medier 28
2.4.2 Ferdige medier 29
2.5 Celler 29
2.6 Kit 30

2.7 Buffere og løsninger 31
3 Metoder 32
3.1 Design av ny mutant 32
3.1.1 Primer design 33
3.1.2 Oppdyrking av bakteriestamme 34
3.1.3 Isolering av plasmid fra *E.coli* cellekultur 34
3.1.4 Måling av plasmidkonsentrasjon 35
3.1.5 Seterettet mutagenese 36
3.1.6 Polymerase Chain Reaction (PCR) 38
3.1.7 Utfelling av plasmid 39
3.1.8 Transformering av plasmid inn i TOP-10 superkompetente *E.coli* celler. 40
3.1.9 Isolering av mutert plasmid 40
3.1.10 Sekvensering 41
3.1.11 Transformering over i One Shot® BL21 Star (DE3) *E.coli* celler. 42
3.1.12 Oppdyrking av transformanter 42
3.1.13 Tillaging av -80 °C frysestock 43
3.2 Uttrykking av ChiB mutanter ved hjelp av *E.Coli* BL21 Star 43
3.2.1 Overekspresjon av ChiB i *E.Coli* BL21 Star. 43
3.2.2 Tillaging av periplasmatisk ekstrakt 44
3.2.3 Rensing av periplasmatisk ekstrakt på kitinkuler 45
3.2.4 Sodium Dodecyl Sulfate- Polyakrylamid Gel Elektroforese (SDS-PAGE) 46
3.2.5 Oppkonsentrering av ChiB villtype og aktuelle mutanter 47
3.2.6 Bestemmelse av proteinkonsentrasjon. Fluorometrisk metode. 48
3.2.7 Spesifikk enzymaktivitet 49
3.3 Fremstilling av kitosan 50
3.3.1 ^{1}HNMR-analyse for bestemmelse av acetyleringsgrad av kitosan 51
3.3.2 Tolkning av ^{1}HNMR spekter for bestemmelse av acetyleringsgrad 51
3.4 Nedbrytning av kitosan 52
3.4.1 Oppløsning av kitosan 52
3.4.2 Degradering av kitosan (F_A = 0,65) 52
3.4.3 Prøveopparbeidelse ^{1}HNMR 53
3.4.4 Kjernemagnetisk resonans (NMR) 54
3.4.5 Tolking av ^{1}HNMR-spekter 54
3.5 Størrelseseksklusjonskromatografi (SEC) 56

3.6 Massespektrometri (MS) ... 57
3.6.1 Annotering av topper fra SEC ved bruk av MALDI-TOF-MS ... 58
3.6.2 Tolking av MS-spekter ved annotering av topper ... 58
3.7.1 AMAC derivatisering av kitooligosakkarider ... 59
3.7.2 Rensing av AMAC-derivatiserte kitooligosakkarider ... 60
3.7.3 Analyse av AMAC-derivatiserte kitooligosakkarider ved bruk av MALDI-TOF-TOF-MS. ... 61
3.7.4 Tolking av MS-spekter ved AMAC-derivatisering ... 61
3.8 Enzymatisk hydrolyse av β-kitin ... 62
3.8.1 Hydrolysereaksjoner ... 62
3.8.2 Tillaging av standard ... 63
3.8.3 High Performance Liquid Chromotography (HPLC) ... 64
3.8.4 Bearbeiding av HPLC-data ... 64
4 Resultater ... 65
4.1 Subsetemutasjoner i ChiB ... 65
4.1.1 E144Q ... 68
4.1.2 Y145A og Y145F ... 68
4.1.3 E221A ... 68
4.1.4 R294A og R294Q ... 68
4.2 Seterettet mutagenese ... 69
4.2.1 Sekvensering ... 69
4.3 Isolering av ChiB mutanter ... 70
4.3.1 Rensing av aktive mutanter på kitinkolonne ... 70
4.3.2 SDS-PAGE ... 73
4.3.3 Bestemmelse av proteinkonsentrasjon. Fluorometrisk metode. ... 76
4.3.4 Spesifikk enzymaktivitet ... 76
4.4 Fremstilling av kitosan ... 77
4.4.1 Bestemmelse av acetyleringsgraden til kitosan ... 77
4.5 Karakterisering av tillagede mutanter ved degradering av kitosan (F_A=0,65) ... 78
4.5.1 ^{1}HNMR ... 79
4.5.1.1 Y145F ... 80
4.5.1.2 R294A ... 82
4.5.1.3 E221A ... 84
4.5.1.4 Sammenlikning av initiell hastighet for nedbrytning av kitosan ... 86

4.5.1.5 Sammenlikning av maksimal nedbrytning av kitosan 86
4.5.2 Størrelseseksklusjonskromatografi (SEC) 87
4.5.2.4 ChiB Villtype 88
4.5.2.5 Y145F 89
4.5.2.6 R294A 91
4.5.2.7 E221A 93
4.6 MS analyser av kitooligosakkarider 95
4.6.1 Sekvensering av hydrolyseprodukter 95
4.6.2 Subsetepreferanser for ChiB villtype, Y145F, E221A og R294A 98
4.7 Hydrolyse av β-kitin 100
5 Diskusjon 103
5.5 Prosessivitet 103
5.6 Effektivitet 105
5.7 Aktivitet 105
5.8 Substratposisjonering 107
5.9 Oppsummering 107
6 Videre studier 108
7 Referanser CX
8. Vedlegg CXIII

Sammendrag

Denne oppgaven er skrevet som del av et større forskningsprosjekt der målet er å tilegne seg mest mulig kunnskap om enzymer som bryter ned den uløselige polymeren kitin som består av repeterte β-(1,4)-bundet-*N*-acety-$_D$-glukosaminenheter. Videre er det overordnede målet å utvikle enzymer som mest mulig effektivt degraderer kitin og dets vannløselige derivat kitosan, til oligosakkarider med en bestemt lengde og en gitt grad av acetylerte enheter.

Den gram negative jordbakterien *Serratia Marcescens* tilhører *Enterobacteriaceae* familien og dens kitinolytiske maskineri er et av de mest studerte enzymsystemene for omdannelse av uløselige polysakkarider. Denne bakterien produserer blant annet tre kitinaser. Kitinase A (ChiA), kitinase B (ChiB) og kitinase C (ChiC). Kitinase B er et prosessivt ekso-enzym som dergaderer kitin fra den ikke-reduserende enden av substratet.

I tidligere studier er det vist at aromatiske residuer i det aktive setet hos ChiB er svært viktige for enzymets prosessive egenskap. Spesielt residuene TRP97 i subsete +1 og TRP220 i subsete +2. I denne oppgaven har polare residuer i det aktive setet til dette enzymet blitt studert. Hovedmålet var å studere sterkt interagerende polare residuers effekt på prosessivitet, aktivitet, effektivitet og substratposisjonering mot både kitin og kitosan.

I denne oppgaven ble tre ChiB mutanter studert. Y145F, E221A og R294A. I tillegg ble mutantene E144Q, Y145A, R294Q, Y145A/E144Q og R294Q/E144Q tillaget. For mutantene Y145F, E221A og R294A ble grad av prosessivitet, aktivitet og effektivitet studert ved å utføre degraderingsforsøk mot både β-kitin med størrelsen på 3 µm og kitosan med 65 % acetylerte enheter.

Produktene etter degradering av kitosan ble analysert ved bruk av kjernemagnetisk resonans (**(**^{1}HNMR) og størrelsesekskluslusjonskromatografi (SEC). Prosessive enzymer vil gi en karakteristisk distribusjon av produktene ved analyse på SEC. Denne distribusjonen består i hovedsak av topper av partalls oligomere. Videre ble produktene etter nedbrytningen analysert ved bruk av massespektrometri, og de ble deretter sekvensert ved bruk av AMAC-derivatisering.

Produktene fra degradering av β-kitin ble analysert ved bruk av «High Performance Liquid Chromotography» (HPLC). Ut fra denne analysen ble dimer/monomer ratioen til de ulike

mutantene beregnet. Denne ratioen vil være høy for prosessive enzymer og lav for ikke-prosessive enzymer.

Resultatene fra disse analysene indikerer at mutanten E221A har nedsatt grad av prosessivitet mens R294A har høyere grad av prosessivitet, sammenliknet med ChiB villtypen. Grad av prosessivitet mot β-kitin var uendret for Y145 sammenliknet med villtypen. E221A derimot viste lavere aktivitet enn villtypen. R294A viste å ha høyere grad av prosessivitet enn villtypen. Men tanke på aktivitet mot kitosan viste Y145F lavere aktivitet enn villtypen, E221Aviste seg å være svært lik villtypen. R294A derimot viste høyere aktivitet mot dette substratet enn villtypen. Aktivitet mot β-kitin ble observert å være uendret for Y145A og R294A sammenliknet med villtypen. Det ble allikevel observert nedsatt aktivitet for mutanten E221A. Med tanke på effektivitet mot kitosan ble alle mutantene og villtypen vist å ha lik effektivitet i degraderingen. Mot β-kitin viste den mest prosessive mutanten R294A å ha lavest effektivitet.

Abstract

This thesis is written as part of a larger research project whose aim is to acquire as much knowledge about the enzymes that break down the insoluble polymer chitin, consisting of repeating β-(1,4)-linked-N-acety-D-glucosamine units. Furthermore, the overall objective is to develop enzymes that most efficiently degrade chitin and its water-soluble derivative chitosan, to oligosaccharides of a certain length and a certain degree of acetylated units.

The gram negative soil bacterium *Serratia Marcescens* belongs to the Enterobacteriaceae family and its chitinolytic machinery is one of the most studied enzyme systems for the conversion of recalcitrant polysaccharides. Among other enzymes, this bacterium produces three chitinases including chitinase A (ChiA), chitinase B (ChiB) and chitinase C (ChiC). Chitinase B is a processive exo-enzyme that degrades chitin from the non-reducing end of the substrate.

In previous studies it has been shown that aromatic residues in the active site of chitinase B (ChiB) are very important for the processive property of the enzyme. Especially TRP97 in subsite +1 and TRP220 in subsite +2. In this thesis, polar residues in the active site of this enzyme have been studied. The main objective was to study strongly interacting polar residues effect on processivity, activity, effectiveness and substrate positioning against both chitin and chitosan.

In this paper, three ChiB mutants were studied. Y145F, E221 and R294A. In addition, the mutants E144Q, Y145, R294Q, Y145A/E144Q and R294Q/E144Q were made. For the active mutants Y145F, E221 and R294A, grade of processivity, activity, efficiency and substrate positioning were studied by performing degradation experiments both on β-chitin with the size of 3 microns and chitosan with 65 % acetylated units.

Products by degradation of chitosan were analyzed using nuclear magnetic resonance (^{1}HNMR) and size exclusion chromatography (SEC). Processive enzymes will provide a characteristic distribution of the products in SEC. This distribution consists mainly of peaks of even-numbered oligomers. Furthermore, the degradation products were analyzed by mass spectrometry, and were then sequenced using AMAC derivatisation. The products of degradation of β-chitin were analyzed using “High Performance Liquid Chromotography” (HPLC). Based on this analysis, the dimer / monomer ratio of the different mutants were

calculated. This ratio will be high for processive enzymes and low for non-processive enzymes.

The results of these analyzes indicate that the mutant E221 has reduced degree of processivity while R294A has a higher degree of processivity compared with the ChiB wildtype. The degree of processivity against β-chitin was unchanged for Y145 compared with the wildtype. E221 however, showed lower activity than the wild type. R294A showed to have a greater degree of processivity than the wildtype. But in terms of activity against chitosan Y145F showed lower activity than the wildtype, E221A showed to be very similar to the ChiB wildtype. R294A however, showed higher activity against this substrate than the wildtype. Activity against β-chitin was observed to remain unchanged for Y145 and R294A compared with the wildtype. It was however observed decreased activity of mutant E221. Considering the effectiveness against chitosan, all mutants and the wildtype shown to have similar effectiveness in degradation of this substrate. Towards β-chitin the most processive mutant R294A showed to have the lowest efficiency.

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
Asp (D)	Asparaginsyre
BSA	Bovin Serum Albumine
CBP	Kitinbindende protein
ChiA	Kitinase A
ChiB	Kitinase B
ChiC	Kitinase C
Da	Dalton
dH$_2$O	Destillert vann
ddH$_2$O	Dobbeldestilert vann
DHB	2,5-dihydrobenzoic acid
DMSO	Dimetyl Sulfoxid

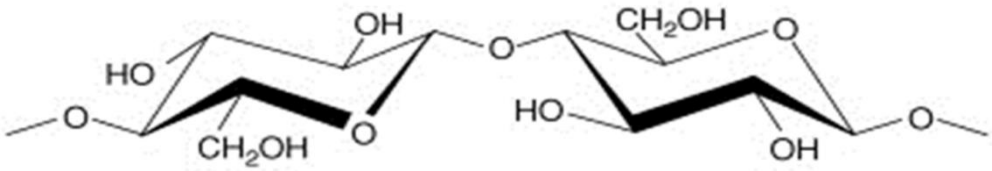
DNA	Deoksyribonukleinsyre
dsDNA	Dobbeltrådet DNA
DP	Polymeriseringsgrad
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
F_A	Acetyleringsgrad / fraksjon av acetylerte enheter
GH18	Glykosyl hydrolase familie 18
GlcN	*D*-glukosamin
GlcNAc	N-acetyl-$_D$-glucosamine
Glu (E)	Glutamat
Glu (Q)	Glutamin
HPLC	High Performance Liquid chromatography
Kb	Kilobaser
kDA	KiloDalton
KOS	Kitooligosakkarider
LB	Luria-Bertani
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
m/z	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
Tyr (Y)	Tyrosin
Å	Ångstrøm

1. Introduksjon

1.1 Karbohydrater

Karbohydrater er kjemiske forbindelser med den generelle formelen $(CH_2O)_n$, eller derivater av dette. Disse er viktige produkter av fotosyntesen og oksidasjon av karbohydrater er en sentral energikilde for både planter og dyr. De klassifiseres som monoskakkarider, oligosakkarider og polysakkarider etter størrelse på molekylene. Monosakkarider er de enkleste karbohydratene og inkluderer de monomere sukkerene som ribose, glukose og fruktose. Disse forekommer som oftest i svært stabile ringstrukturer. Monosakkaridene kan bindes sammen av glykosidbindinger og danne oligosakkarider og polysakkarider. Oligosakkaridene består av få monomerer bundet sammen, mens polysakkaridene kan bestå av opp mot fler tusen monosakkarider bundet sammen. Cellulose er det vanligste polysakkaridet i naturen og inngår i strukturkomponenter i planter og trær. Den kjemiske strukturen av cellulose vises i Figur 1.



Figur 1: Kjemisk struktur av cellulose(Eijsink, V. G. H. et al. 2008)

Karbohydrater har mange ulike funksjoner. De inngår som strukturelementer i planter, i celleveggen til bakterier og i exoskjellettet hos skalldyr. En annen viktig rolle karbohydrater har, er som gjenkjennelsesmolekyler på celleoverflater for andre celler og molekyler. I denne sammenhengen gjelder dette ologisakkarider og polysakkarider bundet til glykoproteiner eller celleoverflater (Mathews, C. K. *et al.* 2000).

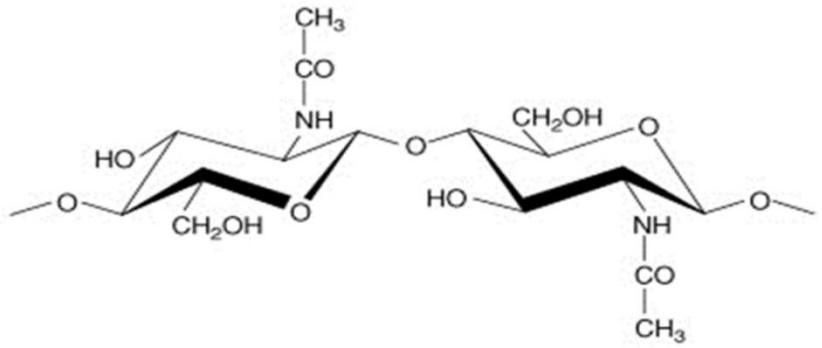
1.2 Kitin og kitosan

1.2.1 Kitin

Kitin er et polysakkarid som syntetiseres av flere organismer. Kitin finnes hovedsakelig i virvelløse dyr, insekter, krepsdyr, alger, sopp og gjær. Strukturen av kitin ligner cellulose og etter cellulose er kitin den biopolymeren i naturen med høyest forekomst (Mathews, C. K. *et al.* 2000). Kitin utgjør en viktig strukturell rolle i celleveggen til enkelte sopparter og eksoskjelettet til insekter og skalldyr. Kitin har et bredt bruksområde som blant annet omfatter fagfelt som kjemi, bioteknologi, medisin, veterinærmedisin, næringsmiddelindustri, miljøvern og tekstilproduksjon (Synowiecki, J. *et al.* 2003).

1.2.2 Kitin struktur

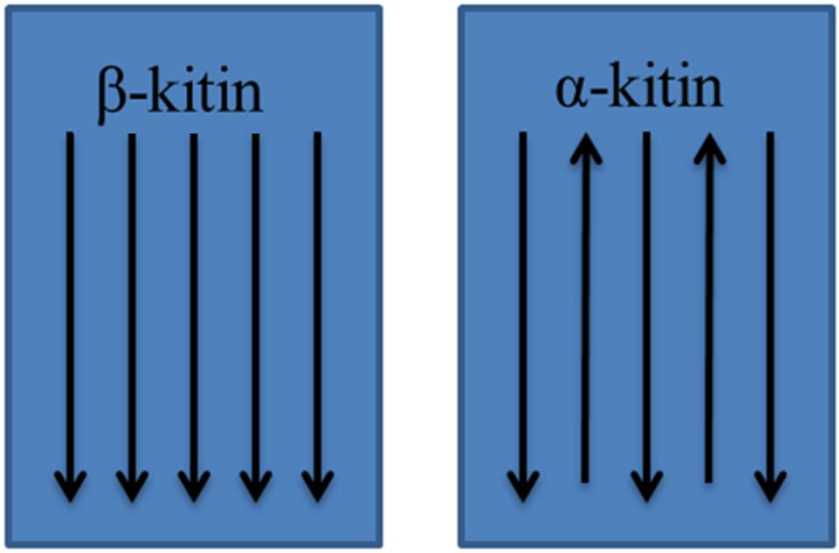
Kitin er en uløselig og lineær biopolymer av β-(1,4)-bundet-*N*-acety-$_D$-glukosaminenheter (GlcNAc eller A). GlcNAc enhetene er rotert 180 ° i forhold til hverandre. Kitin består av lange kitinkjeder bundet sammen av hydrogenbindinger.



Figur 2: Kjemisk struktur av kitin. To N-acetylgluksoamin enheter bundet sammen og rotert 180 ° i forhold til hverandre og bundet sammen av en glykosidbinding (Eijsink, V. G. H. et al. 2008).

Lengden på kitinkjedene varierer på bakgrunn av hvilken organisme de stammer fra. Kitin funnet i krabbe varierer fra 5000-8000 GlcNAc enheter. Kitin i gjær derimot består av rundt hundre GlcNAc enheter.

Det finnes i hovedsak to ulike krystallinske former av kitin, basert på hvordan kitinkjedene er bundet sammen. Den vanligste formen er α-kitin, hvor kitinkjedene er orientert anti-parallelt i forhold til hverandre. Den andre strukturelle formen er β-kitin der kitinkjedene er orientert parallelt i forhold til hverandre. En skissering av strukturene vises i Figur 3.

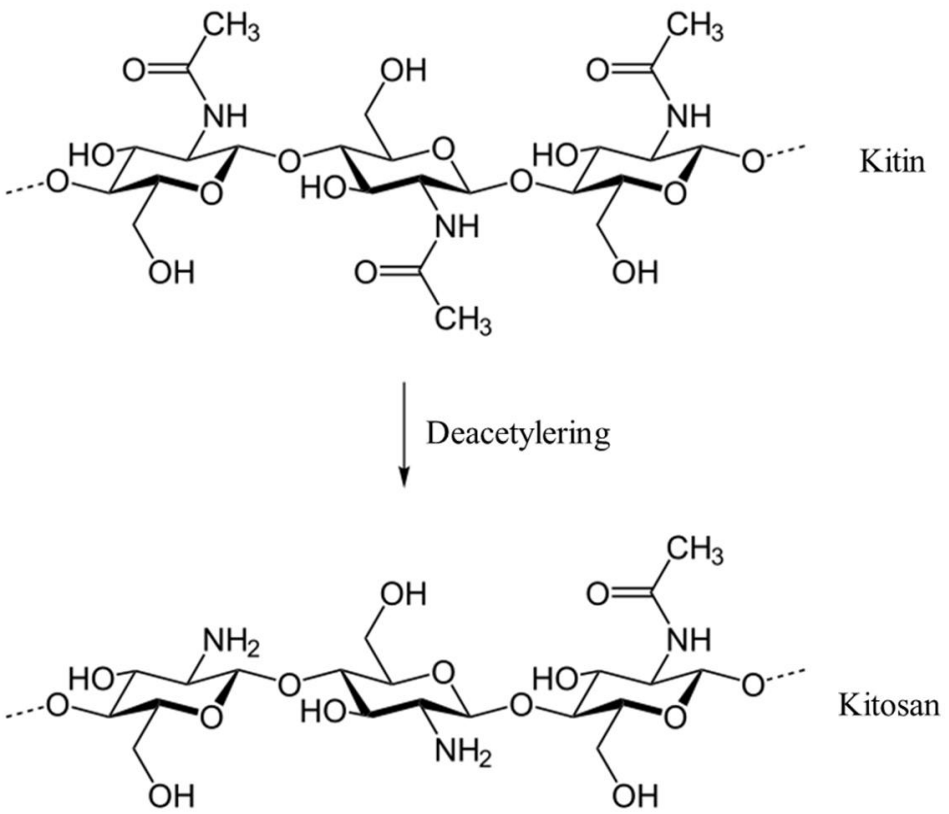


Figur 3: Oversikt over orienteringen av kitinkjedene i α -kitin og β–kitin

I α-kitin er de anti-parallelle kitinkjedene bundet sammen av sterke inter- og intramolekylære hydrogenbindinger. Denne tette pakkingen gjør derfor at α-kitin er den mest rigide kitinstrukturen. I β-kitin er det færre hydrogenbindinger mellom de parallelle kitinkjedene, og følgelig er denne formen derfor lettere å bryte ned (Synowiecki, J. *et al.* 2003). En tredje form for kitin, kalt γ-kitin er tidligere omtalt. Denne strukturelle formens eksistens er omstridt, og det kan tyde på at dette er en variant av α-kitin (Rinaudo, M. 2006).

1.2.3 Kitosan

Kitosan er en vannløselig heteropolymer som består av β-(1,4)-bundet-*N*-acety-$_D$-glukosaminenheter (GlcNAc; A) og $_D$-glukosamin enheter (GlcN; D). De frie amingruppene på glukosaminenhetene kan protoneres og følgelig vil kitosan være vannløselig. Løseligheten avhenger av deacetyleringsgraden (Rinaudo, M. 2006). Løseligheten øker med økende grad av deacetylering. Kitosan forekommer naturlig blant annet i celleveggen til enkelte sopparter, men produseres også kommersielt ved de-*N*-acetylering av kitin, dette vises i Figur 4.



Figur 4: Omgjøring av kitin til dets vannløselige derivat kitosan. Denne omgjøringen kan for eksempel oppnås ved syrekatalyse.

De kjemiske egenskapene til kitosan varierer med fraksjonen av acetylerte enheter (F_A), rekkefølgen av disse og lengden av kitosankjedene. F_A defineres som den molare konsentrasjonen av acetylerte enheter (A) delt på den totale molare konsentrasjonen av monomerenheter (A og D) (Sikorski, P. *et al.* 2006). Ved homogen de-N-acetylering av kitin er det vist at en tilfeldig distribusjon av N-acetylenheter forekommer (Sørbotten, A. *et al.* 2005). Kitosan er biodnedbrytbar, ikke toksisk og har mange ulike bruksområder.

1.2.4 Andvendelser av kitin og kitosan

Kitin har som tidligere nevnt mange ulike anvendelsesområder og produseres i stor skala på verdensbasis. Skall fra reker og krabbe er de vanligste kildene til industriell fremstilling av kitin. Kitin distribueres også i stor grad i naturen hos mange ulike organismer og er bionedbrytbart. Kitin har lav toksisitet, antibakterielle egenskaper, gel-dannende egenskaper og har høy affinitet for proteiner (Rinaudo, M. 2006). Innenfor medisin og helse finner man fler benyttelser av kitin. Blant annet blir oligomerer av kitin benyttet i medisiner mot kreft, kitinfibre er benyttet i sårbandasjer for raskere sårheling og kitinfilm er brukt i medisiner for kontrollert medikamentfrigjørelse over tid. I landbruk er kitin og kitosan brukt for å hemme vekst av sopp på planter. Kitosan er også benyttet til stimulering av plantevekst. Kitin, kitosan og dets derivater benyttes også til rensing av forurenset vann. Innenfor matindustrien finnes det fler ulike benyttelser for kitin og kitosan. Kitosan tilsettes som kostfiber til en rekke produkter, og er også vist å ha en reduserende evne på kolesterol. Kitosan er videre benyttet i kosmetikk for å opprettholde hudens fuktighet (Rinaudo, M. 2006).

1.3 Kitooligosakkarider

Kitooligosakkarider (KOS) er oligomerer fremstilt fra kitin eller kitosan. Kitooligosakkarider kan blant annet fremstilles ved syrehydrolyse av kitosan. En annen metode er enzymatisk hydrolyse av kitosan med glykosyl hydrolaser. KOS er vannløselige, lette å degradere i naturen og har vist seg å ha mange positive biologiske effekter (Aam, B. B. *et al.* 2010). KOS har blant annet vist å ha antifungal aktivitet og en inhiberende effekt på kreft tumorer. De danner stabile komplekser med plasmid og bruk som vektor for administrering av gener til slimhinnevev har vært vellykket. Inhibering av kitinaser er også et viktig område der KOS benyttes. Det skal også tas i betraktning at de biologiske effektene rapportert for kitosan også kan komme av KOS som frigjøres når kitosan brytes ned av hydrolytiske enzymer som forekommer naturlig. Den biologiske aktiviteten til KOS er blant annet avhengig av acetyleringsgrad, polymeriseringsgrad og fordeling av GlcNAc/GlcN enheter i kjeden. Komperative studier mellom struktur og biologisk aktivitet er derfor viktig å utføre (Aam, B. B. *et al.* 2010).

1.4 Glykosyl hydrolaser

Glykosyl hydrolaser også kaldt glykosidaser er en utbredt gruppe enzymer som katalyserer hydrolyse av glykosidbindinger mellom karbohydrater eller mellom et karbohydrat og et annet molekyl. Det finnes stor stereokjemisk diversitet i karbohydrater i naturen. Som et resultat av dette har glykosidasene stor variasjon både i størrelse og strukturell komposisjon. På bakgrunn av aminosyresekvens hos glykosidasene er det sammenfattet en klassifisering i databasen Carbohydrate Active Enzymes (CAZy) hvor enzymer med liknende struktur deles inn i familier (Henrissat, B. 1991).

1.4.1 Struktur

Strukturen til mange av glykosidasesene består av et katalytisk domene der det aktive setet er lokalisert, og ett eller flere ikke-katalytiske domener. Noen av de ikke-katalytiske domenene bidrar til substratbinding, men de fleste av disse domenene har ukjent funksjon (Davies, G. *et al.* 1995). Subsetene i det katalytiske domenet nummereres fra -n til +n. Subseter navgitt –n er plassert på den ikke-reduserende enden, +n representerer dermed subseter på den reduserende enden av substratet. Hydrolyse av glykosidbindingen finner sted mellom +1 og -1 (Davies, G. J. *et al.* 1997). Det aktive setet kan ha tre ulike topologier. Disse tre strukturene er lomme-, kløft- og tunnelstruktur. Endo- og eksoaktivitet er ofte relatert til topologien i det aktive setet. Enzymer med endoaktivitet katalyserer hydrolyse av tilfeldige glykosidbindinger langs polymeren og har vanligvis en åpen struktur i det aktive setet. Enzymer som degraderer polymeren fra den reduserende eller ikke-reduserende enden innehar eksoaktivitet.

1) Lomme/ krater topologi (Figur 5 A)

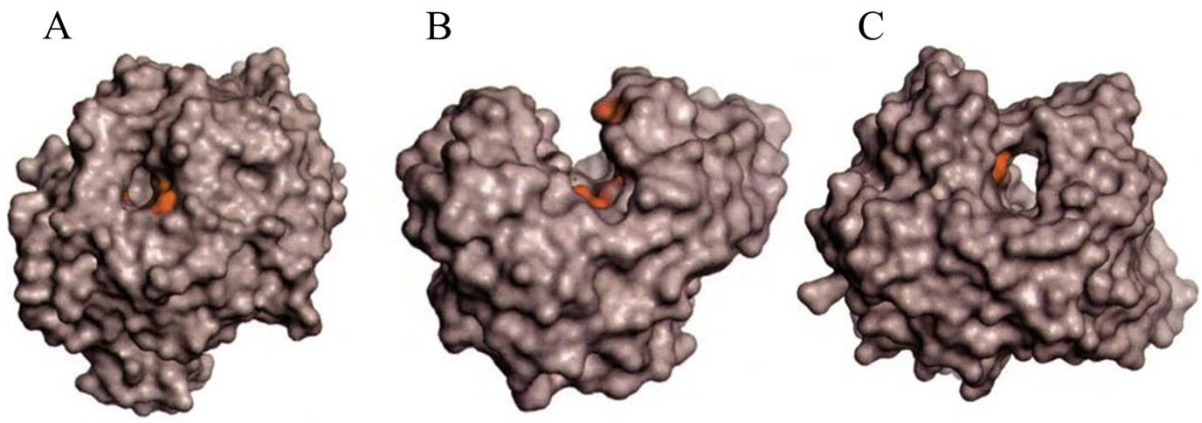
Denne topologien er optimal for gjenkjennelse av sakkarider som har mange tilgjengelige ender på overflaten. Både reduserende og ikke-reduserende ender. På substrater med fiberliknende strukturer slik som cellulose vil disse enzymene ikke være like effektive. Enzymer med denne lommetopologien er blant annet β-galactosidase, β-glucosidase og β-amylase (Davies, G. *et al.* 1995).

2) Kløft topologi (Figur 5 B)

Enzymer med denne topologien har en åpen struktur i det aktive setet. Denne topologien er vanligst å finne i enzymer med endoaktivitet slik som kitinaser, endocellulaser og lysozymer. Denne strukturen tillater tilfeldig binding av fler sukkerenheter i ulike polymere substrater (Davies, G. *et al.* 1995).

3) Tunnel topologi (Figur 5 C)

En tunellformet topologi er egnet for hydrolyse fra enden av substratet. Denne topologien tillater frigjørelse av produkter etter hydrolyse, samtidig som enzymet forblir bundet til substratet. Dette gir mulighet for prosessivitet som er en gunstig for effektiviteten av enzymatisk hydrolyse av uløselige polymere substrater (Davies, G. *et al.* 1995).



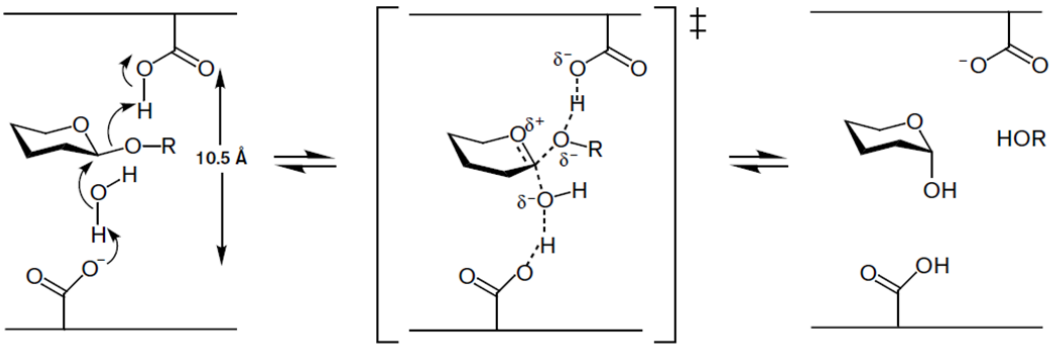
Figur 5: Oversikt over de tre ulike topologiene til det aktive setet hos glykosyl hydrolaser. De katalytiske residuene er merket med rødt. A viser lommestruktur, B viser kløftstruktur og C viser tunnelstruktur (Davies, G. et al. 1995).

1.4.2 Mekanisme

Enzymatisk hydrolyse av glykosidbindinger skjer ved syrekatalyse og krever to essensielle residuer. En protondonor og en nukleofil/base (Davies, G. *et al.* 1995). Glykosidaser hydrolyserer via to ulike mekanismer som begge krever disse residuene. Hydrolysen fører enten til en inversjon eller retensjon (bevaring) av den anomere konfigurasjonen. Glykosidasene klassifiseres dermed etter inverterende mekanisme eller bevarende mekanisme. I begge disse mekanismene er posisjoneringen av protondoneren identisk. Protordonoren er plassert slik at protonet kan inngå i en hydrogenbinding med oksygenet i glykosylbindingen (Davies, G. *et al.* 1995).

1.4.2.1 Inverterende Mekanisme

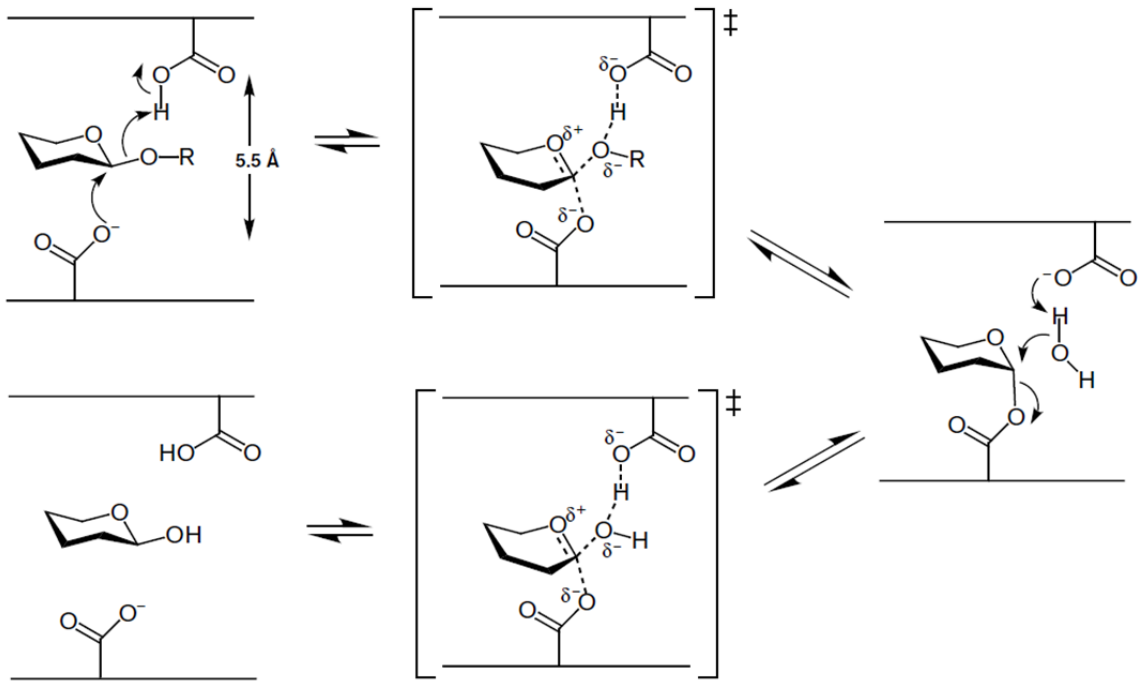
Hydrolyse ved inverterende mekanisme kalles også for «direct replacement mechanism» og skjer ved er en direkte utbytting av den utgående gruppen med et vannmolekyl. Dette vises i Figur 6. I det aktive setet er det to karboksylsyrer plassert med omtrent 10 Å avstand fra hverandre, der den ene fungerer som katalytisk syre og den andre som katalytisk base. Den katalytiske basen deprotonerer vannmolekylet som angriper det anomere karbonet samtidig som den katalytiske syren protonerer glykosidbindingen og gir en nøytral utgående gruppe. Resultatet av denne reaksjonen er en inversjon av den anomere konfigurasjonen (Davies, G. *et al.* 1995, Withers, S. G. 2001). Følgelig vil hydrolyse av en β-glykosid binding i et produkt med α-konfigurasjon på det anomere karbonet og motsatt.



Figur 6: Generell glykosidase mekanisme for inverterende β-glykosidaser som endrer konfigurasjonen av det anomere karbonet. (Rye, C. S. et al. 2000).

1.4.2.2 Bevarende Mekanisme

Den bevarende hydrolysen av glykosidbindingen skjer via en dobbel utbyttings mekanisme, som går over to trinn. I denne mekanismen blir konformasjonen til det anomeriske karbonet ikke endret under hydrolysen. De to katalytiske karboksylsyrene i disse enzymene er plassert omtrent 5,5 Å fra hverandre (Withers, S. G. 2001). Den ene karboksylsyren fungerer i første trinn som en katalytisk syre ved at glykosid oksygenet protoneres. I samme steg fungerer den andre karboksylsyren som nukleofil og angriper det anomere karbonet og danner et kovalent substrat-enzym intermediat. I det påfølgende steget fungerer den første karboksylsyren nå som katalytisk base og deprotonerer det innkommende vannmolekylet som agerer som nulkeofil og angriper det anomere karbonatomet. Dette resulterer i at karboksylsyren som er kovalent bundet til substratet spaltes av og en OH-gruppe sitter på det anomere karbonet i samme stereokjemiske konfigurasjon som før hydrolysen (Davies, G. *et al.* 1995, Withers, S. G. 2001).



Figur 7: Generell mekanisme for reterende β-glykosidaser (Rye, C. S. et al. 2000).

1.5 Prosessivitet

I naturen degraderes krystallinske polysakkarider av en miks av glykosyl hydrolaser og lytiske polysakkarid monooxygenaser som virker i synergi. Denne miksen består av både prosessive og ikke-prosessive enzymer (Payne, C. M. *et al.* 2012).
Evnen til å forbli bundet til substratet mellom påfølgende hydrolytiske kutt karakteriserer prosessive enzymer. Dette er en egenskap som er vanlig for mange glykosyl hydrolaser som bryter med krystallinske polysakkarider som cellulose og kitin (Davies, G. *et al.* 1995, Sørlie, M. *et al.* 2012). Å få tilgang til en enkelt substratkjede på en vannuløselig sukkerpolymer er for enzymer en svært energetisk ugunstig prosess. Prosessivitet er derfor lønnsomt for degradering av krystallinske substrater da dette hindrer reassosiering av den løsnede substratkjeden med resten av den krystallinske strukturen (Sørlie, M. *et al.* 2012). Hos prosessive enzymer er det vanlig at det aktive setet har tunell liknende topologi som lukker seg om substratet i varierende grad. Aromatiske residuer arrangert i det substratbindende setet er også vist å bidra til prosessivitet (Rouvinen, J. *et al.* 1990, Varrot, A. *et al.* 2003). De aromatiske residuene interagerer ved hydrofobe interaksjoner med substratet. Denne formen for interaksjon er uspesifikk og involverer store interaksjonsoverflater. Aromatiske residuer er derfor antatt å bidra til at enzymet forblir bundet samtidig som det forflytter seg langs substratet (Sørlie, M. *et al.* 2012).

Det finnes flere metoder for å analysere enzymers prosessivitet på. Ved sammenlikning av produksjon av løselige og uløselige reduserende ender kan grad av prosessivitet vurderes. Prosessivitet indikeres da om andelen av løselige reduserende ender er høyere enn andel uløselige reduserende ender. Denne metoden vil imidlertid ikke skille på om det gjelder ekso-enzymer som uavhengig av prosessivitet vil gi høyest andel løselige reduserende ender. Eller om det gjelder endo-enzymer med høy grad av prosessivitet (Horn, S. J. *et al.* 2006a). Sammenlikning av mengde produsert dimer vs. monomer etter degradering av krystallinske polysakkarider er en annen velkjent metode for mål av glykosyl hydrolasers grad av prosessivitet (Vaaje-Kolstad, G. *et al.* 2013). For kitinaser fra glykosyl hydrolasefamilie 18 er mengde partallsoligomerer vs. Oddetallsoligomerer etter enzymatisk nedbrytning av kitosan også benyttet som et mål på prosessivitet (Horn, S. J. *et al.* 2006b).

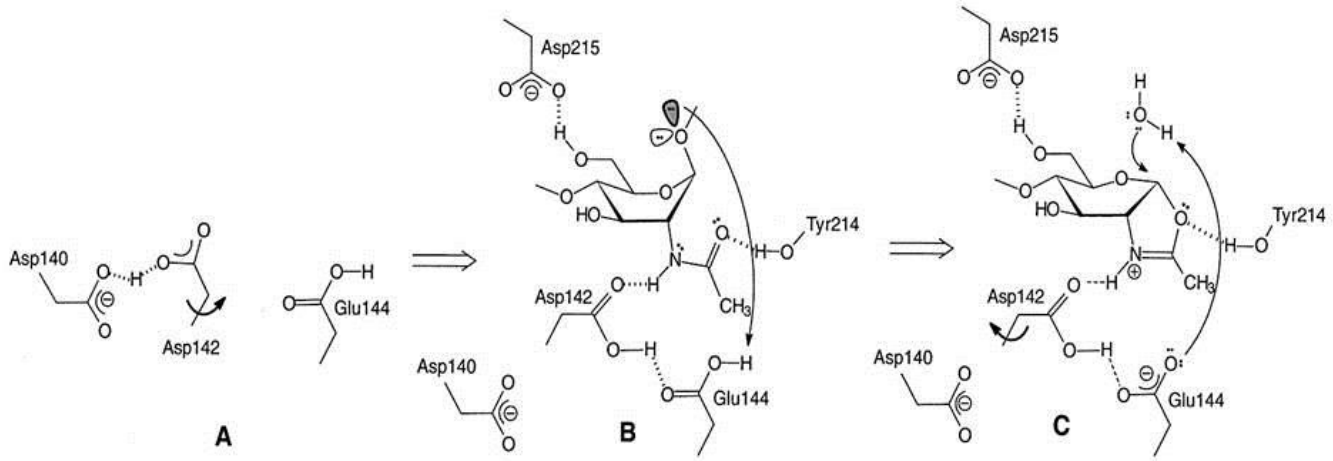
1.6 Kitinaser

Kitinaser katalyserer hydrolyse β-1,4-glykosid bindingen i kitin og finnes i mange ulike organismer, fra prokaryoter til mennesker. I organismer som inneholder kitin, er kitinaser viktige i livssyklus funksjoner slik som celledeling og morfogenese. I planter produseres kitinaser som en del av det antifungale forsvaret mot patogene sopparter. Kitin omdannes i mange bakterier og sopp til komponenter som brukes som energikilder (Brurberg, M. B. *et al.* 2000). Kitinaser klassifiseres i familie 18 og 19 av glykosyl hydrolasene. Familie 18 inkluderer kitinaser hovedsakelig fra bakterier, sopp, insekter og noen planter. Familie 19 omfatter kitinaser som i hovedsak finnes i høyerestående planter og i den gram-positive bakterien bacterium *Streptomyces (Brurberg, M. B. et al. 2000, Fukamizo, T. 2000).* Enzymene er av stor bioteknologisk interesse ettersom kitinhydrolyse gir mange nyttige produkter som har mange bruksområder som beskrevet i avsnitt 1.2.4. Som tidligere nevnt benytter glykosyl hydrolaser to ulike mekanismer, inverterende- og bevarende mekanisme. Familie 19 kitinasene har en inverterende katalyse, mens familie 18 kitinasene bevarer konfigurasjonen av det anomere karbonet via en substratassistert mekanisme (Fukamizo, T. 2000). I denne masteroppgaven er prosessivitet knyttet til familie 18 kitinaser blitt studert.

1.6.1 Substrat assistert katalyse

Familie 18 kitinaser hydrolyserer kitin ved en substratassistert mekanisme som bevarer konfigurasjonen til det anomere karbonet. For kitinasen ChiB fra *Serratia marcescens* har rollen til viktige residuer i enzymet i den substratassisterende mekanismen blitt studert (Aalten, D. M. F. v. *et al.* 2001) (Synstad, B. *et al.* 2004). Blant de viktigste residuene er Asp-140, Asp-142 og Glu-144 er en del av et høyt konservert DXXDXDXE motiv i familie 18 kitinasene. Disse residuene deltar i ulike steg i katalysen som vist i Figur 8. Katalysen initieres ved at sukkerringen i -1 subsetet gjennomgår en konformasjonsendring til båtkonformasjon når enzymet binder til substratet. Denne substratbindingen forårsaker rotasjon av Asp-142 mot Glu-144. Dette fasiliterer dannelse av en hydrogenbinding mellom disse to residuene, samtidig brytes hydrogenbindingen mellom Asp-142 og Asp-140.

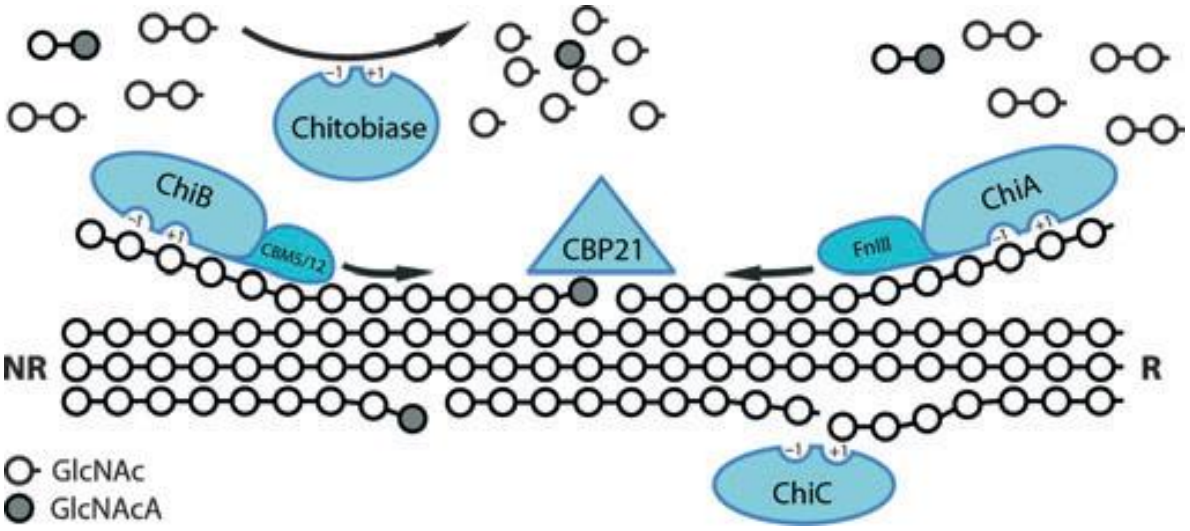
Videre dannes et positivt ladet oxazoliniumion intermediat ettersom karbonyl-oksygenet på sukkeret i -1 subsetet utfører et nukleofilt angrep på det anomere karbonet. Intermediatet stabiliseres gjennom interaksjoner med et konservert Asp-residu i nærheten av Glu-residuet. Katalysen ender ved at Glu-144 protoneres av et vannmolekyl, Asp-142 går dermed tilbake til utgangsposisjon i binding med Asp-140 (Aalten, D. M. F. v. *et al.* 2001, Synstad, B. *et al.* 2004).



Figur 8: Foreslått substratassistert mekanisme for familie 18 kitinaser, her vist med kitinase B fra Serratia marcescens. (A) Hvilende enzym. Asp-142 er for langt unna til å interagere med Glu-144. (B) Binding av substratet forårsaker endring av GlcNAc-enheten til båtkonformasjon og Asp-142 roteres mot Glu-144 som gjør det mulig å danne hydrogenbinding mellom Asp-142 og Glu-144. (C) Hydrolyse av oxazoliniumion intermediatet som fører til protonering av Glu-144 og rotasjon av Asp-142 tilbake til utgangsposisjonen hvor Asp-142 deler et hydrogen med Asp-140 (Aalten, D. M. F. v. et al. 2001).

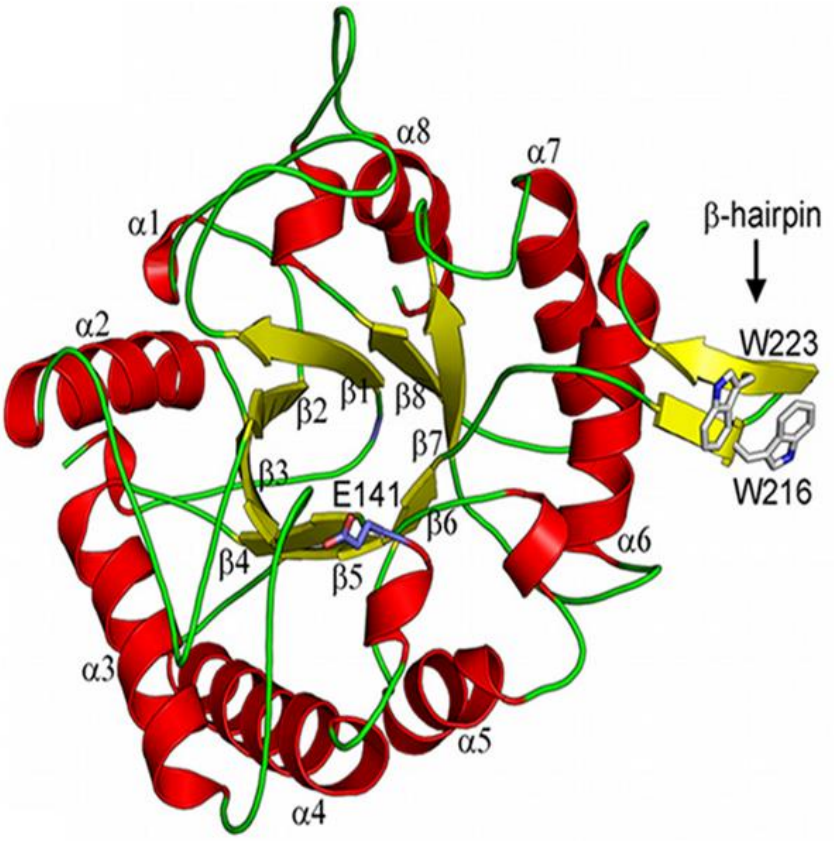
1.6.2 Kitinaser fra *Serratia marcescens*

Serratia marcescens er en gram negativ jordbakterie og tilhører *Enterobacteriaceae* familien (Perrakis, A. *et al.* 1994, Vaaje-Kolstad, G. *et al.* 2013). Det kitinolytiske maskineriet til denne bakterien er et av de mest studerte enzymsystemene for omdannelse av uløselige polysakkarider. *S. marcescens* benyttes derfor som modellsystem for enzymatisk degradering av kitin. Når denne bakterien inkuberes med kitin produseres det tre ulike kitinaser: kitinase A (ChiA), kitinase B (ChiB) og kitinase C (ChiC), et kitinbindende protein CBP21og en kitobiase. ChiA, ChiB og ChiC tilhører familie 18 av glykosyl hydrolasene (GH18). CBP21 er et overflateaktivt enzym som tilhører familien «auxiliary activities family 10» (AA10) og klassifiseres som en lytisk polysakkarid monooksygenase (LPMO). Kitobiasen tilhører familie GH20. Kitobiasen omdanner hovedproduktene av kitinhydrolysen, dimerer til monomerer (Vaaje-Kolstad, G. *et al.* 2013). En skissering av det kitinolytiske maskineriet til *S. marcescens* vises i Figur 9.



Figur 9: Skjematisk fremstilling av det kitinolytiske maskineriet til S. marcescens. ChiA og ChiB, to prosessive enzymer som hydrolyserer i motsatt retning på substratet. Den ikke-prosessive ChiC. Den overflateaktive CBP21 og en kitobiase (Vaaje-Kolstad, G. et al. 2013).

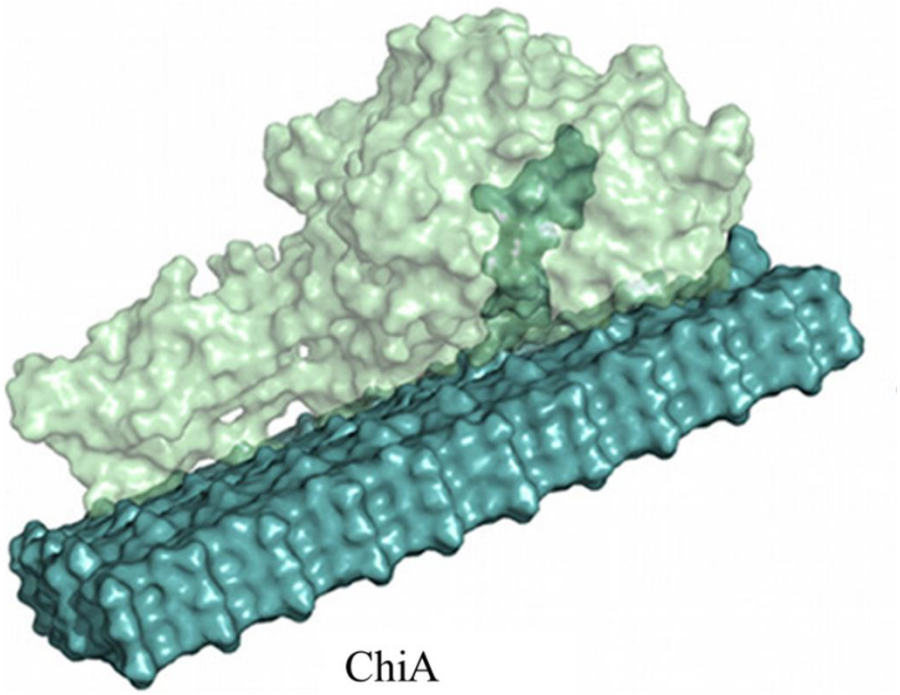
Det katalytiske domenet til familie 18 kitinasene inneholder en konservert $(\beta\alpha)_8$ TIM-tønne struktur som vises i Figur 10 (Aalten, D. M. v. *et al.* 2000, Brurberg, M. B. *et al.* 2000, Payne, C. M. *et al.* 2012). TIM-tønne strukturen er den mest vanlige enzym foldingen i databasen Protein databank (PDB), Denne strukturen består av åtte parallelle β-tråder som er dekket med åtte α-helikser på utsiden. Dette danner en sylinder som kan minne om en tønne (Wierenga, R. K. 2001). Den fjerde β-tråden og α-heliks nummer fire kobles sammen av en loop, på denne loopen er det høyt konserverte DXXDXDXE motivet hvis rolle i den substratassisterte mekanismen er beskrevet overfor. Dette motivet finnes i kitinasene ChiA, ChiB og ChiC. I tillegg til TIM-tønne strukturen har ChiA og ChiB et α/β-domene lokalisert mellom den syvende og åttende β-tråden (Suzuki, K. *et al.* 2002) (Perrakis, A. *et al.* 1994). Dette domenet danner en vegg som skaper en dyp substratbindende kløft hos disse to enzymene. Dette domenet er derimot ikke til stede hos ChiC (Horn, S. J. *et al.* 2006b, Payne, C. M. *et al.* 2012).



Figur 10: Struktur av den konserverte $(\beta\alpha)_8$ TIM-tønne strukturen. Her vist for ChiC hvor den katalytiske syren glutamat er vist i «stick»-formasjon og merket E-141 (Payne, C. M. et al. 2012).

1.6.3 ChiA

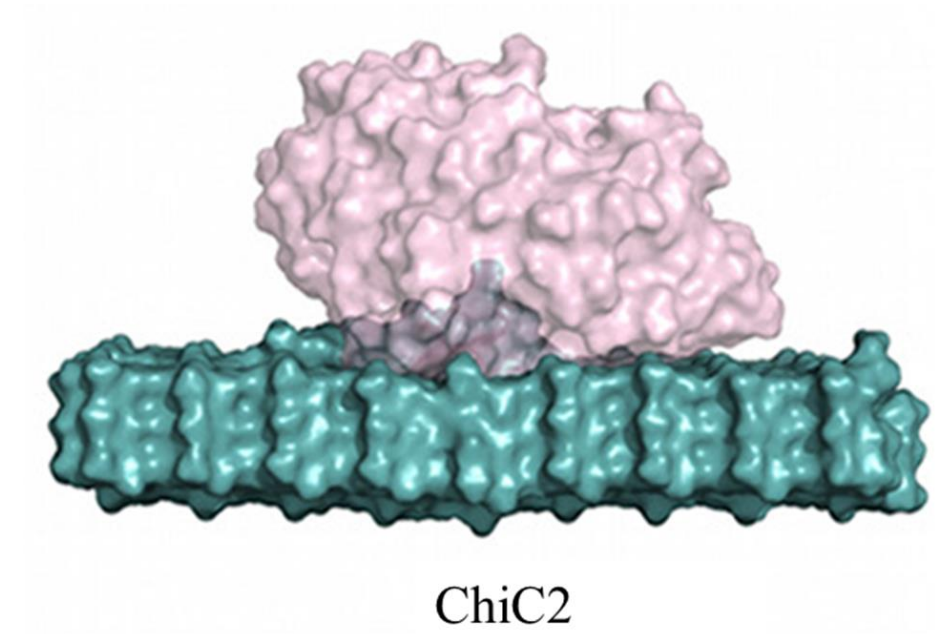
ChiA består av totalt 540 residuer og har en molekylmasse på 58,5kDa. ChiA har en dyp substratbindende kløft, men ingen loop som danner tak over kløften. Den substratbindende kløften er åpen i begge ender og har 6 veldefinerte subseter som strekker seg fra -4 til +2 (Brurberg, M. B. *et al.* 2000). ChiA er et prosessivt exo-enzym som hydrolyserer kitin fra den reduserende enden av kitinkjeden (Sørlie, M. *et al.* 2012). På bakgrunn av den åpne strukturen i den substratbindende kløften kan ChiA også ha noe endo-aktivitet og denne teorien bygges opp under ved at ChiA kan produsere GlcNAc-monomerer ved hydrolyse av kitin (Brurberg, M. B. *et al.* 2000). Ved hydrolyse av kitosan derimot viser ChiA klar endo-aktivitet (Sikorski, P. *et al.* 2006). ChiA har et pH optimum fra pH 4-11. Her opprettholder ChiA 80 % aktivitet. Optimal temperatur for dette enzymet er vist å være 60 °C, temperaturer høyere en dette vil svekke enzymets aktivitet (Suzuki, K. *et al.* 2002). Strukturen til ChiA vises i Figur 11.



Figur 11: Strukturen til ChiA. Figuren viser at enzymet degraderer substratet fra den reduserende enden (Payne, C. M. et al. 2012).

1.6.4 ChiC

Strukturen til ChiC består av et katalytisk domene og to kitinbindende domener. Den substratbindende kløften har en åpen konformasjon, dette kommer av at ChiC mangler α/β-domenet som utgjør en vegg i den substratbindende kløften som beskrevet tidligere. ChiC forekommer ofte i to ulike former. Den ene formen er proteinet i sin helhet og kalles ChiC1. Den andre formen, ChiC2 besår kun av det katalytiske domenet og mangler de to kitinbindende domenene. ChiC1 består av 479 residuer og har en molekylvekt på 51,6kDa, ChiC2 derimot består kun av 325 residuer (Brurberg, M. B. *et al.* 2000, Horn, S. J. *et al.* 2006b). Den substratbindende kløftens åpne struktur gjør det mulig for ChiC å binde seg til substratet på tilfeldige steder og ChiC har derfor endo-aktivitet. ChiC viser høyere aktivitet ved lavere pH verdier enn høye og har et pH optimum på 4-11. Hydrolytisk aktivitet for ChiC har en optimal temperatur på 65-70 °C (Suzuki, K. *et al.* 2002). Figur 12 viser strukturen til ChiC2.



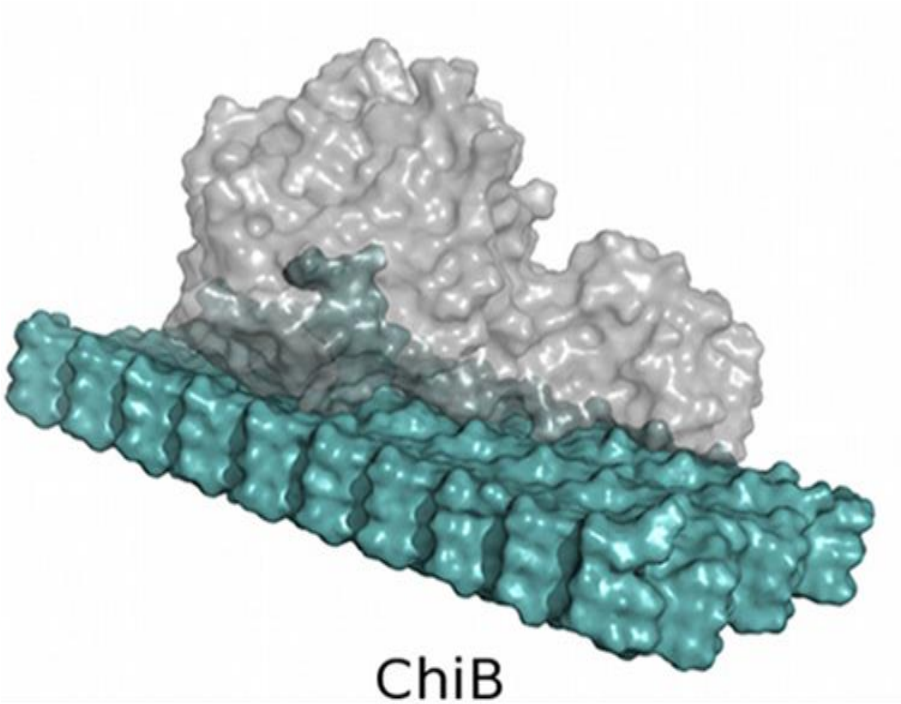
Figur 12: Strukturen til ChiC2 som kun består av et katalytisk domene. ChiC1 har i tillegg to kitinbindende domener (Payne, C. M. et al. 2012).

1.6.5 ChiB

ChiB består av et katalytisk domene, en «linker» og et kitinbindende domene (Aalten, D. M. v. *et al.* 2000). Enzymet er bygget opp av 498 residuer og har en molekylmasse på 55,4 kDa (Brurberg, M. B. *et al.* 2000). Det katalytiske domenet i ChiB inneholder den konserverte TIM-tønne strukturen og et tett assosiert α/β-domene som danner en fleksibel loop nær det aktive setet. Det katalytiske domenet er formet av en lang, dyp kløft bestående av flere hydrofobe residuer og et katalytisk residu. Det katalytiske residuet er plassert i subsete +1 og er lokalisert ved enden av den fjerde β-tråden i TIM-tønne strukturen (Aalten, D. M. v. *et al.* 2000). Her finner man det konserverte DXXDXDXE motivet, hvor Glu-144 utgjør den katalytiske syren (Brurberg, M. B. *et al.* 2000). Asp-142, Asp-140 og Asp-137 er også residuer som inngår i dette konserverte motivet (Aalten, D. M. v. *et al.* 2000).

Den substratbindende kløften i ChiB har en loop som dekker over kløften, dette gir en karakteristisk tunnel-topologi som er typisk for enzymer med ekso-aktivitet. ChiB har i tillegg et veldefinert kitinbindende domene som er koblet til det katalytiske domenet av en «linker». Denne linkeren starter ved TIM-tønnens siste α-heliks og strekker seg til det første residuet i det kitinbindende domenet. Det kitinbindende domenet er bygget opp av tre parallelle β-tråder og har en rekke aromatiske residuer som strekker seg langs dette domenet og frem til det aktive setet (Aalten, D. M. v. *et al.* 2000). Som beskrevet tidligere er aromatiske residuer gunstig for binding av substrat i forhold til prosessivitet. Disse aromatiske residuene og den dype substratkløften er derfor typisk for prosessive enzymer. ChiB er et prosessivt enzym som degraderer kitin fra den ikke-reduserende enden av substratet (Sørlie, M. *et al.* 2012), og omtales som et «ekte» exo-enzym.

Ved subsete -3, nær enden av den substratbindende kløften har ChiB en «poorch loop», denne loopen skaper er hindring slik at binding av substrat ikke kan strekke seg lenger enn subsete -3. Dette forklarer hvorfor ChiB degraderer kitin fra den ikke-reduserende enden (Aalten, D. M. v. *et al.* 2000). ChiB har klar exo-aktivitet mot det uløselige substratet kitin, men ved degradering av kitosan er det observert at ChiB har endo-aktivitet (Sikorski, P. *et al.* 2006). ChiB har en optimumstemperatur for hydrolyse på 60 °C og et pH optimum som strekker seg fra 4-11. ChiB har allikevel vist å ha maksimal aktivitet ved en pH på 6,0 (Suzuki, K. *et al.* 2002). Strukturen av ChiB er vist under i Figur 13.

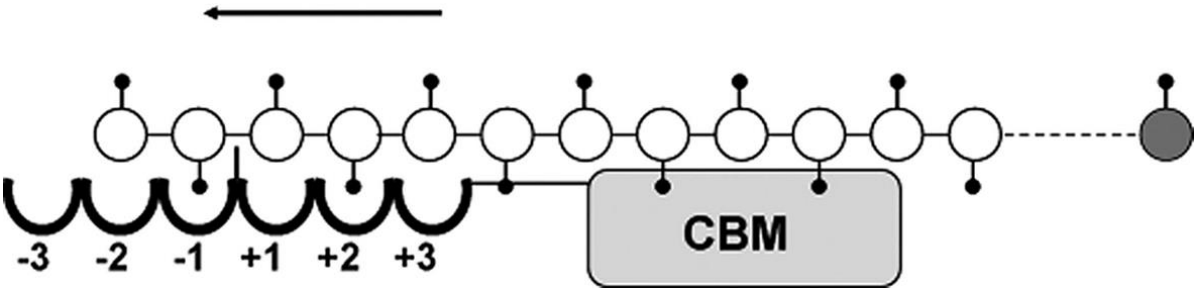


Figur 13: Struktur av ChiB. Figuren viser at enzymet degraderer substratet fra enden og dermed har exo-aktivitet (Payne, C. M. et al. 2012).

1.6.6 Prosessivitet hos kitinaser

Det er observert prosessivitet for ChiA og ChiB fra *S. Marcescens*, ChiC derimot viser ingen prosessiv aktivitet (Horn, S. J. *et al.* 2006b). Det er vist at ChiA i gjennomsnitt utfører 9,1 kutt for hver substrat-enzym assosiasjon, ChiB er vist å utføre 3,4 kutt i gjennomsnitt (Sikorski, P. *et al.* 2006). Videre er det vist at aromatiske residuer på substratsiden hos både ChiA og ChiB bidrar til enzymenes prosessive egenskap og ikke direkte på konformasjonsendringen til sukkeret i +1. Dette vil være residuer i «minussubseter» for ChiA og i «plusssubseter» for ChiB. Som tidligere beskrevet er prosessivitet karakterisert som enzymets evne til å forbli bundet til substratet mellom påfølgende hydrolytiske kutt. Ved prosessiv hydrolyse vil den initielle bindingen til substratet gi et partalls- eller oddetalls produkt. ChiB vil kunne binde substrat frem til subsete -3 og vil da gi en trimer eller dimer som første hydrolytiske produkt. Videre hydrolytiske kutt vil deretter kun gi dimerer. Dette forklares ved at den substratassisterte mekanismen til kitinaser krever en acetylgruppe i subsete -1. Ettersom sukkerenhetene i kitin er rotert 180 ° i forhold til hverandre, vil kun annenhver sukkerenhet gi

produktiv binding. Dette er illustrert i Figur 14 (Horn, S. J. *et al.* 2006a). Ved degradering av kitosan, vil en deacetylert enhet i -1 subsetet ikke gi produktiv binding. Enzymet vil da forflytte substratet to enheter og slik vil det fortsette til en produktiv binding oppnås. Degraderingsforsøk av kitosan kan derfor benyttes til å påvise prosessivitet. For prosessive enzymer vil da polymerene forsvinne sakte, og de initielle produktene i reaksjonen vil bestå av partalls oligomerer med en kjedelengde på 2-12 enheter. For ikke-prosessive enzymer derimot, vil polymerene forsvinne raskt og distribusjonen av partalls- og oddetalls oligomerer vil være tilfeldig (Horn, S. J. *et al.* 2006b).



Figur 14: Viser ChiB bundet til en kitinkjede. Her vises det hvordan sukkerenhetene i kitin er rotert 180 ° i forhold til hverandre. Videre illustreres det hvorfor en produktiv binding kun oppnås hver andre enhet når substratet forflyttes i pilens retning. CBM er det kitinbindende domenet i ChiB (Horn, S. J. et al. 2006a).

I denne oppgaven er det utført prosessivitetsanalyser på β-kitin og dets vannløselige derivat kitosan. Det ble benyttet kitin med størrelsen 3 µm og kitosan med grad av acetylering på F_A= 0,65.

1.7 Seterettet Mutagenese

DNA kopieres under organismers reproduksjon og i enkelte tilfeller kan det oppstå feil som fører til en endring i DNA sekvensen. Disse feilene kan oppstå under kopieringen, som et resultat av kjemiske mutagener eller fra stråling. Disse endringene kalles mutasjoner. Det finnes to typer mutasjoner, utbytting av DNA baser og delesjon eller insersjon av DNA baser i et gen (Mathews, C. K. *et al.* 2000).

Mutasjoner kan også oppnås ved bruk av ulike metoder. Nukleotidsekvensen av et klonet DNA fragment kan endres ved bruk av seterettet mutagenese. Det benyttes i denne metoden syntetiske oligonukleotider. En vanlig tilnærming er å benytte oligonukleotider som er komplementære til deler av templat DNAet, men som inneholder en mismatch slik at ønsket mutasjon oppnås. Det kan konstrueres multiple mutasjoner, insersjoner og delesjoner (Carter, P. 1986).

Seterettet mutagenese er ofte benyttet til å studere enzymers mekanisme og for identifikasjon av ulike regioner i store proteiner. Ved å endre proteiners struktur ved hjelp av seterettet mutagenese kan det avgjøres om denne endringen i struktur henger sammen med proteinets biologiske funksjon (Mathews, C. K. *et al.* 2000). *In vitro* seterettet mutagenese er i dag en ofte benyttet teknikk. Dette er en teknikk som tillater studier av forholdet mellom proteinstruktur og funksjon, studier av genekspresjon og modifisering av vektorer (Technologies, A. 2013).

1.8 Mål med oppgaven

ChiB er en kitinase som degraderer kitin prosessivt. Det er tidligere vist at aromatiske residuer bidrar til enzymers prosessivitet (Sørlie, M. *et al.* 2012). Det antas videre at noen av de polare residuene i det aktive setet i ChiB også bidrar til enzymets prosessivitet ved deres sterke interaksjoner med substratet under hydrolyse. Hovedmålet med denne oppgaven har derfor vært å studere hvilken effekt utvalgte polare residuer, posisjonert i det aktive setet hos ChiB har på prosessivitet, aktivitet, effektivitet og substratposisjonering.

Seterettet mutagenese ble benyttet til å mutere tre ulike polare residuer og deretter ble grad av prossesivitet mot 3 µm β-kitin og kitosan med F_A= 0,65 undersøkt. Det ble også utført analyser for å bestemme subsetepreferanser hos de ulike mutantene under hydrolyse av kitosan. Alle resultater ble deretter sammenliknet opp mot resultater for ChiB villtypen.

Forsøk ble utført på ChiB mutantene Y145F, E221A og R294A. Mutantene Y145A, R294Q, E144Q ble også laget i tillegg til to inaktive mutanter R294Q/E144Q og Y145A/E144Q.

2 Materialer

2.1 Laboratorieutstyr og instrumenter

2.1.1 Laboratorieutstyr

Laboratorieutstyr	Spesifikasjon	Leverandør
Amiconrør	Ultra-15, 10 kDa	Millipore
	Ultra-4, 10 kDa	″
	Ultracel-30 kDa	″
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	Greiner Bio-One
	15 ml	″
	50 ml	″
Blåkorkflasker	1000 ml	VWR
	500 ml	″
	250 ml	″
	100 ml	″
	50 ml	″
C-18 kolonne	sampliQ C-18- EC	Agilent technologies
Cryorør	2 ml	Starsted
Dialysemembran	Vol/lengde: 2,0 ml/cm	Spectrum Lab, Inc.
	Vol/lengde: 8,0 ml/cm	″
Dyrkningkolber	2 L	BD Falcon
Elektroforeseutstyr	Gelkjøringskammer	Invitrogen
	Gelspenningskilde	VWR
	Gelkniv	Nisahu

Eppendorfrør	1,5 ml	Axygen
	2,0 ml	″
Filter	0,22 µm	Millipore
	Ultracell®, 10 kDa	″
	Steritopp 0,22 µm	″
	Whatmanfilter 1,2 mm	″
	Membranfilter 0,8 µm	″
	0,45 µm hydrophilic low protein binding	Multiscreen
Fluorometer	DyNA Quant 200	Hoefer
Fotoutstyr (gel)	Gelfotosystem GSF 1000	Bio-RAD Laboratories
	Lyskilde	Kilab AS
	UV transuliminator	UVP, inc.
Frysetørker	Maxi Dry, SPD111V	Savant Speed Vac
GATC Bokser	”For å sende og pakke dine DNA prøver”	GATC Biotech AG
Glassutstyr		Schott-Duran
HPLC	Ultimate 3000 system	Dionex
	Autoinjektor	″
	Detektor	″
	UV/VIS detektor	″
	Rør og vials	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
Konduktivitetsmåler	TetraCon 96-Electrode	WTW
Magnetrører	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	Greiner
	15 ml	″
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	Infors
	Multitron Eco	″
SEC	HiLoad pumpe P-50	GE healthcare
	133 Refractive Index Detector	Gilson
	Superfrac	Pharmacia
SEC-kolonner	HiLoad 26/60Superdex, Prepgrade	GE healthcare
Sentrifuge	Avanti™ J-25	Beckman
	SORVALL® RC 6	ONEMED
	Sentrifuge- 5430 R	Eppendorf
Sentrifugerotor	JA-10	Beckman
	SLA 3000	ONEMED
	5430/5430 R	Eppendorf
Sentrifugerør	500 ml	Nalgene
Sonikator	Transonic 460/H	ELMA
Sprøyter	1 ml	BD plastipak
	2 ml	″
	50 ml	″
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

2.1.2 Programvare til dataanalyse

Instrument	Programvare	Leverandør
HPLC	Chromeleon	Dionex
MS	FlexAnalysis 2.4 FlexControl 2.4	Bruker Daltonics
NMR	Bruker TOPSPIN 3.1	Bruker Daltonics
PC (sekvensering)	CLC DNA Workbench 6	CLCbio
SEC	Advantec Adamview	KGS systemer
Spektrofotometer	Nano Drop 1000 3.3	Thermo Scientific
Gelfotosystem	Epi White	

2.2 Kjemikalier

Kjemikalie	Leverandør
2,5-Dihydroxybezoic acid, $(HO)_2C_6H_3CO_2H$	Bruker Daltonics
4-methylumbelliferone, $C_{10}H_8O_3$	Sigma-Aldrich
4-methylumbelliferyl-D-N,N'-diacetylchitobiose, $C_{42}H_{60}N_4O_{23}$	Sigma-Aldrich
Acetone, CH_3COCH_3	Sigma-Aldrich
Acetonitril, CH_3CN	Sigma-Aldrich
Agar, Bacto-agar	Merck
Ammoniumacetat, NH_4CH_3COO	Merck
Ammoniumsulfat, $(NH_4)_2SO_4$	Life-Science
Amoicillin, $C_{16}H_{19}N_3O_4S$	Sigma-Aldrich
Bacto™ Tryptone	BD
Bacto™ Yeast extract	BD
Benchmark ladder	Invitro
Bovine serum albumin (BSA)	Biolabs inc.
Chitin Beads	Biolabs Inc.
Coomassie® Briliant Blue R-250 Farge Reagent, $C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$	Bio-Rad
Destillert vann, dH_2O (Milli-Q kvalitet)	
Deuteriumklorid, DCl	Sigma-Aldrich
Deuteriumoksid, D_2O	Sigma-Aldrich
Dibasisk Natriumhydrogenfosfat, NaH_2PO_4	Sigma-Aldrich
Eddiksyre, CH_3COOH	Sigma-Aldrich
Etanol, C_2H_5OH	VWR
Etanolamin, C_2H_7NO	Sigma-Aldrich
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), $C_{10}H_{16}N_2O_8$	Sigma-Aldrich
Glyserol, $C_3H_5O_3$	Merck
Helium 6.0 Utraplus, He	Yara Industrial AS
Hydrogenklorid, HCl	Sigma-Aldrich
Isopropanol, C_3H_8O	Merk
Kaliumhydroksid, KOH	Merk
Magnesiumklorid, $MgCl_2$	VWR

Metanol, $CH_3 3OH$ (high quality)	Sigma-Aldrich
Monobasisk Natriumhydrogenfosfat, $NaHPO_4$	Sigma-Aldrich
MOPS SDS Runningbuffer	Invitrogen
Natriumcyanoborhydrid 95%, CH_3BNNa	Sigma-Aldrich
Natriumdeuteriumoksid, NaOD	Sigma-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), $C_7H_7FO_2S$	Sigma-Aldrich
Plasmid mini kit 1	VWR
Sitronsyre, $C_6H_8O_7$	VWR
Trizma base, $C_4H_{11}NO_3$	Sigma-Aldrich
β-kitin 3µm	Seikagaku corporationen

2.3 Proteiner og substrater

Protein/Substrat	**Spesifikasjoner**	**Leverandør**
Kitin	β-Kitin, 3 µm	Seikagaku corporation
Kitinase	*Kitinase B(ChiB)* Villtype + aktuelle mutanter	Selvlaget
Kitosan	F_A=0,65	
Purified Bovine Serum Albumin (BSA) 100 x, 10 mg/mL		New England Biolabs

2.4 Medier

2.4.1 Selvlagede medier

Medie	Innhold
LB-medium med agar	Trypton 10 g Gjærekstrakt 5 g NaCl 10 g Agar 15 g Løses i dH_2O opp til 1 L pH > 7.0. Justeres med NaOH Ampicillin tilsettes til en konsentrasjon på 100 µg/mL
LB-medium uten agar	Trypton 10 g Gjærekstrakt 5 g NaCl 10 g Løses i dH_2O opp til 1 L pH > 7.0. Justeres med NaOH Ampicillin tilsettes til en konsentrasjon på 50 µg/mL

2.4.2 Ferdige medier

Medie	Innhold
SOC – medie	Vol 1L - 2 % Tryptone - 0,5 % yeast extract - 10 mM NaCl - 2,5 mM KCl - 10 mM $MgCl_2$ - 10 mM $MgSO_4$ - 20 mM glukose

2.5 Celler

Stamme	Spesifikasjon	Bruk	Leverandør
Escheria coli (E.Coli)	Top10 superkompetente celler	Høy transformasjonseffektivitet	Invitrogen
Escheria coli (E.Coli)	One Shot® BL21 Star (DE3)	Ekspresjon	Invitrogen

2.6 Kit

Kit	Innehold	Leverandør
E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I	- 2 mL Oppsamlingsrør - DNA Vaske Buffer - Elueringsbuffer - Ekvilibreringsbuffer (Natrium Hydroxid) - HB Buffer (Guanidin HCl, isopropanol) - HiBind™ DNA Mini Kolonner - Solution I/RNAase - Solution II (Natrium Hydoxid) - Solution III (Guanidin HCl, Eddiksyre)	Omega BIO-TEK
Pellet paint kit	- 0,3 M NaAc pH: 5,2 - Pellet paint® Co-Precipitant	Novagen
QuikChange II Site Directed Mutagenesis Kit	- 10x reaksjonsbuffer - dNTP miks - *DpnI* restriksjons enzym - Oligonucleotide kontroll primer 1 - Oligonucleotide kontroll primer 2 - PfuUltra HF DNA polymerase - pWhitescript 4.5 kb kontroll plasmid	Stratagene

2.7 Buffere og løsninger

Buffer/Løsning	Innhold
Spheroplastbuffer	100 mL 1M tris pH:8,0 171 g sukrose 1 mL 0,5M EDTA pH:8,0 2 mL PMFS Fortynn til 1 L med dH_2O
Fargeløsning SDS-Page	0,25 g Comassie Brilliant Blue R250 125 mL Metanol 25 mL 100 % Eddiksyre 100 mL dH_2O
Avfargingsløsning SDS-Page	50 mL Metanol 50 mL 100 % Eddiksyre 400 mL dH_2O
Nedbrytningsbuffer Kitosan pH 5,5	0,008 mM NatriumAcetat 0,2M NaCl
Citrat-fosfat buffer pH 5,2	23,3 mL 0,1 M Sitronsyre 26,7 mL 0,2 M Natriumfosfat Fortynn til 100 mL med dH_2O
Natriumkarbonat buffer	2,12 g Na_2CO_3 løses i 100 mL dH_2O
Buffer A: kitinkuler 0,1M Natriumfosfatbuffer pH 6.3	155 mL 0,2 M NaH_2PO_4 45 mL 0,2 M Na_2HPO_4 Fortynn til 400 mL med dH_2O
Buffer B: kitinkuler	20 mM Eddiksyre
2,5-dihydroxybenzoic acid	15 mg/mL DHB i 30 % Etanol
NatriumAcetat buffer pH 6.1	50 mM NaAc
HPLC standarder	(GlcNAc) + $(GlcNAc)_2$ Konsentrasjoner: 100 µM, 200 µM, 400 µM.

3 Metoder

3.1 Design av ny mutant

Tidligere forskning viser at residuer i positive subseter i ChiB er viktige for den prosessive aktiviteten, men disse er ikke direkte viktig for konformasjonsendringen av +1 sukkerringen. Videre viser molekylærdynamiske simuleringer at residuene Y145, E221 og R294 binder sterkt til substratet, disse er plassert i positive subseter, hhv i subsetene +1, +3 og +1. På bakgrunn av dette ble disse residuene valgt ut til karakteriseringsstudiene i denne oppgaven.

For å studere disse resisuenes effekt på prosessivitet, aktivitet og effektiviet ble alle residuene mutert til alanin (A). Dette er en vanlig metode for å fjerne funksjonalitet hos ulike residuer. Mutantene R294Q og Y145F ble også tillaget da disse mutasjonene er mer konservative. Disse kunne da benyttes om alanin-mutantene ikke ga uttrykkbart protein. I tillegg til disse mutantene ble doble inaktive mutanter tillaget. Disse inaktive mutantene benyttes til å måle de ulike residuenes bindingsstyrke til substratet.

Av mutantene som ble valgt ut var noen allerede laget, og noen måtte tillages. En oversikt over de ulike mutantene og hvem som laget de vises i Tabell 1.

Tabell 1: Oversikt over mutanter brukt i denne oppgaven

Mutant	Laget av
E114Q	Silje Benedicte Lorentzen
E221A	Kjersti G Lundquist
R294A	Kjersti G Lundquist
R294Q	Silje Benedicte Lorentzen
R294Q/E144Q	Silje Benedicte Lorentzen
Y145A	Silje Benedicte Lorentzen
Y145A/E144Q	Silje Benedicte Lorentzen
Y145F	Kjersti G Lundquist

3.1.1 Primer design

For å oppnå de ønskede mutasjonene på ChiB villtype plasmidet måtte det benyttes to primere med rett og komplementær sekvens. Ved design av primere ble QuikChange Primer Design brukt, et program tilgjengelig på nettsidene til Agilent technologies (Technologies, A. 2005). Design og bestilling av primere ble utført av stipendiat Anne Grethe Hamre. Ved design av primere har det blitt tatt hensyn til en rekke forhold. Primerne som benyttes er komplementere og begge må inneholde ønsket mutasjon. Primerens lengde bør være på 25-45 baser, og smeltetemperaturen bør være 78 °C eller høyere. Dette er cirka 10 °C høyere enn fusjonstemperaturen som benyttes i PCR reaksjonen. I tillegg bør mutasjonen ha 10-15 baser på hver side i primeren. For optimal funksjon bør GC innholdet være minimum 40 %. Primerne ble bestilt fra Life Technologies. Primerne som ble benyttet vises i Tabell 2.

Tabell 2: Primere som ble benyttet i seterettet mutagenese for de aktuelle mutantene som skulle lages

Mutant	Templat	Primer	
Y145A	ChiB WT	Forward	5'-catcgactgggaggccccgcaagcggcg-3'
		Reverse	5'-cgccgcttgcggggcctcccagtcgatg-3'
E144Q	ChiB WT	Forward	5'-ggacatcgactggcagtacccgcaagc-3'
		Reverse	5'-gcttgcgggtactgccagtcgatgtcc-3'
R294Q	ChiB WT	Forward	5'-gcccttctatggccaggccttcaagggcgt-3'
		Reverse	5'-acgcccttgaaggcctggccatagaagggc-3'
R294Q/E144Q	E144Q	Forward	5'-gcccttctatggccaggccttcaagggcgt-3'
		Reverse	5'-acgcccttgaaggcctggccatagaagggc-3'
Y145A/E144Q	E144Q	Forward	5'-catcgactgggaggccccgcaagcggcg-3'
		Reverse	5'-cgccgcttgcggggcctcccagtcgatg-3'
E221A/E144Q	E144Q	Forward	5'-gccggcccctgggcgaaggtaaccaac-3'
		Reverse	5'-gttggttaccttcgcccaggggccggc-3'

3.1.2 Oppdyrking av bakteriestamme

I forkant av seterettet mutagenese var det nødvendig å dyrke *E.coli* celler som inneholdt ChiB villtype plasmid. Dette plasmidet skulle videre benyttes som templat som beskrevet i avsnitt 3.1.5.

Materialer

- LB medium
- Ampicillin 50 mg/mL
- -80 °C Frysestock av aktuell bakteriestamme

Metode

5 mL LB medium og 5 µL ampicillin ble inokulert med celler fra -80 °C frysestock. Bakteriekulturen ble dyrket ved 37 °C og 220 rpm over natt (~16 timer).

3.1.3 Isolering av plasmid fra *E.coli* cellekultur

ChiB villtype plasmidet var nødvendig å isolere før seterette mutagenese. Plasmidet ble isolert ved bruk av E.Z.NA™ Plasmid DNA Mini Kit I Spin Protocol som beskrevet under.

Materialer

- E.Z.NA™ Plasmid DNA Mini Kit I Spin Protocol
- Cellekultur av ønsket bakteriestamme

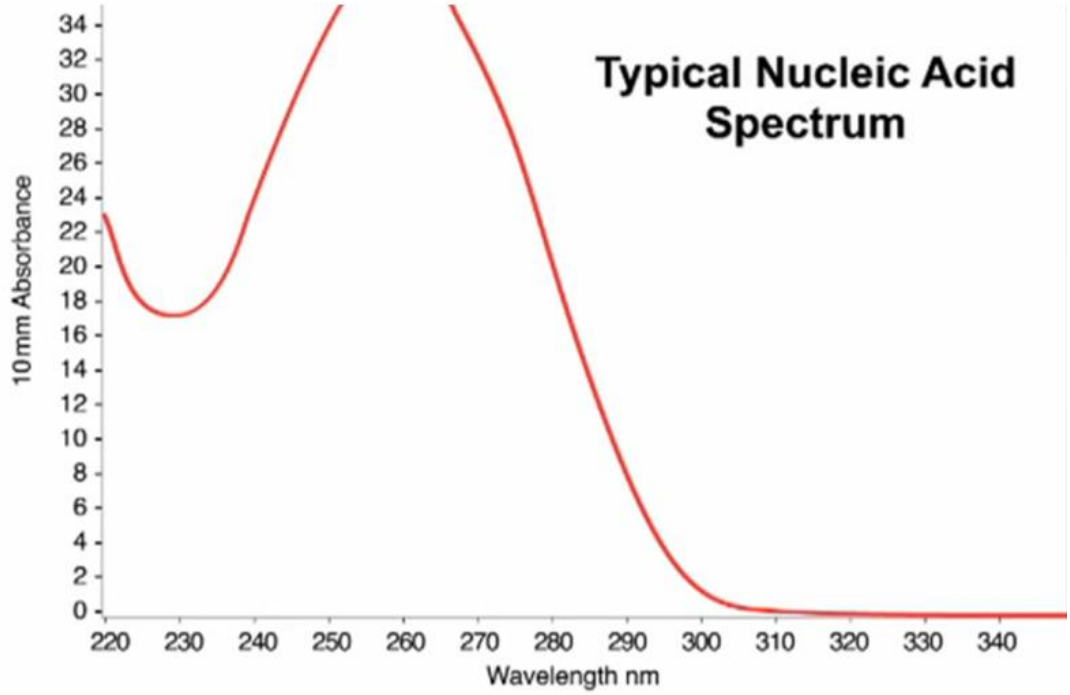
Metode

1,5 mL cellekultur ble overført til et eppendorfrør og spunnet ned i 1 minutt ved 10 000 x g. Cellepelleten ble videre resuspendert i 250 µL Solution 1/RNAase A. Det ble så tilsatt 250 µL solution II. Løsningen ble blandet forsiktig ved å snu eppendorfrøret opp og ned til det ble dannet et klart lysat. 350 µL solution III ble tilsatt og umiddelbart blandet. Det ble dannet en hvit utfelling. Løsningen ble spunnet ned i 10 minutter ved 13 000 x g og den klare supernatanten ble overført til en HiBind® DNA mini kolonne og sentrifugert i 1 minutt ved 13 000 x g. Denne kolonnen ble i forkant ekvilibrert med 100 µL ekvilibrasjonsbuffer og sentrifugert ved 13 000 x g i 1 minutt. For å vaske kolonnen ble det tilsatt 500 µL HB buffer. Dette ble sentrifugert i 1 minutt ved 13 000 x g. Videre ble 700 µL DNA Wash Buffer tilsatt og dette ble også sentrifugert i 1 minutt ved 13 000 x g.

Kolonnematriksen ble så igjen sentrifugert i 2 minutter, dette for å tørke kolonnematriksen. Kolonnen ble avslutningsvis satt i et rent eppendorfrør og 30 µL Elution buffer ble tilsatt før dette ble sentrifugert for siste gang i 1 minutt ved 13 00 x g. Renset plasmid ble oppbevart i fryser ved – 20 °C.

3.1.4 Måling av plasmidkonsentrasjon

Etter isolering av plasmid er det nødvendig å vite plasmidets konsentrasjon. Konsentrasjonen ble målt ved bruk av NanoDrop 1000. Denne analysen måler konsentrasjon av nukleinsyre med et lineært område fra 2 – 3700 ng/µL. Programvaren beregner nukleinsyrekonsentrasjonen ut ifra det spektrofotometriske signalet og oppgir et spekter for hver måling. Om kurven i spekteret er slik som vist i Figur 15 forteller dette i tillegg at plasmidet er rent. Ved urent plasmid vil kurven avvike i fasong.



Figur 15: Viser spekter av plasmid målt på NanoDrop 1000.

Materialer

- ND1000 Spektrofotometer
- Renset ChiB plasmid
- Elution Buffer (E.Z.NA™ Plasmid DNA Mini Kit I Spin Protocol)

Metode

2 µL dH_2O ble brukt til å vaske poden samt for å nullstille instrumentet. Kalibrering ble foretatt med 2 µL Elution buffer. Til slutt ble 2 µL renset plasmid applisert og plasmidkonsentrasjonen ble lest av i ng/mL.

3.1.5 Seterettet mutagenese

Ved hjelp av seterettet mutagenese ble ønskede punktmutasjoner i ChiB villtype plasmidet oppnådd. Det ble benyttet et QuickChange® Site-Direct Mutagenesis Kit fra Stratagene, og protokollen ble fulgt med noen modifikasjoner. Det ble benyttet TOP-10 superkompetente *E.coli* celler i stedet for XL-1 superkompetente *E.coli* celler som følger med kittet. Dette fordi TOP-10 cellene har høyere transformasjonseffektivitet. Ved bruk at QuickChange® Site-Direct Mutagenesis Kit kan punktmutasjoner og utbytting av aminosyrer oppnås. Denne prosedyren benytter en dobbeltrådet DNA-vektor med genet som skal studeres satt inn og to syntetiske oligonukleotidprimere som inneholder ønsket mutasjon. Primerene forlenges under temperatur syklusene av *PfuUltra* HF DNA polymerasen. Ved bruk av polymerase kjede reaksjon (PCR). Resultatet av denne forlengelsen av primerene er et mutert plasmid som inneholder «nicks». Videre etter PCR-reaksjonen behandles PCR-prøvene med *Dpn I*, en endonuklease som kutter ikke-mutert plasmid og foreldre DNA templat. Dette gjøres ved at *Dpn I* gjenkjenner metylerte og hemimetylerte grupper i DNA (Technologies, A. 2013).

Materialer

- 10x reaksjonsbuffer
- pWhitescript 4.5 kb control plasmid
- oligonucleotide kontrollprimer 1
- oligonucleotide kontrollprimer 2
- dNTP mix
- *PfuUltra* HF DNA polymerase
- ChiB dsDNA templat
- ChiB primere (forward og reverse)
- dH_2O

For oversikt over primere og templat brukt for de ulike mutantene se Tabell 2.

Metode

En kontrollreaksjon ble laget og reagentene ble tilsatt i gitt rekkefølge.

Reagent	**Mengde**
10 x reaksjonsbuffer	5 µL
pWhitescript 4,5 kb control plasmid	2 µL
oligonukleotid kontroll primer 1	1,25 µL
oligonukleotid kontroll primer 2	1,25 µL
dNTP miks	1 µL
ddH_2O	38,5 µL
PfuUltra HF DNA polymerase	1 µL
Totalt	**51 µL**

For hver PCR-reaksjon ble følgende reagenser tilsatt i gitt rekkefølge

Reagent	**Mengde**
10 x reaksjonsbuffer	5 µL
ChiB dsDNA templat	75 – 100 ng
Ønsket ChiB primer «forward»	1,25 µL
Ønsket ChiB primer «reverse»	1,25 µL
dNTP miks	1 µL
ddH_2O	Til totalvolum på 50 µL
PfuUltra HF DNA polymerase	1 µL
Totalt	**51 µL**

Reaksjonene ble laget i PCR rør som ble holdt på is under hele tillagingen.

3.1.6 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) er en metode der DNA fragmenter amplifiseres. PCR reaksjonen kan deles i tre trinn. Først denatureres DNAet ved høy temperatur. Deretter senkes temperaturen slik at primerene kan binde seg til DNA trådene. Disse primerene er komplementære til den denaturerte DNA tråden. I det siste trinnet syntetiseres nye DNA fragmenter ved at polymerasen fester seg til primerene og forlenger DNA trådene. Det utføres 25-35 sykluser som gir en eksponentiell amplifisering av DNA fragmentene. Tabell 3 viser reaksjonssyklussene som ble benyttet.

Tabell 3: Oversikt over reaksjonssyklus for PCR

Reaksjonsfase	**Antall sykluser**	**Temperatur °C**	**Tid (sek)**
Initiell denaturering	1	95	30
Denaturering	18	95	30
Annealing	18	55	60
Ekstensjon	18	68	5,5 minutt
Nedkjøling	1	10	-

Etter endt PCR ble 1 µL *Dpn I* tilsatt hver PCR reaksjon. Løsningene ble videre spunnet ned i 1 minutt og deretter inkubert i 1 time ved 37 °C for å kutte ikke-mutert DNA templat.

3.1.7 Utfelling av plasmid

Etter endt PCR reaksjon ble plasmidet oppkonsentrert ved bruk av Pellet Paint® Co-Precipitant Kit fra Novagen. Plasmidet oppkonsentreres ved at fargemerket plasmid felles ut til en synlig rosa pellet. Dette gjør det lett å følge alle vaskesteg, samt forsikre at intet plasmid går tapt. Det er lønnsomt å utføre dette rensesteget etter PCR for å fjerne primere og andre reaktanter fra løsningen samtidig som plasmidet oppkonsentreres. Ved bruk av Pellet Paint® Co-Precipitant kittet vil primere mindre enn 50 nt i lengde fjernes (Millipore 2013a).

Materialer

- Pellet Paint® Co-Precipitant Kit
- EtOH
- dH_2O
- *Dpn I* behandlet DNA

Metode

Det *Dpn I* behandlede DNAet ble etter endt inkubering overført til et eppendorfrør. 2 µL Pellet paint og 0,1 volum 3M NaAc ble tilsatt det *Dpn I* behandlede DNAet og blandet forsiktig. Videre ble 2 volum EtOH tilsatt og blandingen ble blandet kort ved bruk av vortex. Blandingen ble inkubert ved romtemperatur i 2 minutter, før den ble sentrifugert i 5 minutter ved 16 000 x g. Etter endt sentrifugering ble supernatanten fjernet forsiktig. Pelleten ble renset med flere volum 70 % EtOH og deretter ble sentrifugeringssteget gjentatt. Supernatanten ble igjen fjernet og pelleten ble renset med flere volum EtOH før et siste sentrifugeringssteg ble utført. Etter endt sentrifugering, ble supernatanten fjernet og reaksjonen ble inkubert i romtemperatur til all EtOH var fordampet. Avslutningsvis ble pelleten resuspendert i 5 µL dH_2O.

3.1.8 Transformering av plasmid inn i TOP-10 superkompetente *E.coli* celler.

Etter oppkonsentrering av DNA med Pellet Paint® Co-Precipitant Kit ble DNAet transformert inn i TOP-10 superkompetente *E.coli* celler. Disse kompetente cellene er i stand til å ta opp fremmed plasmid ved transformering og er celler som gir høy transformasjonseffektivitet. Transformantene vil innholde en vektor med det muterte plasmidet. Vektoren inneholder også antibiotika resistens. Transformantene dyrkes derfor på agarskåler med ampicillin for å sikre at kun transformantene dyrkes opp.

Materialer

- TOP-10 superkompetente *E.coli* celler
- Oppkonsentrert DNA
- SOC-medium
- LB-agarplater

Metode

Rør med TOP-10 superkompetente celler ble tint forsiktig på is. 5 µL av det oppkonsentrerte DNAet ble tilsatt et rør med TOP-10 superkompetente *E.coli* celler. Dette ble blandet forsiktig og inkubert på is i 30 minutter. Cellene ble så utsatt for et varmesjokk ved 42 °C i 30 sekunder før de deretter ble inkubert 2 minutter på is. 250 µL forvarmet SOC-medium ble så tilsatt før cellene ble satt til inkubasjon i 1 time ved 37 °C og 220 rpm. Etter endt inkubasjon ble cellene platet ut på LB-agarplater med en ampiccillin konsentrasjon på 100 µg/ml. Agarplatene ble plassert til inkubasjon over natten ved 37 °C.

3.1.9 Isolering av mutert plasmid

Transformanter på agarskålene ble dyrket over natt slik som beskrevet i avsnitt 3.1.8. Mutert plasmid ble så isolert på samme måte som beskrevet i 3.1.3.

3.1.10 Sekvensering

For kontroll av seterettet mutagenese ble mutert plasmid sendt til GATC Biotech i Constance, Tyskland for sekvensering. Sekvensering av DNA er en metode der nukleotidsekvensen til det muterte plasmidet gjøres rede for. For kontroll av mutagenesen blir sekvensen til det muterte plasmidet sammenliknet med villtype plasmidet. Sekvensene skal da være like, sett bort fra nukleotidene som er endret for den nye mutasjonen. Programvaren *CLC DNA Workbench* ble brukt for å analysere DNA sekvensene.

Tabell 4: Primere brukt til sekvensering

Primer navn	Sekvens
ChiB_seq_fw1_537	TGAAGGATTA CGGCTTCGAC
ChiB_seq_rev2_1568	CCAGACGTAGCCTTGGTAGG
SP6	ATTAGGTGACACTATAG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG

Materialer

- Sekvenseringsprimere (se Tabell 4)
- Mutert plasmid
- Eluerings buffer

Metode

5 pmol sekvenseringsprimere ble blandet med 400-500 ng mutert plasmid. Løsningen ble fortynnet til et totalvolum på 10 µL med elueringsbuffer fra E.Z.NA™ Plasmid DNA Mini Kit I Spin Protocol. Rørene ble merket med strekkoder og sendt til sekvensering. Resultatene ble returnert og analysert med programvaren *CLC DNA Workbench.*

3.1.11 Transformering over i One Shot® BL21 Star (DE3) *E.coli* celler.

Når sekvenseringen fastslo at rett mutasjon var oppnådd, ble mutert plasmid transformert inn i One Shot® BL21 Star (DE3) *E.coli* celler. Disse kompetente cellene er celler som gir høy ekspresjon. Transformantene ble dyrket opp på LB-agarplater med ampicillin.

Materialer

- One Shot® BL21 Star (DE3) *E.coli* celler
- Mutert plasmid
- SOC-medium
- LB-agarskåler

Metode

Det ble tilsatt 10 ng mutert plasmid til 50 µL celler. Blandingen ble inkubert på is i 30 minutter. Cellene fikk så ett varmesjokk ved 42 °C i 30 sekunder og ble deretter satt på is i 2 minutter. 250 µL SOC-medium ble tilsatt før cellekulturen ble inkubert ved 37 °C og 225 rpm i 1 time. 200 µL cellekultur ble platet ut på agarskåler med 100 µg/mL ampicillin. Platene ble inkubert ved 37 °C over natt.

3.1.12 Oppdyrking av transformanter

Materialer

- LB-agarplater med transformanter
- LB medium
- 50 mg/mL ampicillin

Metode

Fra LB-agarplatene ble enkeltkolonier inokulert i 5 mL LB medium og 5 µL ampicillin. Cellekulturen ble dyrket ved 37 °C og 220 rpm over natt (~16 timer).

3.1.13 Tillaging av -80 °C frysestock

Det ble tillaget glyserolfrysestocker for ChiB villtype og de aktuelle mutantene. Slike frysestocker gjør det mulig å oppbevare de ulike cellekulturene ved -80 °C over lenger tid.

Materialer

- Cellekultur
- 87 % Glyserol

Metode

1050 µL cellekultur ble overført til et cryorør og tilsatt 450 µL 87 % glyserol. Frysestockene ble oppbevart ved -80 °C.

3.2 Uttrykking av ChiB mutanter ved hjelp av *E.Coli* BL21 Star

3.2.1 Overekspresjon av ChiB i *E.Coli* BL21 Star.

Den gram negative *E. coli* ble benyttet som vert for å overuttrykke ulike ChiB mutanter.*E.Coli* stammen One Shot® BL21 Star (DE3) ble benyttet. Cellene ble dyrket i LB-medium. Ampicillin ble tilsatt for å hindre vekst av uønskede bakterier.

Materialer

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

Metode

Dyrkningskolber med volum på 2 L ble tilsatt 500 mL LB-medium og ampicillin til en sluttkonsentrasjon på 50 µg/mL. Mediet ble videre inokulert med frysestock fra ønsket mutant. Cellekulturen ble inkubert ved 37 °C og 200 rpm over natt (~16 timer).

3.2.2 Tillaging av periplasmatisk ekstrakt

Periplasmaet er området mellom innermembranen og yttermembranen i gram negative celler. I dette området befinner det seg nedbrytningsenzymer og transport proteiner. Blant annet uttrykkes ChiB villtypen og mutantene i periplasmaet. For å gjøre disse proteinene tilgjengelige må cellene lyseres. Ved å tilsette spheroplastbuffer vil sukkerkonsentrasjonen inne i cellene øke betraktelig. Dette gir en konsentrasjonsforskjell, som sammen med iskaldt vann vil gi cellene et osmotisk sjokk og føre til lysering.

Materialer

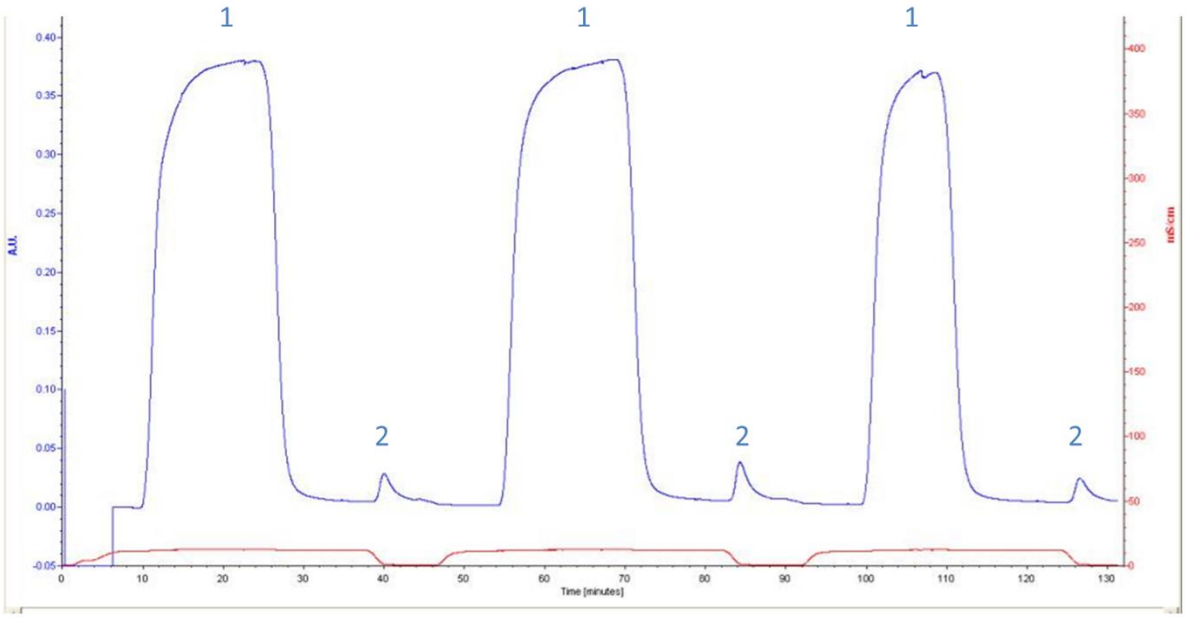
- Spheroplastbuffer
- Sterilt H_2O
- 20 mM $MgCl_2$

Metode

Cellekulturen ble overført til 500 mL sentrifugerør og spunnet ned ved 8000 rpm i 10 minutter ved 4 °C. Rotoren som ble brukt var en SLA-3000 rotor. Supernatanten ble deretter dekantert og pelleten ble resuspendert i 50 mL kald spheroplastbuffer. Resuspensjonen ble inkubert på is i 5 minutter. Videre ble cellene spunnet ned som beskrevet over og pelleten ble inkubert ved romtemperatur i 10 minutter. Pelleten ble så resuspendert i 25 mL iskaldt dH_2O. Cellene ble satt direkte på is i 45 sekunder før 1,25 mL 20mM $MgCl_2$ ble tilsatt. Løsningen ble deretter igjen spunnet ned i 10 minutter ved 8000 rpm og 4 °C. Supernatanten der de periplasmatiske proteinene nå befant seg, ble sterilfiltrert gjennom et 0,22 µm filter ved bruk av vakuum sug. Avslutningsvis ble det tilsatt 2 µL PMSF pr mL periplasmatisk ekstrakt. PMSF er en proteasehemmer som forhindrer spalting av proteinene i løsningen. Det periplasmatiske ekstraktet ble videre oppbevart i kjøleskap ved 4 °C.

3.2.3 Rensing av periplasmatisk ekstrakt på kitinkuler

Det periplasmatiske ekstraktet inneholder flere uønskede proteiner i tillegg til de ønskede ChiB proteinene. På bakgrunn av dette er det derfor nødvendig å utføre et rensesteg. Aktive kitinaser har affinitet mot kitin og vil binde seg til kolonnematerialet, andre proteiner derimot vil elueres ut med mobilfasen. Denne metoden er rask og enkel og dermed mye brukt. Eluering av aktiv kitinase oppnås videre ved å senke mobilfasens pH (se Figur 16).



Figur 16: Rensing av aktiv kitinase ved bruk av kikinkolonne. Toppene merket 1 i kromatogrammet er voidtoppene. Der elueres alle andre proteiner ut. Toppene merket 2 er elueringstoppen av den ønskede kitinasen etter endring av pH.

Materialer

- Buffer A: 100mM Natriumfosfatbuffer pH: 6.3
- Buffer B: 20mM Eddiksyre
- Periplasmatisk ekstrakt
- NEB Kitinkuler
- 20 % Etanol
- Regenereringsbuffer: 0,3M NaOH

Metode

5 mL kolonnemateriale ble pakket med 3 x kolonnevolum av buffer A, deretter ble buffer A tilsatt med en flow på 2,5 mL/min til stabil baselinje ble oppnådd. Dette for å fjerne konserveringsmidler i kolonnematerialet. Det periplasmatiske ekstraktet ble videre justert til 100mM natriumfosfat og pH 6.3 før det ble applisert på kolonna. For ikke å overskride kolonnematerialets bindingskapasitet ble det kun applisert 40-50 mL periplasmatisk ekstrakt per rensing. Deretter ble kolonnen vasket med buffer A til det igjen var oppnådd stabil baselinje. Proteinet ble videre eluert ut isokratisk ved hjelp av buffer B. Kolonnen ble regenerert med 0,3M NaOH og til slutt vasket med 20 % etanol.

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

SDS-PAGE er en rask og enkel metode som separerer proteiner med hensyn på molekylvekt. Denne teknikken er mye brukt til å kontrollere proteinuttrykk og renhet. SDS-PAGE ble derfor benyttet for å kontrollere proteinets renhet etter rensing på kitinkolonnen. Sodium dodecyl sulfate (SDS) er en detergent bestående av en hydrofob og en hydrofil del. Den hydrofobe delen bindes til proteinets hydrofobe gruppe og den hydrofile delen orienteres mot vann. Ved varmebehandling vil proteinløsningen med SDS denatureres og proteinet vil få en negativ ladning. Proteinene denatureres ved høy varme og blir videre satt på en polyakrylamidgel som påsettes et elektrisk felt. Proteinenes negative ladning gjør at de trekkes igjennom gelen mot den positivt ladde polen. Gelen inneholder porer som retarderer de større molekylene mer enn de små og dermed oppnås separasjon. Proteinstandarden gjør det mulig å identifisere ulike proteiner på bakgrunn av størrelse.

Materialer

- Proteinfraksjoner
- dH2O
- MOPS SDS Running Buffer 1x
- NuPAGE ® 10 % Bis-Tris Gel 1,0 mm x 10 well
- NuPAGE® Sample reducing agent (10x)
- NuPAGE® Samplebuffer (4x)
- Proteinstandard: Bench Mark Ladder
- SDS-fargeløsning
- SDS-avfargingsløsning

Metode

En blanding bestående av 5 µL Sample buffer, 2 µL Sample reducing agent, 3 µL dH_2O og 10 µL proteinløsning ble laget. Løsningen ble videre denaturert i 10 minutter ved 70 °C på vannbad. En ferdigstøpt gel ble montert i elektroforesekaret, og MOPS SDS Runnig buffer ble tilsatt både i ytre og indre kammer. 5 µL protein-ladder og 20 µL proteinløsning ble videre applisert i brønnene. En spenning på 200V ble deretter satt på gelen i 50 minutter. Etter endt separering på gelen, ble gelen satt til farging med SDS fargeløsning i 30 minutter på ristebrett. Ved endt farging ble gelen satt til avfarging på ristebrett over natt.

3.2.5 Oppkonsentrering av ChiB villtype og aktuelle mutanter

Amicon Ultra er sentrifugefilter som blant annet benyttes til oppkonsentrering av biologiske løsninger, oppkonsentrering av proteineluat, buffer bytte, avsalting og proteinfraksjonering basert på størrelse (Millipore 2013b). Amicon Ultra-15 kan benyttes til oppkonsentrering av proteinløsninger etter rensing på kitinkolonne. Sentrifugefilteret har porestørrelse på 10 KDa. Forbindelser med lavere molekylvekt vil slippe igjennom filteret, og følgelig vil større forbindelser som ChiB bli gjenværende i filteret. Dermed er det mulig å bytte buffer og oppkonsentrere proteinet.

Materialer

- Proteineluat fra rensing
- Amicon Ultra-15 10KDa oppkonsentreringsrør
- Oppbevaringsbuffer: 100mM TrisHCl pH: 8,0

Metode

Rent protein ble overført til Amiconrør og sentrifugert ved 4 °C og 4300 rpm til det var ca. 1,5 mL væske igjen. Røret ble da etterfylt med oppbevaringsbuffer. Dette trinnet ble gjentatt fire gager. Gjenværende proteinløsning ble overført til eppendorfrør og oppbevart ved 4 °C.

3.2.6 Bestemmelse av proteinkonsentrasjon. Fluorometrisk metode.

Bradford metoden er en fluorometrisk metode som benytter Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent til bestemmelse av proteinkonsentrasjon i løsning. Farge reagenten er en syre og binder seg primært til basiske og aromatiske aminosyre residuer (BioRad 2013). Fargeløsningen tilsettes til proteinløsningen og gir en fargerespons som gjenspeiler mengden protein i løsningen. Absorbans måles ved 595 nm og sammenliknes med en standardkurve. Denne standardkurven er laget med utgangspunkt i prøver med kjent konsentrasjon.

Materialer

- Fargeløsning: BioRad Protein Assay Dye Reagent
- Oppbevaringsbuffer: 100mM TricHCl pH: 8,0
- Renset og oppkonsentrert protein

Metode

Proteinløsning og oppbevaringsbuffer, hhv. 4 µL proteinløsning + 796 µL oppbevaringsbuffer ble blandet til et totalvolum på 800. Videre ble 200 µL fargeløsning tilsatt til blandingen. Reaksjonene ble deretter inkubert ved romtemperatur i 5 minutter. En blankprøve bestående av 800 µL oppbevaringsbuffer + 200 µL fargeløsning ble brukt til å nullstille instrumentet. Tre paralleller av hvert enzym ble tillaget.

3.2.7 Spesifikk enzymaktivitet

4-methylumbelliferyl-β-D-*N*-*N'*-diacetylchitobiose (4-MU $(GlcNAc)_2$) er et kunstig substrat bestående av to sukkerenheter $(GlcNAc)_2$ som er bundet til en fluoriserende gruppe (4-Methylumbelliferyl). Dette substratet benyttes ofte i enzymassay for å bestemme spesifikk enzymaktivitet til familie 18 kitinaser. Ved enzymatisk hydrolyse spaltes den fluoriserende gruppen av. Den frie fluoriserende gruppen absorberer lys ved en gitt bølgelengde og avgir fluorescens som detekteres av et fluorometer. Den målte fluorescensen benyttes til å beregne enzymets spesifikke enzymaktivitet (Synstad, B. *et al.* 2004).

Materialer

- 100 x BSA
- 0,2M Natriumkarbonatbuffer
- Citrat/fosfat buffer pH: 5,2
- 1,0 µM 4- methylumbelliferone
- 1 mg/mL 4-MU $(GlcNAc)_2$
- Fluorometer
- Proteinløsning

Metode

En arbeidsløsning bestående av 4,95 mL Citrat/fosfat buffer og 50 µL BSA ble tillaget. Det ble laget en blindprøve og tre paralleller for hvert enzym. 8 µL 4-MU $(GlcNAc)_2$ ble blandet med 87 µL arbeidsløsning. Reaksjonsblandingene ble deretter tilsatt 5 µL proteinløsning. Blankprøven ble tilsatt 5 µL arbeidsløsning. Reaksjonene ble stoppet etter 10 minutter ved å tilsette 1,9 mL 0,2M natriumkarbonatbuffer. Det ble foretatt en fluorometrisk måling for bestemmelse av den spesifikke enzymaktiviteten. Fluorometeret ble nullstilt med natriumkarbonatbuffer og kjent mengde 4- methylumbelliferone. Gjennomsnittsverdien for hvert enzym ble brukt i utregning av den spesifikke aktivitet ved bruk av følgende likning:

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

Volumet i hvert rør er 2 mL, tiden var 10 minutter, enzymvolumet som ble benyttet var 5 µL og enzymkonsentrasjonen for det aktuelle enzymet er mg/mL.

3.3 Fremstilling av kitosan

Kitosan ble fremstilt fra kitin ved homogen *N*-deacetylering av kitin.

Materialer

- Kitin
- 40 % w/w NaOH
- 80 g NaOH (pellets)
- 120 g dH_2O
- Is
- Konsentrert HCl
- 1M HCl
- pH-papir
- Dialysemembraner
- Whatman filter 1,2 µm
- Membranfilter 0,8 µm

Metode

4,0 g kitin ble veid ut og tilsatt 100 g kaldt 40 % w/w NaOH. Det forekommer da en esterifisering av *N*-acetylbindingene. Løsningen ble oppbevart kjølig over natt for å kontrollere at deacetyleringen ikke startet før ønsket tidspunkt. 300 g is ble tilsatt løsningen under kraftig røring med glasstav, deretter ble løsningen satt på magnetrøring til all is var oppløst og løsningen homogen. Løsningen ble så sentrifugert i 15 minutter ved 10 000 rpm og 4 °C. Supernatanten ble så behandlet med nitrogengass i 10 minutter for fjerning av O_2. For å sette i gang deacetyleringsprosessen ble løsningen satt i vannbad (25 °C) i 50 timer (gir F_A=0,68). Deacetyleringen ble stoppet ved å tilsette 280 g is under omrøring. Videre ble kald, konsentrert HCl tilsatt under sakte omrøring til en pH ≈ 7. Det ble brukt pH-papir for å kontrollere pH og pH ble så justert ned til 4,5 med 1M HCl. Prøvene ble hele tiden oppbevart på is. Dialysemembraner ble renset og sjekket for hull i dH_2O. Løsningen ble overført til

dialysemembranene og dialyse foregikk til en ledningsevne på 3µs var oppnådd. Det ble skiftet vann hvert døgn og konduktiviteten ble sjekket jevnlig. Ferdig dialysert løsning ble overført til et begerglass og pH-justert til 4,5 med 1M HCl. Dette da det er viktig at kitosan er på kloridform for økt løselighet. Til slutt ble løsningen vakuumfiltrert gjennom whatman filter (1,2 µm) og deretter membranfilter (0,8 µm) før den ble frysetørket.

3.3.1 ^{1}HNMR-analyse for bestemmelse av acetyleringsgrad av kitosan

Materialer

- D_2O
- $NaNO_2$ (10mg/mL)
- 1M DCl
- NaOD til pH justering
- NMR Bruker TOPSPIN 3.1
- NMR-rør

Metode

20 mg kitosan ble løst i 2 mL D_2O ved 37 °C og risting over natt. Til kitosanløsningen ble det tilsatt 30 µL $NaNO_2$ og 150 µL 1M DCl, dette ble dekket med sølvpapir og satt på risting i 2 timer ved 37 °C. pH ble så justert til 4,5 med NaOD og løsningen ble overført til NMR-rør.

3.3.2 Tolkning av ^{1}HNMR spekter for bestemmelse av acetyleringsgrad

Prøvene ble analysert slik som beskrevet under 0 kjernemagnetisk resonans. Integralene av de ulike toppene ble bestemt ved bruk av programvaren Topspin 3.1. Ut ifra integralene var det mulig å bestemme grad av acetylering på bakgrunn av likningen under.

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

(Likning 3.1)

3.4 Nedbrytning av kitosan

Kitosan med acetyleringsgrad F_A=0,65 ble degradert av ulike ChiB mutanter. Degraderingsproduktene ble analysert videre ved hjelp av SEC, ^{1}H-NMR og MS. Grad av acetylering defineres som molar konsentrasjon av acetylerte enheter (A) delt på den totale molare konsentrasjonen av monomere enheter (A+D), dette vises i likning 3.1 (Sikorski, P. *et al.* 2006).

3.4.1 Oppløsning av kitosan

Materialer

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

Metode

Kitosan ble veid ut og tilsatt dH_2O til en konsentrasjon på 20 mg/mL. Deretter ble det tilsatt likt volum nedbrytningsbuffer slik at sluttkonsentrasjonen av kitosan ble 10 mg/mL. Løsningen ble satt i riskeinkubator ved 37 °C og 200 rpm til kitosanet var helt løst.

3.4.2 Degradering av kitosan (F_A = 0,65)

Materialer

- Homogen kitosan/buffer løsning
- ChiB villtype
- Mutanter av ChiB
- 1M HCl

Metode

2,5 µg enzym pr mg kitosan ble tilsatt kitosan/buffer løsningen. Reaksjonsblandingen ble inkubert ved 37 °C og 200 rpm. Det ble tatt ut prøver à 1,5 mL etter gitte tidspunkt i reaksjonsforløpet (se Tabell 5). Reaksjonene ble stoppet ved å tilsette 150 µL 1M HCl for å senke pH til under 2,5 og deretter koke dette i 2 minutter. For hver reaksjon ble det tatt ut 1,5 mL prøve før tilsetting av enzym. Null-prøvene ble behandlet på samme måte som de andre

prøvene i videre analyser. 1000 µL av reaksjonsblandingen ble tatt ut til SEC-analyse (avsnitt 3.5) og 500 µL ble tatt ut til ^{1}H-NMR (avsnitt 3.4.3). Prøvene ble tørket ved bruk av SpeedVac og oppbevart ved -20 °C inntil videre analyse.

Tabell 5: Tidspunkter reaksjonene ble stanset for de ulike ChiB mutantene

Mutant	F_A	Tid (minutter)
ChiB WT	0,65	0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 30, 60, 120,(1uke)
Y145F	0,65	0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 30, 60, 120, (1uke)
E221A	0,65	0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 30, (1uke)
R294A	0,65	0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 30, 60 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, (1uke)

3.4.3 Prøveopparbeidelse ^{1}HNMR

Materialer

- NaOD
- DCl
- D_2O
- pH-meter
- Speedvac
- NMR-rør

Metode

Tørkede prøver av nedbrutt kitosan (avsnitt 3.4.2) som videre skulle analyseres på ^{1}H NMR ble løst i 500 µL D_2O og pD-justert til 4,5. Deretter tørket ved bruk av SpeedVac over natten. Denne prosedyren ble utført to ganger. Avslutningsvis ble prøvene løst i 700 µL D_2O og overført til NMR-rør for videre analyse.

3.4.4 Kjernemagnetisk resonans (NMR)

Proton NMR (^{1}H NMR) ble benyttet for å bestemme degraderingsgraden av kitosan hydrolysert av de ulike ChiB mutantene. For at signalene til protoner i løsemiddelet ikke skal overskygge signalet til protoner i analytten blir det i ^{1}H NMR benyttet deuterte løsemidler. Det ble her benyttet deuteriumoksid slik at signaler fra løsemiddelet ikke skulle overlappe med signalene fra OH-gruppen på sukkeret.

Metode

Prøvene ble analysert ved 85 °C og 400 MHz. Spektralvidden ble satt til 8,99 ppm, antall scans til 32, pulsvinkelen til 10,50 og blokkstørrelsen til 8. Det ble benyttet en relakseringstid på 4,56 sekunder. Spektrene ble korrigert ved bruk av en gaussfunkjson i programvaren Topspin.

3.4.5 Tolking av ^{1}HNMR-spekter

Metode

Integralene av de ulike toppene ble bestemt ved bruk av programvaren Topspin. Ut ifra integralene var det mulig å bestemme grad av polymerisering, antall sukkerenheter i polymeren (DPn) og videre da også andel glykosidbindinger brutt i hydrolysen, nedbrytningsgraden (α). Gjennomsnittlig DPn ble bestemt på bakgrunn av protom (H-1) resonans som vist i likning 3.1.

$$DPn = \frac{[areal\ av\ alle\ H{-}1\ resonanser\ (interne\ og\ reduserende\ ender)]}{(Reduserende\ ende\ resonanser)}$$

(Likning 3.2)

Denne likningen kan forenkles som vist i likning 3.2

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

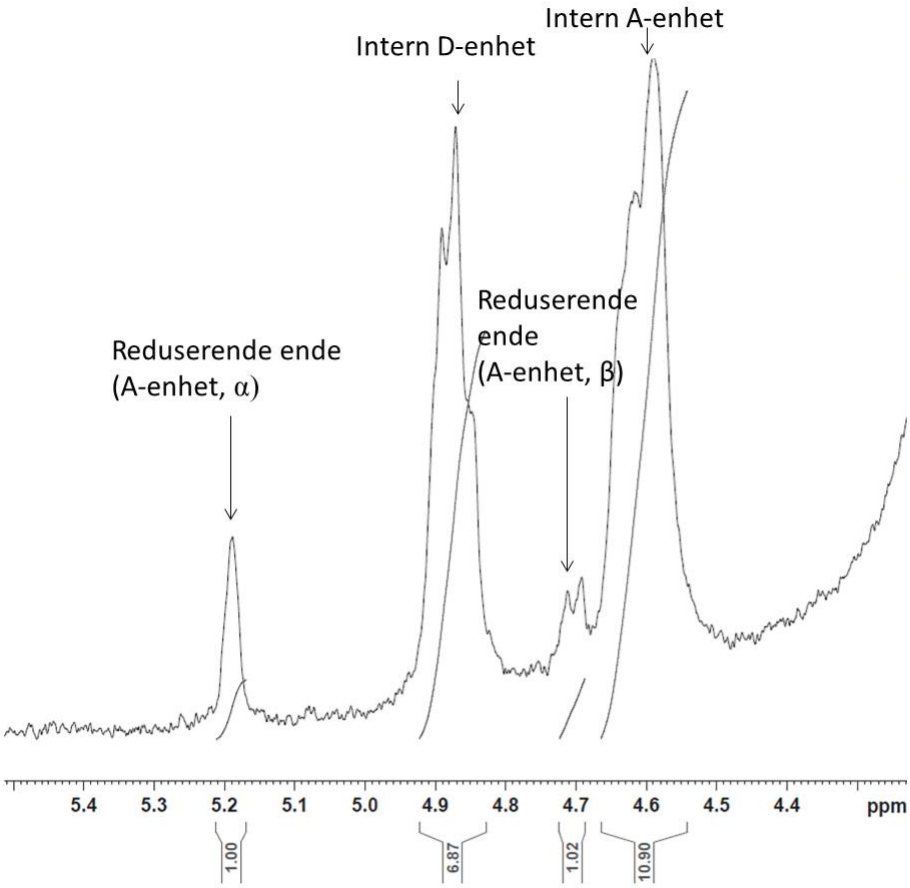
(Likning 3.3)

Videre ble nedbrytningsgraden regnet ut ved bruk av likning 3.3.

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

(Likning 3.4)

De ulike toppene i spekteret vil vises ved gitte ppm verdier. Aα på den reduserende enden vil forekomme på 5,19 ppm, Aβ på den reduserende enden fra 4,7-4,8 ppm og Dα på reduserende ende ved 5,43 ppm. De interne A- og D-enhetene vil gi resonans på henholdsvis 4,6 ppm og 4,9 ppm (Sørbotten, A. *et al.* 2005). Dette vises i Figur 17.



Figur 17: Viser eksempel på et 1HNMR spekter med integraler for utregning av α.

Målet med denne analysen var å oppnå en nedbrytningsgrad på α = 0,05, som forteller at kun 5 % av glykosidbindingene er brutt, og en nedbrytningsgrad på α= 0,33 som oppnås ved maksimal nedbrytning. Disse prøvene ble da videre analysert på størrelseseksklusjonskromatografi.

3.5 Størrelseseksklusjonskromatografi (SEC)

Størrelseseksklusjonskromatografi (SEC) er en kromatografisk metode som separerer molekyler på bakgrunn av størrelse. Denne metoden har vist seg å være egnet til å separere blandinger med delvis *N*-acetylerte oligomerer av ulik størrelse med god separasjon (Horn, S. J. *et al.* 2006a). Denne typen kromatografi brukes til å studere enzymers grad av prosessivitet da prosessive enzymer vil gi en karakteristisk fordelig av oligomerene. Prosessive enzymer vil i hovedsak gi partallsoligomerer mens ikke-prosessive enzymer derimot viser en trend der fordelingen av oligomerene er tilfeldig. SEC systemet som ble brukt består av tre HiLoad 26/60 Superdex kolonner koblet i serie og stasjonærfasen består av dekstran og krysskoblet agarose med en porestørrelse på 34 µm. Porene i stasjonærfasen vil retardere molekylene med hensyn på størrelsen. Store molekyler vil ikke retarderes men vil føres ut med mobilfasen. Tilstrekkelige små molekyler derimot vil retarderes av stasjonærfasen og eluere ut med ulik hastighet. Prøver med ønsket nedbrytningsgrad etter nedbrytning av kitosan ble analysert på SEC for å studere ChiB mutantenes grad av prosessivitet.

<u>Materialer</u>

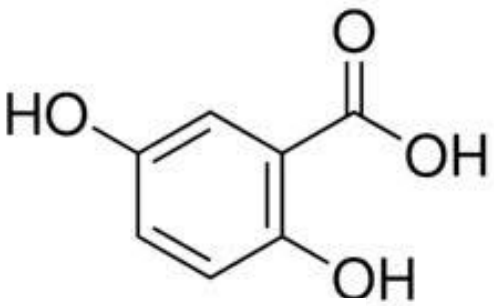
- Mobilfase 0,15M NH_4Ac pH: 4,6
- Stasjonærfase Superdex™ 30 x 3
- Tørket degradert kitosan
- Amicon oppkonsentreringsrør, cutoff 10K
- 2 mL sprøyter
- Kanyler
- 0,45 µm sprøytefilter

Metode

Oligomerene fra degraderingsreaksjonene av kitosan ble separert ved bruk av 3 stykk HiLoad 26/60 Superdex kolonner koblet i serie. Mobilfasen som ble brukt var 0,15M NH_4Ac pH 4,6 med en flow på 0,8 mL/min. De tørkede prøvene av degradert kitosan ble løst i 2 mL mobilfase og overført til et amicon oppkonsentreringsrør med en cutoff på 10K. Dette ble spunnet ned i 20 minutter for å skille polymerene fra oligomerene. Videre ble både oligomerene og polymerene filtrert og deretter injisert i systemet hver for seg. Det ble benyttet en «refractive index»-detektor (RI-detektor) til å detektere både oligomerene og polymerene i de ulike analysene. Fraksjoner på 4mL ble samlet opp, frysetørket og oppbevart ved -20 °C inntil videre analyse.

3.6 Massespektrometri (MS)

Massepsektrometri er en analysemetode som brukes til identifikasjon av en rekke molekyler. Et massespektrometer består av en ionekilde, en masseanalysator og en detektor. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) produserer intakte gassfase-ioner fra en rekke ikke flyktige og termisk ustabile komponenter slik som proteiner, oligonucleotider, syntetiske polymerer og store uorganiske komponenter. Dette er en myk ioniseringsmetode der molekylene ioniseres i ionekilden. Analysatoren som brukes er i dette tilfellet Time of flight (TOF). Separasjonen av ionene i denne analysatoren foregår i en feltfri sone, og *m/z* verdien til analytten blir målt på bakgrunn av tiden analytten bruker gjennom «flight tuben» før den treffer detektoren. I MALDI-TOF brukes en matrix som sørger for både desorpsjon og ionisasjon av analytt og er helt nødvendig for denne typen analyse. 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) ble brukt som matrix, og vises i Figur 18.



Figur 18: 2, 5-dihydroxybenzoic acid (DHB) (Sigma Aldrich)

3.6.1 Annotering av topper fra SEC ved bruk av MALDI-TOF-MS

Annotering av toppene i SEC kromatogrammene etter hydrolyse av kitosan ble gjort ved bruk av MALDI-TOF-MS. 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) ble brukt som matrix. DHB er godt egnet som matrix for MALDI-TOF da det er lett ioniserbart og absorberer lys ved 337nm. DHB inneholder fenol grupper som overfører proton til analyttmolekylene, noe som gir effektiv ionisering (Downard, K. 2004).

Materialer

- DHB matrix
- EtOH
- dH_2O
- Frysetørkede kitooligosakkarid-fraksjoner fra SEC
- Kitooligosakkaridstandard $(GlcNAc)_2$-$(GLcNAc)_6$.

Metode

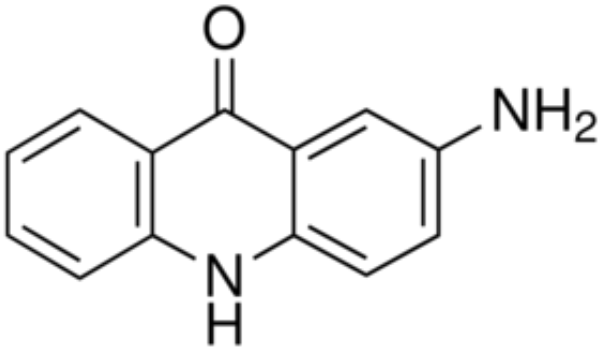
De frysetørkede fraksjonene fra SEC analysen ble løst i ca. 100 µL dH_2O. Matrix ble tillaget ved å løse 15 mg DHB i 1000 µL 30 % EtOH, 70 % dH_2O. Deretter ble fraksjonene fortynnet 1:1 med matrixen, og 1 µL av prøveblanding ble påført MALDI-platen. Det ble benyttet en standard av $(GlcNAc)_2$-$(GLcNAc)_6$, denne standarden ble også påført MALDI-platen og brukt for kalibrering for de gitte oligosakkaridene. Programvaren FlexControl 2.4 ble brukt for analysen.

3.6.2 Tolking av MS-spekter ved annotering av topper

Programvaren FlexAnalysis 2.4 ble gav masselister for de ulike fraksjonene som ble analysert. Disse massene ble sammenliknet mot teoretiske masser og det var da mulig å identifisere hvilke oligomerer de ulike toppene fra SEC inneholdt.

3.7 2-Aminoacridone (AMAC) derivatisering av kitooligosakkarider

2-Aminoacridone (se Figur 19) er en fluoriserende reagent som brukes til å merke reduserende oligosakkarider og glykoproteiner ved å binde seg til den reduserende enden. Molekylene blir da derivatisert og dette utgjør en økning i molekylets masse på 194,1g/mol. Denne derivatiseringen ble utført på produktene etter 7 dagers hydolyse av kitosan med de ulike ChiB mutantene. Fragmentering av kitooligosakkaridproduktene ble gjennomført ved bruk av MALDI-TOF-TOF-MS



Figur 19: 2-Aminoacridone (AMAC) (Sigma Aldrich)

3.7.1 AMAC derivatisering av kitooligosakkarider

Materialer

- 0,1M AMAC i DMSO:eddiksyre (17:3)
- 1M Cyanoborhydrid $NaBH_3CN$
- dH_2O
- 70 % MeOH

Metode

20 µL 0,1M AMAC I DMSO:Eddiksyre (17:3) ble tilsatt kitooligosakkaridprøven (avsnitt 3.4.2). Deretter ble 10 µL 1M cyanoborhydrid tilsatt, et reduksjonsmiddel som stabiliserer binding mellom AMAC og det anomere karbonet på oligosakkaridets reduserende ende. Reaksjonsblandingen ble satt i vannbad i 30 minutter ved 90 °C, prøven ble så satt direkte i vakuumkonsentrator for å fjerne løsemiddelet og dermed stoppe reaksjonen. Prøven ble deretter løst i 700 µL 70 % MeOH og satt ved -20 °C over natt. Videre ble prøven sentrifugert

ved 10 000 rpm i 30 minutter for å spinne ned eventuelt bunnfall. Supernatanten ble overført til et nytt eppendorfrør og oppbevart ved -20 °C frem til rensing.

3.7.2 Rensing av AMAC-derivatiserte kitooligosakkarider

AMAC-derivatiserte kitooligosakkarider ble renset ved bruk av C-18 kolonne. Kolonnen har en upolar stasjonærfase og mobilfasen som ble brukt var polar. De AMAC-derivatiserte kitooligosakkaridene vil feste seg i stasjonærfasen da AMAC gruppen er upolar og binder til kolonna. Uderivatiserte kitooligosakkarider renses da ut før de derivatiserte kitooligosakkaridene til slutt elueres ut.

Materialer

- C-18 kolonne
- MeOH
- dH_2O
- Acetonitril

Metode

C-18 kolonnen ble koblet til en vakuummanifold. 5 mL MeOH, 5 mL dH_2O, 5 mL acetonitril og 5 mL dH_2O ble tilsatt i gitt rekkefølge for å vaske kolonnematerialet. Videre ble 100 µL derivatisert kitooligosakkarid løst i vann satt på kolonna. Kolonnen ble så vasket med 5mL dH_2O før de derivatiserte kitooligosakkaridene ble eluert ut med 2 mL 80 % acetonitril. Eluatet ble overført til 2 mL eppendorfrør, frysetørket og oppbevart ved -20 °C til videre analyse.

3.7.3 Analyse av AMAC-derivatiserte kitooligosakkarider ved bruk av MALDI-TOF-TOF-MS.

De AMAC-derivatiserte kitooligosakkaridene ble analysert ved bruk av MALDI-TOF-TOF-MS. Som matrix ble DHB benyttet.

Materialer

- DHB matrix
- EtOH
- dH_2O
- AMAC-derivatiserte kitooligosakkaridprøver
- Kitooligosakkaridstandard $(GlcNAc)_2$-$(GLcNAc)_6$.

Metode

AMAC-derivatiserte kitooligosakkaridprøver ble prøvepreparert slik som beskrevet i avsnitt 3.7.2. Det ble benyttet to ulike metoder i denne analysen, først MS og deretter MS/MS. Masselister ble kalkulert på bakgrunn av rådata fra programvaren Flex Control 2.4.

3.7.4 Tolking av MS-spekter ved AMAC-derivatisering

Ved bruk av analyseprogrammet FlexAnalysis 2.4 ble masselister fra MS/MS-spektrene kalkulert. MS/MS-spektrene ble sammenliknet med teoretiske masselister for AMAC-derivatiserte kitooligosakkarider, hvor et masseavvik på ±0,5 ble tolerert. Denne sammenlikningen gjorde det mulig å sekvensere de ulike nedbrytningsproduktene.

3.8 Enzymatisk hydrolyse av β-kitin

Hydrolyse av β-kitin kan brukes som et mål på enzymers prosessivitet. Som tidligere nevnt vil hver produktive binding hos prosessive enzymer kun gi et oddetallsprodukt, de resterende produktene fra samme initielle binding vil være dimerer. På bakgrunn av dette vil denne produktratioen være et mål på grad av prosessivitet. Dette er ansett som en attraktiv fremgangsmåte, men metoden har noen fallgruver man skal være klar over. Underestimering av initielle bindinger, enzym inaktivering og dannelse av intermediater underveis i reaksjonen er noen av fallgruvene (Horn, S. J. *et al.* 2012). Det er også sannsynlig at hindringer på polymeren (Kurasin, M. *et al.* 2011) og dannelsen av "traffic jams" (Igarashi, K. *et al.* 2011), også har en effekt på grad av prosessivitet. Hydrolysereaksjonene av β-kitin ble på bakgrunn av dette analysert ved å se på (GlcNAc) 2 / (GlcNAc) ratioen mot prosent nedbrutt substrat.

3.8.1 Hydrolysereaksjoner

Materialer

- β-kitin 3 µm
- 50mM NaAc pH 6,1
- 20mM H_2SO_4
- ChiB villtype + gjeldende mutanter
- 0,45 µm filter

Metode

3 µm β-kitin ble løst i natriumacetat buffer til en konsentrasjon på 2 mg/mL, og videre sonikert i 20-30 minutter. Sonikeringen ble gjort slik at overflaten på substratet øker. Prøvene ble satt i en thermomixer ved 37 °C og 800 rpm og det ble tatt ut en nullprøve for hver reaksjon. For å starte hydrolysen ble det tilsatt enzym til substratløsningen. Det ble tatt ut 75 µL av reaksjonsløsningene til gitte tidspunkt og reaksjonene ble stoppet ved å tilsette 75 µL 20mM H_2SO_4. Enzymkosentrasjoner og tidspunkt for de gitte enzymene vises i Tabell 6. Prøvene ble filtrert med et 0,45 µm filter for å fjerne partikler og oppbevart ved – 20 °C frem til videre analyse.

Tabell 6: Oversikt over enzymer brukt i hydrolyse med tilhørende konsentrasjoner og stopptidspunkt.

Mutant	Enzymkonsentrasjon	Stopptidspunkt
Y145F	2,5µM	0,2,4,6,8,10,15,20,60,200,300,24t
E221A	2,5µM	0,2,4,6,8,10,15,20,60,200,300,24t
R294A	2,5µM	0,2,4,6,8,10,15,20,60,200,300,24t

3.8.2 Tillaging av standard

Det ble laget til standarder med kjent konsentrasjon til bruk i High Performance Liquid Chromotography (HPLC) analysen. Ut i fra analysen av disse standardene ble det laget en standardkurve og konsentrasjonen av prøvene kunne da regnes ut på bakgrunn av denne. Standardene som ble benyttet hadde kjent konsentrasjon av (GlcNAc) (A1) og $(GlcNAc)_2$ (A2).

<u>Materialer</u>

- $(GlcNAc)_2$ (A2)
- (GlcNAc) (A1)
- dH_2O
- 20mM H_2SO_4

<u>Metode</u>

Det ble laget en 1µM stockløsning av både A1 og A2. Disse ble så slått sammen til en 500µM A2A1 standard som videre ble brukt til å lage de to gjeldende standardene på 200µM og 400µM.

3.8.3 High Performance Liquid Chromotography (HPLC)

HPLC er en kromatografisk separasjonsmetode som baserer seg på at stoffene som skal separeres fordeler seg ulikt mellom mobilfasen og stasjonærfasen (Geirbrokk, T. *et al.* 1984). Molekyler med ulik kjemisk sammensetning vil ha ulik affinitet til den stasjonære fasen og elueres ut til forskjellig tid. Det ble i denne HPLC-analysen benyttet en Rezex RFQ-Fast Fruit H+ kolonne der kolonnematerialet består av sulfonert styrene-divinyl benzene (SDVB). Kolonnematerialet (SDVB) er negativ ladet og har protoner bundet. Monomerene og dimerene blir positivt ladet av mobilfasen ved at H_2SO_4 donerer et proton, og kan dermed feste seg til kolonnematerialet. Disse vil så etter en gitt tid elueres isokratisk ut av kolonnen.

Materialer

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

Metode

Ved bruk av en autoinjektor ble 8 µL prøve injisert på kolonna. Kitooligosakkaridene i prøven ble separert med isokratisk eluering ved 85 °C, og en flow på 1 mL/min. (GlcNAc) og $(GlcNAc)_2$ ble detektert av en UV detektor ved 195 nm. Kromatogrammene ble analysert i programvaren Chromeleon.

3.8.4 Bearbeiding av HPLC-data

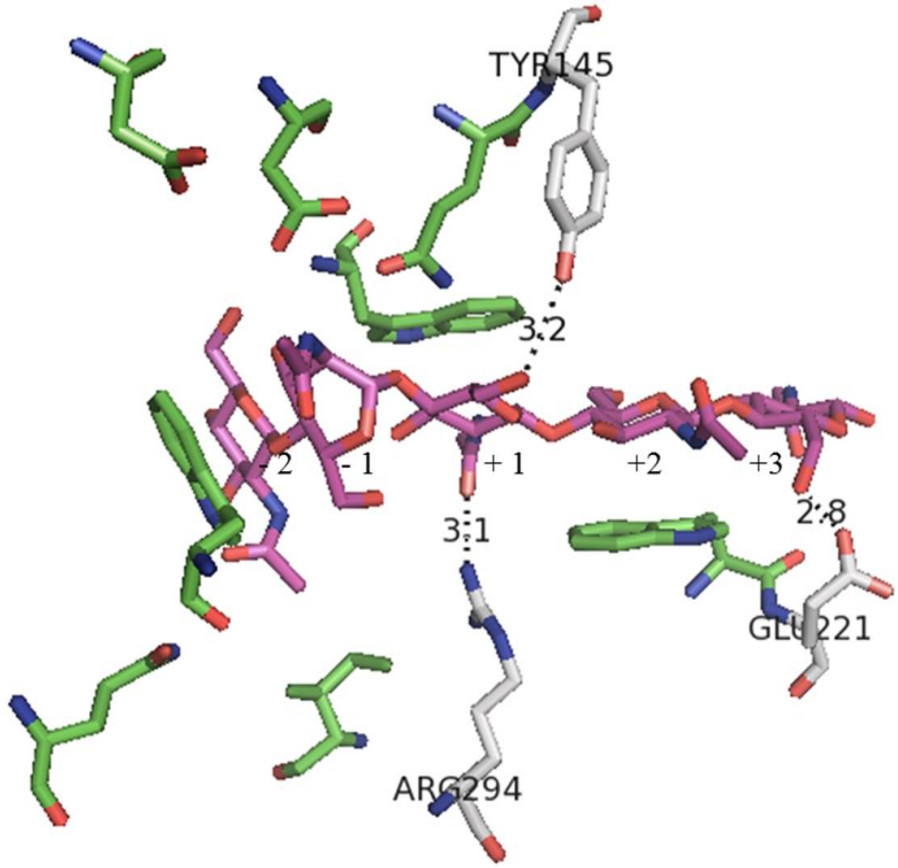
Programvaren Chromeleon ble brukt til bearbeidelse av HPLC-resultatene. Resultatene vises i et kromatogram, og spesifikke topper vil representere dimer og monomer da disse har gitte retensjonstider. Ved bruk av standardene med kjent konsentrasjon kan arealet under toppene beregnes om til konsentrasjon (µM). Videre ble [A2]/[A1] plottet mot grad av nedbrutt β-kitin, og de ulike mutantene ble sammenliknet med ChiB villtypen.

4 Resultater

4.1 Subsetemutasjoner i ChiB

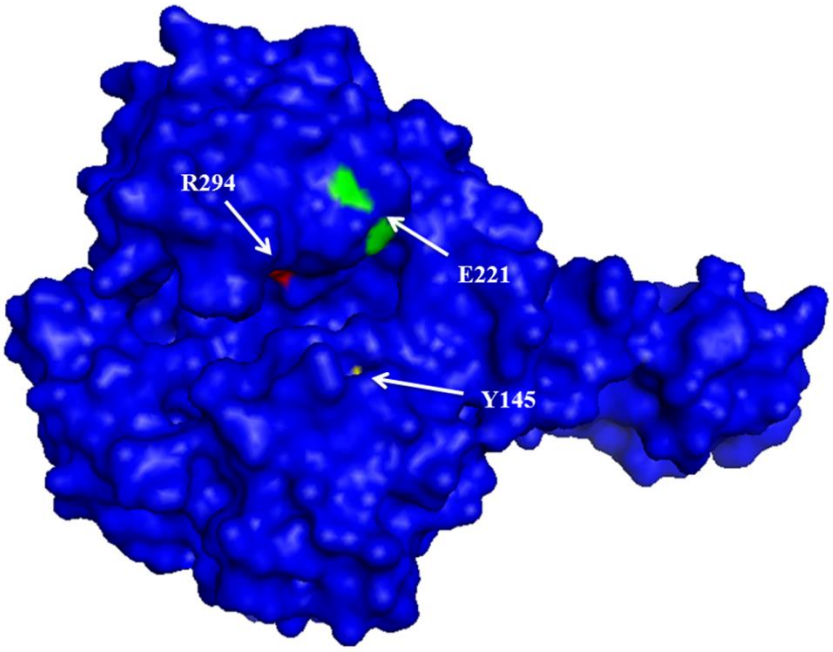
Hos prosessive kitinaser finnes det aromatiske residuer som strekker seg fra det kitinbindende domenet til det katalytiske setet. Disse konserverte aromatiske residuene danner interaksjoner med substratet når substratet skyves gjennom den substratbindene kløften. På denne måten har disse aromatiske residuene vist å være kritiske for enzymets prosessive egenskap (Aalten, D. M. v. *et al.* 2000). Det er tidligere vist at den prosessive karakteren til ChiB styres av aromatiske residuer i +1 (TRP^{97}) og +2 (TRP^{220}) (Sørlie, M. *et al.* 2012). Rundt det aktive setet i ChiB finnes det også en del polare residuer som antas å bidra til den prosessive egenskapen til enzymet. Residuene Y145, E221 og R294 er ved molekylærdynamiske simuleringer vist at binder sterkt til substratet. Disse residuene er plassert i positive subseter, hhv. Y145F i subsete +1, E221A i subsete +3 og R294A i subsete +1. Som tidligere beskrevet er det også vist at det er de positive subsetene i ChiB er viktig for den prosessivie aktiviteten. På bagrunn av dette ble disse resudiene valgt, og mutert som beskrevet i avsnitt 3.1.5. Tabell 1 i avsnitt 3.1 viser hvilke mutanter som ble laget.

Hvordan de muterte residuene i ChiB er plassert i forhold til substratet vises i Figur 20. Polare interaksjoner mellom residuene og substratet er også illustrert. Y145 danner en hydrogenbinding mellom sin OH-gruppe og en OH-gruppe på C6 i +2 sukkeret. E221 danner primært en hydrogenbinding mellom sin karboksylsyre og OH-gruppen på C6 i +3 sukkeret. Sekundært danner E221 hydrogenbinding med oksygenet i sukkerringen i subsete +3. R294 danner en hydrogenbinding mellom sin guanidiniumgruppe og karbonyloksygenet på *N*-acetylgruppen i +1.

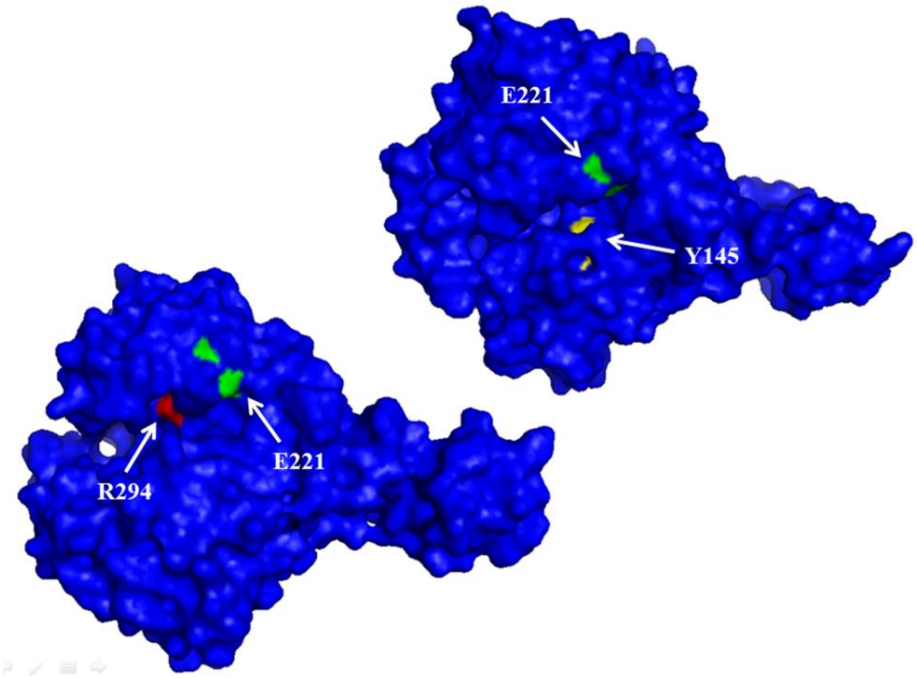


Figur 20: Oversikt over interaksjon mellom residuene Y145, R294, E221 og substrat som er farget rosa.

Mutanten ChiB Y145A ble det ikke utført forsøk med da denne ikke lot seg rense. Rensing på kitinkolonne ble forsøkt flere ganger, men proteinet eluertes ikke ut av kolonnen med elueringsbufferen 20mM eddiksyre. Oppkonsentrering av ChiB R294Q resulterte i utfelling av proteinet som igjen resulterete i for lav konsentrasjon, slik at denne mutanten ikke kunne utføres forsøk med. Det ble forsøkt å oppkonsentrere med Amicon Ultra-15 som beskrevet i metodedelen. Videre ble det forsøkt å benytte cellstirr fra millipore og ved å først justere pH verdien opp for deretter å prøve å oppkonsentrere. Det resulterte likevel i utfelling i alle tilfellene. De doble mutantene er inaktive mutanter som det videre vil bli utført bindingsforsøk på, men som det ikke ble tid til i denne oppgaven. Av ChiB mutantene ble det utført forsøk med følgende tre polare residuer, Y145F i subsete +1, E221A i subsete +3 og R294A i subsete +1. Forsøkene som ble utført var nedbrytning av kitosan, hvor nedbrytningsproduktene ble analysert ved hjelp av ^{1}HNMR, SEC og MS. Videre ble 3 µm β-kitin brutt ned og produktene ble analysert ved bruk av HPLC. Plassering av residuene som ble brukt i forsøkene, i ChiB vises i Figur 21 og Figur 22.



Figur 21: Struktur av ChiB hvor de ulike residuenes posisjon er markert



Figur 22: Illustrasjon av plasseringen av de ulike residuene i ChiB

I avsnittene under følger en beskrivelse av de ulike ChiB mutantene.

4.1.1 E144Q

Aminosyren glutamat (Glu/E) befinner seg i residu 144 og utgjør den katalytiske syren i ChiB. Det er tidligere vist at mutanten ChiB-E144Q er inaktiv og binder substrat (Aalten, D. M. F. v. *et al.* 2001). Her har glutamat blitt mutert til glutamin (Gln/Q). Denne mutanten ble laget slik at de resterende inaktive mutantene videre kunne lages.

4.1.2 Y145A og Y145F

Tyrosin (Tyr/Y) er aminosyren i residu 145. Denne polare aminosyren ble mutert til alanin (Ala/A) og til fenylalanin (Phe/F) som begge er upolare aminosyrer. Dette residuet ligger i subsete +1, rett ved siden av den katalytiske syren glutamat.

4.1.3 E221A

I residu 221 ligger aminosyren glutamat (Glu/E). Denne polare aminosyren ble mutert til den upolare aminosyren alanin. Som vist i Figur 20 er dette residuet plassert i subsete +3, og kan antas å være med på å stabilisere binding til substratet.

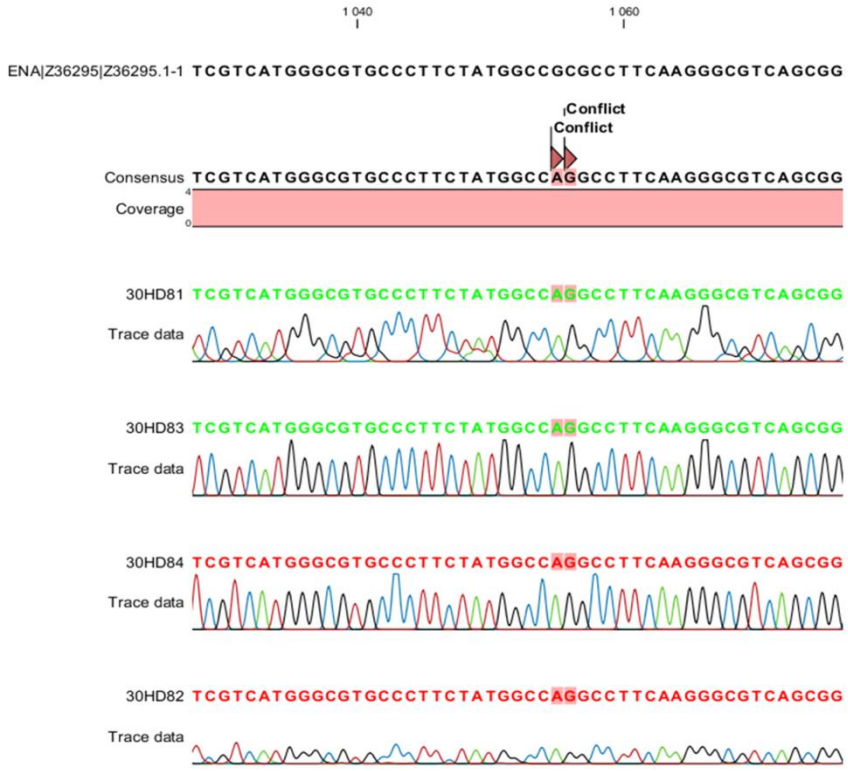
4.1.4 R294A og R294Q

Aminosyren arginin (Arg/R) befinner seg i residu 294. Dette er en polar aminosyre som ble mutert til alanin og glutamin. Dette residuet er som vist i Figur 20 plassert i subsete +1 på motsatt side av residu 145 og også da den katalytiske syren.

4.2 Seterettet mutagenese

4.2.1 Sekvensering

Det muterte plasmidet ble som nevnt i avsnitt 3.1.10 sendt til GATC Biotech i Constance, Tyskland for sekvensering. Sekvensene for ChiB villtype og mutanten skal være like sett bort fra nukleotidene som er endret for den nye mutasjonen. Programvaren *CLC DNA Workbench* ble brukt for å analysere DNA sekvensene. I sekvensen der det har forekommet en endring vil dette bli merket som «conflict» i den muterte sekvensen. Et eksempel på hvordan mutasjonen ble bekreftet i programvaren vises i Figur 23.



Figur 23: Aminosyresekvensen til ChiB villtype sammenliknet med sekvensen til mutert plasmid der mutasjonen skulle være R294Q.

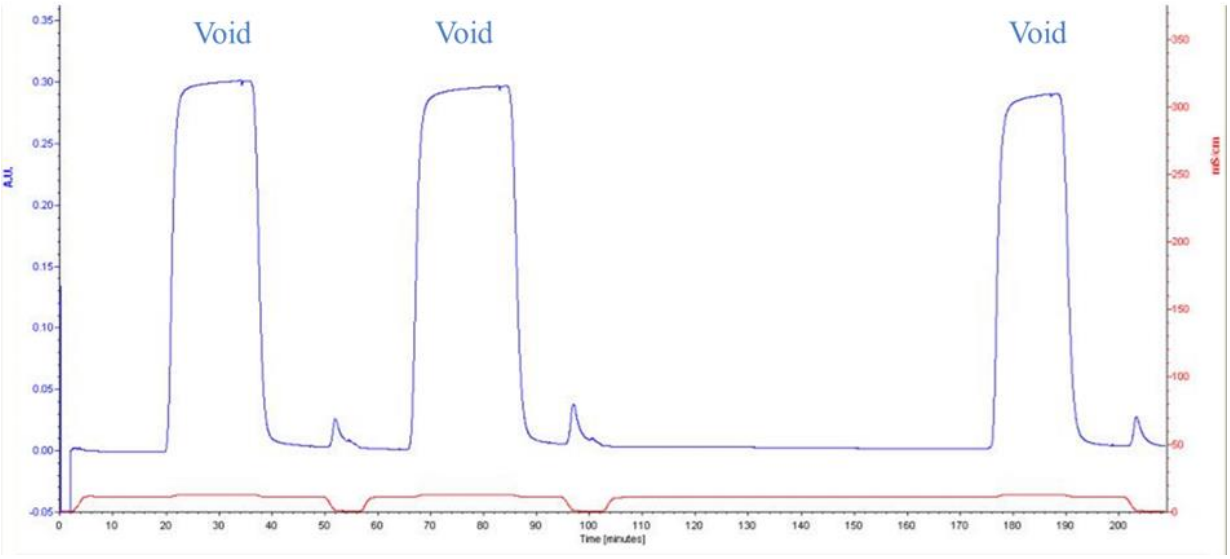
I figuren over vises aminosyresekvensen til ChiB villtype øverst. Konsensussekvensen er sekvensen programmet lager for det nye plasmidet. Den sammenstilles av sekvensene laget fra fire ulike sekvenseringsprimere som nevnt i avsnitt 3.1.10 og vist i Tabell 4. Kodonet [CGC] som koder for arginin (Arg/R) vises i villtypens sekvens øverst.

I sekvensene for det muterte plasmidet er det her merket som «conflict» og kodonet som er tilstede er [CAG] som koder for glutamin (Glu/Q). Dette bekrefter at mutasjonen var vellykket. På samme måte ble de andre mutantene sjekket.

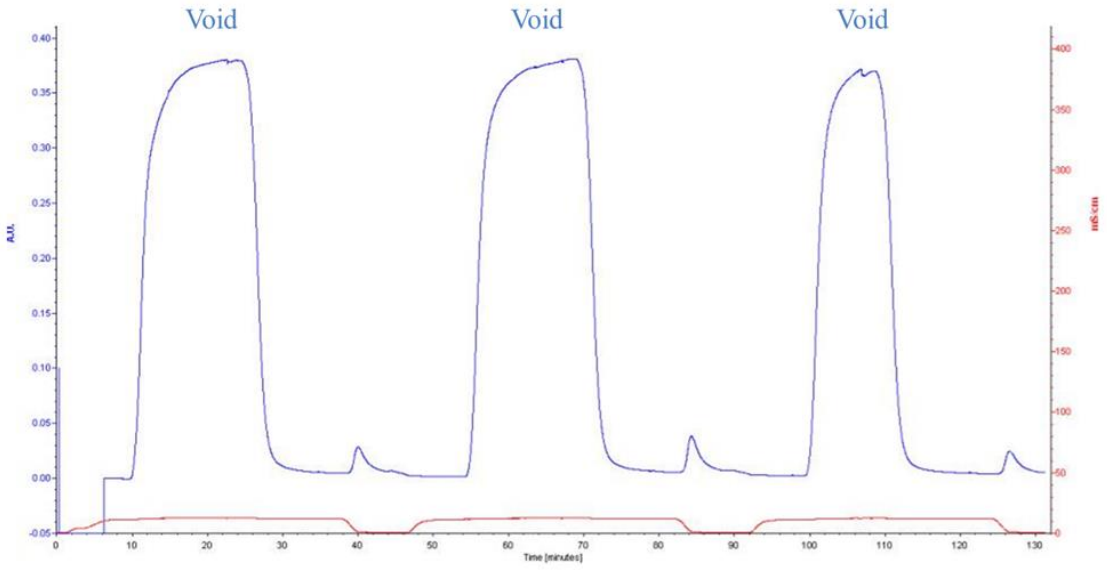
4.3 Isolering av ChiB mutanter

4.3.1 Rensing av aktive mutanter på kitinkolonne

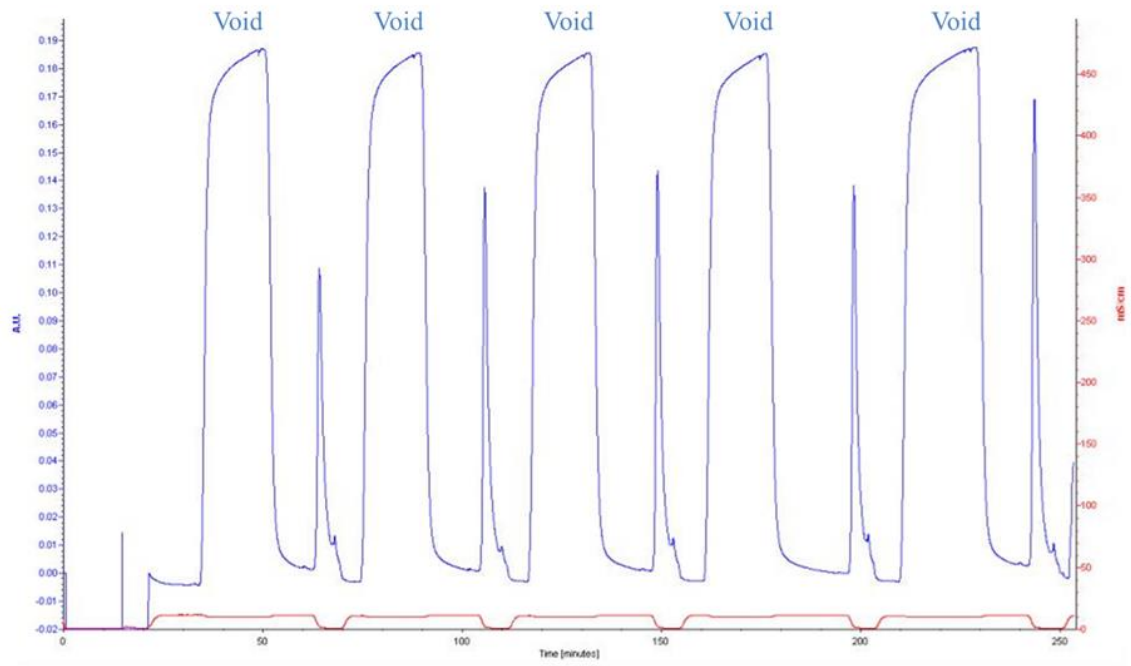
Som beskrevet i avsnitt 3.2.3 ble ChiB villtype og de aktive mutantene renset på kitinkolonne. I figurene Figur 24, Figur 25, Figur 26 og Figur 27, vises kromatrogrammene fra rensinen av de ulike mutantene. Voidtoppen viser ulike komponenter fra det periplasmatiske ekstraktet som elueres ut av kolonnen. I den mindre toppen som følger elueres kitinasen. ChiB mutanten Y145A ble som tidligere nevnt ikke renset i denne oppgaven.



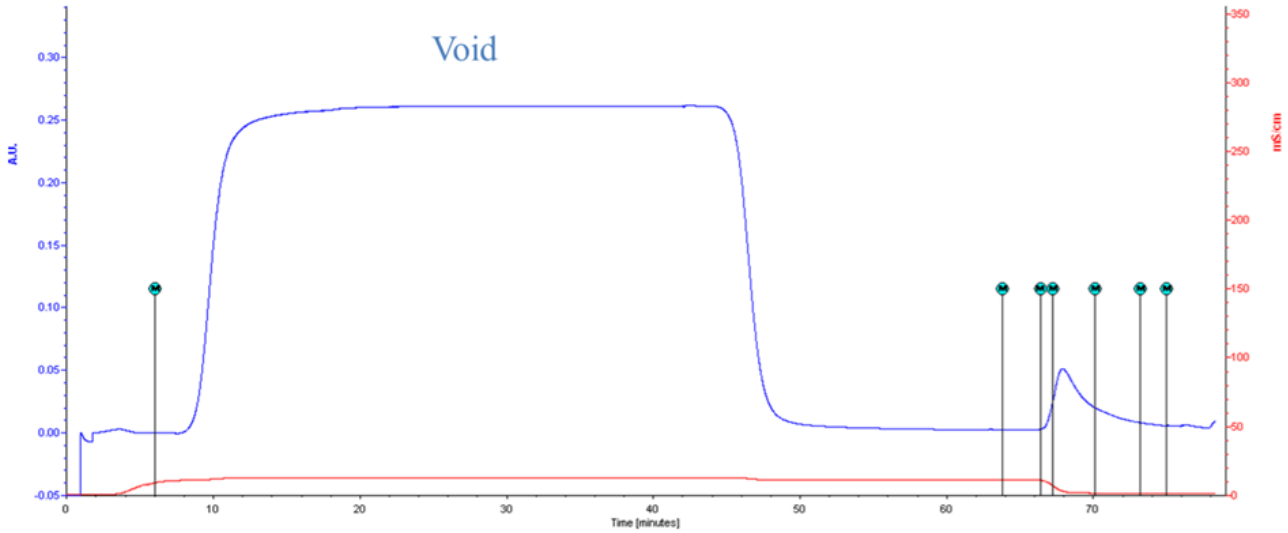
Figur 24: Kromatogram for rensing av ChiB E221A på kitinkuler. Det periplasmatiske ekstraktet ble delt i tre like volum og renset etter hverandre for å forhindre «overload» i kolonnen.



Figur 25: Kromatogram for rensing av ChiB R294A på kitinkuler. Det periplasmatiske ekstraktet ble delt i tre like volum og renset etter hverandre for å forhindre «overload» i kolonnen.



Figur 26: Kromatogram for rensing av ChiB Y145F på kitinkuler. Det periplasmatiske ekstraktet ble delt i fem like volum og renset etter hverandre for å forhindre «overload» i kolonnen.

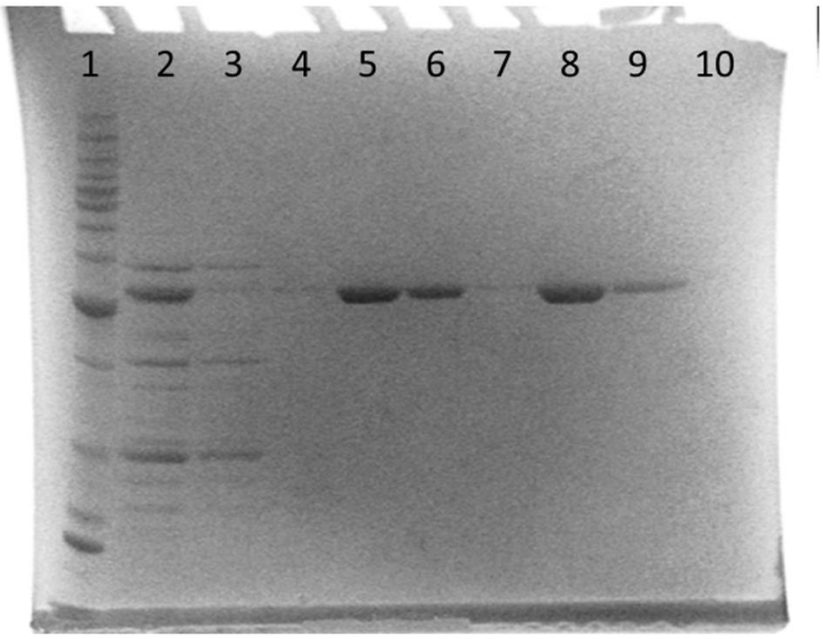


Figur 27: Kromatorgam fra rensing av ChiB R294Q på kitinkolonne. Det periplasmatiske ekstraktet ble delt i tre like volum og renset etter hverandre for å forhindre «overload» i kolonnen.

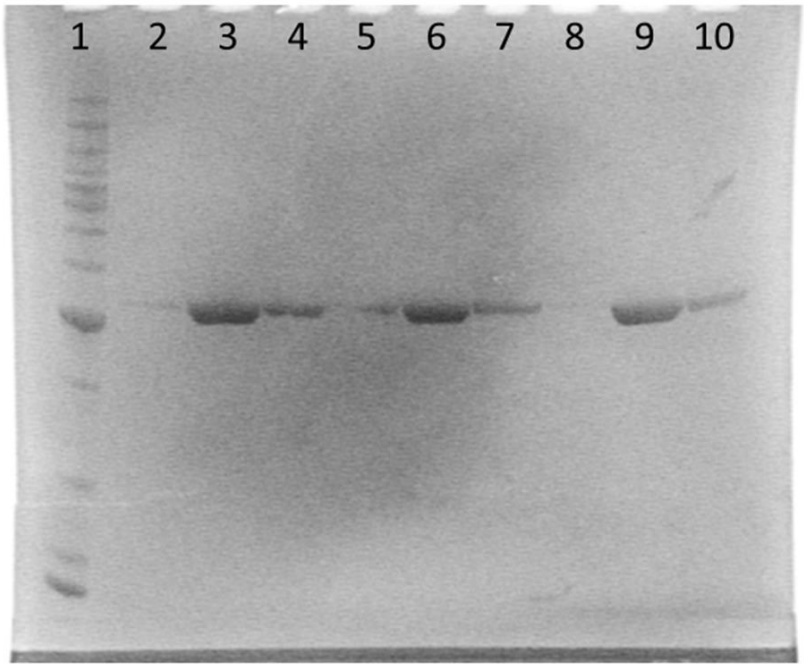
4.3.2 SDS-PAGE

For å kontrollere renheten av de eluerte fraksjonene etter rensingen, ble fraksjonene analysert ved bruk av SDS-PAGE som beskrevet i avsnitt 3.2.4. ChiB villtype har en molekylvek på 55,4 KDa, og mutantene vil ha omtrentlig samme molekylvekt. Bånd på gelen rundt 55 KDa bekrefter da at dette er protein med rett størrelse. Under vises gelbilder fra de ulike analysene.

Figur 28: SDS-page gel av ChiB E221A etter rensing på kitinkolonne. Brønn 1 inneholder ladder, brønn 2 er samlede voidtopper og det er tydelig at kitinasen ikke har eluert ut i denne toppen. Brønn 5,6, 9 og 10 viser klare bånd av protein med rett størrelse.

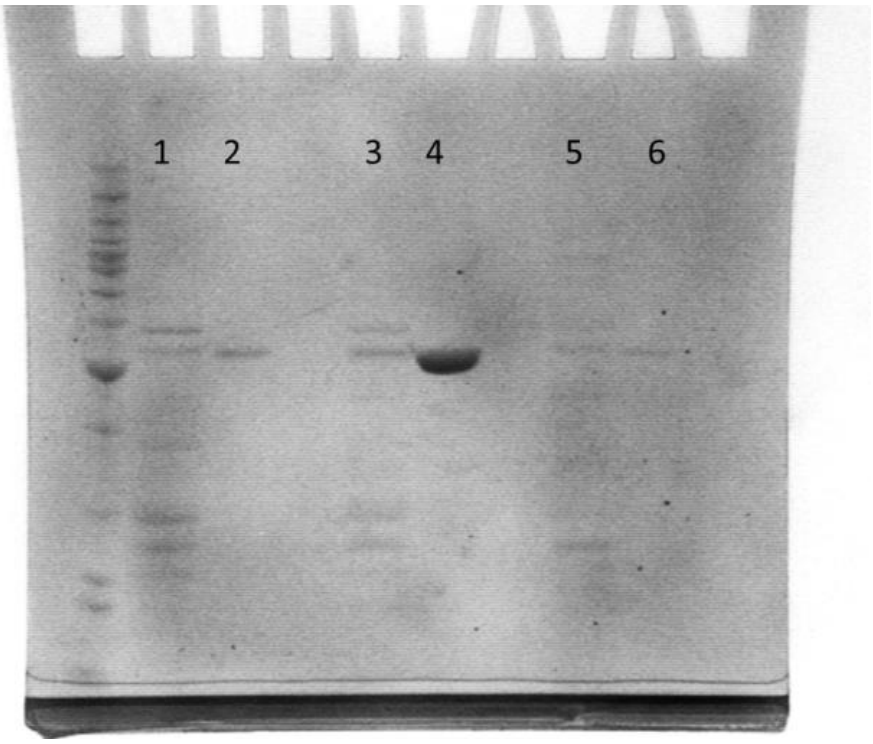


Figur 29: SDS-page gel av ChiB Y145F etter rensing på kitinkolonne. Brønn 1 inneholder ladder, brønn 2 er periplasmatisk ekstrakt.I det periplasmatiske ekstraktet observeres et bånd med lik størrelse som ønsket kitinase. Brønn 3 viser samlede viodtopper.



Figur 30: SDS-page gel av ChiB R294A etter rensing på kitinkolonne. Brønn 1 inneholder ladde. Brønn 1-10 inneholder fraksjoner av elueringstopp og viser klare bånd av protein med rett størrelse.

Rent proteineluat ble deretter oppkonsentrert som beskrevet i avsnitt 3.2.5. Det ble da utført ny SDS-PAGE. Gelbildet under (Figur 31) viser alle mutantenes periplasmatiske ekstrakt og ferdig oppkonsentrert protein. Det vises at de ferdig oppkonsentrerte proteinløsningene er rene fraksjoner uten andre proteiner til stede.



Figur 31: SDS-PAGE av ChiB mutantene før rensing og av ferdig oppkonsentrert protein. ChiB E221A vises i brønn 1 for periplasmatisk ekstrakt og brønn 2 av ferdig oppkonsentrert protein. ChiB Y145F periplasmatisk ekstrakt vises i brønn merket 3 og oppkonsentrert protein vises i brønnen merket 4. Her observeres det «overload» da proteinkonsentrasjonen er relativt høy, det burde da vært satt på mindre mengde for å få ett finere bånd på gelen. ChiB R294A periplasmatisk ekstrakt vises i brønn merket 5 og i brønn merket 6 vises ferdig oppkonsentrert.

ChiB mutanten R294Q ble mutert og renset i denne oppgaven, men under oppkonsentrering ble det som tidligere nevnt umiddelbart utfelling av proteinet. SDS-PAGE forekommer derfor ikke for denne mutanten.

4.3.3 Bestemmelse av proteinkonsentrasjon. Fluorometrisk metode.

Proteinkonsentrasjonen ble som tidligere nevn i avsnitt 3.2.6, bestemt ved hjelp av Bradford metoden som er en fluorometrisk metode for bestemmelse av proteinkonsentrasjon. En oversikt over gjennomsnittskonsentrasjonen til ChiB villtype og de ulike mutantene vises i Tabell 7.

Tabell 7: Oversikt over bestemte proteinkonsentrasjoner i mg/mL for ChiB villtype og de ulike mutantene

ChiB mutant	Proteinkonsentrasjon (mg/mL)	Sluttvolum (mL)	Liter vekstmedium
Y145F	2,9	3	3
E221A	1,3	1,4	3
R294A	0,7	2	3
Villtype	1,1	1,6	3

4.3.4 Spesifikk enzymaktivitet

Enzymenes spesifikke aktivitet ble som tidligere beskrevet i avsnitt 3.2.7 ble målt flourometrisk. Det lineære området til fluorometeret ligger i området 0 – 5000 nm. De oppkonsentrerte proteinløsningene ble derfor fortynnet slik at de falt innenfor dette lineære området. Resultatene av aktivitetsmålingen vises i Tabell 8.

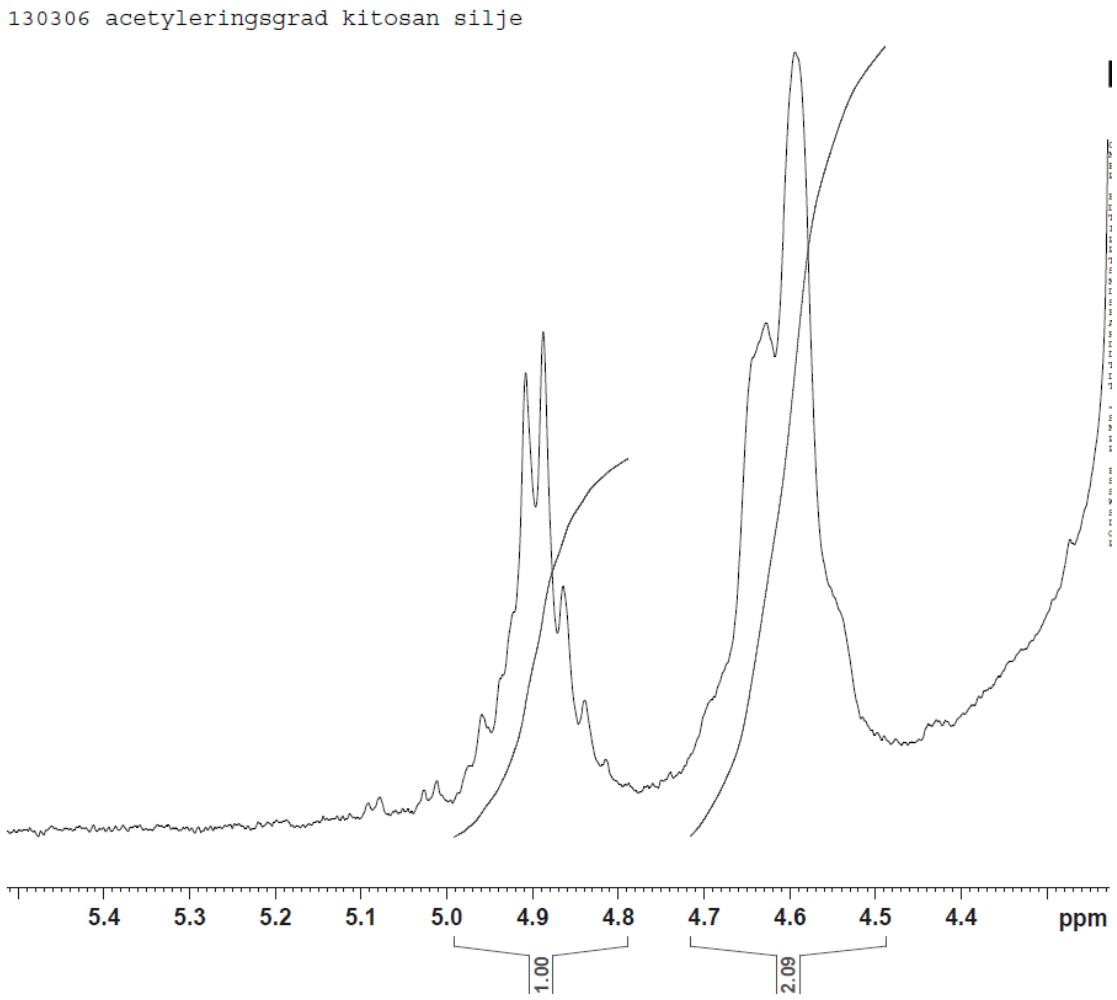
Tabell 8: Oversikt over ChiB villtype og de ulike mutantenes spesifikke enzymaktivitet.

ChiB mutant	Gjennomsnittlig absorbans (fortynning)	Spesifikk aktivitet (nm/min/mg)	Aktivitet relativt til villtype i %
ChiB villtype	1309 (1:1000)	4760	100
Y145F	1330 (1:1000)	1847	39
E221A	1337 (1:1000)	4244	89
R294A	1395 (1:1000)	7971	168

4.4 Fremstilling av kitosan

4.4.1 Bestemmelse av acetyleringsgraden til kitosan

Kitosan ble fremstilt ved homogen deacetylering som beskrevet i avsnitt 3.3. Acetyleringsgraden (F_A) ble bestemt ved å foreta ^{1}HNMR- analyse som beskrevet i avsnitt 3.3.1. Figur 32 viser 1HNMR- spekteret for tillaget kitosan med F_A= 0,68



Figur 32: ^{1}H-NMR spekter for tillaget kitosan

Acetyleringsgraden ble estimert ved å legge sammen acetylerte α-anomerer og acetylerte β-anomerer på reduserende ende og acetylerte enheter inni eller på ikke-reduserende ende. Dette ble så dividert på det totale antallet reduserende og ikke-reduserende ender (likning 3.1). Dette gav en F_A=0,68. Parallelt, av andre i forskningsgruppen ble det også tillaget en kitosan med acetyleringsgrad F_A=0,65 som ble benyttet i karakteriseringsforsøk av fremstilte mutanter.

4.5 Karakterisering av tillagede mutanter ved degradering av kitosan (F_A=0,65)

De ulike mutantene ble inkubert med kitosan med en F_A = 0,65 som del av deres karakterisering. Som tidligere nevnt vil forholdet mellom partallsoligomere og oddetallsoligomere tidlig i kitosanhydrolysen (α ≈ 0,05) gi en indikasjon på grad av prosessivitet for de ulike mutantene. Videre ble initiell hastighet for kitosannedbrytning bestemt. Det er tidligere vist at redusert grad av prosessivitet kan ha en korrelasjon med økt hastighet for nedbrytning av kitosan (Horn, S. J. *et al.* 2006a, Zakariassen, H. *et al.* 2010). Til slutt ble maksimumsdegradering bestemt for å undersøke om mutantenes evne til å bryte ned kitosan er påvirket. Uttakene fra hydrolysereaksjonene ble videre ved ^{1}HNMR. Nedbrytningsgraden ble regnet ut ved bruk av likning 3.2 og likning 3.3. Prøvene med ønsket nedbrytningsgrad ble deretter analysert ved bruk av SEC.

4.5.1 ^{1}HNMR

Nedbrytningsreaksjonene etter hydrolyse av kitosan ble analysert ved bruk av ^{1}HNMR. Denne analysen ga spekter slik at grad av hydrolyse (α) kunne beregnes som nevnt i avsnitt 3.4.5.

Figur 33: Hydrolyse av kitosan for ChiB VT og mutantene Y145F, E221A og R294A.

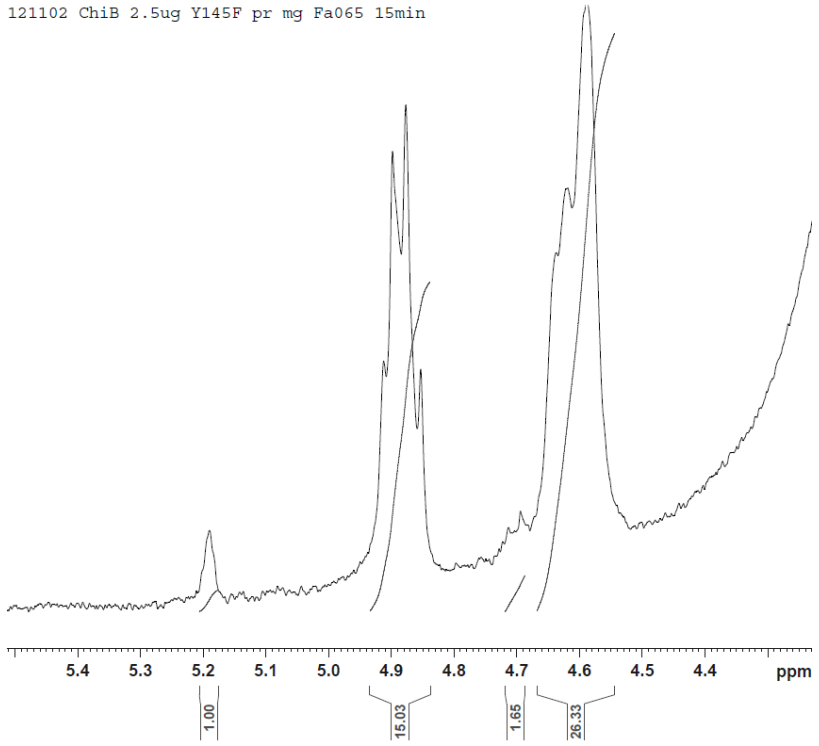
Figur 33 viser hvordan degraderingsgraden av kitosan endrer seg over tid for ChiB villtype og de ulike mutantene. Resultatene av ^{1}HNMR analysen for de ulike mutantene presenteres i de påfølgende avsnittene.

4.5.1.1 Y145F

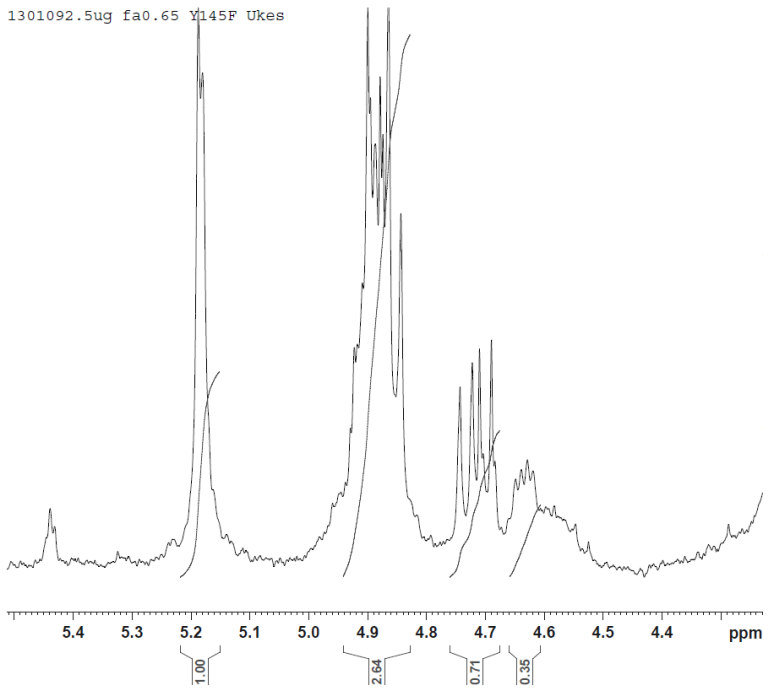
Etter hydrolyse av kitosan med ChiB mutanten Y145F ble reaksjonsuttakene analysert ved bruk av ^{1}HNMR for å bestemme grad av nedbrytning og gjennomsnittlig grad av polymerisering (DPn) ved ulike tidspunkt. Oversikt over reaksjonsuttakene med tilhørende DPn og nedbrytningsgrad vises i Tabell 9. ^{1}HNMR spektra for ≈ 5 % og maksimal nedbrytning vises i Figur 34 og Figur 35.

Tabell 9: Oversikt over DPn og α for de ulike tidspunktene hydrolysereaksjonen av kitosan for ChiB Y145F ble stoppet. Prøven med α = 0,06 er markert i gult og ble videre analysert ved hjelp av SEC.

Mutant	**Tid (min)**	**DPn**	**α**
Y145F	0	45	0,022
	2,5	31	0,032
	5	26	0,039
	7,5	50	0,02
	10	56	0,018
	15	17	0,06
	20	15	0,067
	30	12	0,085
	60	10	0,102
	120	6	0,172
	7 dager	3	0,36



Figur 34: ^{1}HNMR spekter for kitosanhydrolyse med ChiB Y145F α = 0,06



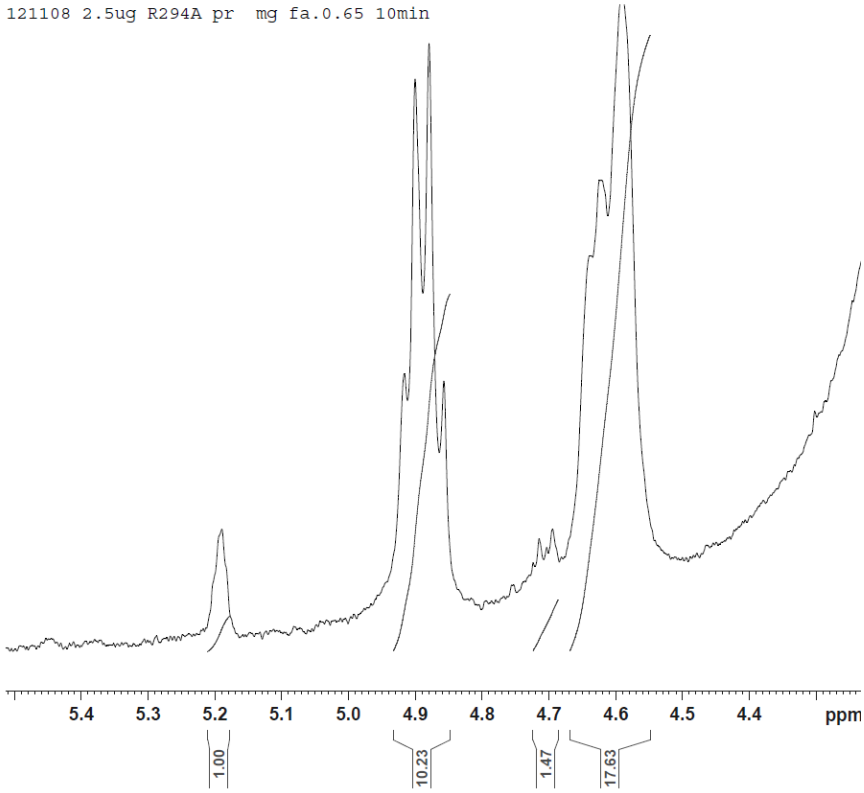
Figur 35: ^{1}HNMR spekter for kitosanhydrolyse med ChiB Y145F α = 0,36

4.5.1.2 R294A

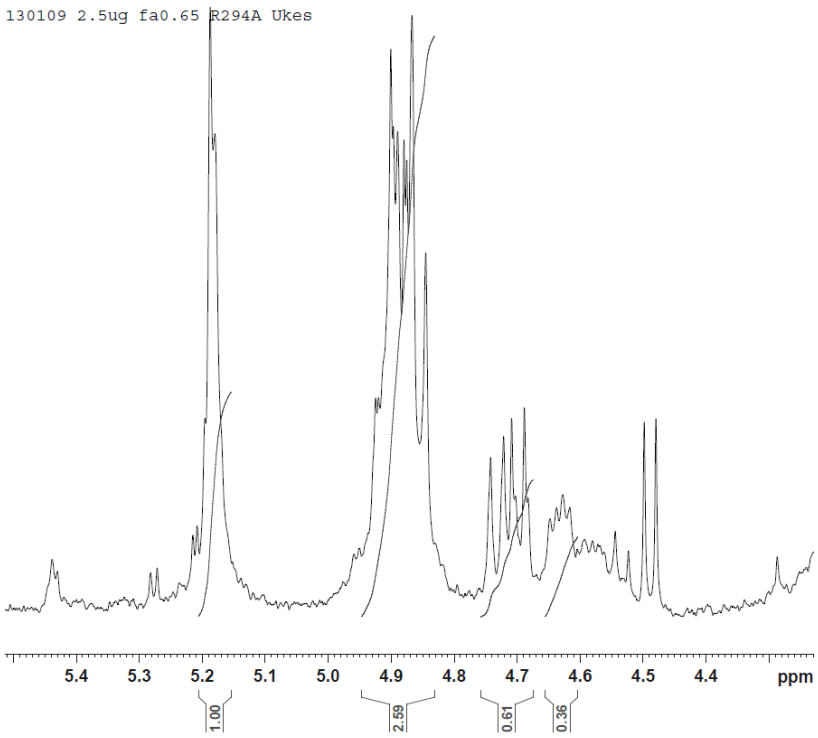
ChiB mutanten R294A ble brukt til hydrolyse av kitosan med F_A=0,65. Reaksjonsuttakene ble for denne mutanten også analysert ved hjelp av ^{1}HNMR. Grad av nedbrytning og gjennomsnittlig grad av polymerisering (DPn) ved ulike tidspunkt ble bestemt. Oversikt over DPn og nedbrytningsgrad for de ulike reaksjonsuttakene vises i Tabell 10. ^{1}HNMR spektra for ≈ 5 % og maksimal nedbrytning vises i Figur 36 og Figur 37.

Tabell 10: Oversikt over DPn og α for de ulike tidspunktene hydrolysereaksjonen av kitosan ble stoppet for ChiB R294A. Prøven med α = 0,081 er markert i gult og ble videre analysert på SEC

Mutant	Tid (min)	DPn	α
R294A	0	56	0,018
	2	83	0,012
	4	29	0,034
	6	17	0,059
	8	15	0,068
	10	12	0,081
	20	8	0,126
	7 dager	3	0,35



Figur 36: ^{1}HNMR spekter for kitosanhydrolyse med ChiB R294A α = 0,081



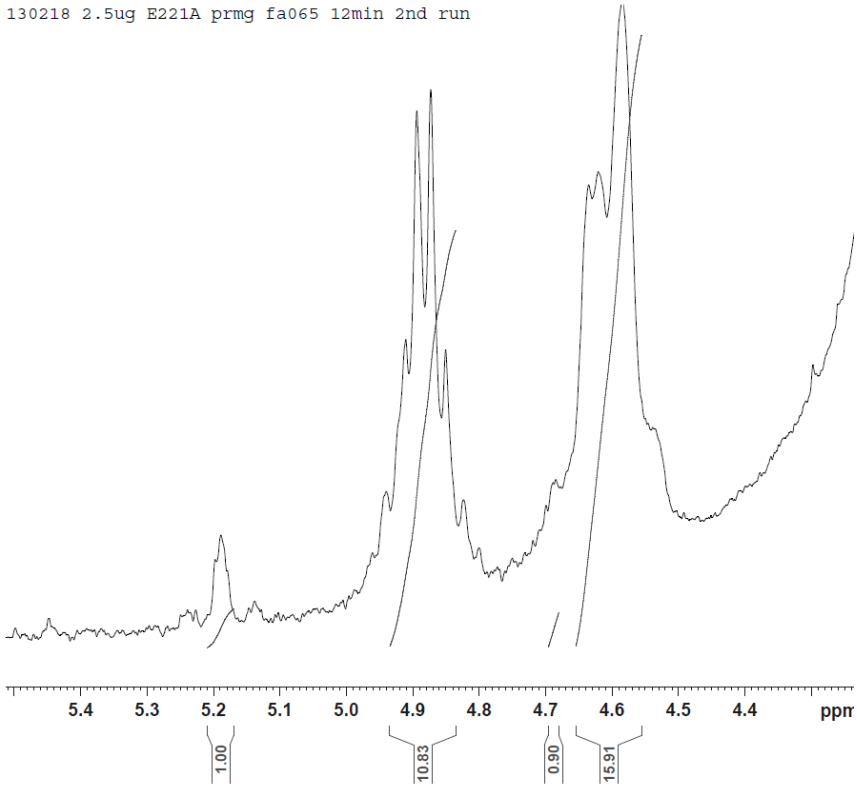
Figur 37: ^{1}HNMR spekter for kitosanhydrolyse med ChiB R294A α = 0,35

4.5.1.3 E221A

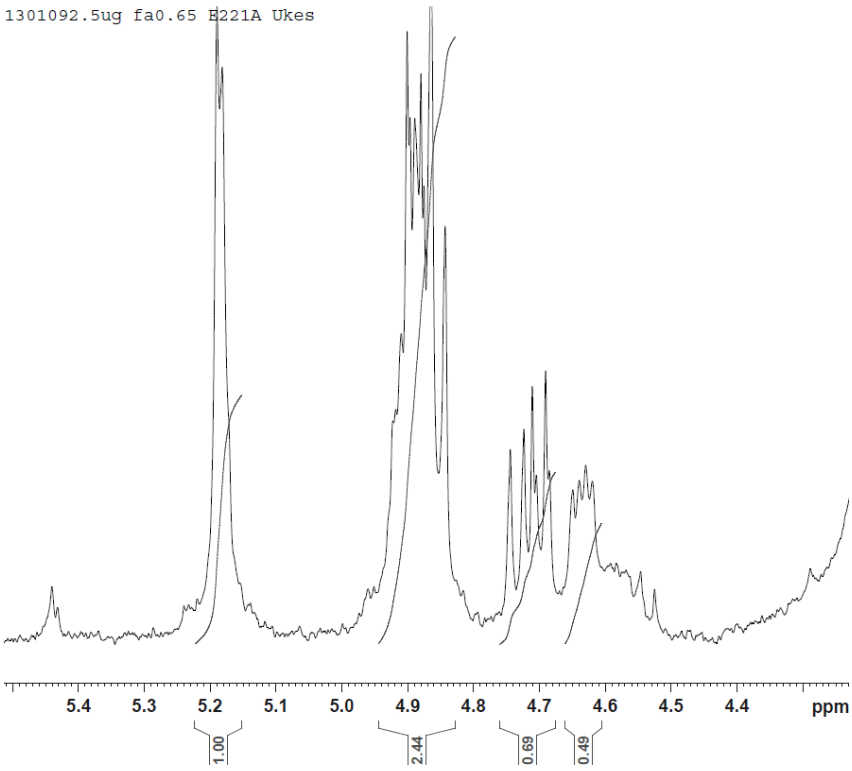
Etter hydrolyse av kitosan med ChiB mutanten E221A ble reaksjonsuttakene analysert ved bruk av ^{1}HNMR for å bestemme grad av nedbrytning og gjennomsnittlig grad av polymerisering (DPn) ved ulike tidspunkt. Oversikt over DPn og nedbrytningsgrad for de ulike prøvene vises i Tabell 11. ^{1}HNMR spektra for ≈ 5 % og maksimal nedbrytning vises i Figur 38 og Figur 39.

Tabell 11: Oversikt over DPn og α for de ulike tidspunktene hydrolysereaksjonen av kitosan ble stoppet for ChiB E221A. Prøven med α = 0,066 er markert i gult og ble videre analysert på SEC

Mutant	**Tid (min)**	**DPn**	**α**
E221A	0	21	0,047
	2	31	0,032
	4	36	0,028
	6	39	0,026
	8	21	0,048
	10	36	0,028
	12	15	0,066
	7 dager	2,7	0,37



Figur 38: ^{1}HNMR spekter for kitosanhydrolyse med ChiB E221A α ≈ 0,05



Figur 39: ^{1}HNMR spekter for kitosanhydrolyse med ChiB E221A α ≈ 0,3

4.5.1.4 Sammenlikning av initiell hastighet for nedbrytning av kitosan

Ved nedbrytning av substrat er det interessant å undersøke enzymenes initielle hastighet i nedbrytningsreaksjonen. I Tabell 12 vises initiell hastighet for ChiB VT og de ulike mutantene for nedbrytning av kitosan med en $F_A = 0{,}65$.

Tabell 12: Oversikt over ChiB VT og de ulike mutantenes initielle hastighet (α/min) for nedbrytning av kitosan

Enzym	α / min	R^2-verdi
ChiB VT	0,002	1
Y145F	0,001	0,93
E221A	0,003	0,85
R294A	0,006	0,94

4.5.1.5 Sammenlikning av maksimal nedbrytning av kitosan

Når ChiB har oppnådd maksimal nedbrytning av kitosan med $F_A = 0{,}65$ vil man oppnå en $\alpha \approx 0{,}33$. Dette gir informasjon om mutantene er like affektive som villtypen i nedbrytning av dette substratet. En oversikt over oppnådd maksimal nedbrytning etter 7 dager, for ChiB VT og de ulike mutantene vises i Tabell 13.

Tabell 13: Oversikt over DPn og α verdier etter 7 dagers hydrolyse av kitosan med $F_A = 0{,}65$ for ulike ChiB mutanter

Enzym	Ant dager hydolysert	DPn	α
ChiB Y145F	7	2,77	0,36
ChiB R294A	7	2,85	0,35
ChiB E221A	7	2,70	0,37

4.5.2 Størrelseseksklusjonskromatografi (SEC)

Hydrolysereaksjoner ved ≈ 5 % nedbrutt, samt fullstendig nedbrutt ble analysert på SEC. Når kitosan er totalt nedbrutt vil man oppnå en $\alpha \approx 0{,}33$.

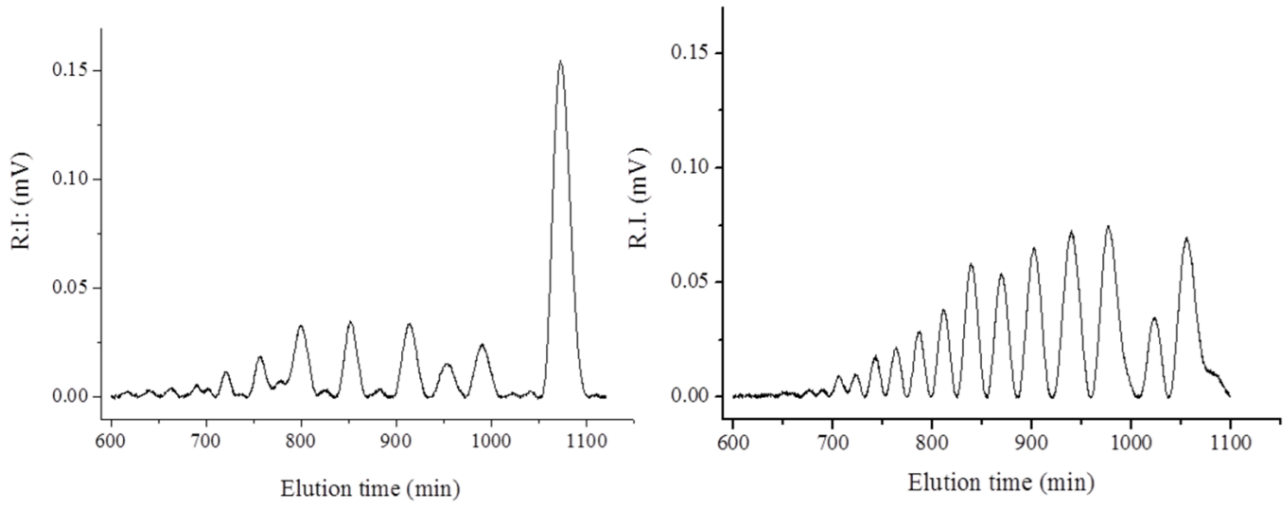
Fraksjonene samlet fra SEC analysen ble analysert ved bruk av MALDI-TOF-MS for å bestemme DPn slik at de ulike toppene fra SEC analysen kunne bli annotert. Dette gav tidspunktene for elueringen til de ulike kitooligosakkaridene og vises i Tabell 14.

Tabell 14: Oversikt over elueringstidspunkt for ulike oligomerer analysert på SEC

Kitooligosakkarid	Tid (min)
A2	995-1035
A4	923-973
A6	855-895

4.5.2.4 ChiB Villtype

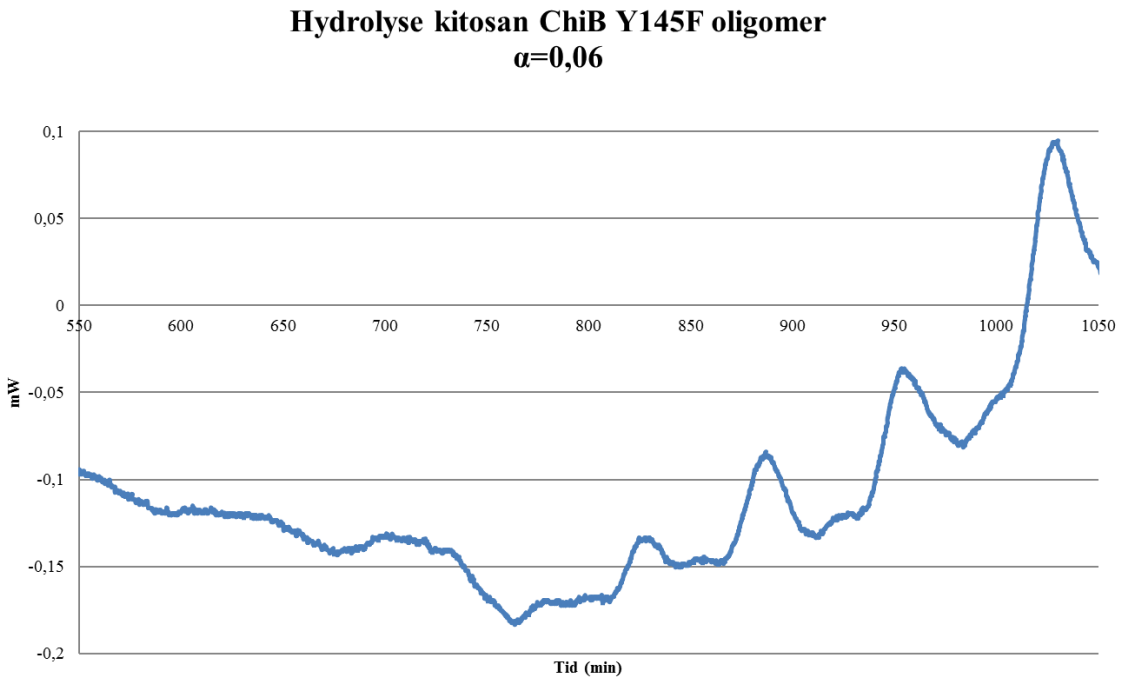
Fordelingen av oligomere etter nedbrytning av kitosan analysert på SEC er karakteristisk for prosessive enzymer. Som tidligere beskrevet vil prosessive enzymer gi høye topper for partallsoligomerer og lave for oddetallsoligomerene. Under i Figur 40 vises SEC kromatogram for ChiB VT og den ikke-prosessive mutanten ChiB W97A. Her vises det hvordan prosessessive og ikke-prosessive enzymer gir ulik fordelig av oligomerene. Analysene som ligger til grunn for denne figurene er utført av post doc Anne Line Norberg.



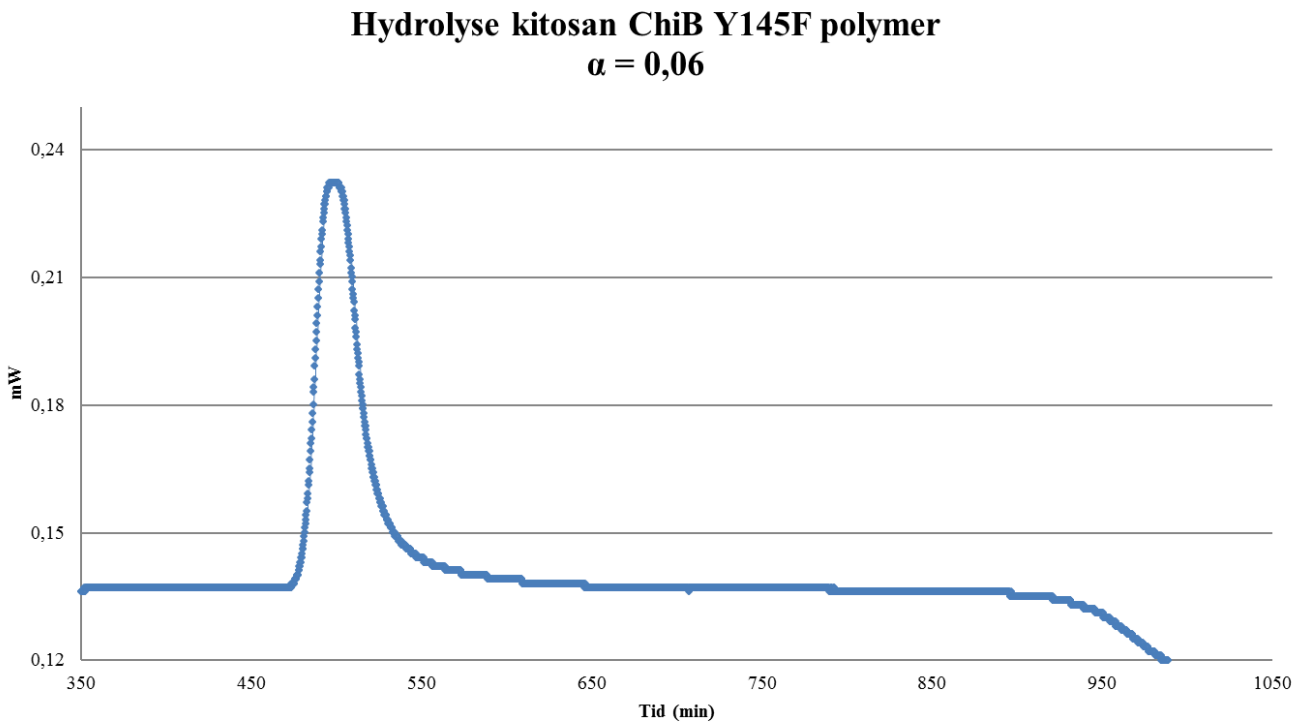
Figur 40: SEC kromatogram for produkter etter hydrolyse av kitosan med F_A= 0,65. Til venstre vises kromatogram for ChiB VT med en nedbrytningsgrad på 5 %. Til høyre vises kromatogram for ChiB W97A også med en nedbrytningsgrad på 5 %. Figurene er laget av Anne Line Norberg.

4.5.2.5 Y145F

Prøvene med α = 0,06 etter hydrolyse av kitosan ble analysert ved hjelp av SEC. Som beskrevet i avsnitt 3.5 ble oligomerene filtrert fra polymerene i reaksjonene som hadde oppnådd en nedbrytningsgrad på α ≈ 0,05. Oligomerene og polymerene ble analysert hver for seg på SEC systemet og kromatogrammene for disse vises i Figur 41 og Figur 42.



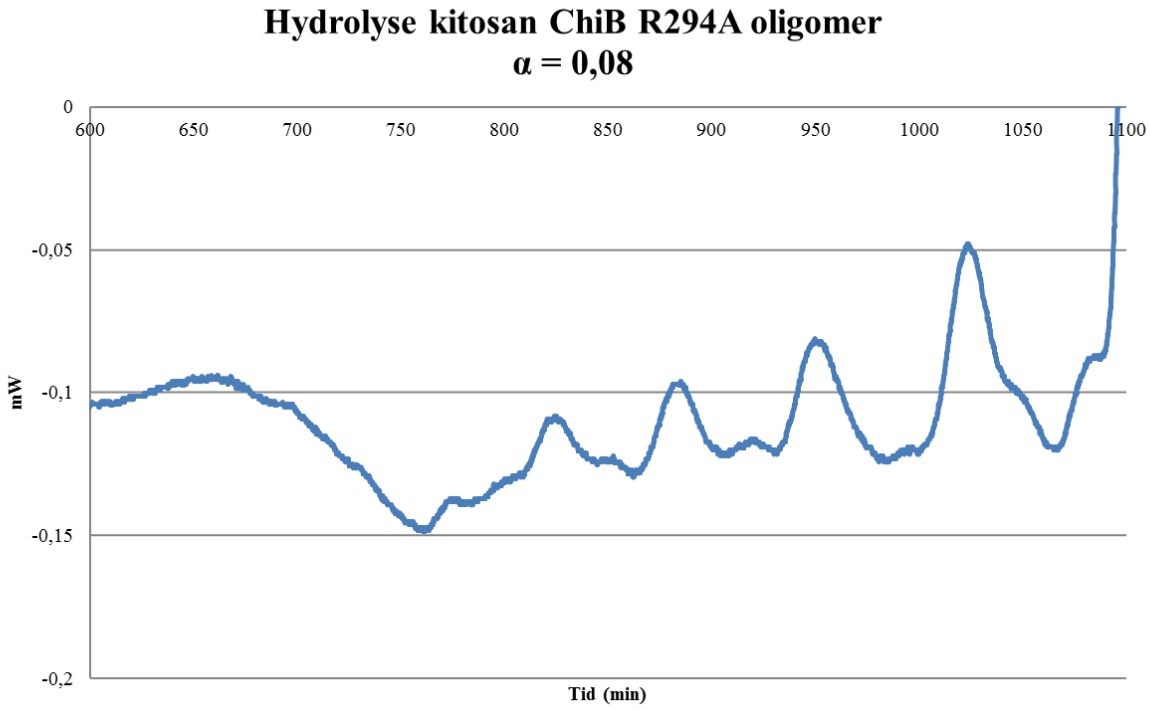
Figur 41: SEC kromatogram av oligomer-fraksjonen fra hydrolysereaksjonen med en α = 0,06 av ChiB Y145F



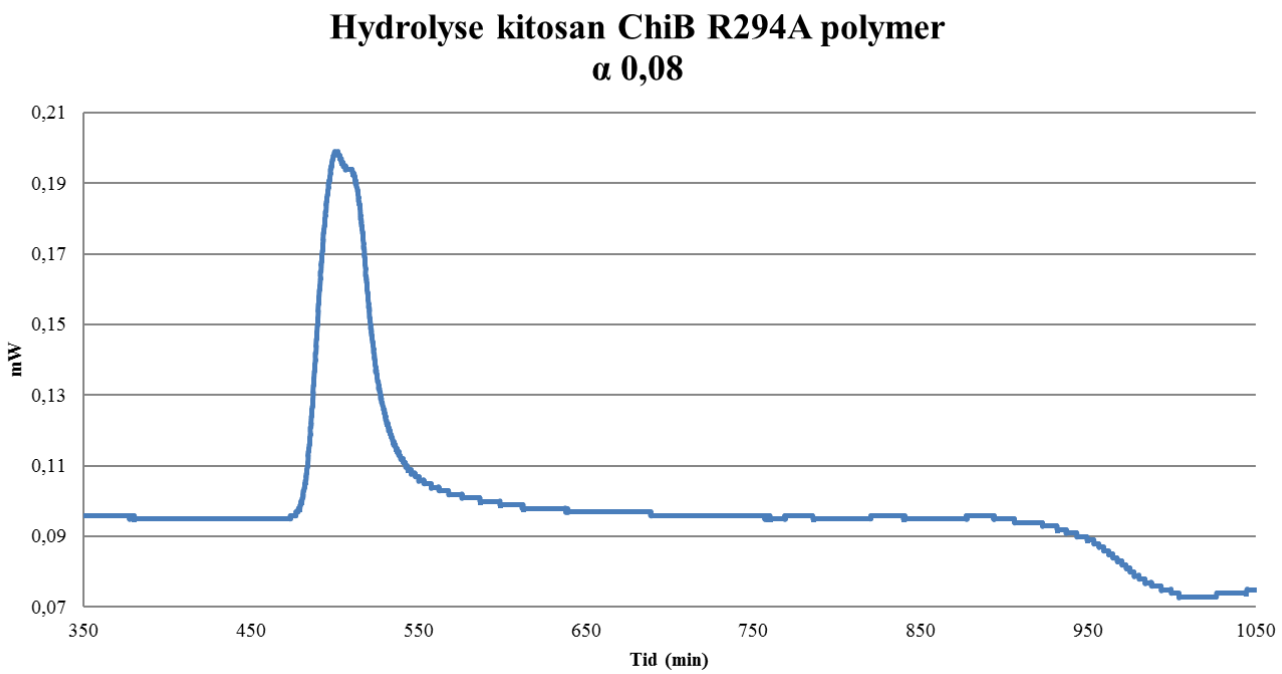
Figur 42: SEC kromatogram av polymer-fraksjonen fra hydrolysereaksjonen med en α = 0,06 av ChiB Y145F

4.5.2.6 R294A

Prøvene med α = 0,08 ble analysert ved hjelp av SEC. Som beskrevet i avsnitt 3.5 ble oligomerene filtrert fra polymerene i reaksjonene som hadde oppnådd en nedbrytningsgrad på α ≈ 0,05. Oligomerene og polymerene ble analysert hver for seg på SEC systemet og kromatogrammene for disse vises i Figur 43 og Figur 44.



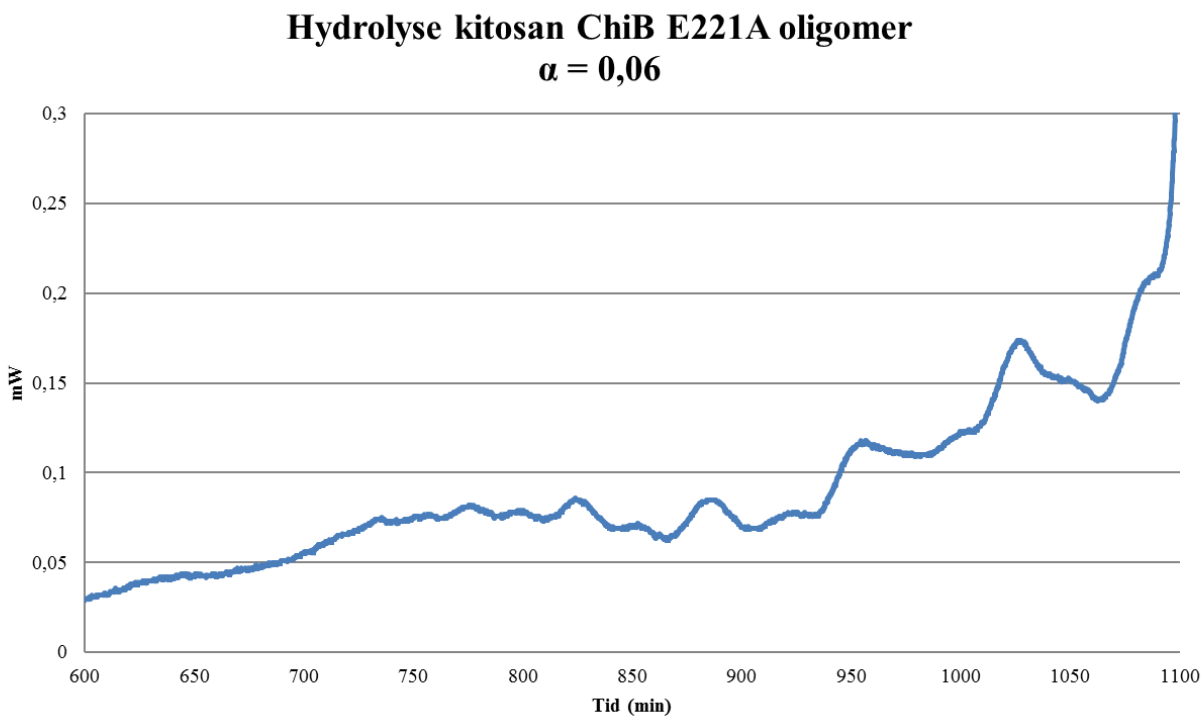
Figur 43: SEC kromatogram av oligomer-fraksjonen fra hydrolysereaksjonen med en α = 0,08 av ChiB R294A.



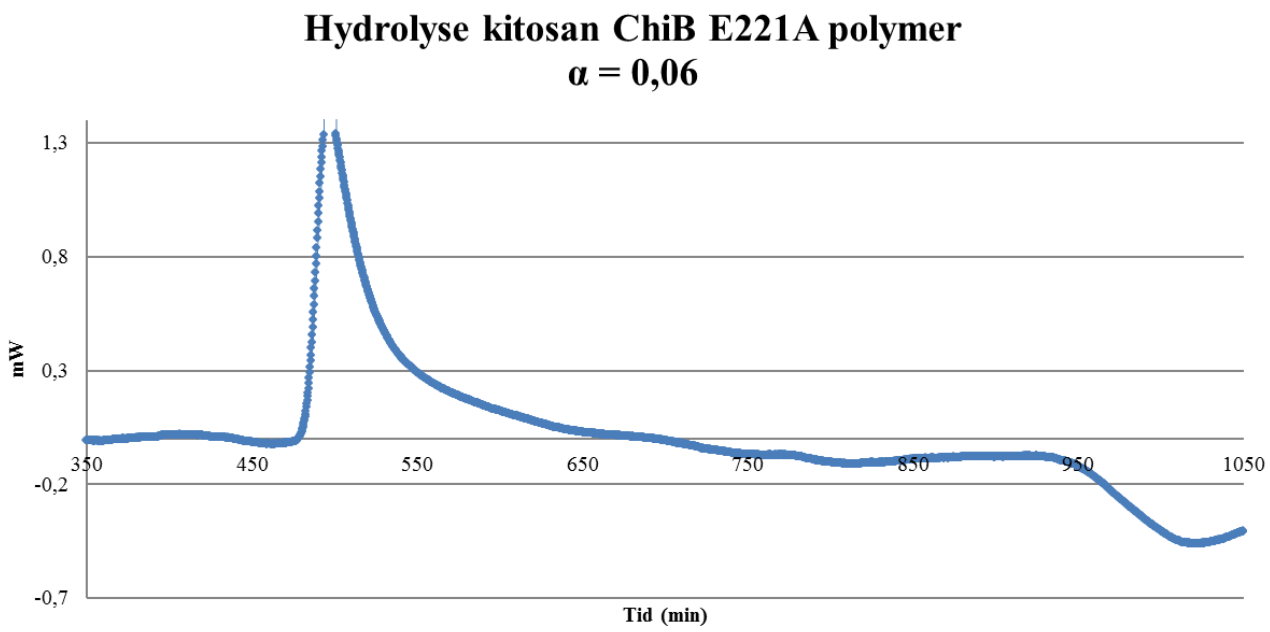
Figur 44: SEC kromatogram av polymer-fraksjonen fra hydrolysereaksjonen med en α = 0,08 av ChiB R294A

4.5.2.7 E221A

Prøvene med α = 0,06 ble analysert videre på SEC. Som beskrevet i avsnitt 3.5 ble oligomerene filtrert fra polymerene i reaksjonene som hadde oppnådd en nedbrytningsgrad på α ≈ 0,05. Oligomerene og polymerene ble analysert hver for seg på SEC systemet og kromatogrammene for disse vises i Figur 45 og Figur 46.



Figur 45: SEC kromatogram av oligomer-fraksjonen fra hydrolysereaksjonen med en α = 0,06 av ChiB E221A

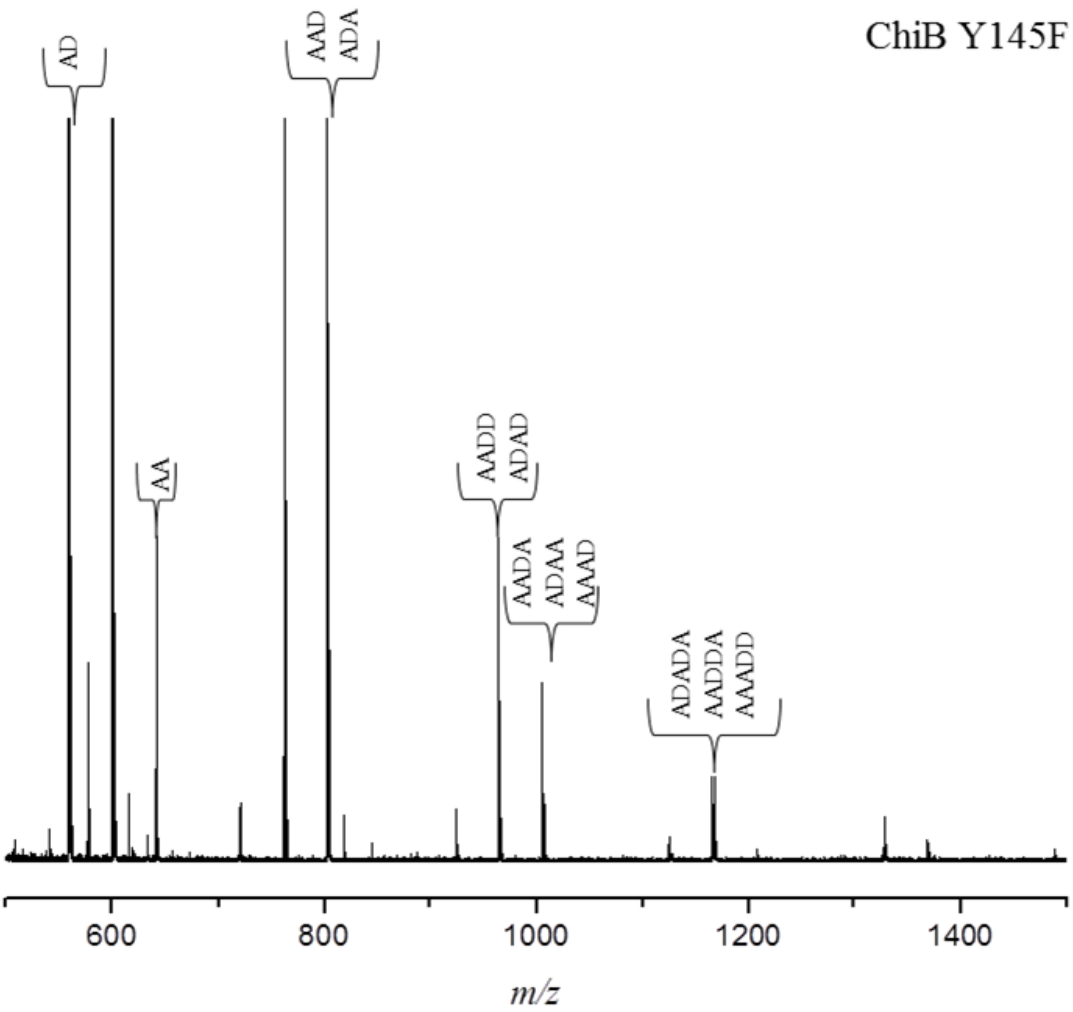


Figur 46: SEC kromatogram av polymer-fraksjonen fra hydrolysereaksjonen med en α= 0,06 av ChiB E221A

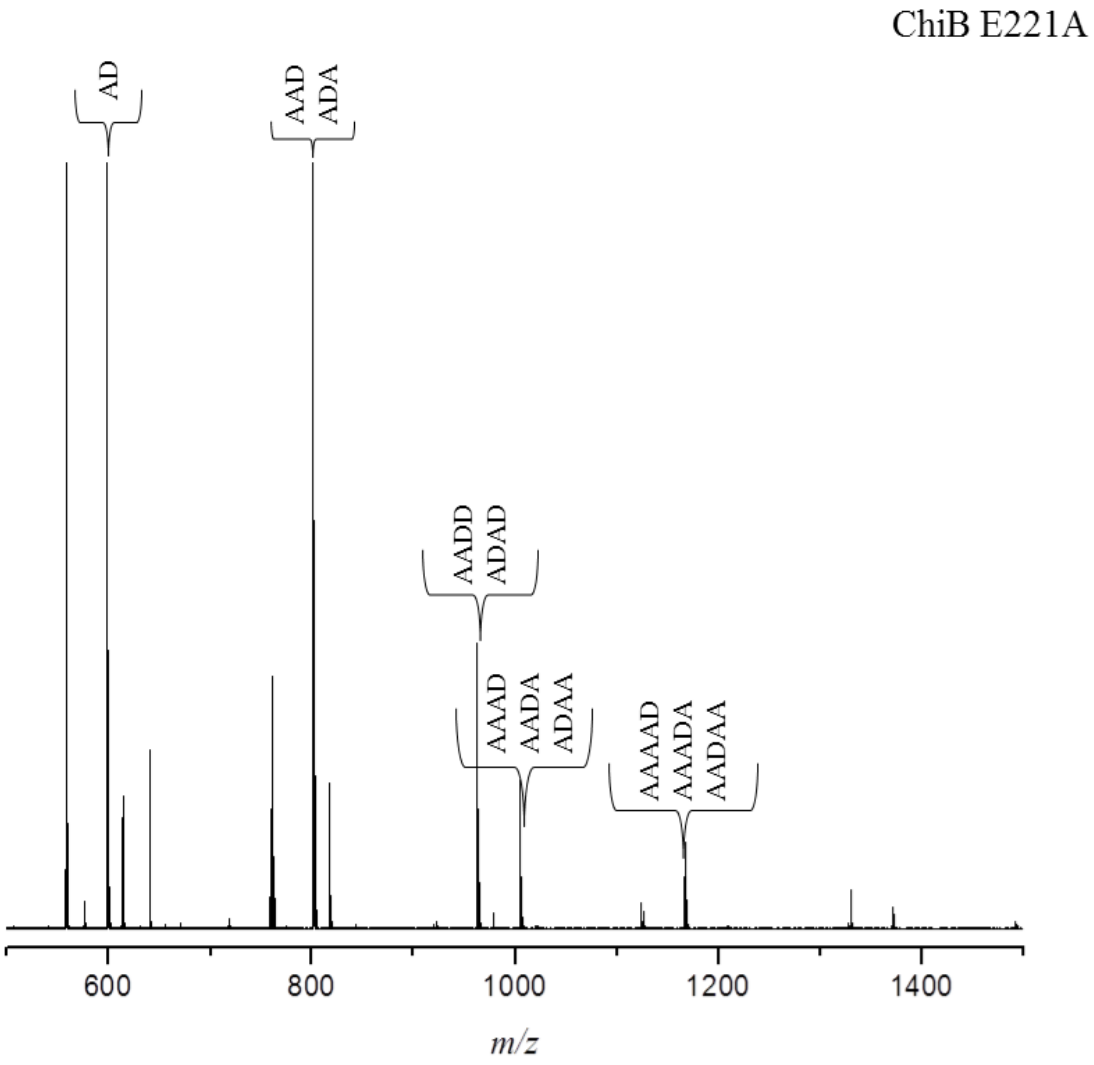
4.6 MS analyser av kitooligosakkarider

4.6.1 Sekvensering av hydrolyseprodukter

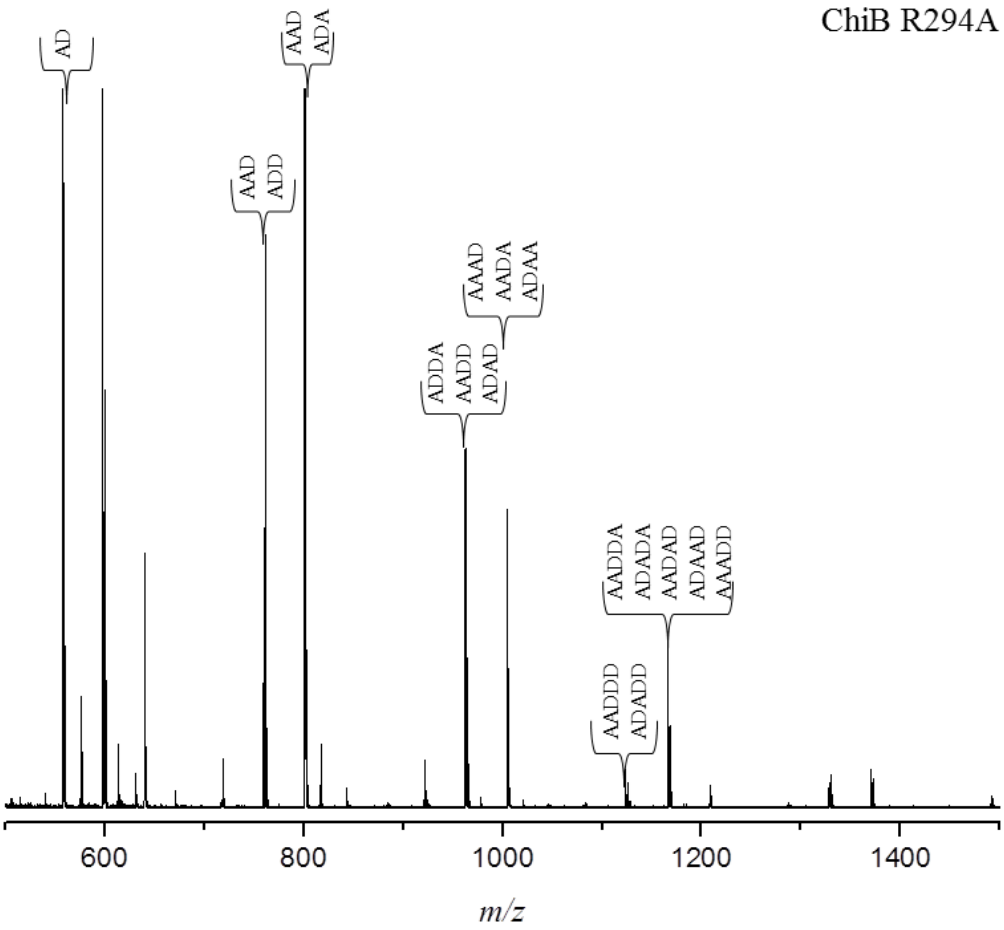
Hydrolyseproduktene etter fullstendig nedbrytning ble derivatisert med AMAC som beskrevet i avsnitt 3.7.1. De derivatiserte kitooligosakkaridene ble deretter analysert ved bruk av MALDI-TOF-MS-MS som forklart i avsnitt 3.7.3. Denne analysen gav resultater slik at hydolyseproduktene kunne sekvenseres. Massespekterne (MS^1) til produserte KOS fra de ulike mutantene er vist i Figur 47, Figur 48 og Figur 49.



Figur 47: Massespekter med sekvensering av hydrolyseprodukt etter fullstendig nedbrytning av kitosan F_A=0,65 for ChiB Y145F



Figur 48: Massespekter med sekvensering av hydrolyseprodukt etter fullstendig nedbrytning av kitosan F_A=0,65 for ChiB E221A



Figur 49: Massespekter med sekvensering av hydrolyseprodukt etter fullstendig nedbrytning av kitosan F_A=0,65 for ChiB R294A

4.6.2 Subsetepreferanser for ChiB villtype, Y145F, E221A og R294A

Resultatene fra sekvenseringen av hydrolyseproduktene gir informasjon om enzymenes subsetepreferanser under hydolyse av kitosan med F_A=0,65. Tabell 15 viser en oversikt over ChiB villtypen og de ulike mutantenes forekomst av *N*-acetyl-D-glucosamine (A) enheter i de ulike subsetene.

Tabell 15: Oversikt over sekvenserte hydrolyseprodukter ved maksimal nedbrytning for ChiB villtype og de ulike mutantene. A merket med rødt representerer N-acetyl-D-glucosamine enhet på den reduserende enden av de ulike oligosakkaridene.

ChiB enzym	**Kitooligoakkarid**	**Sekvens**
ChiB Villtype*	A2/AD	AA DA
	A2D/AD2	DAA DDA ADA
	A2D2/A1D3/A3D1	DDAA (MAJOR) ADDA DADA DAAA ADAA AADA DDDA
Y145F	A2/AD	AA DA
	A2D	DAA ADA
	D2A2/D1A3	DDAA DADA ADAA DAAA
	D2A3	ADADA

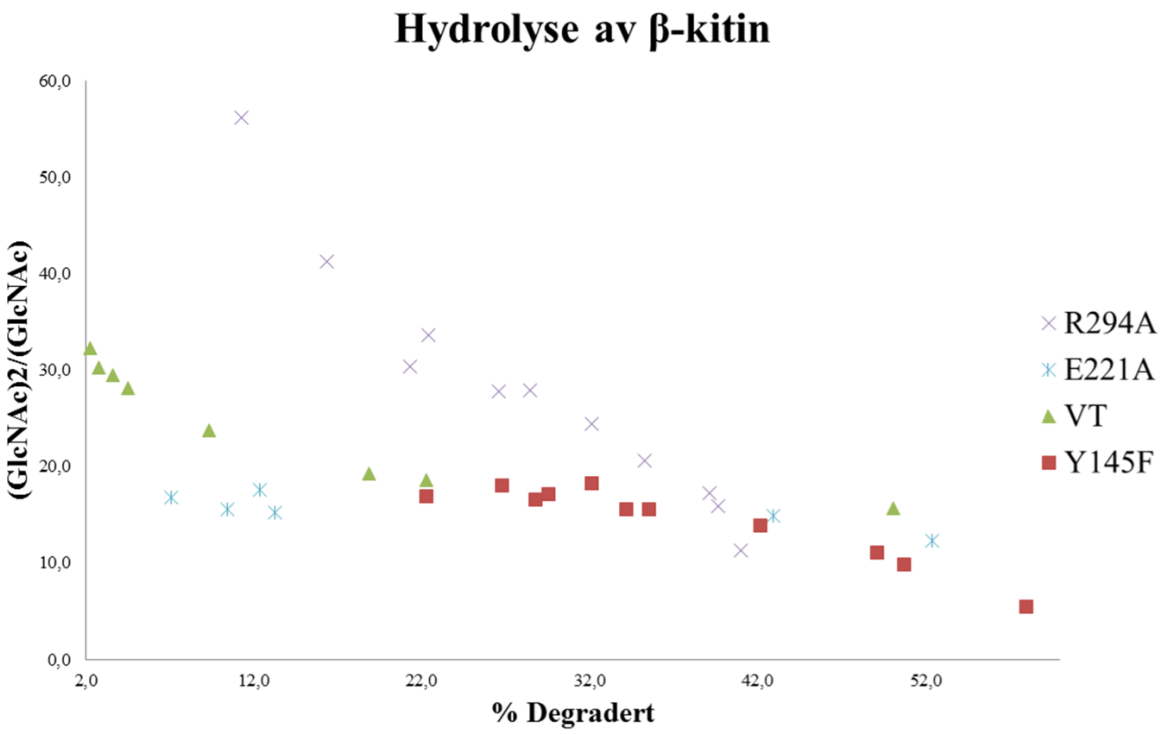
		ADDAA DDAAA
E221A	AD	DA
	A2D	DAA ADA
	A2D2/A3D1	DDAA DADA DAAA ADAA AADA
	A4D1	DAAAA ADAAA AADAA
	A4D2	DDAAAA

* Resultat hentet fra Degradation of chitosans with chitinase B from Serratia marcescens (Sørbotten, A. *et al.* 2005).

4.7 Hydrolyse av β-kitin

Som tidligere beskrevet i avsnitt 3.8 kan hydrolyse av β-kitin gi et bilde på enzymers prosessivitet ved å se på dimer/monomer ratioen $(GlcNAc)_2$/ (GlcNAc). Produktene etter hydrolyse av β-kitin (3 µm) ble på bakgrunn av dette analysert på HPLC. Deretter ble $(GlcNAc)_2$/ (GlcNAc) ratioen plottet mot prosent nedbrutt substrat. Figur 50 viser en samlet oversikt over dette for ChiB villtype og de ulike mutantene.

Beregning av 100 % nedbrutt β-kitin vises i 8. vedlegg.



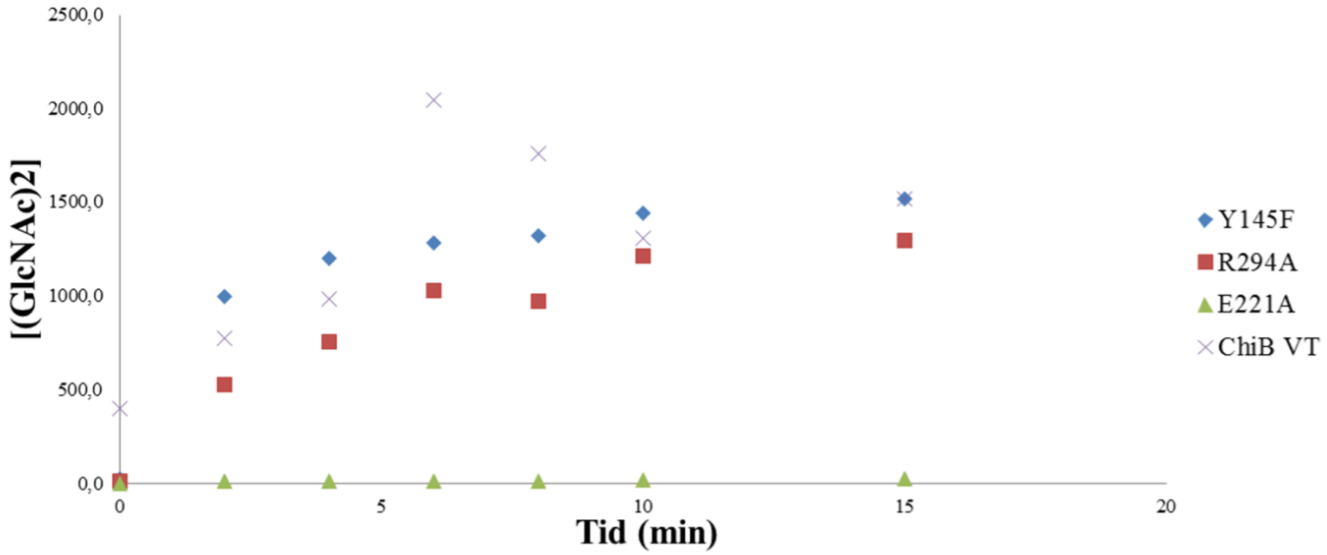
Figur 50: Samlet oversikt over hydrolyse av β-kitin 3 µm, for ChiB villtype, ChiB Y145F, ChiB E221A og ChiB R294A. (GlcNAc)2 / (GlcNAc) ratioen er plottet mot % av degradert kitin.

Når β-kitin hydrolyseres vil $(GlcNAc)_2$ / (GlcNAc) ratioen endres med prosentandelen av degradert substrat. Ved sammenlikning av enzymers prosessivitet må sammenlikning foregå ved å sammenlikne $(GlcNAc)_2$ / (GlcNAc) ratioen ved samme prosent degradert substrat. Tabell 16 viser $(GlcNAc)_2$ / (GlcNAc) mot gitte punkter for % degradert substrat.

Tabell 16: Oversikt over $(GlcNAc)_2$/(GlcNAc) ratio mot prosentandel av nedbrutt β-kitin 3 µm, for ChiB villtype, ChiB Y145F, ChiB E221A og ChiB R294A.

	$(GlcNAc)_2$ / (GlcNAc)			
% Degradert	**ChiB Villtype**	**Y145F**	**E221A**	**R294A**
10	25	22	15,5	51
20	23	20	14	38
30	19	17	13	26
40	16	15	12	12,5
50	11	10	11,5	~ 0

Grad av prosessivitet gir et bilde av enzymers effektivitet og aktivitet. Sammenlikning av konsentrasjonen av $(GlcNAc)_2$ mot tid vil gi mulighet til å sammenlikne enzymenes effektivitet og aktivitet. Figur 51 viser konsentrasjonen av $(GlcNAc)_2$ mot tid for ChiB villtype og de ulike mutantene.



Figur 51: Oversikt over initiell hastighet for ChiB villtype, Y145F, E221A og R294A. Konsentrasjonen (µM) av dimer etter hydrolyse av β-kitin 3 µm er plottet mot tid i minutter.

Den initielle hastigheten kan betegnes som mengde A2 pr minutt. Tallene for ChiB VT og de ulike mutantene er presentert i Tabell 17.

Tabell 17: Oversikt over initiell hastighet for ChiB VT og de ulike mutantene og tilhørende R^2verdier.

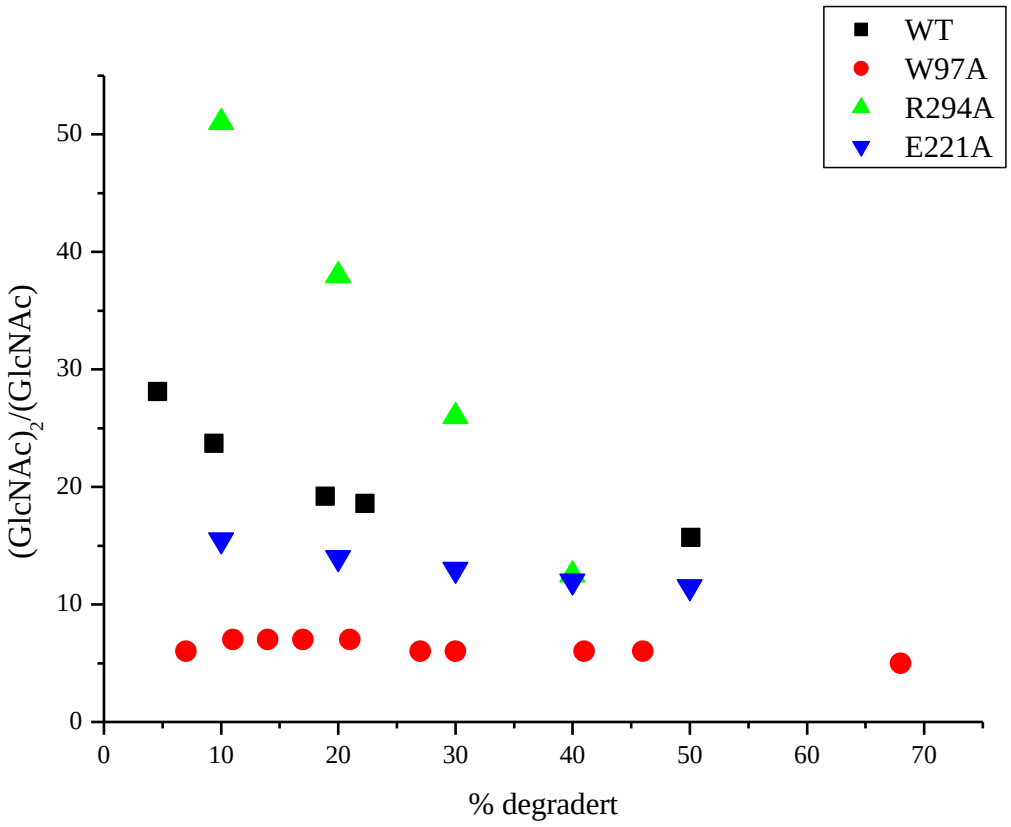
Enzym	**[A2]/min**	**R^2-verdi**
ChiB VT	72	0,40
Y145F	78	0,61
E221A	1	0,75
R294A	78,8	0,81

5 Diskusjon

I denne oppgaven ble det utført prosessivitetsanalyser på tre residuer posisjonert i det aktive setet i ChiB. De polare residuene som ble analysert i denne oppgaven var, Y145 i subsete +1, E221 i subsete +3 og R294 i subsete +1. Disse antas å interagere og binde substratet under hydrolyse og bidra til enzymets prosessivitet. Det ble i disse analysene benyttet enzymets naturlige substrat β-kitin, og kitosan. Målet med oppgaven har derfor vært å studere hvilken effekt polare residuer, posisjonert i det aktive setet hos ChiB har på prosessivitet, effektivitet, aktivitet og substratposisjonering.

5.5 Prosessivitet

Resultatene etter nedbrytning av kitosan og påfølgende analyse ved hjelp av SEC viser at ChiB villtypen gir en klar prosessiv fordelig av oligomerene ved at partallstoppene er høyere enn oddetallstoppene i SEC-kromatogrammet. ChiB mutantene viser også en prosessiv fordeling av oligomerproduktene etter SEC-analysen sammenliknet med en ikke-prosessiv mutant ChiB W97A. SEC-kromatogram fra den ikke-prosessive mutanten illustreres i Figur 40. Etter nedbrytning av β-kitin når A2/A1 ratioen studeres, endres bildet hva gjelder prosessivitet. ChiB-R294A viser en markert økning i grad av prosessivitet sammenliknet med villtypen. ChiB-Y145F er relativ lik villtypen i grad av prosessivitet, ChiB-E221A derimot viser en redusert grad av prosessivitet. Dataene over A2/A1 ratioen som mål på prosessivitet kan tenkes å være et bedre mål på prosessivitet enn kitosandataene, da kitin er det naturlige substratet til kitinaser. Det er svært interessant at polare residuer kan påvirke graden av prosessivitet både positivt og negativt. De samlede resultatene for villtypen- og mutantenes prosessivitet er sammenliknet med ChiB-W97A, en mutant som har vist å ha meget liten grad av gjenværende prosessivitet. Dette illustreres i Figur 52.



Figur 52: Sammenlikning av A2/A1 ratio mot % degradert β-kitin for ChiB VT, ChiB-E221A, ChiB-R294A og ChiB-W97A. ChiB-W97A er en såkalt ikke-prosessiv mutant. Resultatene for ChiB-Y145F er i denne figuren utelatt da de er svært like resultatene for villtypen. Resultatene for ChiB-W97A er hentet fra post.doc. Anne Line Norberg.

5.6 Effektivitet

Effektiviteten mot kitosan er relativt uendret for ChiB mutantene sammenliknet med villtypen. Dette vises ved at nedbrytning av kitosan gir tilnærmet lik α_{maks} for villtypen og de ulike mutantene. ChiB vil ikke oppnå fullstendig nedbrytning da enzymet ikke klarer å bryte ned dimerer. En annen årsak er at en andel av sukkerenhetene i kitosan har en fri amingruppe og ikke en *N*-acetylgruppe og enzymet kan dermed ikke utføre den substratassisterte hydrolysen. At α_{maks} verdiene er relativt like betyr at den katalytiske mekanismen til ChiB er uendret hos mutantene.

Ved nedbrytning av β-kitin observeres det dermed forskjeller i effektivitet når man sammenlikner villtypen og de ulike mutantene. Her vises det at den mest prosessive mutanten ChiB-R294A kun klarer å bryte ned 40 % av substratet. ChiB-Y145F bryter ned ca 57 % mens villtypen og ChiB-E221A oppnår ca. 50 % nedbrutt substrat. Polare resisuer i ChiC fra *S. marcescens*, den katalytiske syren Glu-141 (Payne, C. M. *et al.* 2012) og i ChiB fra *S. marcescens*, Asp-313 (Norberg, A. L. *et al.*)(upubliserte date) er tidligere vist at er svært bevegelige residuer. Disse kan lett gå fra «solvet exposed» konformasjon hvor de peker ut mot løsningen, til katalytisk aktivt kompleks. Disse residuene blir tolket til å spille en viktig rolle i å «hente» substrat inn i det aktive setet og i å holde substratet fast under hydrolyse. Dataene her kan antyde at også mutanten ChiB-R294A kan ha en slik rolle som nevnt ovenfor.

5.7 Aktivitet

Det er tidligere vist at assosiasjon av enzym til polymeren er det hastighetsbestemmende trinnet når det gjelder uløselig substrat. Når substratet er løselig endres det hastighetsbestemmende trinnet til produktfrigjøring fra enzymet (Zakariassen, H. *et al.* 2010). Etter endt hydrolyse skal to produkter frigjøres, både i positive og negative subseter. $(GlcNAc)_2$-4MU og kitosan er i løselige substrater benyttet i denne oppgaven og 4-MU okkuperer subsete +1 og deler av +2 (Krokeide, I.-M. *et al.* 2007). På bakgrunn av dette er det ikke uventet at ChiB-R294A plassert i subsete +1, er raskere enn villtypen på $(GlcNAc)_2$-4MU. Mutasjonen i residuet ChiB-E221 påvirker aktiviteten mot $(GlcNAc)_2$-4MU i liten grad, noe som er forventet da dette residuet ikke interagerer med 4-MU under katalysen. ChiB-

Y145F har svært nedsatt spesifikk aktivitet mot det kunstige substratet $(GlcNAc)_2$-4MU sammenliknet med villtypen.

Tidligere observasjoner tyder på at økt grad av prosessivitet gjør enzymet tregere enn ikke-prosessive enzymer, på substrater som kan degraderes prosessivt (Zakariassen, H. *et al.* 2010). (Horn, S. J. *et al.* 2006a). ChiB-R294A viser seg som sagt å være mer prosessiv enn villtypen, denne mutanten burde da på bakgrunn av argumentasjonen over, være tregere enn villtypen mot kitosan. Resultatene etter degradering av kitosan viser derimot at denne mutanten har en forhøyet aktivitet sammenliknet med villtypen. For E221A observeres ingen store endringer hva gjelder aktivitet mot kitosan. ChiB-Y145F viser derimot å ha lavest aktivitet mot dette substratet.

Den initielle hastigheten i degradering av β-kitin benyttes som mål på aktiviteten mot dette substratet. Den initielle hastigheten er relativt lik for villtypen og mutantene ChiB-R294A og ChiB-Y145F. ChiB-E221A derimot viser nedsatt aktivitet mot sitt naturlige substrat. Dette residuet kan dermed antas å være viktig for substratassosiasjon.

ChiB-Y145F er plassert i subsete +1, tidligere er det vist at det aromatiske residuet tryptofan-97 (W97) som er plassert i subsete +1, styrer prosessiviteten til ChiB, sammen med W220 i subsete +2 (Sørlie, M. *et al.* 2012). Y145 er også plassert rett ved siden av E144 som er den katalytiske syren i ChiB. Når den katalytiske syren muteres til glutamin (E144Q) er det tidligere vist at det resulterer i en inaktiv mutant. For ChiB-Y145F observeres svært nedsatt aktivitet og ChiB-Y145A antas å være inaktiv, det kan derfor tenkes at mutasjon i residuet Y145 fører til nedsatt aktivitet for enzymet.

Enzym	**Spesifikk aktivitet $(GlcNAc)_2$-4MU (nm/min/mg)**	**Aktivitet mot kitosan (α/min)**	**Aktivitet mot kitin ($(GlcNAc)_2$/min)**
ChiB VT	4760	0,002	71,6
Y145F	1847	0,001	78,1
E221A	4244	0,003	1,1
R294A	7971	0,006	78,8

5.8 Substratposisjonering

I kitin er hver monomer rotert 180 ° i forhold til hverandre og det er derfor en interessant tanke å spekulere i at ChiB har residuer i substratbindende subseter som gjenkjenner og orienterer *N*-acetylgruppene før sukkeret bindes i subsete -1. Dette kan gjøres ved interaksjon mot selve *N*-acetylgruppen eller mot OH-gruppen på C6 karbonet på motsatt side. Dette er tidligere observert for ChiA (Norberg, A. L. *et al.* 2011, Reppert, N. 2013). Alle tre undersøkte ChiB residuer danner hydrogenbindingsinteraksjoner til substratet, endten mot *N*-acetylgruppen eller mot C6-OH som beskrevet i 4.1. Ved degradering av kitosan (F_A =0,65), vil fler sukkerenheter mangle *N*-acetylgruppen hvilket vil kunne påvirke posisjonering av substratet. De analyserte oligomerene er et resultat av produktiv binding med kitosan. Det orginale kitosanet hadde en gjennomsnittlig DPn = 1400 sukkerenheter (Heggset, E. B. *et al.* 2010). Sekvensen til disse oligomerene er «tillatte» sekvenser for substratet ved hydrolyse i subsetene -1 til -4 og fra +1 til +4. Tabell 15 viser når man ser på tetramerene at ChiB-VT ikke har en særskilt preferanse for A eller D i subsetene fra +1 til +3. Det samme observeres for de tre studerte mutantene, med unntak at det kan antas at ChiB-E221A har en litt forhøyet preferanse for A i subsete +3.

5.9 Oppsummering

Resultatene fra denne oppgaven viser at polare residuer som har sterke interaksjoner med substratet påvirker enzymets grad av prosessivitet. Det er veldig interessant at det observeres både en økning og reduksjon i grad av prosessivitet. Prosessivitet er enzymers evne til å forbli assosiert med substratet mellom multiple suksessive hydrolytiske kutt. Det har vist seg å være lønnsomt å degradere uløselige polysakkarider som for eksempel kitin med prosessive enzymer som kitinaser. Prosessivitet kommer allikevel med en straff for den enzymatiske hastigheten. Det virker derfor som at det er en balanse mellom grad av prosessivitet og enzymets hastighet og effektivitet. Ved mutasjon av arginin til alanin i residu 294 observeres det en økning i grad av prosessivitet samt en reduksjon i enzymets effektivitet. Ved mutasjon av tyrosin til fenylalanin i residu 145 oppstår det en nedgang i enzymets aktivitet og for mutanten E221A observeres det redusert grad av prosessivitet samt at dette residuet har en viktig rolle i substratposisjonering.

6 Videre studier

Y145A:

Denne mutanten ville vært interessant å få renset. Ettersom dette ikke var mulig på kitinkule kolonnen kan en to stegs rensemetode være aktuell. Dette kan gjøres ved bruk av en anion-ionebytter kolonne for deretter å rense eluenten som inneholder ønsket protein, på en «high interaction»-kolonne (HIC). Videre ville det vært interresant å teste mutantens spesifikke enzymaktivitet mot 4-MU $(GlcNAc)_2$ slik det er utført med de andre ChiB mutantene i denne oppgaven. Dette ville bekreftet eller avkreftet hvorvidt Y145A er inaktiv slik som antatt.

R294Q:

Denne mutanten ble som tidligere beskrevet ikke utført forsøk med da denne felte ut under oppkonsentreringen. Videre arbeid med denne mutanten ville være å prøve fler oppkonsentreringsmetoder. Dette ble ikke gjort i denne oppgaven da tiden ikke strakk til.

Y145A/E144Q, R294Q/E144Q, E221A/E144Q:

Det ville også være svært interessant å analysere de ulike residuenes bindingsstyrke til substratet. Dette utføres ved å lage inaktive mutanter for de samme residuene som er analysert i denne oppgaven. Videre ville disse isoleres ved en tostegs rensprosedyre som nevnt over. Deretter ville de inaktive mutantenes bindingsstyrke til substratet analyseres ved bruk av isotermisk titrerings kalorimetri (ITC).

E221A:

Denne mutanten viste å ha en redusert prosessivitet mot høyacetylert kitosan, og denne trenden kunne muligens komme tydeligere frem ved nedbrytning av lavacetylert kitosan. Bindingsstudier som beskrevet over ved bruk av ITC ville også være nødvendig, for videre å undersøke hvor sterkt denne mutanten binder til substratet.

Y145F:

En videre studie med denne mutanten ville være å utføre nedbrytning av β-kitin og analysert dette på ny, dette for å verifisere at denne mutanten når opp mot 60 % degradert substrat. Bindingsstyrken til denne mutanten ville også som sagt være interresant å undersøke.

R294A:

Denne mutanten ville det som beskrevet over, være interessant å teste bindingsstyrke til substratet ved hjelp av ITC. En inaktiv mutant måtte da brukes og et bilde på hvor sterkt interagerende dette residuet er, ville bli klart.

Det ville i tillegg vært interessant å utføre nye nedbrytningsforsøk på β-kitin for villtypen, for å se på villtypens initielle hastighet med tall som har en bedre R^2-verdi. Videre for å se om denne er raskere eller lik som de ulike mutantene.

7 Referanser

Aalten, D. M. F. v., et al. (2001). "Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exochitinase." PNAS **98**(16): 8979-8984.

Aalten, D. M. v., et al. (2000). "Structure of a two-domain chitotriosidase from Serratia marcescens at 1.9-A resolution." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 5842-5847.

Aam, B. B., et al. (2010). "Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Application in Medicine." Marine Drugs: 1482-1517.

BioRad (2013). "Instruction Manual, Bio-Rad Protein Assay Tilgjengelig fra: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_9004.pdf." Retrieved 04.06.13.

Brurberg, M. B., et al. (2000). "Chitinases from *Serratia marcesscens*." Recent Research Developments in Microbiology.

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

Davies, G., et al. (1995). "Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases." Structure **3**(9): 853-859.

Davies, G. J., et al. (1997). "Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases." Biochemical Journal **321**(2): 557-559.

Downard, K. (2004). Mass Spectrometry, A Foundation Course.

Eijsink, V. G. H., et al. (2008). "Towards new enzymes for biofuels: lessons from chitinase research." Trends Biotechnol **26**(5): 228-235.

Fukamizo, T. (2000). "Chitinolytic enzymes: catalysis, substrate binding, and their application." Current Protein and Peptide Science **1**: 105-124.

Geirbrokk, T., et al. (1984). Kromatografi.

Heggset, E. B., et al. (2010). "Degradation of Chitosans with a Family 46 Chitosanase from Sterptomyces coelisolor A3(2)." Biomacromolecules **11**: 2487-2497.

Henrissat, B. (1991). "A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities." Biochem. J. **280**: 309-316.

Horn, S. J., et al. (2006a). "Costs and benefits og processivity in enzymatic degradation of recalsitrant polysaccharides." PNAS **103**(48): 18089-18094.

Horn, S. J., et al. (2006b). "Endo⁄exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by Serratia marcescens." FEBS Journal **273**(3): 491-503.

Horn, S. J., et al. (2012). "Measuring processivity." Methods in enzymology, **510**: 70-91.

Igarashi, K., et al. (2011). "Traffic Jams Reduse Hydrolytic Efficiency of Cellulase on Cellulose Surface " Science **333**: 1279-1282.

Krokeide, I.-M., et al. (2007). "Natural substrate assay for chitinases using high-performance liquid chromatography: A comparison with existing assays." Analytical Biochemistry **363**: 128-134.

Kurasin, M., et al. (2011). "Processivity of cellobiohydrolases is limited by the substrate." J Biol Chem **286**(1): 169-177.

Mathews, C. K., et al. (2000). Biochemistry Third Edition, Addison Wesley Longman.

Millipore (2013a). "http://www.emdmillipore.com/is-bin/INTERSHOP.enfinity/WFS/Merck-US-Site/en_CA/-/USD/ViewPDF-Print.pdf;sid=Qg2xkrW00WaSkuQMdE7cxR10xY6jYt8TeiOvxAYZYHkP8Ts6bu3SOLOKVVY8L57Nwn6hjrZtvzWYlTx94IkEeRr-Y_mo1nlkcZcJsw2txg4ERQBf7UeQZqzw?RenderPageType=ProductDetail&CatalogCategoryID=AJKb.s1O9eQAAAEjHRx9.zLX&ProductUUID=XQub.s1OpKkAAAEiRohRV1.U&PortalCatalogUUID=ywGb.s1LAyMAAAEWzdUfVhTl." Retrieved lest 05.06.13.

Millipore (2013b). "Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units. Tilgjengelig fra:http://www.millipore.com/catalogue/module/c7715 ". Retrieved lest 02.06.2013.

Norberg, A. L., et al. "Upubliserte resultater."

Norberg, A. L., et al. (2011). "Substrate positioning in chitinase A, a processive chito-biohydrolase from
Serratia marcescens." FEBS Letters **585**: 2339-2344.

Payne, C. M., et al. (2012). "Hallmarks og Processivity in Glycoside Hydrolases from Crystallographic and Computational Studies of the *Serratia marcescens* Chitinases." Journal of Biological Chemistry.

Perrakis, A., et al. (1994). "Crystal Structure og a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution." Structure **2**: 1169-1180.

Reppert, N. (2013). "Masteroppgave."

Rinaudo, M. (2006). "Chitin and chitosan: Properties and applications." Prog. Polym. Sci., **31**(7): 603-632.

Rouvinen, J., et al. (1990). "Threedimensional structure of cellobiohydrolase II from Trichoderma reesei." Science **249**: 380-386.

Rye, C. S., et al. (2000). "Glycosidase Mechanisms." Current Opinion in Chemical Biology **4**(5): 573-580.

Sikorski, P., et al. (2006). "Serratia marcescens chitinases with tunnel-shaped substrate-binding grooves show endo activity and different degrees of processivity during enzymatic hydrolysis of chitosan." Biochemistry **45**(31): 9566-9574.

Suzuki, K., et al. (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): 1075-1083.

Synowiecki, J., et al. (2003). "Production, properties, and some new applications og chitin and its derivatives." Crit.Rev.Food Sci **43 (2)**: 145-171.

Synstad, B., et al. (2004). "Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase." Eur.J.Biochem **271**(2): 253-262.

Sørbotten, A., et al. (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.

Sørlie, M., et al. (2012). "Processivity and substrate-binding in family 18 chitinases." Biocatal.Biotransfor **30**(3): 1-13.

Technologies, A. (2005). "Tilgjengelig fra: https://http://www.genomics.agilent.com/CollectionSubpage.aspx?PageType=Product&SubPageType=ProductData&PageID=384." Retrieved lest 05.06.2013.

Technologies, A. (2013). "QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual Tilgjengelig fra: http://www.chem.agilent.com/library/usermanuals/Public/200523.pdf." Retrieved lest 12.07.13.

Vaaje-Kolstad, G., et al. (2013). "The Chitinolytic machinery of Serratia marcenscens - a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides." FEBS Journal **208**(13): 1-22.

Varrot, A., et al. (2003). "Structural basis for ligand binding and processivity in cellobiohydrolase Cel6A from Humicola insolens. ." Structure **11**: 855-864.

Wierenga, R. K. (2001). "The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes." FEBS Letters **492**(3): 193-198.

Withers, S. G. (2001). "Mechanism of glycosyl transferase and hydrolases." Carbohydrate Polymers **44**(4): 325-337.

Zakariassen, H., et al. (2010). "Signatures of activation parameters reveal substrate-dependent rate determining steps in polysaccharide turnover by a family 18 chitinase." Carbohydrate Polymers **81**: 14-20.

8. Vedlegg

Utregning av 100 % teoretisk nedbrutt β-kitin:

Teoretisk 100 % nedbrutt vil si at alt kitin brytes ned til dimerer.

Mengde β-kitin:

2 mg 3 µm β-kitin

MW Dimer:

$C_{16}H_{28}N_2O_{11}$ = 424,40 g/mol

100 % nedbrutt i antall mol:

$mol = \frac{0{,}002\ g}{424{,}40 \frac{g}{mol}}$ = 4,7 10^{-6} mol

$$C = \frac{n}{v} = \frac{4{,}7 * 10^{-6}}{0{,}001\ L} = 0{,}0047\ M = 4712{,}5\ \mu M$$

100 % nedbrutt = 4712,5 µM