



# Forord

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

Det er mange som fortjener en stor takk for både faglig og personlig støtte under dette arbeidet. Først vil jeg takke min veileder, Morten Sørlie, for både faglig dyktighet og personlig raushet. I det eksperimentelle arbeidet har stipendiat Anne Grethe Hamre og Kristine Eide, som også arbeider med dette forskningsprosjektet, kommet med viktige innspill. Silje Lorentzen som har bidratt med nyttige tips og et kjempe godt miljø på laboratoriet. Stor takk til dere alle.

Det er også mange andre som fortjener en takk, og sin del av æren for at denne oppgaven nå er en realitet. Mine medstudenter Matilde Menkrog Holen og Linn Berge Vormedal må nevnes, og takkes for godt humør og et utrolig morsomt år på labben. Tilslutt vil jeg takke min familie, venner og kjæreste som har støttet meg på så mange måter gjennom denne tiden.

# Innholdsfortegnelse

Sammendrag .....	V
Abstract .....	VII
Forkortelser .....	IX
<b>1 Introduksjon .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Polymerer .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Karbohydrater .....</b>	<b>1</b>
<b>1.3 Kitin .....</b>	<b>3</b>
1.3.1 Anvendelser av kitin og kitosan.....	4
<b>1.4 Glykosylhydrolaser.....</b>	<b>6</b>
1.4.1 Struktur .....	6
1.4.2 Mekanisme.....	8
<b>1.5 Prosessivitet.....</b>	<b>10</b>
<b>1.6 Kitinaser .....</b>	<b>12</b>
1.6.1 Substrat assistert katalyse .....	13
1.6.2 Kitinaser fra <i>Serratia marcescens</i> .....	14
1.6.3 ChiA .....	17
1.6.4 ChiB.....	18
1.6.5 Prosessivitet hos kitinaser .....	20
<b>1.7 Seterettet mutagenese.....</b>	<b>21</b>
<b>1.8 Mål med oppgaven.....</b>	<b>23</b>
<b>2 Materialer .....</b>	<b>24</b>
2.1 Laboratorieutstyr .....	24
2.2 Kjemikalier.....	27
2.3 Proteiner, enzymer, substrater og standarder .....	29
2.4 Bakteriestammer og plasmid .....	30
2.5 Muteringsprimere.....	30
2.6 Sekvenseringsprimere .....	31
2.7 Kit.....	32
2.8 Selvlagde Medier.....	32
2.9 Selvlagde løsninger og buffere.....	34
2.9.1 Løsninger .....	34
2.9.2 Buffere.....	38

2.10 Programvare .....	39
<b>3 Metoder .....</b>	<b>40</b>
3.1 Design av nye mutanter .....	41
3.1.1 Design av primere .....	41
3.1.2 Oppdyrking av frysestock .....	41
3.1.3 Rensing av plasmid ved hjelp av E.Z.N.A Plasmid Miniprep Kit I Spin Protocol .....	42
3.1.4 Måling av plasmidkonsentrasjon ved bruk av Nanodrop (ND-1000) .....	43
3.1.5 Seterettet mutagenese .....	44
3.1.6 Dpn I digestion .....	47
3.1.7 Utfelling av DNA .....	47
3.1.8 Transformering inn i TOP-10 celler .....	48
3.1.9 Tillaging av frysestocker .....	49
3.1.10 Sekvensering .....	49
3.1.11 Databehandling for sekvensering .....	50
3.1.12 Transformering ved bruk av B121 Star™ (DE3) .....	50
3.2 Produksjon av ChiA og ChiB .....	53
3.2.1 Overekspresjon .....	53
3.2.2 Periplasmatisk ekstrakt .....	54
3.3 Isolering av ChiA og ChiB .....	55
3.3.1 Ionebytter kromatografi (IEC): .....	55
3.3.2 Sodium Dodecyl Sulfate-Polyakrylamid Gel Elektroforese (SDS-PAGE) .....	56
3.3.3 Hydrofob Interaksjonskromatografi (HIC) .....	58
3.3.4 Rensing av periplasmatisk ekstrakt på kitinkuler .....	60
3.3.5 Oppkonsentrering av proteinløsning med Amiconrør .....	61
3.3.6 Bestemmelse av proteinkonsentrasjonen ved bruk av Quant-iT .....	61
3.3.7 Bestemmelse av proteinkonsentrasjonen ved bruk av Bio-Rad Protein Assay-Bradford .....	62
3.3.8 Spesifikk enzymaktivitet .....	63
3.4 Enzymatisk hydrolyse av $\beta$ -Kitin .....	64
3.4.1 [GlcNAc] <sub>2</sub> /[GlcNAc] assay .....	64
3.4.2 Tillaging av standarder .....	65
3.5 $k_{cat}/K_M$ .....	66
3.5.1 $k_{cat}/K_M$ .....	66

3.5.2 Tillaging av standarder .....	68
3.6 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) .....	69
3.6.1 Analyse av HPLC data fra enzymatisk hydrolyse av $\beta$ -kitin.....	70
3.6.2 Analyse av HPLC data $k_{cat}/K_M$ .....	70
4 Resultater .....	71
4.1 Residuanalyse.....	71
4.1.1 ChiA .....	74
4.1.2 ChiB.....	75
4.2 Seterettet mutagenese.....	76
4.3 Isolering av aktive enzymer .....	77
4.3.1 Rensing av aktive mutanter på kitinkuler .....	77
4.3.2 SDS-PAGE av aktive enzymer.....	82
4.3.3 Fluorimetrisk bestemmelse av proteinkonsentrasjonen til aktive enzymer ....	83
4.3.4 Spesifikk enzymaktivitet .....	84
4.4 Isolering av enzymer med katalytisk syre Glu mutert til Gln.....	85
4.4.1 Rensing av enzymer med katalytisk syre Glu mutert til Gln.....	85
4.4.2 SDS-PAGE av enzymer med katalytisk syre Glu mutert til Gln.....	87
4.5 Bestemmelse av $k_{cat}$ og $K_M$ ved bruk av et HPLC assay .....	89
4.6 Hydrolyse av $\beta$ -kitin .....	99
5 Diskusjon.....	103
5.1 Kinetisk signatur på direksjonalitet og prosessivitet for aromatiske residuer ....	103
5.2 Kinetisk signatur på prosessivitet for et polart residu .....	107
5.3 Andre residuer .....	108
5.4 Forholdet mellom $[GlcNAc]_2/[GlcNAc]$ som et mål på grad av prosessivitet.....	109
5.5 Veien videre.....	113
6 Referanser .....	114
7 Vedlegg .....	119
7.1 Utregning av prosent teoretisk nedbrytning av $\beta$ -kitin.....	119
7.2 Resultater fra nedbrytningsassay ved hjelp av HPLC.....	120

## Sammendrag

Denne oppgaven er skrevet som en del av et større forskningsprosjekt hvor målet er å utvikle enzymer som degraderer den uløselige krystallinske polymeren kitin. I denne oppgaven var målet å studere effekten utvalgte residuer rundt det aktive setet for to familie 18 kitinaser, kitinase A (ChiA) og kitinase B (ChiB) fra *Serratia marcescens* har på prosessivitet og direksjonalitet.

Den enzymatiske nedbrytningen av de nært beslektede uløselige polysakkaridene cellulose  $\beta$ -1-4- linket glukose av cellulaser og kitin  $\beta$ -1-4- linket *N*- acetylglucosamine av kitinaser er av stor biologisk og økonomisk betydning. Prosessive enzymer med ulike iboende direksjonaliteter, det vil si angripe polysakkaridkjedene fra motsatt ender, er avgjørende for effektiviteten av denne nedbrytningsprosessen. Mens prosessive cellulaser med komplementære funksjoner varierer i struktur og katalytisk mekanisme, tilhører prosessive kitinaser en enkel proteinfamilie med lik aktiv sete arkitektur. Ved hjelp av det unike modellsystemet som disse kitinasene gir, viser vi her at forskjellige direksjonaliteter er korrelert til distinkte forskjeller i kinetiske signaturer.

Her har vi fastslått  $k_{cat}$  og  $K_M$ -verdier ved hjelp av oligomeren tetra-*N*-acetyl chitotetraose for kitinase A villtype (prosessive fra den reduserende ende) og kitinase B villtype (prosessive fra den ikke-reduserende ende) fra *Serratia Marcescens*. Deres tryptofan (Trp/W) til alanin (Ala/A) mutanter i det kritiske +1 subsetet, som er henholdsvis produkt dissosiasjonsbindings- og substratbindings subseter i den prosessive hydrolysen. I kitinase A resulterer Trp til Ala mutasjonen en 4 x reduksjon i  $k_{cat}$  og en 17 x økning i  $K_M$  som i stor grad avviker fra det som er observert for kitinase B med en 5 x økning i  $k_{cat}$  og en 200 x økning i  $K_M$ . Lignende, men mindre effekter er observert i +2 subsetene. Vi tror at det er direksjonaliteten som reflekteres i disse kinetiske signaturene.

Prosessiv enzymatisk nedbrytning av kitin gir normalt mer  $[GlcNAc]_2$  enn  $[GlcNAc]$  som sluttprodukter. I denne oppgaven overvåket vi  $[GlcNAc]_2/[GlcNAc]$  forholdet som en funksjon av grad av polymerdegradering. Både ChiA villtype og ChiB villtype ble sammenlignet og resultatene viste at ChiA var mer prosessiv en ChiB ved de initielle punktene, mens ved endepunktene hadde ChiB en høyere  $[GlcNAc]_2/[GlcNAc]$  forhold enn ChiA. Det ble også vist at tryptofan til alanin mutanter for ChiB (W97A og W220A i henholdsvis +1 og +2 i substratbindings subsetene) gav en redusert prosessivitet (W97A mer enn W220A). Sammenlikning av ChiA W167A og ChiA W275A mot villtype var ikke i

overensstemmelse med andre prosessvitetsmålinger hvor kitosan var substratet, noe som indikerer at opprinnelsen til substratet kan være av betydning.

## Abstract

This masterthesis is written as part of a larger research project where the overall aim is to develop enzymes that efficiently degrade the insoluble polymer chitin. The goal was to study the effect selected residues around the active site of two family 18 chitinases, chitinase A (ChiA) and chitinase B (ChiB) of *Serratia marcescens* have on processivity and directionality.

The enzymatic degradation of the closely related insoluble polysaccharides cellulose  $\beta$ -1–4-linked glucose by cellulases and chitin  $\beta$ -1–4-linked *N*-acetylglucosamine by chitinases is of large biological and economical importance. Processive enzymes with different inherent directionalities, i.e. attacking the polysaccharide chains from opposite ends, are crucial for the efficiency of this degradation process. While processive cellulases with complementary functions differ in structure and catalytic mechanism, processive chitinases belong to one single protein family with similar active site architectures. Using the unique model system that these chitinases provide, we show here that different directionalities are correlated to distinct differences in the kinetic signatures.

Here, we have determined  $k_{\text{cat}}$  and  $K_{\text{M}}$  values using oligomeric tetra-*N*-acetyl chitotetraose for chitinase A WT (processive from the reducing end) and chitinase B WT (processive from the non-reducing end) from *Serratia marcescens* and their Trp to Ala mutants in the crucial +1 subsite, which are product release and substrate binding subsites, respectively, in processive hydrolysis. In chitinase A, the Trp to Ala mutation results in a 4-fold *reduction* in  $k_{\text{cat}}$  and 17-fold increase in  $K_{\text{M}}$  that greatly differs from what is observed for chitinase B with a 5-fold *increase* in  $k_{\text{cat}}$  and a whopping 200-fold increase in  $K_{\text{M}}$ . Similar, but smaller effects are observed in the +2 subsite. We believe that is the directionality of enzymes that are reflected in these kinetic signatures.

Processive enzymatic degradation of chitin normally yield more  $[\text{GlcNAc}]_2$  than  $[\text{GlcNAc}]$  as end products. In this thesis, we monitored the  $[\text{GlcNAc}]_2/[\text{GlcNAc}]$  ratio as a function of the extent of polymer degradation. Both ChiA WT and ChiB WT were compared and the results showed that ChiA was more processive than ChiB at initial points while looking at end points alone ChiB yielded a higher  $[\text{GlcNAc}]_2/[\text{GlcNAc}]$  ratio than ChiA. It was also shown that tryptophan to alanine mutants of ChiB (W97A and W220A, respectively in +1 and +2 substratebinding subsites) showed a reduced degree of processivity (W97A more than W220A). Comparison of W167A and W275A against ChiA WT was not consistent with other



processivity measurements where chitosan was the substrate indicating that the origin of the substrate may be of importance.

## Forkortelser

Forkortelse	Definisjon
°C	Grader (celsius)
µg	Mikrogram
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
4-MU	4-metylumbelliferyl
4-MU-[GlcNAc] <sub>2</sub>	4-metylumbelliferyl-β-D-N,N'-diacetylchitobiose
Arg (R)	Arginin
Asp (D)	Asparaginsyre
BSA	Bovin Serum Albumine
ChiA	Kitinase A
ChiB	Kitinase B
ChiC	Kitinase C
Da	Dalton
dH <sub>2</sub> O	Destillert vann
ddH <sub>2</sub> O	Dobbeltdestillert vann
DNA	Deoksyribonukleinsyre
dsDNA	Dobbeltrådet deoksyribonukleinsyre
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
GH 18	Glykosylhydrolase familie 18
GlcNAc	<i>N</i> -acetylglukosamin
Glu (E)	Glutamat
Gln (Q)	Glutamin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Kb	Kilobaser
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
M	Molar (mol/L)
Mg	Milligram
mL	Milliliter

<b>Forkortelse</b>	<b>Definisjon</b>
<b>mM</b>	Millimolar (mmol/L)
<b>Mops</b>	3-(N-morfolin) propansvovelsyre
<b>MW</b>	Molekylvekt
<b>ng</b>	Nanogram
<b>Nm</b>	Nanometer
<b>PMSF</b>	Phenyl-methyl sulfonylfluorid
<b>Pr</b>	Per
<b>RNA</b>	Ribonukleinsyre
<b>Rpm</b>	Rotasjon per minutt
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium Dodecyl Sulfate Polyakrylamide Gel Elektroforese
<b>Thr (T)</b>	Threonin
<b>Trp (W)</b>	Tryptofan
<b>WT</b>	Villtype
<b>Å</b>	Ångstrøm (0,1 nm)

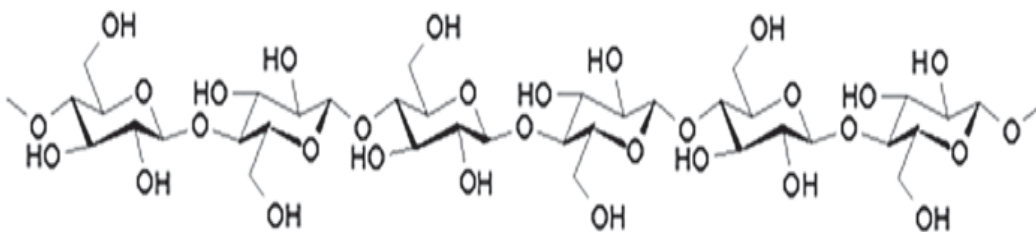
# 1 Introduksjon

## 1.1 Polymerer

Polymerer eller makromolekyler, er store molekyler som er bygget sammen med repetitive enheter. Slike polymerer kan være syntetiske eller naturlige. De viktigste naturlige polymerene er karbohydrater (cellulose, stivelse), proteiner og nukleinsyrer (DNA, RNA) (Hart 2007).

## 1.2 Karbohydrater

Karbohydrater er essensielle byggesteiner for alt liv på jorden. Karbohydrater kjennetegnes ved at de inneholder karbonatomer og 2 funksjonelle grupper; hydroksylgrupper (-OH) og karbonylgrupper (-CO). Plantenes konvertering av atmosfærisk karbondioksid gjennom fotosyntesen gir i hovedsak karbohydratene: cellulose, stivelse og sukker. Karbohydrater har utallige formål, der de for eksempel fungerer som energikilde i alle levende organismer, er strukturmateriale i planter/insekter, celledifferensieringskomponent, involvert i celleinteraksjon og er involvert i oppbygningen av DNA/RNA (Hart 2007). Molekylstrukturen til cellulose er vist i figur 1.



**Figur 1.** Molekylstrukturen til cellulose (Sorlie et al. 2012).

Karbohydrater blir klassifisert etter deres strukturer som monosakkarider, oligosakkarider og polysakkarider. Den enkleste formen for et karbohydrat er et monosakkarid, og denne kan ikke hydrolyseres til mindre deler. Et polysakkarid inneholder flere enheter av monosakkarider. I naturen finnes 3 store polysakkaridformer, cellulose, stivelse og glykogen (Hart 2007).

Disse formene inneholder bare glukoseenheter, men de er forskjellige fra hverandre når det kommer til ringposisjonen av bindingen dem imellom, orienteringen av visse bindinger og deres utstrekning av forgreninger. Andre polysakkarider inneholder andre funksjonelle grupper som nitrogen (Silberberg 2009).

Cellulose er den organiske forbindelsen som det finnes mest av i naturen. Cellulose består av glukoseenheter som er uforgrenet og er bundet sammen med  $\beta$ -1-4- glykosidbinding. Dette lineære molekylet inneholder i gjennomsnitt 5000 glukose monomerenheter og danner hydrogenbindinger mellom hydroksylgrupper på nabokjeder. Disse bindingene gjør at cellulosefibre kan få betydelig fysisk styrke, når de blir tvunnet i motsatt retning rundt en sentral akse. Bomull, hamp, lin og tre er eksempler på celluloseprodukter (Hart 2007). Mennesker innehar ikke enzymene som behøves for nedbrytning av cellulose, men mikroorganismer som forekommer i tarmsystemer til forskjellige dyr har muligheten til å bryte ned slike polymerer.

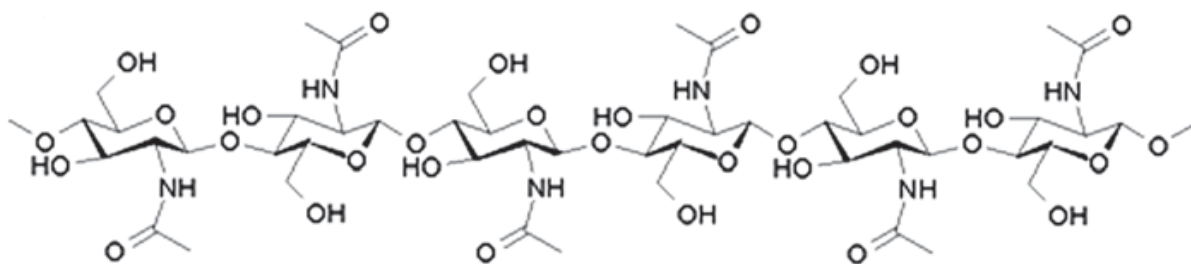
Det har blitt funnet forskjellige former for cellulose, der forskjellen ligger i pakking av polymerene. I cellulose I er kjedene pakket parallelt, slik at alle de reduserende endene peker i samme retning. I cellulose II er disse kjedene pakket antiparallelt (Eijsink et al. 2008).

Stivelse består av glukoseenheter som er bundet sammen ved hjelp av  $\alpha$ -1-4- glykosidbindinger. I tillegg har kjedene forgreninger som er bundet sammen av  $\alpha$ -1-6- glykosidbindinger. Stivelse er karbohydratet for energilagring til planteceller. Når celler trenger energi, så hydrolyseres bindingene mellom glukoseenheter slik at glukose kan frigjøres og oksideres gjennom en trinnvis metabolsk vei. Stivelse kan separeres i to fraksjoner: amylose og amylopectin. Amylopektin er den formen med flest forgreninger og inneholder rundt 300-500 glukoseenheter som er linket sammen med  $\alpha$ -1-4- og  $\alpha$ -1-6- glykosidbindinger. Amylose består bare av glukose som er bundet sammen i en rett kjede av  $\alpha$ -1-4- glykosidbindinger (Hart 2007).

Glykogen er energilagringssystemet for dyr. Som i stivelse, er også glykogen ordnet slik at glukosemolekylene er bundet sammen gjennom  $\alpha$ -1-4- og  $\alpha$ -1-6- glykosidbindinger. Glykogen består av flere forgreninger enn amylopektin og har dermed mye større molekylvekt enn stivelse. Glykogen har forgreninger ved hvert 8-12 glukoseenhet på hovedkjeden (Hart 2007).

### 1.3 Kitin

Det vanligste nitrogenbærende organiske stoffet i naturen, er kitin. Denne polymeren finnes blant annet i eksoskjelettet til insekter, skallet på krepsdyr og i celleveggene til sopp. Kitin er en uløselig lineær polymer bestående av  $\beta$ -1-4-linket *N*-acetylglucosamine residuer [(GlcNc)<sub>n</sub>], som er rotert 180° relativt til naboliggende monomerer (Brurberg 2000; Jollès & Muzzarelli 1999; Zakariassen et al. 2009). Kitin har flere likhetstrekk med cellulose, der forskjellen ligger i at cellulose har en hydroksylgruppe (-OH) ved C-2 atomet, har kitin en acetylamino gruppe (CH<sub>3</sub>CONH-) (Hart 2007). Molekylstrukturen til kitin er vist i figur 2.



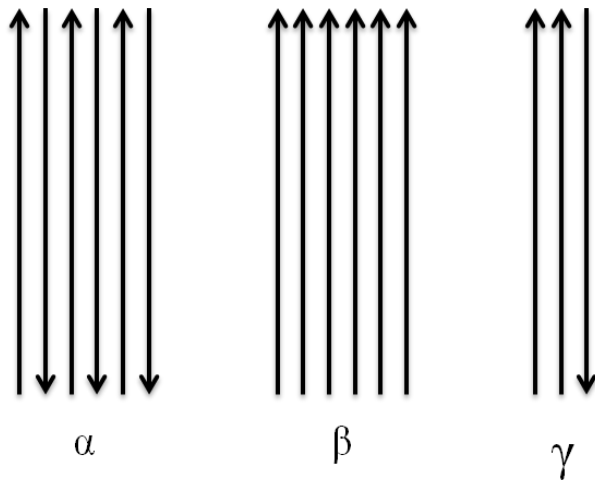
**Figur 2.** Molekylstrukturen til kitin (Sorlie et al. 2012) .

Kitin eksisterer i forskjellige polymorfe former. Etter syntese av kitin, assosieres kjedene sammen ved hjelp av hydrogenbindinger. Bindingene finner sted mellom -NH grupper på en kjede og -C=O grupper på nabokjedene (Synowiecki & Al-Khateeb 2003). De krystallinske strukturene er forskjellige fra hverandre med hensyn på pakking og polariteten til GlcNAc kjedene. Formene som kitin eksisterer i er  $\alpha$ -,  $\beta$ - og  $\gamma$ -kitin (Synowiecki & Al-Khateeb 2003). Hvorfor kitin kan krystallisere seg til tre forskjellige former er fortsatt ukjent, men det er mulig at prosessen involverer nærvær av en forbindelse som påvirker krystalliseringen (Jollès & Muzzarelli 1999).

Kitin finnes i tre krystallinske former i naturen.  $\alpha$ -kitin er den formen det finnes mest av og som i tillegg er den mest stabile.  $\alpha$ -kitin dannes når kjedene er ordnet antiparallelt i forhold til hverandre og på grunn av dette vil kjedene ordnes lagvis. Det vil dannes sterke intermolekulære hydrogenbindinger mellom kjedene (Synowiecki & Al-Khateeb 2003).

$\beta$ -kitin dannes når kitinkjedene er ordnet parallelt mot hverandre.  $\beta$ -kitin vil ikke være like stabilt, og dette skyldes at kjedene ikke danner like mange intermolekulære hydrogenbindinger, som skyldes retningene på kitinkjedene (Jollès & Muzzarelli 1999; Synowiecki & Al-Khateeb 2003).

$\gamma$ -kitin dannes når to kitinkjeder er ordnet parallelt, mens den tredje kjeden er antiparallelt orientert. Denne krystallinske formen er kontroversiell (Synowiecki & Al-Khateeb 2003). De forskjellige polymorfe formene for kitin er vist i figur 3.



**Figur 3.** Forskjellige polymorfe former for kitin.  $\alpha$ -kitin dannes når kjedene er ordnet antiparallelt i forhold til hverandre. Når kitinkjedene er ordnet parallelt dannes  $\beta$ -kitin. Når to kitinkjeder er ordnet parallelt, mens den neste er ordnet antiparallelt dannes  $\gamma$ -kitin (Schaupp 2013).

### 1.3.1 Anvendelser av kitin og kitosan

Forskjellige kjemiske modifikasjoner kan utføres for å forstyrre inter- og intramolekulære hydrogenbindinger i kitin, uten å bryte glykosidbindingene. Den enkleste modifikasjonen er ved å deacetylere kitin, slik at det dannes kitosan. Kitosan er det derivatet som er mest brukt og dette skyldes dens høye molekylvekt, polyelektrolytt egenskaper, reaktive funksjonelle grupper, geldannelses egenskaper og adsorpsjonskapasitet (Synowiecki & Al-Khateeb 2003).

Spesifikke egenskaper til kitin og dens derivater gir en mengde anvendelser innenfor forskjellige industrier. Kitin er nontoksisk og er et bionedbrytbart polysakkarid som brukes mye blant annet innenfor medisinvitenskapen. Introduksjon av kitin i menneske- og dyrekropp har vist seg å være nyttig i leging av forskjellige sykdommer og i forebygging av sykdom (Synowiecki & Al-Khateeb 2003). Det har vært stor utvikling når det kommer til å bruke kitinfilmer og fibre i medisinsk- og farmasøytiskindustri. Slike komponenter brukes som bandasje mot sår og som materialet for kontrollert frigjøring av medikamenter. Kitin brukes som hjelpestoff og som medikamenttransportør i filmer, geler og pulverform.

En interessant anvendelse er å bruke kitin som et beinfyllmateriale, som danner et selvherdende lim for regenerering av vev i behandling av defekter i skjelett (Rinaudo 2006). Kitin brukes også for regenerering av vev, der biopolymeren fungerer som et ”stilas” som cellene kan vokse på (Wan & Tai 2013).

Innenfor kosmetikk brukes kitosan i tannkremer, hårprodukter og i hånd- og kroppskremer. Ved å forandre på grad av deacetylering og molekylvekt kan kitosan gi en fuktighetsgivende effekt på hud. Derfor anvendes forbindelsen mye i hånd- og kroppskremer. Ved påføring av slike kremer vil kitosan danne en film på huden som har antiseptiske egenskaper og vil beskytte mot mikrobiellinfeksjoner (Synowiecki & Al-Khateeb 2003). Ved å anvende kitosan i hårprodukter oppnår man redusert statisk elektrisitet (Rinaudo 2006). Kitosan danner hydrogeler som forsegler dentinal tubules i tennene og beskytter mot mikrobiell infeksjoner, samtidig som den tillater diffusjon av ioner og vann (Synowiecki & Al-Khateeb 2003).

Kitosan anvendes innenfor landbruk, matpreservering og i tekstilindustrien. Kitosan som stammer fra noen sopp- og krepsarter viser en inhiberingseffekt på patogene mikroorganismer, som samtidig induserer resistans mot sopp-, virale- og viruslignende infeksjoner i planter. Denne resistansen mot soppinfeksjoner skyldes induksjon av stoffet phytoalexin, som hemmer veksten av sopp.

Tilsetning av kitin til landbruk vil redusere antallet plantesykdommer og skyldes vekst av kitolytiske bakterier som vil hydrolysere celleveggene til plantepatogener (Synowiecki & Al-Khateeb 2003).

Kitin og dens derivater blir brukt i tekstilindustrien til overflatebehandling av cellulose, nylon, bomull og ullfibre. Tilsetning av kitin i vanntette tekstiler medfører stor økning i tekstilets permeabilitet for vanndamp (Synowiecki & Al-Khateeb 2003).



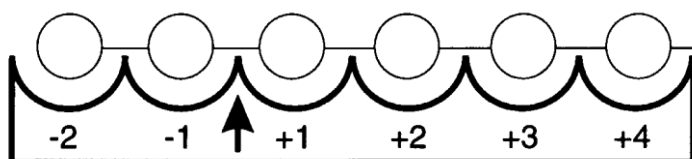
## 1.4 Glykosylhydrolaser

Glykosylhydrolaser er enzymer som hydrolyserer glykosidbindingene mellom suktermolekyler, eller mellom suktermolekyler og en ikke-karbohydrat forbindelse (Davies & Henrissat 1995). Nedbrytning av polysakkarider er en utbredt biologisk aktivitet, og skyldes dens sentrale rolle i energisyklusen. Et stort antall enzymer har utviklet evnen til å katalysere hydrolysen av glykosidbindinger. Enzymer som er involvert i nedbrytning av sukkerbaserte polymerer er cellulaser, kitinaser, kitosanaser og lysozymer (Jollès & Muzzarelli 1999). Nedbrytning av polysakkarider til oligomerer og monomerer er ikke bare viktig i energisyklusen til levende organismer, den er også viktig i celleveggsyntese, lagring og celledifferensiering.

Glykosylhydrolaser har blitt kategorisert etter deres aminosyresekvens til 133 familier (februar 2014). Siden konservering av aminosyresekvensen indikerer strukturell likhet, er denne klassifiseringen også korrelert med struktur og funksjon til disse enzymene (Henrissat 1991). Databasen Carbohydrate Active Enzymes (CAZy) beskriver familiene til strukturelle moduler av enzymer som hydrolyserer glykosidbindinger (Carbohydrate Active Enzymes (CAZy) 2013).

### 1.4.1 Struktur

Strukturen til mange glykosylhydrolaser består av forskjellige domener. Det aktive setet er lokalisert i det katalytiske domenet. I tillegg finnes det også en eller flere ikke-katalytiske domener. Disse kan være involvert i binding av substrat, men de fleste har ukjent funksjon (Davies & Henrissat 1995). Det er hensiktsmessig å ha en nomenklatur for disse subsetene. Subsetene i det katalytiske domenet nummereres fra -n til +n, der -n indikerer at subsetene er lokalisert på den ikke-reduserende enden, mens +n indikerer at subsetene er på den reduserende enden. Hydrolyse av glykosidbindingen finner sted mellom subsetene -1 og +1 (Davies et al. 1997). De sukkerbindende subsetene i glykosylhydrolaser er vist i figur 4.



**Figur 4.** Skjematisk tegning av sukkerbindende subsetene i glykosylhydrolaser, der -n, +n systemet er brukt (Davies et al. 1997).

Det aktive setet i det katalytiske domenet kan bestå av tre forskjellige topologier. Strukturene kan være lomme-, kløft- eller tunnelstruktur. Enzymets struktur rundt det aktive setet er en avgjørende faktor for hvordan hydrolyse av glykosidbindinger forekommer. Enzymer kan enten være endo- eller eksoaktive. Endoaktive enzymer vil katalysere hydrolyse av glykosidbindinger ved tilfeldige steder på polymerkjeden og vil på grunnlag av dette ha en mer åpen struktur rundt det aktive setet. Eksoaktive enzymer vil katalysere nedbrytingen av polymerkjeden langs den ikke-reduserende eller reduserende ende. Disse katalysatorene vil ha en mer lukket struktur rundt det aktive setet, slik som kløft- og tunnel topologien (Davies & Henrissat 1995). De forskjellige topologiene er vist i figur 5.

### **Lomme/krater topologi**

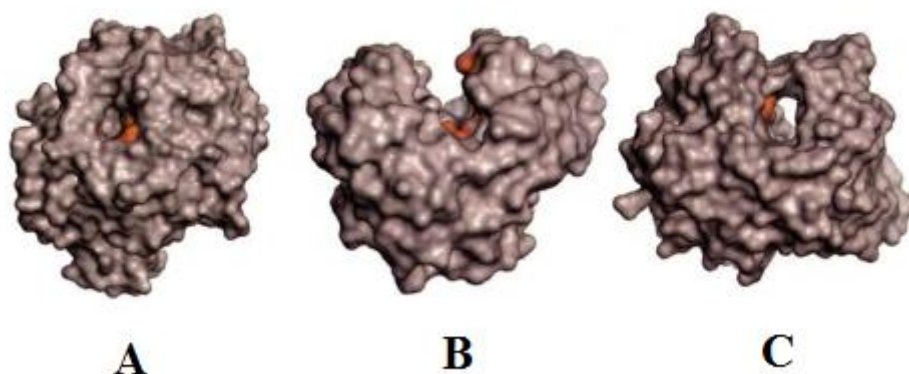
Lomme/krater er en optimal topologi for gjenkjennelse av sakkarider som har mange tilgjengelige ender på overflaten. Denne topologien brukes blant annet av  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucosidase og  $\beta$ -amylase, og disse enzymene innehar eksoaktivitet. Enzymer med denne fasongen er ikke effektive når det gjelder substrater med fiberliknende strukturer, slik som cellulose (Davies & Henrissat 1995).

### **Kløft topologi**

Denne topologien har en åpen struktur rundt det aktive setet, som resulterer i tilfeldige bindinger av flere sukkerenheter i ulike polymeriske substrat. Denne topologien finnes som oftest i endoaktive enzymer, slik som endocellulaser, lysozymer og kitinaser (Davies & Henrissat 1995).

### **Tunnel topologi**

Topologien er en videreutvikling av kløft strukturen, der lange loops dekker deler av det aktive setet. Denne tunnelformen gjør det mulig for polysakkaridkjeder å bli tredd igjennom det aktive setet. Tunneltopologien gjør det mulig for enzymet å være bundet til polysakkaridkjeden samtidig som enzymet frigir produkt, som resulterer i effektivitet i form av prosessivitet. Enzymer med denne topologien er egnet til å hydrolysere fra enden av substratet (Davies & Henrissat 1995).



**Figur 5.** Oversikt over de forskjellige topologiene til det aktive setet hos glykosylhydrolaser. A) viser lommestruktur, B) viser kløftstruktur og C) viser tunnelstruktur. Det aktive setet med de katalytiske residuene er merket med rødt (Davies & Henrissat 1995).

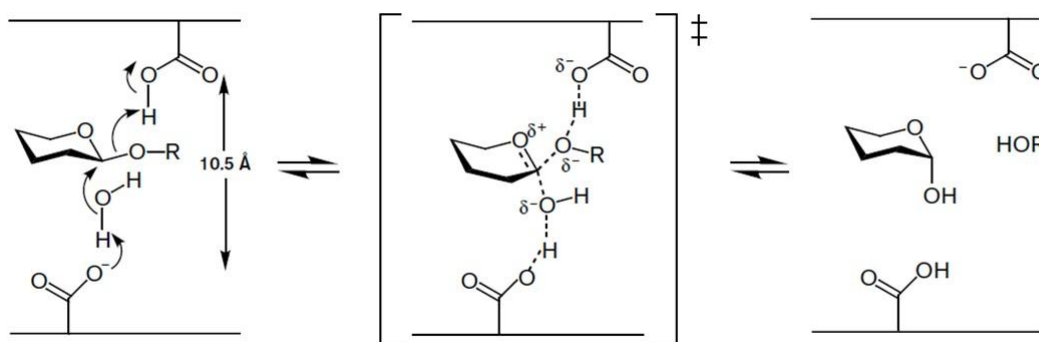
#### 1.4.2 Mekanisme

Hovedoppgaven til glykosylhydrolaser er å katalysere hydrolyse av  $\beta$ -glykosidbindingen mellom GlcNAc enheter. Generelt sett kan hydrolysen skje på to måter, enten så bevares (retensjon) eller så forekommer en inversjon av den anomere konfigurasjonen. Detaljene rundt mekanismene til glykosylhydrolasene har blitt grundig studert. Det er 2 karboksylsyre residuer som er ansvarlig for katalyse av glykosidbindingene i det aktive setet. Disse essensielle residuene vil oppføre seg som en katalytisk syre og en katalytisk base/nukleofil (Davies & Henrissat 1995; Jollès & Muzzarelli 1999).

I begge mekanismene har den protondonerende syren identisk avstand til glykosidbindingen, slik at de kan danne hydrogenbindinger med oksygenet. Avstanden fra dette oksygenet til den nukleofile basen derimot vil variere avhengig av hva slags mekanisme som benyttes. I den bevarende mekanismen vil residuet være  $\approx 5,5$  Å unna det anomeriske karbonatomet, mens i den inverterende vil aminosyren være  $\approx 11$  Å unna (Davies & Henrissat 1995; Withers 2001).

### 1.4.2.1 Inverterende Mekanisme

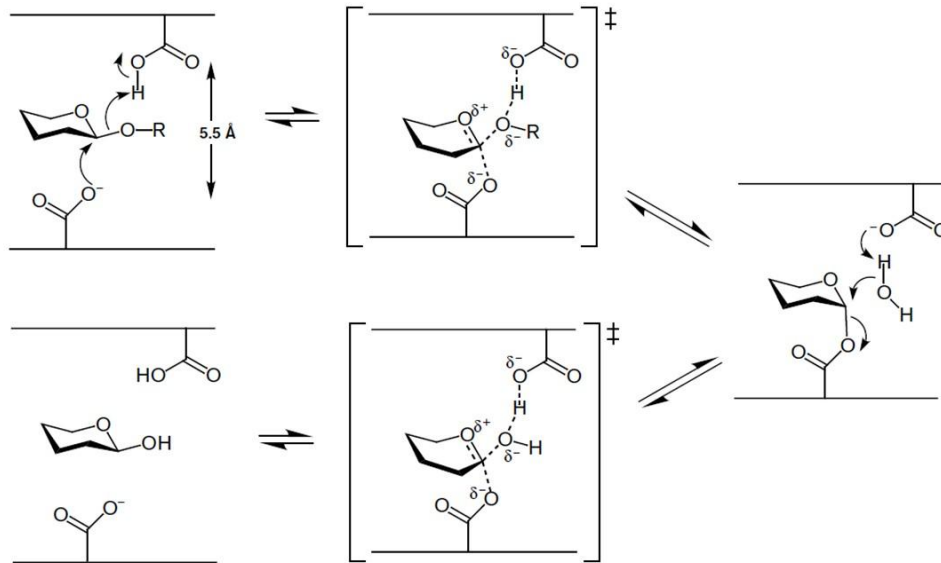
Inverterende glykosidaser bruker *direct displacement mechanism* som går via en positivt ladet oksokarbeniumintermediat. Dette molekylet vil ha en "halv-stol" lignende konfigurasjon sammenlignet med stol konfigurasjonen som er vanlig for sakkarider. Den inverterende mekanismen er vist i figur 6. Mekanismen starter ved at karboksylsyre residuet donerer et proton til oksygenet på det utgående sakkaridet. Et vannmolekyl blir deretter polarisert av den nukleofile basen og angriper det anomere karbonatomet. Dette resulterer i at sakkaridet får en invers geometri (Davies & Henrissat 1995; Jollès & Muzzarelli 1999).



**Figur 6.** Inverterende mekanisme for  $\beta$ -glykosidaser som endrer konfigurasjonen til det anomere karbonet (Withers 2001).

### 1.4.2.2 Bevarende Mekanisme

Bevaring av den anomere konfigurasjonen skjer via en *double displacement mechanism* (Davies & Henrissat 1995). Mekanismen starter ved at den katalytiske syren protonerer oksygenet på den utgående alkoholgruppen. Samtidig vil den andre katalytiske syren foreta et nukleofilt angrep på det anomere karbonatomet. Det dannes da et substrat-enzym kompleks. I andre steg av reaksjonen vil den første karboksylsyren nå fungere som en nukleofil og deprotonere et vannmolekyl. Vannmolekylet angriper substrat-enzym komplekset og spalter av substratet. Dermed oppnås en nukleofilsubstitusjon ved det anomere karbonatomet som ivaretar stereokjemien til substratet (Davies & Henrissat 1995; Jollès & Muzzarelli 1999). Den bevarende mekanismen er vist i figur 7.



**Figur 7.** Bevarende mekanisme for  $\beta$ -glykosidaser. Konfigurasjonen rundt det anomere karbonatomet bevares (Rye & Withers 2000).

## 1.5 Prosessivitet

Strukturelle polysakkarider, slik som cellulose og kitin finnes typisk i uløselige polymerkrystaller som benyttes som komponenter i for eksempel plante-, sopp- og algecellevegger. Mikroorganismer har utviklet et spesielt enzymatisk maskineri for nedbryting av slike polysakkarider til løselige sukkerenheter for energi. Disse enzymblandinger inneholder primært forskjellige glykosylhydrolaser som jobber synergistisk for å bryte glykosidbindingene mellom sakkariidene effektivt (Beckham 2013; Payne et al. 2012). Enzymmiksen vil inneholde glykosylhydrolaser som er prosessive og ikke-prosessive mot det uløselige substratet samt oksidative enzymer som kan kutte glykosidbindinger (Payne et al. 2012; Vaaje-Kolstad et al. 2010).

Prosessivitet er evnen til å forbli bundet til et krystallinsk substrat mellom hydrolytiske reaksjoner (Divne et al. 1994; Rouvinen et al. 1990; Stahlberg et al. 1996). Prosessiv nedbrytning antas å forbedre den katalytiske effektiviteten, fordi den hindrer polymerkjeden i å reasosiere med det uløselige substratet mellom katalytiske kutt. Dette vil dermed redusere antallet ganger enzymet må utføre den energetisk ugunstige prosessen med å binde seg til en enkel polymerkjede (Sorlie et al. 2012; Zakariassen et al. 2009).

Prosessive enzymer har som oftest lange og dype substratbindingskløfter som lukker seg rundt substratet.

Disse substratbindingskløftene er pakket med aromatiske residuer, særlig tryptofan, og påvirker prosessivitet ved å virke som et hydrofobisk lag som polymerkjeden "glir" på mellom hydrolytiske trinn (Rouvinen et al. 1990). Dette hydrofobiske laget dannes når de aromatiske residuene og sakkariidringene er orientert plant i forhold til hverandre.  $\pi$  elektronene på aminosyrene danner CH-  $\pi$  interaksjoner med sukkerringene (Quioco et al. 1989; Umezawa & Nishio 1998). Den hydrofobiske interaksjonen er ikke spesifikk og gir et stort interaksjonsareal, som fører til at substratet på samme tid kan være bundet samtidig som det forflytter seg under den prosessive hydrolysen (Gilbert 2012; Sorlie et al. 2012; Vaaje-Kolstad et al. 2013; Zakariassen et al. 2009).

Det finnes flere standardtilnærminger for å måle prosessivitet, der de fleste utnytter produktprofilen til prosessive glykosylhydrolaser (Beckham 2013).

Under den prosessive hydrolysen vil glykosylhydrolaser produsere disakkarider, med relativt få oddetalls sakkarider. Produkt slik som trimerer og monomerer indikerer initiell binding, hvor dimeriske produkter primært blir generert ved prosessive hydrolytiske reaksjoner. En effektiv måte å måle grad av prosessivitet på er å måle forholdet mellom disakkarider og mono- og trisakkarideneheter (Beckham 2013; Gilbert 2012). Ulempen med denne teknikken er at forholdet mellom sakkarideneheter påvirkes av bindingspreferansene til ikke-prosessive enzymer (Vaaje-Kolstad et al. 2013).

En annen teknikk går ut på å måle forholdet mellom løselig og ikke-løselige reduserende ender. Prosessive glykosylhydrolaser produserer større mengder løselige reduserende ender i forhold til ikke-prosessive glykosylhydrolaser. Dette skyldes at ikke-prosessive glykosylhydrolaser primært frigjør løselige produkter (Beckham 2013). Ulempen ved denne metoden er at den ikke kan skille mellom eksoenzymer som gir høy andel løselige reduserende ender, som er uavhengig av prosessivitet og endoenzymer med høy grad av prosessivitet (Horn et al. 2006b).

Teknikker som involverer substrat merking har blitt utviklet for å overkomme ulempene ved bruk av tradisjonelle metoder for måling av prosessivitet. En av metodene går ut på at prosessive enzymer produserer flere løselige enn uløselige reduserende ender. I denne metoden blir de uløselige reduserende endene bestemt mer nøyaktig gjennom fluorescensbaserte merkemeter.

Løselige reduserende ender som frigjøres representerer antallet katalytiske reaksjoner, og når for eksempel redusert cellulose brukes som substrat, vil den uløselige endene omfatte antallet initielle reaksjoner (Kipper et al. 2005; Kurasin & Valjamae 2011a; Velleste et al. 2010).

## 1.6 Kitinaser

Kitinaser er glykosylhydrolaser som hydrolyserer  $\beta$ -1-4-glykosidbinding mellom *N*-acetylglykosamin residuer i kitin. Selv om kitinaser er klassifisert under en singel IUB-MB enzymnummer (EC3.2.1.14), viste tidligere sammenligning av aminosyresekvens at deres katalytiske domene kunne bli gruppert i to forskjellige familier, familie 18 og 19 glykosylhydrolaser. Siden sekvens konservering indikerer strukturell likhet er denne klassifikasjonssystemet korrelert med strukturelle og mekanistiske funksjoner. Det har blitt vist at den molekylære mekanismen er konservert innenfor familiene. På samme måte som de katalytiske domenene, vil de ikke-katalytiske domene av kitinaser kunne inndeles i distinkte familier på grunn lag av deres sekvenslikhet (Davies et al. 1997; Henrissat 1991; Jollès & Muzzarelli 1999).

Kitinaser katalyserer hydrolyse av  $\beta$ -1-4-linket substrat slik som kitin, kitosan og peptidoglycan i cellevegg og er et utbredt enzym i mange levende organismer (Fukamizo 2000; Tews 1997).

Kitinaser spiller viktige roller innenfor livsyklusene til forskjellige organismene. I bakterier er disse enzymene viktig i celledeling og morfogenese, mens planter produserer kitinaser som en del av deres forsvarsmekanisme mot patogene sopparter. Mange bakterier og sopparter utnytter de kitinolytiske enzymene til å generere energi ved å omdanne kitin til løselige produkter som brukes i mikroorganismenes energisyklus (Brurberg et al. 1996; van Aalten et al. 2001).

Kitinaser er primært funnet i 2 familier av glykosylhydrolaser, altså familie 18 og 19. Glykosylhydrolaser fra familie 18 inkluderer kitinaser fra bakterier, sopp, nematoder og insekter. (Fukamizo 2000). Familie 19 inneholder for det meste kitinaser fra planter, men også fra den gramnegative bakterien *Streptomyces*. (Brurberg et al. 1996; Jollès & Muzzarelli 1999; Perrakis et al. 1994).

Som nevnt i avsnitt 1.5 anvender glykosylhydrolaser to mekanismer for å katalysere hydrolyse av glykosidbindinger. Familie 18 kitinaser katalyserer hydrolysen med en substrat assistert katalyse som bevarer konfigurasjon ved det anomere karbonatomet.

Familie 19 katalyserer reaksjonen med inverterende mekanisme ved det anomere karbonet (Fukamizo 2000). Substrat assistert katalyse er beskrevet nærmere i avsnitt 1.6.2.

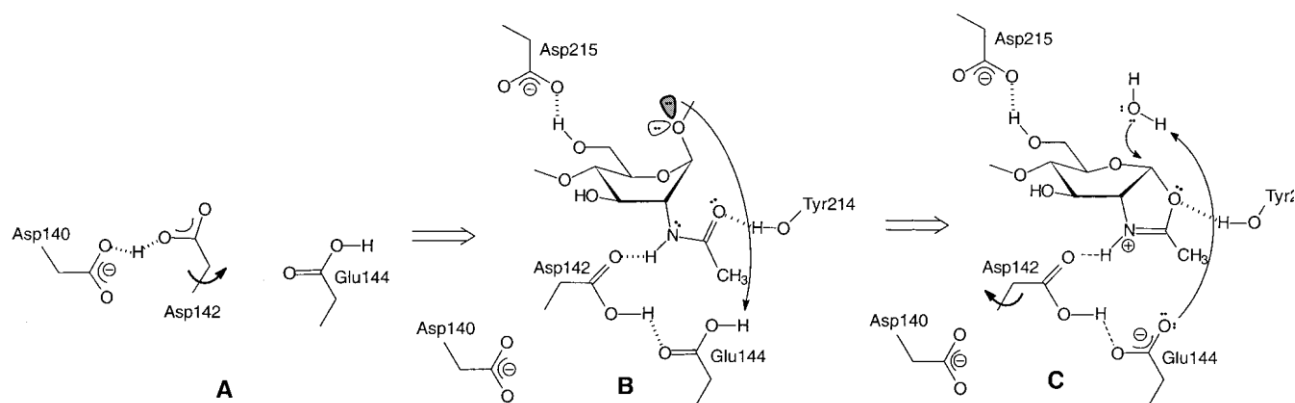
Kitinaser er av stor bioteknologisk interesse, fordi disse enzymene kan omdanne biomasser av kitin til nyttige produkter. Kitinaser kan også brukes for å kontrollere eller fjerne patogene insekter og sopparter i planter. Dette skyldes at celleveggene til mikroorganismene brytes ned og gjør de sårbare. Bruk av kitinase inhibitorer kan inhibere vekst av patogene organismer som trenger kitinaser for en normal livssyklus (Brurberg et al. 1996).

### **1.6.1 Substrat assistert katalyse**

Kitinaser fra familie 18 glykosylhydrolaser katalyserer hydrolyse av substrat ved hjelp av substrat assistert katalyse. Denne hydrolysen bevarer den stereokjemiske konfigurasjonen til det anomere karbonatomet. I familie 18 finnes det tre residuer som tar del i en konservert DXXDXDXE motiv som er spesielt viktige for den substrat assisterte katalysen. Disse residuene er Aspartat 140 (Asp 140), Aspartat 142 (Asp 142) og Glutamat 144 (Glu 144) (Synstad et al. 2004; van Aalten et al. 2000; van Aalten et al. 2001). Figur 8 viser residuenes orientering og oppgave under katalysen.

Når enzymet ikke er bundet til substrat vil Asp 140 og Asp 142 danne hydrogenbindinger med hverandre. Asp 142 residuet er for langt unna til å kunne interagere med Glu 144. Når substratet binder til enzymet medfører dette at pyranoseringen på substratet endrer konformasjon til båtkonfigurasjonen i -1 subsetet. Samtidig roterer Asp 142 residuet mot Glu 144 og danner hydrogenbindinger med Glu 144, samt acetamido gruppen på -1 sakkariidet. Karbonyloksygenet på acetamido gruppen i -1 subsetet foretar et nukleofilt angrep på det anomere karbonatomet slik at det dannes et positivt ladd oxazoliniumionintermediat. Hydrolysen avsluttes med at Glu 144 deprotonerer et vannmolekyl slik at det dannede hydroksidionet angriper oxazolinium intermediet. Dette fører til at Asp 142 roteres tilbake til sin opprinnelige posisjon og danner hydrogenbinding med Asp 140 (Payne et al. 2012; van Aalten et al. 2001).

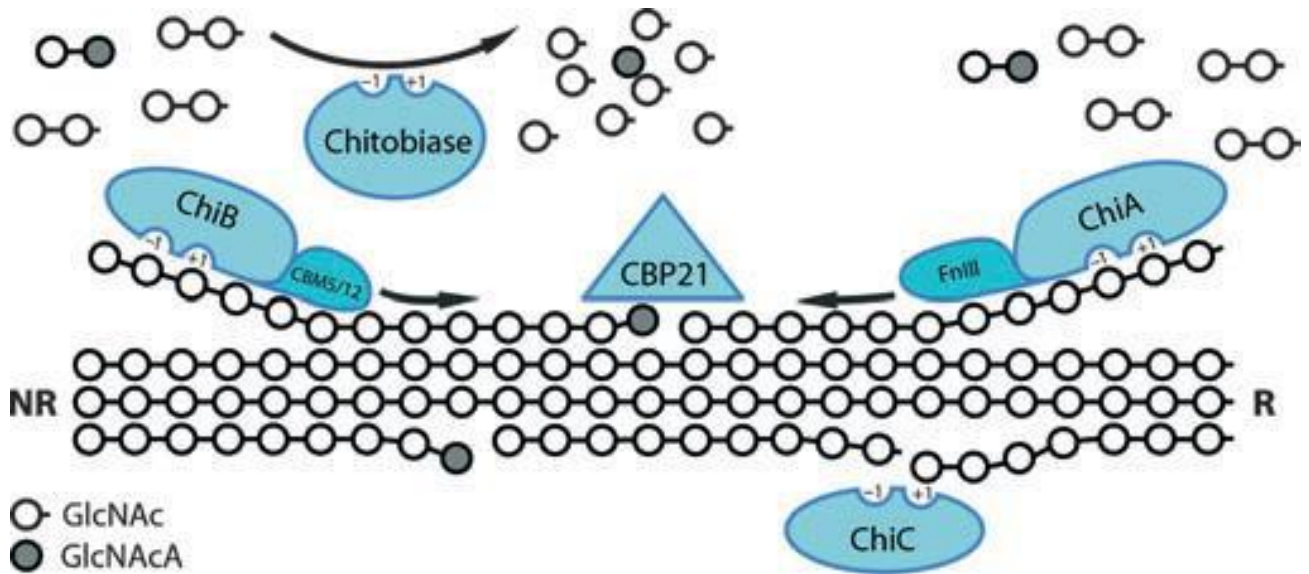




**Figur 8.** Den bevarende katalytiske mekanismen til ChiB og familie 18 kitinaser. (A) Enzym uten bundet substrat; (B) Binding og forandring av substratkonfigurasjonen (-1 sakkariidet er vist). (C) Dannelse av oxazolinium ion intermediat ved substratbinding (D) Hydrolyse av oxazolinium ion intermediat ved hjelp av et vannmolekyl (Synstad et al. 2004).

### 1.6.2 Kitinaser fra *Serratia marcescens*

*Serratia marcescens* er en gram negativ bakterie som er medlem i Enterobacteriaceae familien (Vaaje-Kolstad et al. 2013). *S. marcescens* er en av de mest effektive bakteriene for degrading av kitin og dens kitinolytiske system har blitt omfattende studert. *S. marcescens* produserer 4-5 enzymer som er ansvarlig for degrading av det uløselige polysakkaridet (Vaaje-Kolstad et al. 2013). Disse er kitinase A (ChiA), kitinase B (ChiB), kitinase C (ChiC), CBP21 og en kitobiasen. ChiA, ChiB og ChiC er involvert i hydrolysen av substratet, mens CBP21 er et overflateaktiv monooksygenase som induserer hydrolyse av polysakkaridet ved bruk av oksidative reaksjoner. Kitobiasen konverterer oligomeriske produkter fra andre enzymer til monomerisk *N*-acetylglukosamin. ChiA, ChiB og ChiC tilhører glykosylhydrolase familie 18 (GH18), mens kitobiasen tilhører familie 20. CBP21 tilhører familien *Auxiliary activities family 10* (AA10) (Vaaje-Kolstad et al. 2013). Skjematisk fremstilling av enzymmaskineriet involvert i degrading av kitin er vist i figur 9.

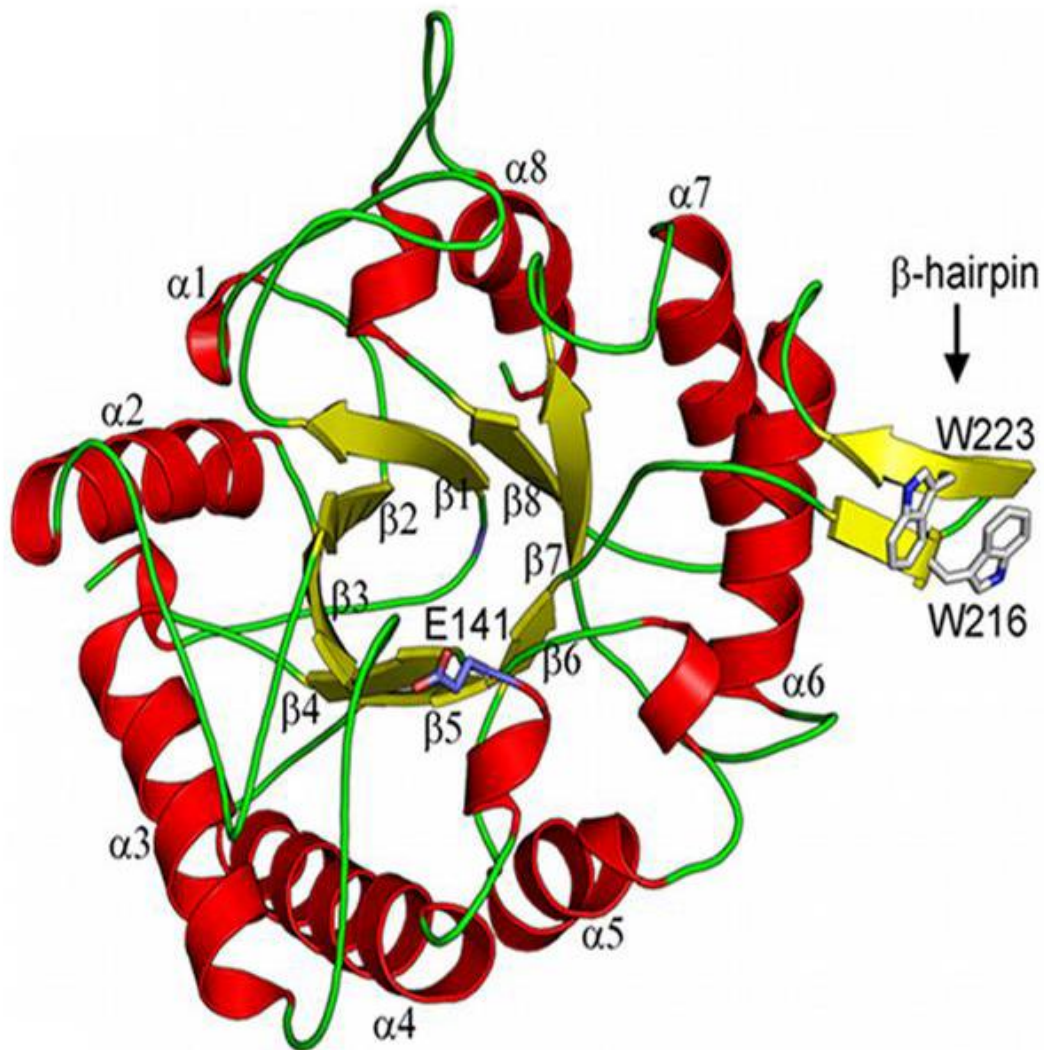


**Figur 9.** Skjematisk perspektiv av det kitinolytiske maskineriet til *S. marcescens*. Både ChiA og ChiB er prosessive enzymer og katalyserer hydrolyse av substratet på hver sin ende. ChiC er ikke-prosessivt og hydrolyserer ved tilfeldige områder på polysakkaridet. CBP21 danner nye ender på substratet ved bruk av oksidativ hydrolyse. Kitobiasen konverterer oligomeriske produkter til monomerenheter (Vaaje-Kolstad et al. 2013).

Analyse og sammenligning av sekvensene samt tredimensjonale strukturene til ChiA, ChiB og ChiC viser at de har en modular struktur som er vanlig for enzymer som bryter ned uløselige biopolymerer. Alle tre kitinasene inneholder et katalytisk domene som er karakteristisk for familie 18 glykosylhydrolaser. Dette domenet er involvert i substratbinding og har en konserverte TIM-tønnestruktur ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub> (Brurberg 2000). En TIM-tønne er dannet av åtte  $\alpha$ -helikser og åtte parallelle  $\beta$ -kjeder.  $\alpha$ -heliksene er ordnet slik at de er mellom  $\beta$ -kjedene. En lukket sylindrisk struktur dannes ved at  $\beta$ -kjedene blir bøyd til en tønne struktur, der  $\alpha$ -heliksene danner en ring mot utsiden av strukturen. Denne topologien er en av de mest vanlige og brukes av mange forskjellige enzymer (Jollès & Muzzarelli 1999; Lesk 2010). På  $\beta$ -tråd nummer 4 sitter et høyt konserverte DXXDXDXE og SXGG motiv som inneholder de katalytiske residuene som er vitale for den substrat assisterte mekanismen (Vaaje-Kolstad et al. 2013). Denne TIM-tønne strukturen er vist i figur 10.

Både ChiA og ChiB har et innsatt ( $\alpha/\beta$ ) motiv som er mellom den syvende og åttende  $\beta$ -tråden i TIM- tønne domenet (Perrakis et al. 1994; van Aalten et al. 2000). Strukturen til både ChiA og ChiB får dermed en dyp substratbindingskløft i det katalytiske domenet (Horn et al. 2006c). Denne innersjonesjonen er ikke til stedet i ChiC.

Funksjonen av dette domenet med hensyn på biofysikalske og enzymatiske egenskaper er fortsatt uklart, men nåværende forskning indikerer at dette domenet er delvis ansvarlig for eksoaktiviteten og prosessiviteten til enzymene (Zees et al. 2009).



**Figur 10.** TIM-tønne ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub> struktur av ChiC2. Figuren viser den katalytiske syren (Glu) ved posisjon 141, som er mellom en  $\beta$ -tråd og en  $\alpha$ -heliks. Den katalytiske syren er vist med ”stick” formasjon (Payne et al. 2012).

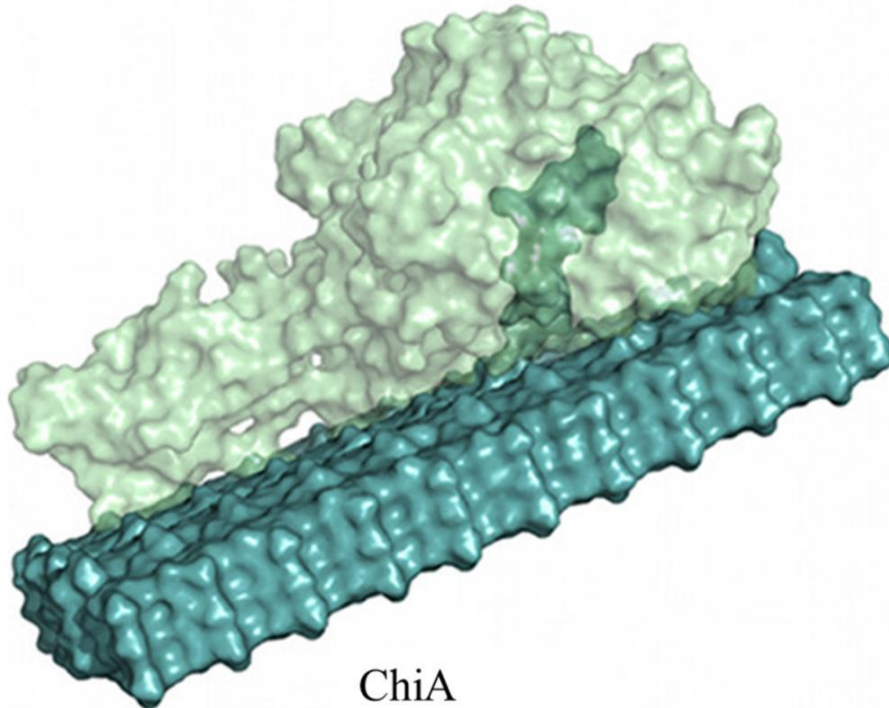
### 1.6.3 ChiA

Kitinase A produseres av ribosomer som et 563 residuers precursor. Denne forløperen blir sekretet ekstracellulært og samtidig som dette skjer blir signalpeptidet kuttet ved N-terminal (Brurberg 2000). Dette resulterer i at det aktive enzymet består av 540 residuer og har en molekylvekt på 58,5 kDa.

ChiA inneholder en dyp substratbindingskløft som består av aromatiske residuer involvert i kitin binding. Substratbindingskløften består av seks veldefinerte subsepter som går fra -4 til +2. ChiA er et prosessivt eksoenzym fra *Serratia marcescens* som hydrolyserer kitin fra den reduserende ende (Hickey et al. 2007; Vaaje-Kolstad et al. 2013). Strukturen av ChiA er vist i figur 11. Videre har dette substratdomenet til ChiA en mer åpen struktur enn for eksempel ChiB.

Dette er også sannsynlig årsak til at ChiA har mer endoaktivitet enn ChiB. Dette er blitt vist ved dannelse av GlcNAc monomerer ved hydrolyse av kitin og i degradering av kitosan (Brurberg 2000; Norberg et al. 2011). Endoaktivitet er gunstig, fordi det er flere endobindingsområder på kitin i forhold til eksobindingsområder. Et +3 subsepte i ChiA kan være involvert i å gi enzymet endoaktivitet, slik at det er mindre steriske hindringer når ChiA binder substrat i endomodus (Norberg et al. 2011).

Enzymet har den høyeste hydrolyseaktiviteten mot uløselig kitin i forhold til de to andre kitinasene. ChiA er et robust og aktiv enzym som har en bred pH område for hydrolyse av uløselig substrat (Suzuki et al. 2002). Enzymet er aktiv i området mellom pH 4-11. Enzymet viste størst aktivitet rundt 60 °C, over dette ble aktiviteten til enzymet hemmet.



**Figur 11.** Struktur av ChiA. Figuren viser hvordan enzymet hydrolyserer kitin fra den reduserende ende (Payne et al. 2012).

#### 1.6.4 ChiB

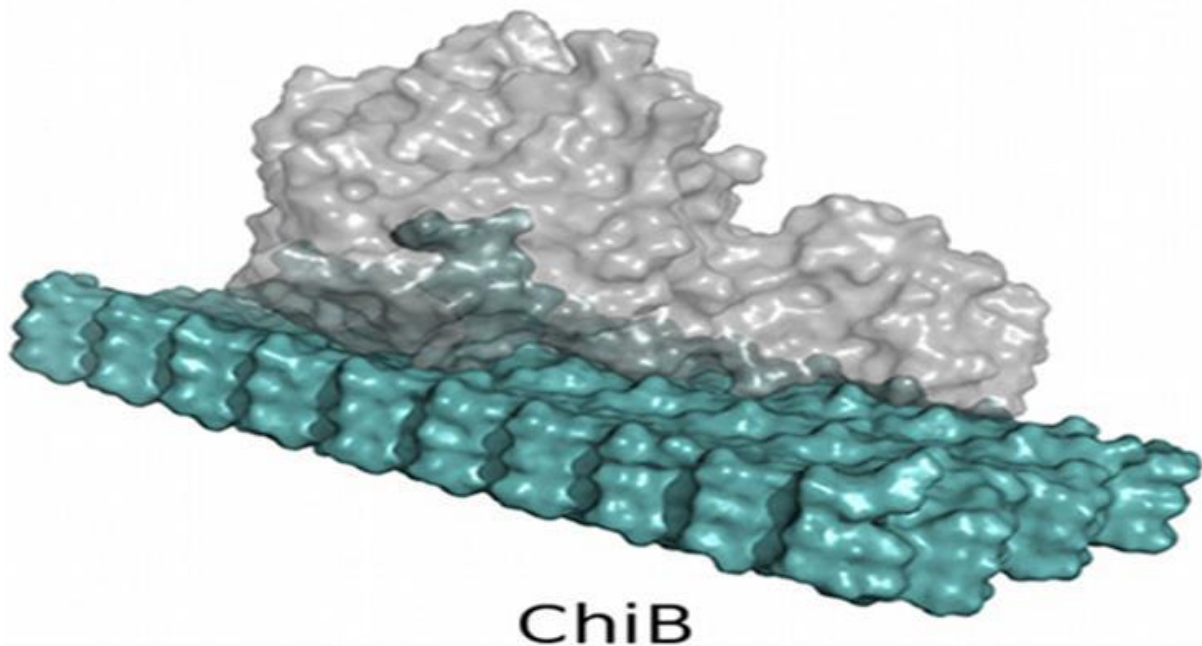
ChiB består av 498 residuer og har en molekylmasse på 55,4 kDa. Dette enzymet finnes i den periplasmatiske- og ekstracellulære løsningen i *S. marcescens*, mens den i *Escherichia coli* i hovedsak finnes i den cytosoliske løsningen. ChiB inneholder ingen typisk N-terminal signalpeptid slik som ChiA (Brurberg 2000). ChiB er bygget opp av et katalytisk domene, en ”linker region” og et lite kitinbindende domenet (van Aalten et al. 2000). Strukturen av ChiB er vist i figur 12.

Det katalytiske domenet har en typisk TIM-tønne topologi med en tunnelliknende aktiv setet. Den tunnelliknende aktive setet skyldes  $\alpha/\beta$  domenet, som danner en fleksibel loop nær TIM-tønningen (van Aalten et al. 2001). En slik topologi er typisk for enzymer med eksoaktivitet. Det aktive setet til ChiB består av en lang og dyp kløft som inneholder mange hydrofobe residuer og som samtidig innehar den katalytiske residuen Glu144. Den katalytiske syren er i den konserverte DxxDxDxE motivet som er lokalisert på enden av den fjerde  $\beta$ -tråden på TIM-tønningen. Lengre inn i TIM-tønningen ligger de konserverte aspartat residuene Asp142, Asp140 og Asp137, som også er i samme motivet som den katalytiske syren (van Aalten et al. 2000).

Det kitinbindende domenet (ChBD) består av 49 residuer som er lokalisert etter TIM-tønningen av en "linker". Denne linkerens starter etter den siste  $\alpha$ -heliksen i TIM-tønningen og slutter ved første residu på ChBD domenet. Det kitinbindende domenet er formet av tre antiparallele  $\beta$ -tråder som er koblet sammen av lange loops. Dette domenet inneholder 2 overflateeksponerte aromatiske residuer og noen polare aminosyrer som er involvert i hydrogenbinding med *N*-acetyl gruppene på kitin polymeren. Substratbindingsområdet til ChiB er betydelig lengre på grunn av ChBD domenet. Distansen fra den katalytiske syren til den siste aromatiske residuen korresponderer til 10 kitin monomerenheter (van Aalten et al. 2000).

ChiB har vel definerte subseter som går fra -3 til +2, der + siden korresponderer til den reduserende ende på suktermolekylet. Hydrolyse av substratet skjer mellom subsetene -1 og +1. -3 subsetet er lokalisert ved enden av substratbindingskløften som stoppes av en "porch loop", slik at binding av oligomerer ikke kan binde utover -3. Dette forklarer hvorfor ChiB har eksoaktivitet og katalyserer hydrolyse fra den ikke-reduserende ende (van Aalten et al. 2000).

Slik som ChiA har også ChiB en bred pH område for katalyse av substratdegradering. Enzymet er aktiv i pH området 4-10. ChiB viste størst aktivitet når pH var på 6 og temperaturen var på 60 °C, over dette ble aktiviteten til enzymet hemmet (Brurberg et al. 1996; Suzuki et al. 2002).



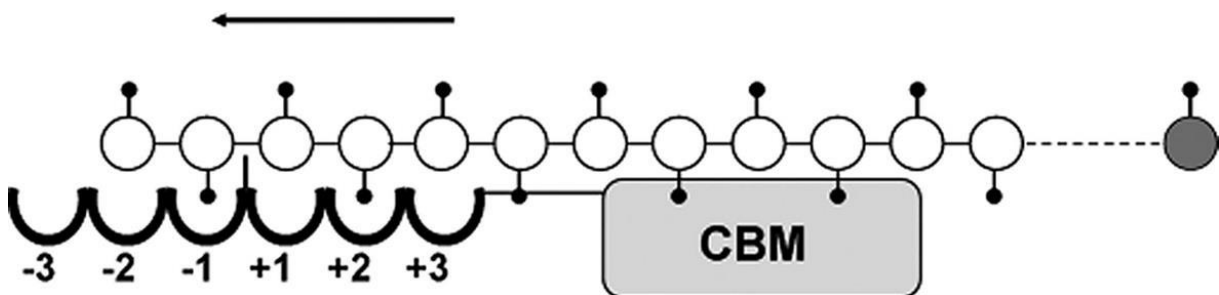
**Figur 12.** Struktur av ChiB fra *Serratia marcescens*. Enzymet hydrolyserer kitin fra den ikke-reduserende ende og er et eksoenzym (Payne et al. 2012).

### 1.6.5 Prosessivitet hos kitinaser

Det har blitt vist at ChiA og ChiB fra *S. marcescens* er prosessive enzymer, mens ChiC ikke er prosessiv. Som forklart i avsnitt 1.5 prosessivitet, så har det blitt påvist at aromatiske residuer i substratbindingsregionen bidrar med å gi ChiA og ChiB prosessive egenskaper. Prosessivitet har blitt presisert tidligere og er evnen et enzym har til å forbli bundet til substratet mellom hydrolytiske kutt. Disse aromatiske residuene vil i ChiA være i subsetene merket med minus, mens de vil være merket med pluss i ChiB (Horn et al. 2006b; Horn et al. 2006c).

Den initielle bindingen til prosessive enzymer vil enten gi et oddetalls- eller et partalls produkt, men produktene etter vil kun gi dimerer (Horn et al. 2006b). Initiell binding av ChiB til en kitinkjede vil involvere subseter fra -3 eller -2. Dermed vil produktet som dannes kunne være en dimer eller trimer, der trimeren vil hydrolyseres videre til en dimer og monomer.

Som følge av at kitinasene i familie 18 GH bruker substrat-assistert katalyse er det kritisk at en korrekt posisjonert N-acetyl gruppe er i subsetet -1. Siden sukkerenhetene i kitin er rotert  $180^\circ$  i forhold til hverandre, vil forflytning av polymeren gjennom det aktive setet til enzymet gi produktiv binding for annenhver sakkariidenhet. Prosessiv degradering av kitin vil dermed gi dimerer (Horn et al. 2006b). En skjematisk illustrasjon av dette er vist i figur 13.



**Figur 13.** Et skjematisk bilde av ChiB bundet til en kitinkjede. Enzymet har seks subseter som er nummerert fra -3 til +3. En riktig plassert N-acetyl gruppe (svarte sirkler) er vist i -1 subsetet som er essensiell for katalyse av glykosidbindingen. Siden sakkariidenhetene er rotert  $180^\circ$  i forhold til hverandre vil produktiv binding skje mellom annenhver monomerenhet. Bildet viser en prosessiv degradering der dimere produseres. CBM er domenet involvert i substratbinding (Horn et al. 2006b).

Aromatiske residuer rundt det aktive setet har vist seg å være viktig i enzymets prosessivitet. I ChiA er Trp 167 på substratbindingsetet (-1) viktig for prosessivitet. Residuene som er lokalisert i +1 og +2 subsetene er vist å være viktig i produkt dissosiasjon, men ikke i prosessivitet (Zakariassen et al. 2009).

I ChiB er residuene i substratbindingsetene +1 (Trp 97, mer) og +2 (Trp 220, mindre) viktig for prosessivitet (Horn et al. 2006b).

## 1.7 Seterettet mutagenese

Mutasjoner er forandringer i den opprinnelige DNA sekvensen. Dette kan komme av kjemiske- eller fysiske mutagener, men kan også oppstå som følge av feil i DNA replikasjonen. Hvis ikke slike mutasjoner blir rettet opp vil mutasjonene bli konservert ved celledeling. En mutasjon kan forekomme ved utbytting, innsetting, delesjon eller reorientering av basene i en DNA sekvens. Mutasjoner i gener vil sannsynligvis påvirke proteinets funksjon, mens mutasjoner utenfor genområdet ikke vil berøre funksjonen (Hickey et al. 2007).

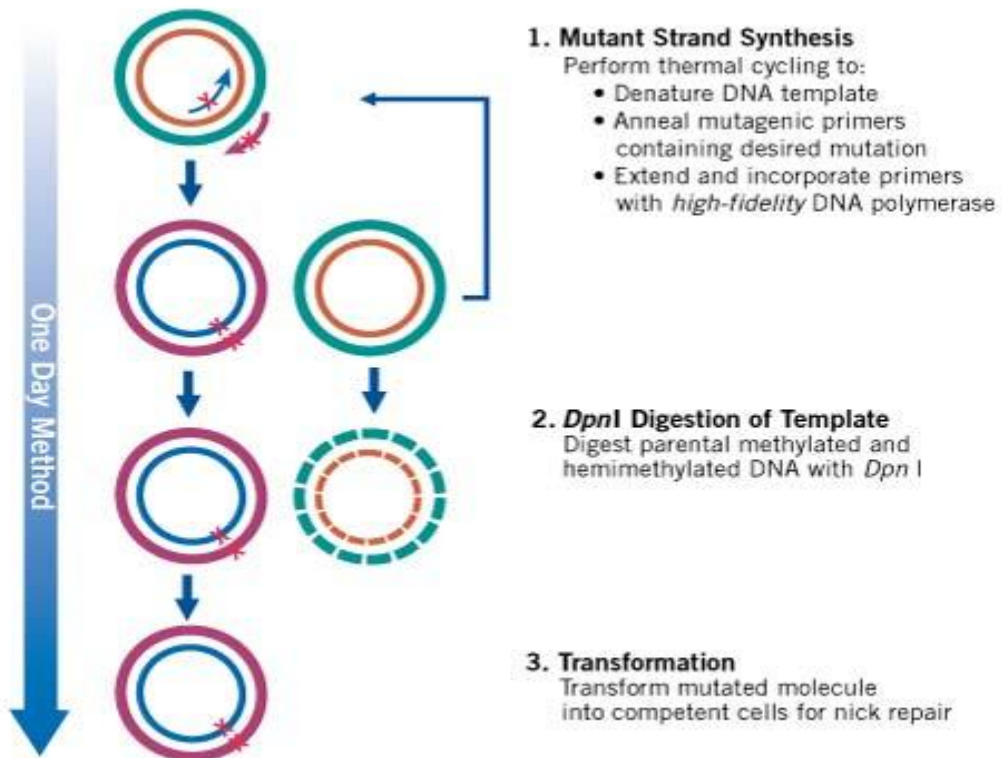
De fleste genetikere studerer effekten av mutasjoner i et bestemt gen. Med rekombinant DNA teknologi er det blitt mulig å klonere gener og produsere store mengder av DNA for analyse og manipulasjon. Det betyr at det nå er mulig å mutere et spesifikt gen i en spesifikk posisjon (Russell 2006).

*In vitro* seterettet mutagenese er en uvurderlig teknikk som kan brukes til forskjellige eksperimenter. Den kan brukes til karakterisering av det dynamiske forholdet mellom proteinstruktur og funksjon, studier av genekspressjons elementer og for vektormodifikasjon (Agilent Technologies 2013). Ved å bruke denne metoden kan en eller flere nukleotider fjernes, tilføres eller forandres (Klug 2009).

Det første steget i seterettet mutagenese er å syntetisere to oligonukleotider som er komplementære til den delen av DNA-sekvensen som ønskes å mutere. Disse oligonukleotidene kalles primere og vil binde på hver sin DNA-tråd (Klug 2009). Primerene inneholder vanligvis 20 eller flere nukleotider, der den ønskede mutasjonen vanligvis er midt i sekvensen (Russell 2006).



Polymerase chain reaction (PCR) brukes deretter til å fremstille og oppamplifisere et nytt gen med den ønskede mutasjonen. Figur 14 viser hvordan PCR teknikken fungerer.



**Figur 14.** Skjematisk fremstilling av seterettet mutagenese med oligonukleotider. 1) PCR reaksjon med denaturering, annealing og forlengelse av oligonukleotidene. 2) Restriksjons enzymet *Dpn* I degraderer "foreldre" DNA som ikke har blitt mutert. Disse enzymene degraderer metylert og hemimetylert DNA. 3) Det muterte molekylet transformeres inn i en kompetent celle (Agilent Technologies 2013).

## 1.8 Mål med oppgaven

ChiA og ChiB er prosessive kitinaser som bryter ned kitin. Prosessive enzymer er viktige, fordi de hindrer at allerede dissocierte tråder reassosierer med det krystallinske materialet. Enzymenes direksjonalitet er viktig for å få en mest mulig effektiv nedbrytelse av kitin (at enzymene angriper polymerene fra hver sin ende).

Hovedmålet med denne oppgaven var å bestemme  $k_{cat}$ ,  $K_M$  og  $k_{cat}/K_M$  for mutanter hvor residuer som er viktige for prosessivitet og direksjonalitet. Disse parameterene måles for å se om grad av prosessivitet og direksjonalitet reflekteres i de kinetiske signaturene.

Et annet mål med oppgaven var å se om  $[GlcNAc]_2/[GlcNAc]$  ratioen endrer seg som en funksjon av prosent nedbrutt kitin for bedre å forstå samspillet mellom substrat og prosessivitet.

## 2 Materialer

### 2.1 Laborieutstyr

Utstyr	Spesifikasjon	Leverandør
Amiconrør	Ultra-15, 10 kDa Ultracel, 30 kDa	Millipore "
Autoklavteip	12 mm	VWR
Aluminiumsfolie		
Automatpipetter	Finnpipette ® F2	Thermo Scientific Thermolabsystems
Avtrekkskap	AV-100	Telstar
Bordrister	Swip	Edmund Bühler
Bordsentrifuge	Sigma 1-14	LABEX
Blåkorkflasker	1000 mL 500 mL 250 mL 100 mL 50 mL	VWR " " " "
Blåkorkrør, Cellstar® tubes	50 mL	Greiner Bio-One
C-18 Kolonne	SampliQ C-18-EC	Agilent Technologies
Cryorør	2 mL	Sarstedt
Dyrkningskolber	2 L	BD Falcon
Elektroforeseutstyr	Gelkjøringskammer Gelspenningsskilde Gelkniv	Invitrogen VWR Nisahu
Eppendorfrør	1,5 mL 2,0 mL	Axygen "
Filter	0,22 µm Steritop 0,22 µm Durapore membrane, 0,45 µm hydrofil, low protein binding	Millipore " "

Utstyr	Spesifikasjon	Leverandør
Flurometer	Qubit™ Flurometer	Invitrogen
Fotoutstyr (gel)	Gel Doc™ EZ System Lyskilde UV transuliminator	Bio-RAD Laboratories Kilab AS UVP inc.
Fryser	-80 °C -20 °C	SANYO Bosch
GATC Bokser	“Sende DNA prøver”	GATC Biotech AG
High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	Ultimate 3000 system Autoinjektor Detektor UV/VIS detektor Vials og caps	Dionex " " " VWR
HPLC-forkolonne	Carbo-H 4 x 3,0 mm	Phenomenex
HPLC-Kolonne	Rezex RFO-Fast Fruit H+ 7,8 x 100 mm	Phenomenex
Inkubator	Inkubatorskap 37 °C	Infors
Ismaskin	KF185A	Thermax
Econo-Column® Chromatography Columns	98 mL	Bio-Rad
Kyvette	1 x 1 cm	VWR
Magnetrorer	Magnetic Stirrer, Standard Unit	VWR
Merketeip	13 mm	VWR
Microvekt	Sartorius CP-2P	VWR
Målekolbe	2 L	Kelbo
Målesylinder	2 L 1 L 250 mL 100 mL 50 ml 25mL	VWR " " " " "

Utstyr	Spesifikasjon	Leverandør
Nanodrop	ND-1000 Spectrofotometer	Saveen Werner
NuPAGE® 10% Bis-Gel	1,0 mm x 10 well	Invitrogen
Parafilm	10 cm og 5cm bredde	VWR
PCR maskin	Master cycler gradient	VWR
PCR-rør	0,2 mL	VWR
Petrisskåler	9 cm	Heger
pH- meter	MicroFET 9270-010	Sentron
Pipettespisser	Next generation Tip Refil 0,1-10 µL	VWR
	Next generation Tip Refil 1-200 µL	"
	Next generation Tip Refil 100-1250 µL	"
	Finntip® 5 mL	Thermo Scientific
	Labtip Blue	VWR
	Labtip Yellow	"
Qubit™ assay rør		Invitrogen
Risteinkubator	Multitron Standard	Infors
	Multitron Eco	"
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
	30 mL	Nalgene
Snakeskin Pleated Dialysis Tubing, Dialyserør	3,7 mL/cm, 10 000 MWCO	Thermo Scientific
Sonikator	Transonic 460/H	Elma

Utstyr	Spesifikasjon	Leverandør
Sprøyter	50 mL 10 mL	BD plastipak "
Sprøytefilter	0,20 µm	Sarstedt
Sterilbenk	AV-100	Telstar
Tannpirkere		Jordan
Thermomikser	Thermomixer confort 1,5 mL	Eppendorf
Vakuumpumpe		Millipore
Vannbad	Eco Temp TW12	Julabo
Vekt	LC621P	Sartorius
Whirlmixer	Vortex- Genie 2	Scientific Industries

## 2.2 Kjemikalier

Kjemikalie	Leverandør
4-metyllumbelliferone	Sigma-Aldrich
4-metyllumbelliferyl-D-N-N'- diacetylchitobiose	Sigma-Aldrich
Agar, Bakto-agar	Merck
Ammoniumacetat, CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	Merck
Ammoniumsulfat, NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
Ampicillin, C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	Sigma-Aldrich
Bacto™ Tryptone	BD
Bacto™ Yeast Extract	BD
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent	Bio-Rad
Coomassie® Brilliant Blue R-250 Farge Reagent, C <sub>45</sub> H <sub>44</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	Bio-Rad
D(+)-Saccharose, C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	Sigma-Aldrich
Destillert vann, dH <sub>2</sub> O (Milli-Q kvalitet)	
Dibasisk Natriumhydrogenfosfat, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
Dikaliumhydrogensulfat, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Applichem

Kjemikalie	Leverandør
Eddiksyre, CH <sub>3</sub> COOH	Sigma-Aldrich
Etanol, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Arcus
Etanolamin, NH <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OH	Sigma-Aldrich
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Na <sub>2</sub> C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich
Glyserol, 87 %, C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> (OH) <sub>3</sub>	Merck
Hydrogenklorid, HCl	Sigma-Aldrich
Isopropanol, CH <sub>3</sub> CH(OH)CH <sub>3</sub>	Vinmonopolet AS
Kaliumdihydrogensulfat, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Applichem
Kaliumhydroksid, KOH	Sigma
Kitinkuler	Biolabs Inc.
Magnesiumklorid, MgCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich
Metanol, CH <sub>3</sub> OH	Sigma-Aldrich
Monobasisk Natriumhydrogenfosfat, NaHPO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
MOPS SDS Runningbuffer	Merck
Natriumacetate, CH <sub>3</sub> COONa	Sigma-Aldrich
Natriumhydroksid, NaOH	Merck
Natriumklorid, NaCl	Sigma-Aldrich
NuPAGE® Samplebuffer (4x)	Invitrogen
NuPAGE® Sample reducing agent (10x)	Invitrogen
Phenyl-methyl sulfonylfluorid (PMSF), C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> FO <sub>2</sub> S	Sigma
Sitronsyre, C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	VWR
Trizma base, NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich

### 2.3 Proteiner, enzymer, substrater og standarder

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

Kitinase	Mutant	Leverandør
<b>ChiA</b>	Villtype	Laget av (Brurberg et al. 1996)
	W167A	Laget av Anne Line Norberg
	R172A	Laget av Ida Nielsen
	W275A	Laget av Henrik Zakariassen
	T276A	Laget av Nicole Reppert
	E315Q	Laget av Nicole Reppert
	F396W	Laget av Nicole Reppert
<b>ChiB</b>	Villtype	Laget av (Brurberg et al. 1996)
	E144Q	Laget av Silje Lorentzen
	W220A	Laget av Svein J. Horn
	R294A	Laget av Kjersti G Lundquist

Substrat	Leverandør
Tetra-acetyl chitotetraose, [GlcNAc] <sub>4</sub>	Megazyme
β- kitin, 3μm	Seikagaku Corporation

Standarder	Leverandør
<i>N</i> -acetyl-D-glucosamine, [GlcNAc]	Sigma-Aldrich
Di-acetyl chitobiose, [GlcNAc] <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich
Tetra-acetyl chitotetraose, [GlcNAc] <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich



## 2.4 Bakteriestammer og plasmid

Celler	Spesifikasjoner	Bruk	Leverandør
<i>Escherichia coli</i>	BL21 Star™ (DE3) pLysS	Ekspresjon	Invitrogen
	TOP10 Superkompetente	Høy transformasjonseffektivitet	Invitrogen

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

## 2.5 Muteringsprimere

Mutant	DNA Templat	Primer	Sekvens
<b>ChiA F396A</b>	ChiA WT	Forward	5'- ACGACTTCTATGGCGGCCCGATCTGAAGAACCTGG- 3'
		Revers	5'- CCAGGTTCTTCAGATCGGCGGCGCCATTAGAAGTCGT- 3'
<b>ChiA E315Q/ W167A</b>	E315Q	Forward	5'-TTCTTATTTTCGTCGAGGCGGGCGTTTACGG-3'
		Revers	5'-GCGCCCGTAAACGCCCGCCTCGACGAAATA-3'
<b>ChiA E315Q/ W275A</b>	E315Q	Forward	5'-GTCGATCGGCGGCGCGACGCTGTCCGAC-3'
		Revers	5'-GTCGGACAGCGTCGCGCCGCGATCGAC-3'
<b>ChiA E315Q/ F396A</b>	E315Q	Forward	5'- ACGACTTCTATGGCGGCCCGATCTGAAGAACCTGG-3'
		Revers	5'- CCAGGTTCTTCAGATCGGCGGCGCCATAGAAGTCGT-3'

Mutant	DNA Templat	Primer	Sekvens
<b>ChiA</b> <b>E315Q/</b> <b>F396W</b>	E315Q	Forward	5'-CGACTTCTATGGCGCCCTTGGGATCTGAAGAA-3'
		Revers	5'-CCCAGGTTCTTCAGATCCCAGGCGCCATAG-3'
<b>ChiB</b> <b>W97A</b>	ChiB WT	Forward	5'- GTTCTCCATCGGCGGCGGGTACTACTCCAACGAT-3'
		Revers	5'- ACGTTGGAGTAGTACGCGCCCGCCGATGGAGAAC-3'
<b>ChiB</b> <b>E144Q/</b> <b>W97A</b>	E144Q	Forward	5'-GTTCTCCATCGGCGGCGGTTACTACTCCAACGAT-3'
		Revers	5'-ATCGTTGGAGTAGTACGCGCCCGCCGATGGAGAAC-3'
<b>ChiB</b> <b>E144Q/</b> <b>W220A</b>	E144Q	Forward	5'-TCTGGCCGCCCCGCGGAGAAGGTAACCA-3'
		Revers	5'-TGGTTACCTTCTCCGCGGGGCCGCCAGA-3'

## 2.6 Sekvenseringsprimere

Kitinase	Primer	Sekvens
<b>ChiA</b>	T7	5` - TAATACGACTCACTATAGGG - 3`
	FW 1378	5` -'CGTGGATATCGACTGGGAGT- 3`
	Rev 1574	5`-AAGCCACCTTGTCGATCTTG-3`
	Seq 797 fw	5`- CCGTTATCAAATGCAGGTGGCATTGTGC -3`
	Seq 770 fw	5`- GCACAATGCACCTGCATTTGATAACGG- 3`
<b>ChiB</b>	T7	5` - TAATACGACTCACTATAGGG- 3`
	SP6	5` -ATTTAGGTGACACTATAG-3`
	Seq 1537 Fw	5`-TGAAGGATTACGGCTTCGAC-3`
	Seq 731 Rev	5`-AATAGCGCGACAGGAAGAAA-3`

## 2.7 Kit

Kit	Innhold	Leverandør
E.Z.N.A <sup>®</sup> Plasmid Mini kit I	Løsning I/RNAase	Omega Bio-TEK
	Løsning II (Natriumhydroksid)	
	Løsning III (Guanidine HCl Eddiksyre)	
	HiBind <sup>™</sup> DNA Mini kolonner	
	Ekvilibreringsbuffer (Natriumhydroksid)	
	HB Buffer (Guanidine HCl Isopropanol)	
	DNA Vaskebuffer med etanol	
	Elueringsbuffer	
QuikChange <sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit	10x Reaksjonsbuffer	Stratagene
	Dpn I Restriksjons enzym	
	pWhiteScript <sup>™</sup> 4.5-kb Kontrollplasmid	
	dNTP mix	
	Pfu Ultra DNA polymerase	
	Oligonukleotid Kontrollprimer #1	
	Oligonukleotid Kontrollprimer #2	
Pellet Paint <sup>®</sup> Co-Precipitant	Pellet Paint <sup>®</sup> Co-Precipitant	Novagen
	0,3 M Sodium acetat pH 5,2	

## 2.8 Selvlagde Medier

Luria-Bertani (LB) medie	Innhold
Bacto <sup>™</sup> Tryptone	10 g
Bacto <sup>™</sup> Yeast Extract	5 g
Natriumklorid, NaCl	10 g
dH <sub>2</sub> O	Fylte opp til 1 L
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mediet autoklaveres</li> </ul>	

<b>Luria-Bertani (LB) Agar</b>	<b>Innhold</b>
Bacto Tryptone	10 g
Bacto Yeast Extract	5 g
Natriumklorid, NaCl	10 g
Bacto Agar	15 g
dH <sub>2</sub> O	Fylte opp til 1 L
<ul style="list-style-type: none"> <li>• pH justeres til mer enn 7 med NaOH og mediet autoklaveres</li> <li>• Etter autoklivering kjøles mediet ned til ca 50 °C før ampicillin tilsettes sterilt til en sluttkonsentrasjon på 100 µg/mL.</li> <li>• Agarløsningen overføres til pertriskåler sterilt.</li> <li>• Agarskålene oppbevares ved 4 °C.</li> </ul>	

<b>Super Optimal Broth (S.O.C ) Medium</b>	<b>Innhold</b>
Bacto Tryptone	2 g
Bacto Yeast Extract	0,5 g
Natriumklorid, NaCl	0,057 g
Kaliumklorid, KCl	0,019 g
Magnesiumsulfat, MgSO <sub>4</sub>	0,247 g
dH <sub>2</sub> O	60 mL
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Løsningen autoklaveres.</li> <li>• 1 mL sterilfiltrert 2 M glukose tilsettes</li> <li>• dH<sub>2</sub>O tilsettes til totalt 100 mL.</li> <li>• Lagres ved -20 °C.</li> </ul>	

## 2.9 Selvlagde løsninger og buffere

### 2.9.1 Løsninger

Løsninger	Innhold
[GlcNAc] <sub>2</sub> /[GlcNAc], 200 µM	200 µL 1 mM <i>N</i> -acetyl-D-glucosamine 200 µL 1 mM Di-acetyl chitobiose 50 mM Natriumacetate pH 6.1 til totalt 1000 µL
[GlcNAc] <sub>2</sub> /[GlcNAc] <sub>1</sub> , 400 µM	400 µL 1 mM <i>N</i> -acetyl-D-glucosamine 400 µL 1 mM Di-acetyl chitobiose 50 mM Natriumacetate pH 6.1 til totalt 1000 µL
[GlcNAc] <sub>4</sub> /[GlcNAc] <sub>2</sub> , 200 µM	200 µL 1 mM Tetra-acetyl chitotetraose 200 µL 1 mM Di-acetyl chitobiose 50 mM Natriumacetate pH 6.1 til totalt 1000 µL
[GlcNAc] <sub>4</sub> /[GlcNAc] <sub>2</sub> , 400 µM	400 µL 1 mM Tetra-acetyl chitotetraose 400 µL 1 mM Di-acetyl chitobiose 50 mM Natriumacetate pH 6.1 til totalt 1000 µL
Ammoniumsulfat, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 3 M	198,21 g Ammoniumsulfat dH <sub>2</sub> O til totalt 500 mL
Ammoniumsulfat, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0,5 M	83,33 mL 3 M Ammoniumsulfat dH <sub>2</sub> O til totalt 500 mL
Ampicillin Sodium salt, C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>4</sub> S, 50 mg/mL	500 mg Ampicillin dH <sub>2</sub> O til totalt 10 mL
Avfargingsløsning SDS-PAGE	100 mL Eddiksyre 100 mL Metanol dH <sub>2</sub> O til totalt 1 L
Di-acetyl-D-glucosamine [GlcNAc] <sub>2</sub> , C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>11</sub> , 1 mM	0,4244 g Di-acetyl chitobiose 20 mM Natriumacetate pH 6.1 til totalt 1000 µL

Løsninger	Innhold
Dikaliumfosfat, $K_2PO_4H$ , 1 M	174,18 g Dikaliumfosfat dH <sub>2</sub> O til totalt 1 L
Eddiksyre, $CH_3COOH$ , 20 mM	1,15 mL Konsentrert eddiksyre dH <sub>2</sub> O til totalt 1 L
Eddiksyre, $CH_3COOH$ , 40 mM	2,30 mL Konsentrert eddiksyre dH <sub>2</sub> O til totalt 1 L
Eddiksyre, $CH_3COOH$ , pH 2.2, 1 M	5 mL Konsentrert eddiksyre dH <sub>2</sub> O til totalt 100 mL
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), $Na_2C_{10}H_{16}N_2O_8 \times 2H_2O$ , pH 8.0, 0,5 M	46,5 g Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 200 mL dH <sub>2</sub> O pH justeres med natriumhydroksid dH <sub>2</sub> O til totalt 250 mL
Elueringsbuffer IEC: Etanolamin, $NH_2C_2H_4OH$ , pH 9.4, 40 mM, Natriumklorid, NaCl, 1 M	80 mL 0,5 M Etanolamin 700 mL dH <sub>2</sub> O 58,44 g Natriumklorid pH justeres med saltsyre dH <sub>2</sub> O til totalt 1 L
Elueringsbuffer HIC: Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM, Isopropanol, $CH_3CH(OH)CH_3$ , 4 %	20 mL 1 M Tris-HCl 40 mL 100 % Isopropanol dH <sub>2</sub> O til totalt 1 L
Etanol, $CH_3CH_2OH$ , 20 %	200 mL 100 % Etanol dH <sub>2</sub> O til totalt 1 L
Etanol, $CH_3CH_2OH$ , 70 %	700 mL 100 % Etanol dH <sub>2</sub> O til totalt 1 L
Etanolamin, $NH_2C_2H_4OH$ , 0,5 M	15,3 mL Etanolamin dH <sub>2</sub> O til totalt 500 mL
Fargeløsning SDS- PAGE	0,25 g Coomassie Brilliant Blue R250 125 mL Metanol 25 mL 100 % Eddiksyre dH <sub>2</sub> O til totalt 250 mL

Løsninger	Innhold
Glycine/natriumhydroksid, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> /NaOH pH 10.6, 0,2 M	2,1 g Di-natriumkarbonat dH <sub>2</sub> O til totalt 100 mL
Hydrogenklorid, HCl, 1 M	21 mL Konsentrert saltsyre dH <sub>2</sub> O til totalt 300 mL
Hydrogenklorid, HCl, 6 M	0,515 L Konsentrert saltsyre dH <sub>2</sub> O til totalt 1 mL
Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub> S, 1 M	2,38 g Isopropyl β-D-1- thiogalactopyranoside (IPTG) dH <sub>2</sub> O til totalt 10 mL
Kaliumdihydrogenfosfat, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1 M	136,09 g Kaliumdihydrogenfosfat dH <sub>2</sub> O til totalt 1 L
Magnesiumdiklorid, MgCl <sub>2</sub> , 1 M	10,5 g Magnesiumdiklorid x 6H <sub>2</sub> O dH <sub>2</sub> O til totalt 500 mL
MOPS, C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub> S, 1X	100 mL 20 X MOPS dH <sub>2</sub> O til totalt 2 L
Mobilfase IEC: Etanolamin, NH <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OH, pH 9.4, 40 mM	2,45 mL Etanolamin dH <sub>2</sub> O til totalt 1 L
Mobilfase HIC: Tris- HCl, pH 8.0, 20 mM, Ammoniumsulfat, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0,5M	20 mL 1 M Tris-HCl 166,7 mL 3M Ammoniumsulfat dH <sub>2</sub> O til totalt 1 L
<i>N</i> -acetyl-D-glucosamine [GlcNAc], C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>6</sub> , 1 mM	0,221 g <i>N</i> -acetyl-D-glucosamine 20 mM Natriumacetate pH 6.1 til totalt 1000 µL
Natriumacetate, CH <sub>3</sub> COONa, pH 6.1, 20 mM	2 mL 1 M Natriumacetate dH <sub>2</sub> O til totalt 100 mL
Natriumacetate, CH <sub>3</sub> COONa, pH 6.1, 50 mM,	5 mL 1 M Natriumacetate dH <sub>2</sub> O til totalt 100 mL
Natriumacetate, CH <sub>3</sub> COONa, pH 8,5, 1 M	82 g Natriumacetate dH <sub>2</sub> O til totalt 1 L

Løsninger	Innhold
Natriumhydroksid, NaOH, 0,3 M	3,15 g Natriumhydroksid dH <sub>2</sub> O til totalt 250 mL
Natriumhydroksid, NaOH, 6 M	240 g Natriumhydroksid dH <sub>2</sub> O til et sluttvolum på 1 L
Natriumhydroksid, NaOH, 0,3 M	50 mL 6 M Natriumhydroksid 950 mL dH <sub>2</sub> O
Svovelsyre, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 20 mM	50 µL Konsentrert svovelsyre dH <sub>2</sub> O til totalt 50 mL
Svovelsyre, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 40 mM	1,087 mL Konsentrert svovelsyre dH <sub>2</sub> O til totalt 0,5 L
Tetra-acetyl chitotetraose [GlcNAc] <sub>4</sub> , C <sub>24</sub> H <sub>41</sub> N <sub>3</sub> O <sub>16</sub> , 1 mM	0,83 mg Tetra-acetyl chitotetraose 20 mM Natriumacetate pH 6.1 til totalt 1000 µL
Tetra-acetyl chitotetraose [GlcNAc] <sub>4</sub> , C <sub>24</sub> H <sub>41</sub> N <sub>3</sub> O <sub>16</sub> , 5 mM	4,154mg Tetra-acetyl chitotetraose 20 mM Natriumacetate pH 6.1 til totalt 1000 µL
Tetra-acetyl chitotetraose [GlcNAc] <sub>4</sub> , C <sub>24</sub> H <sub>41</sub> N <sub>3</sub> O <sub>16</sub> , 10 mM	8,3079 mg Tetra-acetyl chitotetraose [GlcAc] <sub>4</sub> 20 mM Natriumacetate pH 6.1 til totalt 1000 µL
Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM	20 mL 1 M Tris HCl dH <sub>2</sub> O til total 1 L
Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM	100 mL 1M Tris- HCl dH <sub>2</sub> O til totalt 1L



## 2.9.2 Buffere

Buffer	Innhold
Citrat/fosfat buffer, $C_6H_8O_7/Na_3PO_4$ , pH 5.2	23,3 mL 0,1 M Citratsyre 26,7 mL 0,2 M Natriumfosfat dH <sub>2</sub> O til totalt 100 mL
Kaliumfosfat buffer, $KH_2PO_4/ K_2PO_4H$ , pH 6.0, 0,1 M	132 mL 1 M Dikaliumfosfat 868 mL 1 M Kaliumdihydrogenfosfat pH justerte med 1 M $K_2PO_4H$ og 1 M $KH_2PO_4$
Natriumacetate buffer, $CH_3COONa/CH_3COOH$ , pH 6.1, 1 M	920 mL Natriumacetate 25 mL 1 M Eddiksyre
Natriumfosfatbuffer, $NaH_2PO_4/Na_2HPO_4$ , pH 6.3, 100 mM	10,7 g Mononatriumfosfat med 387,5 mL dH <sub>2</sub> O 4 g Dinatriumfosfat med 112,5 mL dH <sub>2</sub> O dH <sub>2</sub> O til totalt 1 L
Spheroplastbuffer	100 mL Tris-HCl 171 g D (+)-Saccharose 1 mL 0,5 M EDTA 2 mL PMSF dH <sub>2</sub> O til totalt 1 L
Tris-HCl pH 8.0, 1 M	800 mL dH <sub>2</sub> O 121,1 g Trizma base Justerte pH ved å tilsette ca 42 mL 6 M saltsyre dH <sub>2</sub> O til totalt 1 L

## 2.10 Programvare

Bruksområde	Programvare	Leverandør
Dataanalyse av $k_{cat}/K_M$	Origin 7.0	Originlab
HPLC	Chromeleon	Dionex
Kontroll av sekvenseringresultater	CLC DNA Workbench	CLCbio
Proteinrensing	LP Data View	Bio-Rad
Spektrofotometer	Nano Drop 1000	Thermo Scientific

### 3 Metoder

I denne masteroppgaven ble det laget seks inaktive dobbeltmutanter, der hensikten var å analysere bindingsaffiniteten og termodynamikken til enzymene. Det ble laget enkelt mutanter som var aktive mot kitin, der prosessiviteten og direksjonaliteten for residuene ble analysert. En oversikt over mutanter som ble laget i ChiA og ChiB er vist i tabell 1. Det ble også utført eksperimentelle forsøk med mutanter som var blitt mutert tidligere og disse er vist i tabell 2.

**Tabell 1.** Oversikt over ChiA og ChiB mutanter som ble laget.

Kitinase	Enkel mutanter	Dobbel mutanter
<b>ChiA</b>	F396A	E315Q/W167A
		E315Q/W275A
		E315Q/F396W
<b>ChiB</b>	W97A	E144Q/W97A
		E144Q/W220A

**Tabell 2.** En oversikt over ChiA og ChiB mutanter som var blitt mutert tidligere.

Kitinase	Enzym
<b>ChiA</b>	E315Q
	W167A
	R172A
	W275A
	T276A
	F396W
<b>ChiB</b>	E144Q
	W220A
	R294A
	W97A/W220A

### 3.1 Design av nye mutanter

#### 3.1.1 Design av primere

Primere som brukes til mutering må være designet individuelt for hver mutasjon. Flere hensyn må tas til etterfølge når primere designes (Agilent Technologies 2013).

Begge primere skal inneholde den ønskede mutasjonen, slik at de vil binde til hver sin komplementære DNA-tråd på plasmidet. Mutasjonen skal være i midten av primeren med omtrent  $\approx 10-15$  baser på hver side. GC innholdet til primeren bør være på minimum 40 %, og enden av primerene bør ha en eller flere G eller C baser. Primere skal være mellom 25-45 baser lange, med en smeltetemperatur ( $T_m$ )  $\geq 78$  °C. Estimering av  $T_m$  for primere involvert i mutasjonsreaksjonen brukes likningen 3.1 (Agilent Technologies 2013).

$$T_m = 81,5 + 0,41(\% GC) - \left(\frac{675}{N}\right) - \% mismatch \quad \text{Likning 3.1}$$

$N$  er primerens lengde i baser, prosent GC innhold og prosent mismatch.

I denne oppgaven ble programvaren Quick Change Primer Design brukt for å designe primerene. Programvaren er tilgjengelig på Agilent Technologies sin nettside (Agilent Technologies 2013). Primerene ble designet og bestilt fra Invitrogen (Life Technologies 2013c) av stipendiat Anne Grethe Hamre (jfr. Avsnitt 2.5).

#### 3.1.2 Oppdyrking av frysestock

Før seterettet mutagenese kunne iverksettes var det nødvendig å dyrke opp *Escherichia coli* som inneholdt ChiA og ChiB villtype plasmid. Det var også nødvendig å dyrke opp ChiA E315Q og ChiB E144Q plasmidene. Disse plasmidene skulle brukes videre som templat for mutering som beskrevet i 3.1.5.

For å være sikker på at *E.coli* bærer vektoren for uttrykking av ChiA og ChiB brukes forskjellige markører. Antibiotika resistens er en markør som vanligvis brukes. Dette innebærer at plasmidet inneholder et gen som koder for enzym som er involvert i degradering av antibiotika. Bakterierceller med denne vektoren vil dermed kunne overleve i løsninger med antibiotika. Mutanter dyrkes derfor med ampicillin for å sikre at kun disse er tilstede i løsningen (Mathews et al. 2013).

Materialer:

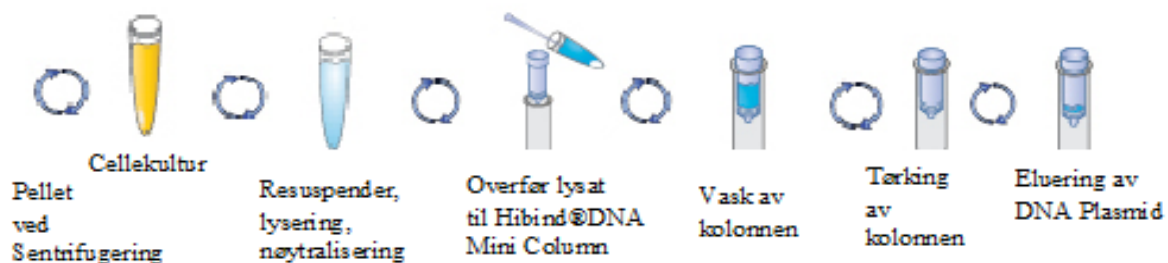
- Villtype celler
- LB-Medium
- Ampicillin, 50 mg/mL

Metode:

*Escherichia coli* med villtype plasmid ble inokulert med 4 mL LB-medium og 4  $\mu$ L 50 mg/mL ampicillin. Rørene ble inkubert i 37 °C og 200 rpm i 12-16 timer.

**3.1.3 Rensing av plasmid ved hjelp av E.Z.N.A Plasmid Miniprep Kit I Spin Protocol**

E.Z.N.A Plasmid Miniprep Kit I Spin Protocol er et system som gjør det enkelt å ekstrahere og rense nukleinsyrer. HiBind® matriksen binder DNA eller RNA reversibelt under optimaliserte forhold, noe som gjør at proteiner og andre kontaminanter fjernes. Nukleinsyrer elueres med deionisert vann eller en lav saltbuffer. E.Z.N.A Plasmid Miniprep Kit I Spin Protocol blir brukt til å isolere plasmid DNA fra 1-5 mL kulturer som vist i figur 15 (Omega-biotek 2013).



**Figur 15.** Rensing av Plasmid DNA ved hjelp av E.Z.N.A Plasmid Miniprep Kit I Spin Protocol (Omega-biotek 2013).

Materialer:

- Løsning I / RNase A
- Løsning II
- Løsning III
- Ekvilibreringsbuffer
- Miniprep kolonne
- HB buffer
- DNA vaskebuffer fortynnet i etanol
- Elueringsbuffer

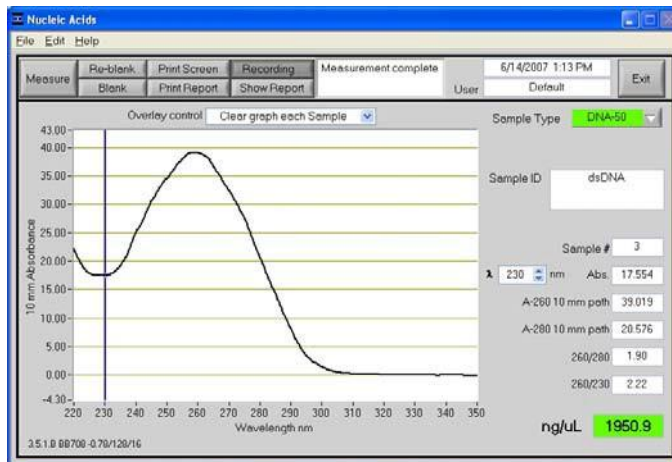
Metode:

1,5 mL cellekultur ble overført til eppendorfrør og sentrifugert i 1 minutt ved 10 000 x g. Supernatanten ble dekantert. 250 µL Løsning I (RNase A) ble tilsatt og pelleten ble resuspendert ved pipettering. 250 µL Løsning II ble tilsatt, og løsningen ble blandet til et klarere lysat ble observert. 350 µL Løsning III ble tilsatt, og løsningen ble blandet til et hvitt bunnfall ble synlig. Prøvene ble sentrifugert ved 13 000 x g i 10 minutter. Miniprep-kolonnen ble gjort klar ved å tilsette 100 µL ekvillibrasjonsbuffer. Kolonnen ble plassert i et 2 mL oppsamlingsrør og sentrifugert ved 13 000 x g i 1 minutt. *Flow through'en* ble dekantert og den klare supernatanten ble overført til miniprep kolonnen. Prøvene ble sentrifugert i 1 minutt ved 13 000 x g. 500 µL HB buffer ble tilsatt og prøvene ble igjen sentrifugert ved 13 000 x g i 1 minutt. 700 µL DNA vaskebuffer ble tilsatt og prøvene ble sentrifugert ved 13 000 x g i 1 minutt. Den tomme kolonnen ble sentrifugert ved 13 000 x g i 2 minutter for å tørke kolonnematriksen. Kolonnen ble deretter satt i et rent 1,5 mL eppendorfrør og tilsatt 30 µL elueringsbuffer. Kolonnen ble sentrifugert i 1 minutt ved 13 000 x g for å eluere ut plasmidet. Eluatet ble oppbevart ved - 20 °C.

**3.1.4 Måling av plasmidkonsentrasjon ved bruk av Nanodrop (ND-1000)**

Nanodrop 1000 er et spektrofotometer som gir resultater ved prøvetaking i mikrovolumskala. Instrumentet virker ved 220 nm-750 nm, slik at Nanodrop kan brukes til måling av DNA- og proteinkonsentrasjoner. Instrumentet måler 1 µL prøver med høy nøyaktighet og reproduserbarhet. Nanodrop detekterer dsDNA konsentrasjoner opptil 3700 ng/µL uten fortykning. Måling av DNA og RNA foregår på henholdsvis 260 nm og 280 nm.

Kurvens form forteller også noe om hvor ren prøven er (Thermo Scientific 2008). Et nanodrop spektra er vist i figur 16.



**Figur 16.** Nanodrop spekter fra DNA konsentrasjonsmåling. Når spekteret har en kurve som vist i figuren, tyder dette på at plasmidet er rent. Figuren er hentet fra (Thermo Scientific 2008).

#### Materialer:

- dH<sub>2</sub>O
- Elueringsbuffer, fra E.Z.N.A Plasmid Miniprep Kit I Spin Protocol
- Plasmid DNA

#### Metode:

2 µL dH<sub>2</sub>O ble brukt til å nullstille instrumentet. Kalibrering ble deretter utført med 2 µL elueringsbuffer. 2 µL plasmid ble påført og plasmidkonsentrasjonen ble avlest i ng/mL.

#### **3.1.5 Seterrettet mutagenese**

For å utføre enkle punktmutasjoner i både ChiA og ChiB plasmidene ble kitet *QuickChange® II Site Directed Mutagenesis* fra Agilent Technologies brukt. Seterrettet mutagenese oppnås i en PCR-reaksjon som starter med at plasmidet denatureres. Oligonukleotid primerene bindes deretter komplementært til plasmidet, og primerene forlenges av *PfuUltra* Polymerase (For mer detalj se avsnitt 1.7). Det ble brukt TOP-10 superkompetente celler til transformering av det muterte plasmidet og årsaken er at disse cellene har høy transformasjonseffektivitet (New England Biolabs Inc. 2013). Mutanter som ble laget er vist i tabell 1.

Materialer:

- 10x reaksjonsbuffer
- pWhitescript 4,5 kB kontrollplasmid
- Oligonukleotid primer 1
- Oligonukleotid primer 2
- dsDNA templat, 100 ng
- dNTP miks
- dH<sub>2</sub>O
- Pfu Ultra HF (DNA polymerase)

Metode:

PCR-reaksjonen ble laget i PCR-rør på kuldeblokk. Tabell 3 og 4 viser henholdsvis kontroll- og prøvereksjonen.

**Tabell 3.** Kontrollreaksjon benyttet i PCR for seterettet mutagenese.

<b>Kjemikalier</b>	<b>Volum</b>
<b>10x Reaksjonsbuffer</b>	5 µL
<b>Whitescript 4,5 kB kontrollplasmid</b>	2 µL
<b>Oligonukleotid kontrollprimer 1</b>	1,25 µL
<b>Oligonukleotid kontrollprimer 2</b>	1,25 µL
<b>dNTP miks</b>	1 µL
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	38,5 µL



**Tabell 4.** Prøvereaksjonen benyttet i PCR for seterettet mutagenese.

Kjemikalier	Volum
10x reaksjonsbuffer	5 µL
dsDNA templat	1 µL av 80-100 ng plasmid
Primer 1	1,25 µL av 100 ng primer 1
Primer 2	1,25 µL av 100 ng primer 2
dNTP miks	1 µL
ddH <sub>2</sub> O	40,5 µL
Pfu Ultra HF	1 µL

PCR-programmet som ble benyttet vises i tabell 5. Ekstensjonstiden ble satt til 5,5 min fordi vektoren for både ChiA og ChiB er på cirka 5500 basepar (1 minutt per kb). Det ble benyttet 18 sykluser, slik at et stort antall kopier av plasmidet ble laget.

**Tabell 5.** PCR-program.

	Runder	Temperatur (°C)	Tid (min)
Heating lid	1	110	
Initiell denaturering	18	95	0,5
Denaturering		95	0,5
Annealing		55	1
Extension		68	5,5
Nedkjøling	1	10	

### 3.1.6 Dpn I digestion

Dpn I er et restriksjonsenzym som har endonuklease aktivitet. Enzymet gjenkjenner og degraderer metylerte og hemimetylerte DNA tråder (New England Biolabs Inc. 2013).

#### Materialer:

- Dpn I
- PCR-reaksjon

#### Metode:

Til hver PCR-reaksjon ble det tilsatt 1 µL Dpn I restriksjonsenzym. Løsningen ble blandet forsiktig før den ble spunnet ned i 1 minutt. Reaksjonsløsningene ble deretter inkubert ved 37 °C i 1 time.

### 3.1.7 Utfelling av DNA

Pellet Paint® Co-Precipitant er et visuelt fargestoff som brukes spesielt til alkohol presipitering av nukleinsyrer. Pellet Paint® Co-Precipitant er en ideell metode for rensing av DNA og skyldes at metoden er rask, primere fjernes effektiv og DNA blir gjenvunnet kvantitativt (Millipore 2013b).

#### Materialer:

- Pellet paint® Co-Precipitant
- Natriumacetate, CH<sub>3</sub>COONa, 3M
- Etanol, CH<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>OH, 96 %
- Etanol, CH<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>OH, 70 %
- dH<sub>2</sub>O
- Dpn I behandlet DNA

#### Metode:

Dpn I behandlet DNA ble overført til eppendorfrør. 2 µL Pellet paint og 0,1 volum 3 M natriumacetate ble tilsatt Dpn I behandlet DNA, og løsningen ble blandet forsiktig. 2 volum 96 % etanol ble tilsatt, og reaksjonen ble blandet ved bruk av vortex. Reaksjonen ble videre inkubert ved romtemperatur i 2 minutter, før den ble sentrifugert ved 16 000 x g i 5 minutter. Etter sentrifugeringen skulle det være mulig å se en rosa pellet på bunnen av eppendorfrøret.

Hvis dette ikke var tilfellet ble det sentrifugert et par minutter til. Supernatanten ble forsiktig fjernet ved bruk av en pipette. Det ble videre tilsatt flere volum 70 % etanol for å rense pelletten.

Deretter ble blandingen blandet lett, før den på ny ble sentrifugert ved 16 000 x g i 5 minutter. Supernatanten ble fjernet med en pipette. Pelletten ble rensed ved å tilsette noen volum 96 % etanol. Løsningen ble sentrifugert ved 16 000 x g i 5 minutter. Så mye som mulig av supernatanten ble fjernet med en pipette. Prøvene ble inkubert i romtemperatur til all overflødig etanol var fordampet. Pelletten ble resuspendert i 5µL dH<sub>2</sub>O.

### 3.1.8 Transformering inn i TOP-10 celler

TOP-10 superkompetente *E.coli* celler gir en transformasjonseffektivitet på  $1 \times 10^9$  cfu/µg plasmid DNA og er ideell for effektiv kloning. Cellene gir stabil replikasjon av plasmider med høyt-kopi nummer (Life Technologies 2013d).

#### Materialer:

- TOP-10 celler
- S.O.C medium, 42 °C
- Agarplater med ampicillin, 100 mg/mL
- Oppkonsentrert DNA

#### Metode:

Cellene ble tint forsiktig på is. Det oppkonsentrerte DNAet ble overført til rørene med de superkompetente cellene. Løsningene ble mikset ved å knipse forsiktig på eppendorfrørene. Deretter ble reaksjonene inkubert på is i 30 minutter. Rørene ble varmebehandlet i 30 sekunder ved 42 °C i et vannbad. Reaksjonene ble satt direkte på is i 2 minutter. 250 µL forvarmet S.O.C-medium ble tilsatt sterilt, og rørene ble inkubert ved 37 °C i 1 time ved 200 rpm. 100 µL cellekultur ble platet ut på to agarskåler. Agarskålene hadde en konsentrasjon på 100 µg/mL ampicillin. Resten av cellekulturen ble tilsatt 0,5 µL 100 mg/mL ampicillin og inkubert videre ved 37 °C. Hvis det ikke var vekst på agarplatene neste dag ble resten platet ut. Platene ble invertert og inkubert ved 37 C° i mer enn 16 timer.

**Tabell 6.** Følgende reaksjoner ble platet ut på agarskåler som inneholdt ampicillin [100 µg/mL]

Reaksjonstype	Volum
Mutagenesekontroll	100 µL
Transformeringskontroll	5 µL i 200µL medium
Prøve	100 µL på 2 plater

### 3.1.9 Tillaging av frysestocker

Transformanter ble dyrket over natt som beskrevet i avsnitt 3.1.2. Frysestocker av hver transformant ble laget, slik at de kunne oppbevares over lengre tid.

#### Materialer:

- Cellekultur
- Glycerol, C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>, 87 %

#### Metode:

1050 µL cellekultur ble blandet med 450 µL 87 % glyserol i et cryorør. Dette ble utført sterilt for å forhindre kontaminering. Celleløsningen ble oppbevart ved -80 °C.

For å finne ut om plasmidet inneholdt riktig mutasjon ble plasmidet rensert og sendt til sekvensering. Isolering av plasmid har blitt beskrevet i 3.1.3.

### 3.1.10 Sekvensering

Plasmidene ble deretter sekvensert for å kontrollere at plasmidet inneholdt riktig mutasjon. En sekvenseringsreaksjon bestående av sekvenseringprimere og plasmid DNA ble lagd og sendt til GATC Biotech i Constance, Tyskland.

#### Materialer:

- Plasmid, 80-100 ng/µL
- Primere, 5 pmol/µL
- Elueringsbuffer (fra E.Z.N.A Plasmid Miniprep Kit I Spin Protocol)

**Metode:**

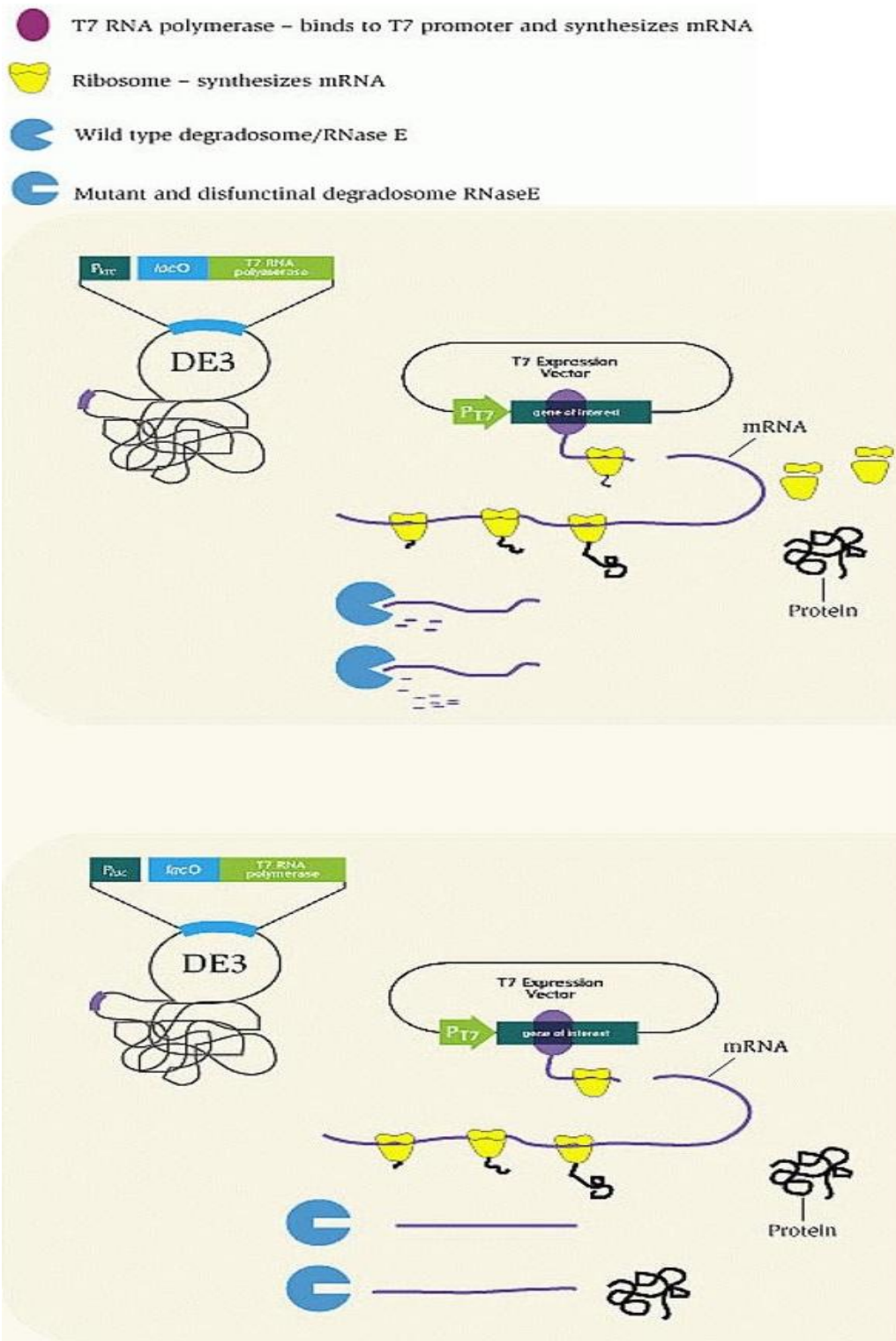
Isolert plasmid ble fortynnet til mellom 80-100 ng/ $\mu$ L med elueringsbuffer (fra E.Z.N.A Plasmid Miniprepkit I Spin Protocol). 5  $\mu$ L av plasmidløsningen ble blandet med 5  $\mu$ L 5 pmol/ $\mu$ L primer. Sekvenseringsreaksjonene ble merket med strekkoder og sendt til sekvensering. Resultatet fra sekvenseringen ble gitt i form av datafiler som ble analysert med dataprogrammet CLC DNA Workbench.

**3.1.11 Databehandling for sekvensering**

Sekvensen til det transformerte plasmidet ble sammenlignet med sekvensen til villtypen. Plasmidet som er blitt mutert skal ha lik sekvens som villtype, bortsett fra der basene er blitt endret. Programmet CLC DNA Workbench (CLC Bio 2013) ble benyttet til å analysere sekvensene. Databehandlingen ble utført av Anne Grethe Hamre.

**3.1.12 Transformering ved bruk av BL21 Star™ (DE3)**

BL21 Star™ (DE3) pLysS *Escherichia coli* er kompetente celler som har blitt spesielt designet for å uttrykke ikke-giftige rekombinante proteiner fra et promotor-basert uttrykingsystem. Disse cellene har en transformasjonseffektivitet på mer enn  $1,0 \times 10^8$  cfu/ $\mu$ g plasmid DNA. BL21 Star celler gir bedre mRNA stabilitet, slik at større mengder mRNA er tilgjengelig for uttrykking av protein (Life Technologies 2013b). Et skjematisk bilde av hvordan BL21 Star™ (DE3) celler fungerer er vist i figur 17.



**Figur 17.** Skjematisk fremstilling av BL21 Star™ *E. coli* og dens funksjon. *rne* genet i *E. coli* koder for enzymet RNase E som er en endonuklease involvert i rRNA utvikling og degradering. *rne131* mutasjonen i BL21 Star™ (DE3) celler koder for en RNase E som mangler mRNA degraderingsaktivitet. Dermed vil disse cellene uttrykke mRNA med økt stabilitet og økt utbytte av rekombinante proteiner (Life Technologies 2013b).

Materialer:

- BL21Star™ celler
- Plasmid DNA
- Forvarmet Super Optimal Broth (S.O.C), 42 °C
- Ampicillin, C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S, 50 mg/mL
- Agarskåler

Metode:

BL21Star™ celler ble tint forsiktig på is. 5-10 ng plasmid DNA ble overført og ble blandet forsiktig med BL21 Star™ cellene. Deretter ble reaksjonene inkubert på is i 30 minutter. Rørene ble varmebehandlet i 30 sekunder ved 42 °C i et vannbad. Reaksjonene ble satt direkte på is i 2 minutter. 250 µL forvarmet S.O.C-medium ble tilsatt sterilt, og rørene ble inkubert ved 37 °C i 1 time ved 200 rpm. 100 µL av cellekulturen ble platet ut på 2 agarplater. Agarskålene hadde en konsentrasjon på 100 µg/mL ampicillin. Resten av cellekulturen ble tilsatt 0,5 µL 100 mg/mL ampicillin og inkubert videre ved 37 °C. Hvis det ikke var vekst på agarplatene neste dag ble resten platet ut. Platene ble invertert og inkubert ved 37 °C i mer enn 16 timer.

**Tabell 7.** Følgende reaksjoner ble platet ut på agarskåler som inneholdt ampicillin [100 mg/mL].

Reaksjonstype	Volum
Mutagenesekontroll	100 µL
Transformeringskontroll	5 µL i 200µL medium
Prøve	100 µL på 2 plater

Transformanter ble dyrket opp som beskrevet i avsnitt 3.1.2.

Det ble videre laget frysestocker av disse som beskrevet i avsnitt 3.1.9.

## 3.2 Produksjon av ChiA og ChiB

### 3.2.1 Overekspresjon

*Escherichia coli* er en vertsorganisme som blant annet brukes for å uttrykke kitinase A og B. Denne organismen er en av de best studerte modellorganismene med tanke på genom, fysiologi og biokjemi (NCBI 2013).

Ved dyrking av *E.coli* og andre bakterier tilsettes antibiotika for å unngå kontaminering fra andre mikroorganismer. Antibiotika er forbindelser som brukes innen human- og veterinærmedisin for å behandle infeksjoner (Laura Brinas 2002). Disse forbindelsene består av en  $\beta$ -laktamring som inhiberer bakteriens celleveggsyntese. Dette medfører at bakteriecellen lyses og bakteriens cytosol frigjøres (Bank 2013). *E.coli* har blitt transformert med et plasmid som inneholder et gen som koder for enzymet  $\beta$ -laktamase. Dens oppgave er å hydrolysere  $\beta$ -laktamringen, slik at antibiotikumet blir inaktivert (Laura Brinas 2002). Mikroorganismer som ikke har dette enzymet vil ikke overleve i en løsning med ampicillin. Derfor stilles det ikke like strenge krav til sterilitet når det arbeides med denne typen mikroorganismer.

LB mediet som benyttes til overekspresjon inneholder produkter fra enzymatisk nedbrytning av kasein, kjent som pepton, gjærekstrakt og natriumklorid. Pepton inneholder aminosyrer og peptider, mens gjærekstraktet inneholder nukleinsyrer, lipider og andre næringstoffer som er viktig for bakterievekst (Expression Technologies Inc. 2013).

#### Materialer:

- LB medium
- Ampicillin, 50 mg/mL
- Frystock av ønsket kitinase

#### Metode:

500 mL LB-mediet ble overført til 2 L dyrkningskolber. 500  $\mu$ L 50 mg/mL Ampicillin ble tilsatt hver dyrkningskolbe. Mediet ble inokulert med frysestock fra ønsket kitinase. Kolbene ble inkubert ved 37 °C og 200 rpm i 12-18 timer.



### 3.2.2 Periplasmatisk ekstrakt

*E. coli* er en gram negativ bakterie. I gram negative bakterier er celleveggen bygd opp av 2 membraner, der området mellom de to membranene kalles periplasmaet (Reece 2012).

Kitinase A og B uttrykkes i periplasmaet. Disse proteinene vil kunne frigjøres dersom cellene blir utsatt for et osmotisk sjokk. På grunn av at sukkerkonsentrasjonen blir mye større inne i cellen, vil cellen få et osmotisk sjokk og lyses når iskaldt vann tilsettes. Proteinene er dermed i løsnings og blir stabilisert av  $MgCl_2$ . PMSF er en proteasehemmer som tilsettes det periplasmatiske ekstraktet for å hindre at proteinene blir brutt ned av proteaser.

#### Materialer:

- Cellekultur
- Iskald spheroplastbuffer
- $dH_2O$
- Magnesiumklorid,  $MgCl_2$ , 1M
- PMSF,  $C_7H_7FO_2S$ , 50 mM

#### Metode:

Cellekulturene ble spunnet ned ved 8000 rpm i 10 minutter på 4 °C. Supernatanten ble dekantert.

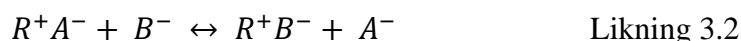
25 mL spheroplastbuffer ble tilsatt, og pelleten ble resuspendert. Løsningene ble inkubert på is i 5 minutter før de ble overført til 30 mL sentrifugerør. Suspensjonen ble spunnet ned i 10 minutter ved 8000 rpm på 4 °C. Supernatanten ble dekantert og pelleten ble inkubert i minimum 10 minutter ved romtemperatur. 15 mL iskald  $dH_2O$  ble tilsatt, og pelleten ble igjen resuspendert. Løsningen ble avkjølt på is i 45 sekunder, før 1,5 mL 1 M  $MgCl_2$  ble tilsatt.

Prøven ble videre spunnet ned i 8 minutter ved 8000 rpm på 4 °C. Supernatanten ble sterilfiltrert gjennom et 0,22  $\mu m$  filter. Det ble tilsatt 2  $\mu L$  50 mM PMSF per mL periplasmatisk ekstrakt. Ekstraktet ble lagret i kjøleskap ved 4 °C.

### 3.3 Isolering av ChiA og ChiB

#### 3.3.1 Ionebytter kromatografi (IEC):

Ionebytterkromatografi er en teknikk som brukes til å separere ioner og noen polare molekyler. Teknikken går ut på at det sitter en funksjonell gruppe på kolonnen som enten er ionisk eller ioniserbar. Denne interagerer med et ion med motsatt ladning. Når en mobilfase med et mot-ion beveger seg over stasjonær fasen vil mot-ionet bytte ut ionet som interagerer med den funksjonelle gruppen (Miller 2005). Dermed vil separasjon kunne skje. I likning 3.2 vises en generell reaksjonslikning for ionebytter kromatografi.



der  $B^-$  -ionet representerer analytten som blir separert fra andre kationer, som for eksempel  $C^-$  eller  $D^-$ .

Anionene vil bli separert fra hverandre hvis den stasjonære fasen har en selektiv affinitet til de forskjellige anionene. Forbindelsen som interagerer minst med den stasjonære fasen vil komme ut først, mens den som har sterkest interaksjon vil komme ut sist. Eksemplet over viser bytting av anioner og er et eksempel på anionbyttekromatografi, mens det motsatte kalles en kationbyttekromatografi (Miller 2005).

Viktige faktorer som påvirker separasjon av forbindelser i IEC er pH, konsentrasjon av mot-ionet i den mobile fasen og selektiviteten til de forskjellige ionene. pH er viktig fordi den bestemmer om den funksjonelle gruppen er ionisert eller ikke (Miller 2005).

ChiA og ChiB har en pI på 8 som betyr at en  $\text{pH} > 8$  vil gi proteinet en netto negativ ladning. Dette skyldes at proteinet blir deprotonert. Q Sepharose brukes som stasjonærfase på grunn av at den vil interagere med det negativt ladede proteinet. Mobilfase og det periplasmatiske ekstraktet ble justert til en pH på 9,4. Proteiner uten ladning vil elueres ut i voidtoppen, mens negativt ladede proteiner vil interagere med den positivt ladede stasjonærfasen og retarderes.

Eluering av ChiA og ChiB forekommer ved gradvis økning av saltkonsentrasjonen i bufferløsningen. ChiA og ChiB vil elueres ut mellom 10 – 40 % i elueringsprogrammet.

#### Materialer:

- Etanolamin, 0,5 M
- Periplasmatisk ekstrakt
- Mobilfase
  - Etanolamin, C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>ON, pH 9.4, 40 mM
- Elueringsbuffer
  - Etanolamin, C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>ON, pH 9.4, 40 mM
  - Natriumhydroksid, NaCl, pH 9.4, 1 M
- Natrimhydroksid, NaOH, 1 M
- dH<sub>2</sub>O
- Etanol, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O, 20 %

#### Metode:

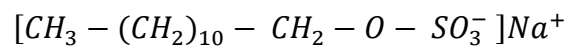
pH i det periplasmatiske ekstraktet (fra 3.2.2 ”Periplasmatisk ekstrakt”) ble justert slik at ekstraktet tilsvarer den i mobilfasen. Mobilfase ble påsatt kolonnen med en flow på 4 mL/minutt til rett baselinje ble oppnådd. Det periplasmatiske ekstraktet ble deretter påsatt med samme flow. Kolonnen ble videre vasket med mobilfase til baselinjen igjen ble rett. En gradienteluering ble deretter startet. Den gikk fra 0 % elueringsbuffer til 100 % i løpet av 120 minutter. Proteinene detekteres ved hjelp av en UV-detektor og rensingen kan følges via et program kalt LP Data View. Hver topp som ble observert ble samlet for seg. Ved fullført rensing ble kolonnen og systemet vasket med 100 mL 1M NaOH, 100 mL dH<sub>2</sub>O og 100 mL 20 % Etanol.

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

Teknikken brukes til å separere proteiner fra hverandre med hensyn på deres molekylvekt. Proteiner som blir separert ved bruk av SDS-PAGE denatureres av en detergent, sodium dodecyl sulfat (SDS). SDS er et sterkt denatureringsmiddel og består av en polar og en hydrofob del. SDS molekylet er vist i figur 18.

Den hydrofile delen av detergenten vil orientere seg mot vannet i løsningen, mens den hydrofobe delen vil interagere og denaturere proteinet. Det dannes et protein-detergent kompleks med en uniform negativ ladning langs hele peptidet (Lesk 2010).

Proteinene blir applisert på en polyakrylamid gel. Gelen blir så påsatt et elektrisk felt, der de negativt ladede proteinene vil vandre mot den positive polen. Gelen består av nettverk av ”tunneler” og porer, som varierer i størrelse. Det betyr at små proteiner kan passere gjennom små og store ”tunneler”, og derfor vil de bevege seg raskere i gelen sammenliknet med større proteiner. Proteinene separeres dermed etter deres molekylvekt. For å gjøre proteinene synlige brukes et fargestoff, Coomassie Blue (Lesk 2010). I denaturering av proteiner brukes en reduktant (Dithiothreitol, DTT) som reduserer disulfidbindinger i proteinene.



**Figur 18.** Sodium dodecyl sulfat.

For å bestemme et proteins molekylære masse brukes det ”markør”-proteiner med kjent masse (ladder), som blir analysert på samme gel som prøven (Life Technologies 2013a).

IEC fraksjonene ble analysert med SDS-PAGE for å finne fraksjonen der enzymet var tilstede.

#### Materialer:

- Proteinprøve
- Bench Mark Protein Ladder
- NuPAGE® 10% Bis-Tris Gel 1,0 mm x 10 well
- NuPAGE® Samplebuffer (4x)
- NuPAGE® Sample Reducing Agent (10x)
- MOPS SDS Running Buffer, 1X
- Proteinladder
- Fargeløsning
- Avfargingsløsning

**Metode:**

10 µL proteinprøve ble blandet med 5 µL NuPAGE® Samplebuffer (4x), 2 µL NuPAGE® Sample Reducing Agent (10x) og 3 µL dH<sub>2</sub>O. Prøven ble denaturert i 10 minutter ved 70 °C. En NuPAGE® 10 % Bis-Tris Gel ble brukt til å separere proteinene. Gelen ble satt inn i kjørekammeret sammen med en veggplate som dannet et indre bufferkammer. Det indre kammeret ble fylt med 1X MOPS SDS Running Buffer, mens det ytre kammeret halvveis ble fylt med samme buffer. Gelkammen ble fjernet før applisering av ladder og prøver. 3 µL proteinstandard (ladder) ble applisert i første brønn, mens 20 µL av proteinprøvene ble applisert i de andre brønnene. Gelen ble påsatt en spenning på 200 V i 50 minutter. Gelen ble videre farget i 30 minutter på et ristebrett. Fargeløsningen ble helt av og avfargingsløsning ble tilsatt gelen. Gelen ble satt på en risteinkubator til proteinbånd ble synlig.

**3.3.3 Hydrofob Interaksjonskromatografi (HIC)**

Hydrofob interaksjonskromatografi (HIC) er en annen teknikk som brukes til å separere biomolekyler. Prinsippet bak teknikken er at analytter på basis av deres hydrofobisitet separeres. Den stasjonære fasen er som oftest basert på silika eller forgrenet agarose (Miller 2005).

Mobilfasen som benyttes ved HIC er nesten alltid en vandig salt løsning, mens eluering gjøres ved å bruke en gradient med synkende salt-konsentrasjon. Høy konsentrasjon av salt i den mobile fasen favoriserer binding av analytt til den stasjonære fasen i en prosess som kalles ”utsalting”. Når saltløsningen i den mobile fasen reduseres under gradienten, vil analytten frigjøres fra den stasjonære fasen. Forbindelse med svakest binding til den stasjonære fasen elueres først (Miller 2005).

Siden ChiA og ChiB inneholder residuer som er hydrofobe og eksponerte er HIC en god metode for rensing. Stasjonærfasen som brukes er Phenyl Superose, som er et derivat av den kovalent-bundne hydrofobe fenyl forbindelsen Superose 12. De hydrofobe residuene på enzymet vil vekselvirke med de hydrofobe gruppene på stasjonær fasen. Dette medfører at molekyler med lite hydrofobisitet vil elueres ut i voidtoppen, mens proteiner med hydrofobe residuer vil interagere med stasjonærfasen og retarderes. Eluering av ChiA og ChiB forekommer ved gradvis økning av hydrofobisiteten, slik at ionestyrken reduseres i mobilfasen (Miller 2005).

Ofte brukes isopropanol i elueringen siden alkoholen er mer hydrofob enn både ChiA og ChiB. Proteinene vil elueres ut ved 100 % i elueringsprogrammet.

#### Materialer:

- Fraksjoner fra IEC
- Tris-HCl, pH 8.0, 1 M
- Ammoniumsulfat, (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>, 3 M
- Mobilfase
  - Tris-HCl , pH 8.0, 20 mM
  - Ammoniumsulfat, (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>, 0,5 M
- Elueringsbuffer
  - Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM
  - Isopropanol, C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O, 4 %
- Natriumhydroksid, NaOH, 1 M
- dH<sub>2</sub>O
- Etanol, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, 20 %

#### Metode:

pH til fraksjonene fra IEC ble justert slik at den tilsvarer den i mobilfasen. Mobilfase ble påsatt kolonnen med en flow på 4 mL/minutt til rett baselinje ble oppnådd. Fraksjonene ble påsatt med samme flow. Kolonnen ble videre vasket med mobilfase til baselinjen igjen ble rett. En gradienteluering ble deretter startet. Denne gikk fra 0 % elueringsbuffer til 100 % i løpet av 30 minutter. Proteinene detekteres ved hjelp av en UV-detektor og rensingen kan følges via et program kalt LP Data View. Hver topp som ble observert ble samlet for seg. Ved fullført rensing ble kolonnen og systemet vasket med 100 mL 1 M NaOH, 100 mL dH<sub>2</sub>O og 100 mL 20 % Etanol.

Fraksjonene fra rensingen ble analysert på SDS-PAGE (avsnitt 3.3.2) for å finne ut hvilken fraksjon som inneholdt protein med riktig størrelse. Disse fraksjonene ble tatt med videre til oppkonsentrering.

### 3.3.4 Rensing av periplasmatisk ekstrakt på kitinkuler

Aktive kitinaser har affinitet mot kitin, og det periplasmatiske ekstraktet kan derfor renses ved bruk av kitinkuler. Enzymene elueres ut ved bruk av eddiksyre som senker pH-verdien. Dette fører til svakere binding mellom proteinet og kolonnematerialet, slik at enzymene løsner fra kolonnematerialet. Denne metoden er mindre tidskrevende og enklere enn andre kromatografiske metoder beskrevet.

#### Materialer:

- Periplasmatisk ekstrakt fra aktiv enzym
- Kitinkuler
- Mobilfase
  - Tris HCl, pH 8.0, 50 mM
- Elueringsbuffer
  - Eddiksyre, CH<sub>3</sub>COOH, 20 mM
- Vaskebuffer: Natriumhydroksid, NaOH, 0,3 M

#### Metode:

10 mL kolonnemateriale ble pakket i kolonnen. Buffer A ble deretter påsatt med en hastighet på 2,5 mL/minutt til baselinjen ble rett. Det periplasmatiske ekstraktet ble justert med 1 M Tris-HCl pH 8.0 til 50 mM og påsatt kolonnen. Kolonnen ble videre vasket med mobilfase til baselinjen igjen ble rett. Deretter ble 20 mM eddiksyre påsatt kolonnen, slik at proteinet ble eluert ut av kolonnematriksen. Proteinene detekteres ved hjelp av en UV-detektor og rensingen kan følges via et program LP Data View.

Hver topp som ble observert ble samlet for seg. Ved fullført rensing ble kolonnen og systemet vasket med mobilfase, 0,3 M NaOH og 20 % etanol.

Fraksjonene fra rensingen ble analysert på SDS-PAGE (3.3.2) for å finne ut hvilken fraksjon som inneholdt protein med riktig størrelse. Disse fraksjonene ble tatt med videre til oppkonsentrering.

### 3.3.5 Oppkonsentrering av proteinløsning med Amiconrør

Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter er et sentrifugefilter som gir rask ultrafiltrering og har kapasitet for høye konsentrasjoner. Amiconrør blir brukt til oppkonsentrering av biologiske prøver, rensing av makromolekyler, bufferbytte, desalting og diafiltrasjon (Millipore 2013a). For oppkonsentrering og bytting av buffer for kitinase A og B ble filter med 10 og 30 kDa porestørrelse brukt. Det vil si at molekyler med molekylvekt mindre enn 10 000- og 30 000 Da slipper gjennom filteret, mens molekyler med høyere molekylvekt blir værende i filteret.

#### Materialer:

- Proteineluat fra IEC/HIC
- Proteineluat fra rensing med kitinkuler
- Amicon Ultra-15 rør, 10 kDa
- Amicon Ultra-15 rør, 30 kDa
- Storage buffer
  - ChiA og ChiB: Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM

#### Metode:

Fraksjoner med ren kitinase ble overført til Amiconrør. Rørene ble sentrifugert ved 4300 rpm ved 4 °C til det var 1,5 mL eluat igjen. Amiconrøret ble fylt med storagebuffer, mens væsken som var kommet gjennom filteret ble fjernet. Rørene ble sentrifugert ved 4300 rpm ved 4 °C til det var igjen 1,5 mL i filteret. Dette steget ble gjort totalt 4 ganger for å sikre at all buffer ble byttet ut. Proteinløsningen ble overført til cryorør etter oppkonsentreringen og oppbevart ved 4 °C.

### 3.3.6 Bestemmelse av proteinkonsentrasjonen ved bruk av Quant-iT

Quant-iT er en fluorometrisk metode. I fluorometriske metoder brukes spesielt designede fluorometriske prober som kvantifiserer biomolekyler av interesse. Disse fluorometriske probene gir kun signal når de er bundet til spesifikke molekyler, selv ved små konsentrasjoner (Life technologies 2013e).

Fluorosens går ut på at et molekyl tar opp energi i form av fotoner slik at molekylet blir eksitert til en høyere energitilstand. Denne energitilstanden er ustabil, og molekylet vil raskt gå tilbake til den stabile tilstanden igjen.



Når dette skjer sender molekylet ut den overflødig energi i form av lys. Lyset er av høyere bølglengde enn det absorberte, og dette skyldes at noe av energien omgjøres til varme. Lyset som frigjøres måles ved en bestemt bølglengde og gir en nøyaktig bestemmelse av konsentrasjonen av makromolekylene som analyseres. Det kvantifiserbare utbyttet blir målt av den fluoreserende intensiteten i prøven, det vil si ratioen mellom antallet fotoner utstrålt mot antallet fotoner absorbert (Lesk 2010). Det er denne metoden som benyttes i Quant-iT.

#### Materialer:

- Quant- iT™ reagens
- Quant- iT™ buffer
- Quant- iT™ fluorometer
- Proteinløsning

#### Metode:

En arbeidsløsning ble laget der 1 µL Quant- iT reagens og 199 µL Quant- iT buffer per prøve ble blandet. 10 µL proteinløsning og 190 µL arbeidsløsning ble blandet, og løsningen ble inkubert ved romtemperatur i 15 minutter. Deretter ble konsentrasjonen lest av på fluorometeret som hadde en forhåndslagt standardkurve. Konsentrasjonen ble vist i µg/mL.

### **3.3.7 Bestemmelse av proteinkonsentrasjonen ved bruk av Bio-Rad Protein Assay-Bradford**

Bradford protein assay er en enkel og nøyaktig metode for måling av proteinkonsentrasjonen i løsning. Teknikken involverer addisjon av et surt fargestoff til en proteinløsning for så å måle lys gjennomstrømning ved 595 nm med et spektrofotometer. Ved å sammenligne med en standardkurve gis den relative proteinkonsentrasjonen. Den fargestoffbindende forbindelsen endrer farge ved forskjellige konsentrasjoner av protein.

Fargestoffet kan eksistere i 3 former: kationisk (rød), nøytral (grønn) og anionisk (blå). I surt miljø er fargestoffet i rød kationisk form ( $A_{\text{maks}} = 470\text{nm}$ ). Når fargestoffet binder til protein, blir stoffet konvertert til en stabil uprotonert blåfarget form ( $A_{\text{maks}} = 495\text{nm}$ ). Dette blå protein-fargestoff kompleks kan detekteres ved 595nm i et spektrofotometer. Det blå fargestoffet binder primært til basiske og aromatiske aminosyrer, spesielt arginin. Metoden bruker Beer's lov for å kvantifisere proteinkonsentrasjon som er vist i likning 3.3 (Bio-Rad 2013).

$$A = \log \frac{P_0}{P} = a \times b \times C \quad \text{Likning 3.3}$$

der A er absorbansen, a er den molare absorptiviteten (konstant for den aktuelle forbindelsen), b er bredden av kyvetten og C er den molare konsentrasjonen.

Materialer:

- Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent
- Storagebuffer, Tris-HCl, 100mM
- Renset protein

Metode:

Det ble lagd 3 paralleller per mutant. X  $\mu\text{L}$  Enzym og Y  $\mu\text{L}$  Tris-HCl ble blandet sammen i et eppendorfrør til et totalvolum lik 800  $\mu\text{L}$ . En blankprøve bestående av 800  $\mu\text{L}$  100 mM Tris-HCl ble også laget. Blankprøven ble brukt til å nullstille instrumentet. 200  $\mu\text{L}$  Biorad Protein Assay ble overført til alle prøvene og blandet sammen. Prøvene ble inkubert ved romtemperatur i 5 minutter. Konsentrasjonen ble deretter målt ved 595 nm og avlest i  $\mu\text{g/mL}$ .

### 3.3.8 Spesifikk enzymaktivitet

For å kontrollere at både det periplasmatiske ekstraktet og det oppkonsentrerte proteinet inneholdt aktive kitinaser ble det foretatt en aktivitetstest. Aktiviteten til enzymene bestemmes spektrofotometrisk ved bruk av 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -N-N'-diacetylchitobiose (4-MU-[GlcNAc]<sub>2</sub>) som substrat. Proteinprøven og 4-MU-[GlcNAc]<sub>2</sub> inkuberes, og 4-MU frigjøres fra substratet ved hydrolysering. 4-MU detekteres spektrofotometrisk ved at forbindelsen avgir fluorescens når bindingen mellom [GlcNAc]<sub>2</sub> brytes. Dette måles ved 460 nm og ut i fra mengden lys detektert kan antall kutt per enzym per tidsenhet beregnes.

Materialer:

- Prøve
- 100x Bovint serum albumin (BSA)
- Glycine/NaOH, pH 10.6, 0,2 M
- Citrat/fosfat buffer, pH 5.2
- 4-MU, 1,0  $\mu\text{M}$
- 4-MU-[GlcNAc]<sub>2</sub>, 1 mg/mL

Metode:

En arbeidsløsning bestående av 4,95 mL Citrat/fosfat buffer og 50 µL 100x BSA ble blandet sammen. Det ble laget en blankprøve og 3 paralleller per prøve. For hver prøve ble 87 µL arbeidsløsning og 8 µL 1 mg/mL 4-MU-[GlcNAc]<sub>2</sub> blandet og inkubert ved 37 °C i et vannbad med resting. Reaksjonene ble startet ved å tilsette 5 µL enzym til hvert rør. Etter 10 minutter ble 1,9 mL 0,2 M Natriumkarbonat tilsatt for å stoppe reaksjonene. Nullstilling av flourometeret ble gjort ved å tilsette 1,9 ml 0,2 M Natriumkarbonat. 100 µL 1,0 µM 4-MU ble tilsatt natriumkarbonatløsningen for å kalibrere instrumentet. Den spesifikke enzymaktiviteten ble beregnet etter likning 3.4.

$$\text{Enzymaktivitet} = \left( \frac{\text{vol(L)} \times \frac{\text{Gjennomsnittlig fluorescens}}{10}}{\frac{\text{Tid (minutter)}}{\text{Enzymkonsentrasjon} \times \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)}} \right) \quad \text{Likning 3.4}$$

### 3.4 Enzymatisk hydrolyse av β-Kitin

#### 3.4.1 [GlcNAc]<sub>2</sub>/[GlcNAc] assay

Ved å hydrolysere β-kitin kan enzymeres grad av prosessivitet bestemmes. Hver produktive binding vil hos prosessive enzymer kun gi et oddetallsprodukt, mens de resterende produktene fra den samme initielle bindingen vil være dimerer. Dermed vil forholdet mellom disse to produktene kunne gi en indikasjon på mutantenes grad av prosessivitet.

Forholdet mellom produktene ble bestemt ved analyse på HPLC.

Materialer:

- Natriumacetate, pH 6.1, 50 mM
- Svovelsyre, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM
- β-kitin, 3 µm
- dH<sub>2</sub>O
- Enzym

- ChiA WT
- ChiA W167A
- ChiA W275A
- ChiA F396A
  
- ChiB WT
- ChiB W97A
- ChiB W220A

#### Metoder:

2 mg 3 $\mu$ m  $\beta$ -kitin ble løst i 50 mM Natriumacetate til konsentrasjon 2 mg/mL. Kitin-løsningen ble sonikert i cirka 30 minutter. Dette ble gjort for å øke overflatearealet til kitinet ved å gi flere ”ender” i kitinets krystallstruktur. Løsningen ble deretter inkubert i en termomikser ved 37 °C og 800 rpm i 10 minutter. 75  $\mu$ L av løsningen ble tatt ut og overført til eppendorfrør som var fylt med 75  $\mu$ L 20 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. 2,5  $\mu$ M enzym ble tilsatt kitin-løsningen og uttak ble gjort ved bestemte tider. 75  $\mu$ L av reaksjonsløsningene ble tatt ut, og reaksjonene ble stoppet ved å tilsette 20 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Prøvene ble filtrert ved bruk av en 0,45  $\mu$ m hydrofil low protein binding membran for å fjerne eventuelle partikler. Prøvene ble oppbevart ved – 20 °C frem til analyse.

#### **3.4.2 Tillaging av standarder**

En standard er en løsning som inneholder kjent konsentrasjoner av analytt. Ved å lage en standardkurve med en serie standardløsninger vil det være mulig å bestemme konsentrasjonen av analytt i en ukjent prøve. Forutsetningen for bruk av en standardkurve er at konsentrasjonen av analytt i den ukjente prøven er innenfor standardkurvens konsentrasjonsområde.

#### Materialer:

- Stockløsning [GlcNAc], 1 mM
- Stockløsning [GlcNAc]<sub>2</sub>, 1 mM
- Svovelsyre, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM

Metode:

1 mM stockløsninger ble benyttet til å lage 3 standarder; 100  $\mu\text{M}$  [GlcNAc]<sub>2</sub>/ [GlcNAc], 200 $\mu\text{M}$  [GlcNAc]<sub>2</sub>/ [GlcNAc] og 400 $\mu\text{M}$  [GlcNAc]<sub>2</sub>/[GlcNAc]. 75  $\mu\text{L}$  standard ble deretter blandet med 75  $\mu\text{L}$  20 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i et HPLC-rør. Standardene ble oppbevart ved -20 °C.

**3.5  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$** **3.5.1  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$** 

$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$  er et mål på effektiviteten til enzymatisk katalyse.  $k_{\text{cat}}$  er en direkte måling av den katalytiske produksjonen av produkt under optimale forhold. Dette betyr tiden som et enzyimmolekyl trenger for å omdanne et substratmolekyl til produkt.  $K_{\text{M}}$  assosieres som oftest med affiniteten et enzym har til et substrat, men denne tenkemåten er ikke alltid korrekt.  $K_{\text{M}}$  er substratkonsentrasjonen der reaksjonen er halvparten av maksimal hastighet til enzymet ( $V_{\text{maks}}$ ) (Lesk 2010).

$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$  brukes til å bestemme om hastigheten til reaksjonen er begrenset av produktdannelse eller mengde substrat i løsning. Noen enzymer er så effektive at reaksjonen er begrenset til diffusjonsraten. Det er 2 faktorer som kan bidra til en økning av  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ . En lav  $K_{\text{M}}$  innebærer høy affinitet mellom substrat og enzym, mens en høy  $k_{\text{cat}}$  innebærer at enzym-substrat komplekset raskt vil konvertere substrat til produkt (Lesk 2010).

En av de mest vanlige måtene å bestemme  $k_{\text{cat}}$  og  $K_{\text{M}}$  på er ved bruk av et Lineweaver-Burk plott. Det blir da satt opp en serie eksperimenter, der enzymkonsentrasjonen er den samme for alle eksperimentene mens substratkonsentrasjonen er forskjellig. Plottet lages ved å måle den initielle hastigheten til enzymet. Siden [S] er kjent og forandring i [S] versus tid er tilnærmet lineær i den initielle fasen kan nøyaktige informasjon for hastigheten som funksjon av [S] bli funnet (Mathews et al. 2013).

Michaelis-Menten kinetikk er en av de best kjente og enkleste modellene for studie av enzymkinetikk. Modellen forklares ved bruk av en likning som relaterer den initielle hastigheten  $v_0$  til en enzymatisk reaksjon med substratkonsentrasjonen [S] i nærvær av en konstant mengde enzym (Lesk 2010; Mathews et al. 2013). Michaelis-Menten likningen er vist i likning 3.5.

$$v_0 = \frac{V_{max} \times [S]}{K_M + [S]} \quad \text{Likning 3.5}$$

Der  $v_0$  og  $V_{maks}$  er initiell og maksimum hastighet,  $K_M$  er Michaelis-Menten konstanten og  $[S]$  er konsentrasjonen av substrat (Lesk 2010).

Forskjellige forbindelser kan gi redusert hastighet av en enzym katalysert reaksjon. Et spesielt tilfelle av reversibel inhibering er substrat inhibering, som forekommer hos cirka 20 % av alle kjente enzymer. I normale tilfeller vil en økning av substratkonsentrasjonen gi økt hastighet av den enzymatiske reaksjonen. Enzymer som viser substrat inhibering vil derimot gi motsatt effekt slik at store mengder substrat vil redusere reaksjonshastigheten. Dette skjer primært ved at enzymet binder flere enn et substratmolekyl i det aktive setet (Papezova et al. 2007).

Michaelis-Menten likningen for substrat inhibering er vist i likning 3.6.

$$v_0 = \frac{V_{maks} \times [S]}{K_M + \left(1 + \left(\frac{[S]}{K_{SI}}\right) \times [S]\right)} \quad \text{Likning 3.6}$$

Der  $v_0$  og  $V_{maks}$  er initiell og maksimum hastighet,  $K_M$  er Michaelis-Menten konstanten,  $[S]$  er konsentrasjonen av substrat og  $K_{SI}$  er substrat inhiberingskonstanten (Papezova et al. 2007).

#### Materialer:

- Natriumacetate, pH 6.1, 20 mM
- Bovine Serum Albumin (BSA), 10 mg/mL
- Svovelsyre, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM
- Tetra-acetyl chitotetraose, [GlcNAc]<sub>4</sub>
- Protein
  - ChiA R172A
  - ChiA W275A
  - ChiA T276A
  - ChiA F396A
  - ChiA F396W
  - ChiB W97A/W220A
  - ChiA R294A

**Tabell 8.** Oversikt over kitinasene som ble brukt i  $k_{cat}/K_m$  analysen. Tabellen viser tid, enzym- og substratkonsentrasjonene som ble brukt.

Kitinase	Mutant	Enzymkonsentrasjon [nM]	Substratkonsentrasjon [ $\mu$ M]	Tid [min]
ChiA	R172A	0,2	100, 80, 60, 40, 20, 15, 10, 5	0,1,2,4,6,8,10
	W275A	1	200,150,100,50,40,25,20,15, 10,5	0,2,4,8,12,16,20
	T276A	1	100, 80, 60, 40, 20, 15, 10, 5	0,1,2,4,6,8,10
	F396A	0,5	80,60,40,25,20,15,10,5,2	0,1,2,4,6,8,10
	F396W	0,25	80,60,40,25,20,15,10,5,2	0,1,2,3,4,5,6
ChiB	W97A/ W220A	2	2500, 1000, 600, 400, 200, 100, 50	0,2,4,8,12,16,20
	R294A	0,35	100, 80, 60, 40, 20, 15, 10, 5	0,1,2,4,6,8,10

#### Metode:

Ønsket mengde [GlcNAc]<sub>4</sub> ble laget i 20 mM Natriumacetate pH 6.1. 10  $\mu$ L av 10 mg/mL BSA ble tilsatt prøvene til en sluttkonsentrasjon lik 0,1 mg/mL. 20 mM Natriumacetate pH 6.1 ble tilsatt prøvene til et sluttvolum på 1 mL. Prøvene ble deretter inkubert i en termomikser ved 37 °C og 800 rpm i 10 minutter. 75  $\mu$ L ble overført til eppendorfrør med 75  $\mu$ L 20 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for å stoppe reaksjonene. En nullprøve ble laget før reaksjonen ble startet. Enzymet ble tilsatt prøvene og uttak ble foretatt ved bestemte tider. Når alle prøvene var blitt stoppet ble de lagret ved -20 °C.

#### **3.5.2 Tillaging av standarder**

En standard er en løsning som inneholder kjent konsentrasjon av analytten. Ved å sammenligne en serie standardløsninger mot en prøve med ukjent konsentrasjon, kan konsentrasjonen av analytt bli bestemt. Forutsetningen for å bruke en slik framgangsmåte er at konsentrasjonen av analytt i den ukjente prøven er innenfor konsentrasjonsområdet til standardene. I HPLC ble det laget en standardkurve fra topparealene til standardløsningene, slik at konsentrasjonen av analytt fra de ukjente prøvene ble bestemt.

Materialer:

- Stockløsning [GlcNAc]<sub>4</sub>, 1 mM
- Stockløsning [GlcNAc]<sub>2</sub>, 1 mM
- Svovelsyre, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM

Metode:

1 mM stockløsninger ble benyttet til å lage 3 standarder; 100 µM A4/A2, 200 µM [GlcNAc]<sub>4</sub>/[GlcNAc]<sub>2</sub> og 400 µM [GlcNAc]<sub>4</sub>/[GlcNAc]<sub>2</sub>. 75 µL standard ble deretter blandet med 75 µL 20 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i et HPLC-rør. Standardene ble oppbevart ved -20 °C.

### 3.6 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC er en kromatografisk teknikk som brukes til å separere komponenter i en blanding. I tillegg kan forbindelser identifiseres og kvantifiseres. Ionebytterkromatografi er en metode som brukes til separasjon av ioner og noen polare molekyler (Miller 2005). Denne teknikken er beskrevet mer detaljert i avsnitt 3.3.1.

Kolonnen som ble brukt til å separere kitoooligomerene var Rezex RFQ-Fast Fruit H+. Denne kolonnen er en ionebytterkolonne. Kolonnens stasjonære fase inneholder negativt ladede sulfonerte styrene-divinylbenzene partikler, som har et mot-ion (H<sup>+</sup>) reversibelt bundet til seg. Når GlcNAc forbindelsene blandes med svovelsyre, vil disse komponentene ta til seg et H<sup>+</sup> ion fra svovelsyren. Dette medfører at GlcNAc enhetene får ladning og kan interagere med den negativt ladede stasjonærfasen. Kitoooligosakkaridene vil bytte plass med mot-ionet på kolonnen og elueres isokratisk med hensyn på grad av protonasjon.

HPLC ble brukt for å analysere kitoooligosakkarider etter både enzymatisk hydrolyse av β-kitin og  $k_{cat}/K_M$  assay.

Materialer:

- Rezex RFQ-Fast Fruit H+ kolonne
- Forklonne: Carbo-H 4x 3.0 mm
- Mobilfase
  - Svovelsyre, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 mM
- Standarder
  - [GlcNAc]<sub>2</sub>/[GlcNAc], 100, 200 og 400 µM
  - [GlcNAc]<sub>4</sub>/[GlcNAc]<sub>2</sub>, 100, 200 og 400 µM



**Metode:**

8  $\mu\text{L}$  prøve ble injisert på kolonnen ved hjelp av en autoinjektor. Kitoooligosakkaridene ble eluert isokratisk ved 85 °C og en flow lik 1 mL/minutt. De ble detektert av en UV-detektor ved 195 nm. Kromatogrammene ble analysert med programvaren Chromeleon 7, og prøvene ble sammenlignet med kjente standarder.

**3.6.1 Analyse av HPLC data fra enzymatisk hydrolyse av  $\beta$ -kitin**

For å identifisere og kvantifisere de forskjellige kitoooligosakkaridene ble programmet Chromeleon 7 brukt. Kvantifisering av forbindelsene ble gjort ved at de aktuelle toppene ble integrert. Arealene fra prøvene ble sammenlignet med arealene fra standardene med kjent konsentrasjon. Dermed ble konsentrasjonen av  $[\text{GlcNAc}]_2$  og  $[\text{GlcNAc}]$  bestemt. For å studere grad av prosessivitet til de ulike mutantene ble  $[\text{GlcNAc}]_2 / [\text{GlcNAc}]$  plottet mot prosent nedbrutt kitin.

**3.6.2 Analyse av HPLC data  $k_{\text{cat}}/K_M$** 

For å identifisere og kvantifisere de forskjellige kitoooligosakkaridene ble programmet Chromeleon 7 brukt. Kvantifisering av forbindelsene ble gjort ved at de aktuelle toppene ble integrert. Arealene til prøvene ble sammenlignet med arealene fra standardene med kjent konsentrasjon. Dermed ble  $[\text{GlcNAc}]_4$  og  $[\text{GlcNAc}]_2$  konsentrasjonene i prøvene bestemt.  $[\text{GlcNAc}]_2$  ble dividert på to, fordi under hydrolyse ble det dannet to dimerer av  $[\text{GlcNAc}]_4$ . Et plott ble fremstilt der  $[\text{GlcNAc}]_2/2$  ble plottet mot tid, og tok stigningstallet fra plottene med videre i analysen. Stigningstallene ble dividert på seksti for å få reaksjonshastighetene i sekunder.

Plottet stigningstallet/60 mot konsentrasjonen slik at  $k_{\text{cat}}$  og  $K_M$  kunne bestemmes.  $k_{\text{cat}}/K_M$  ble ut ifra disse parameterene bestemt. Datapunktene ble fjernet hvis produktkonsentrasjonen var over 20 %. Dette ble gjort for å forsikre at kun initielle hastigheter ble analysert (Zakariassen et al. 2011).

## 4 Resultater

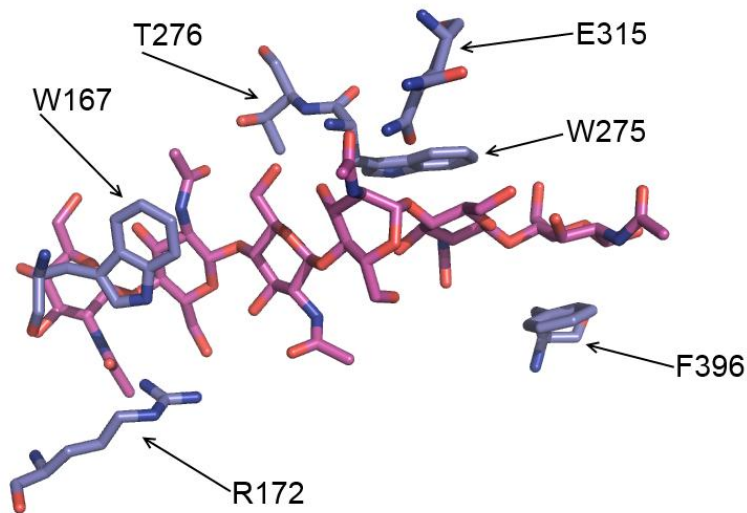
### 4.1 Residuanalyse

Som beskrevet i avsnitt 1.6, inneholder ChiA og ChiB aromatiske residuer som går fra det kitinbindende domenet til det aktive setet. Disse aromatiske aminosyrene har vist seg i å være viktige for substrat assosiasjon og hydrolyse (Horn et al. 2006b; Uchiyama et al. 2001; Watanabe et al. 2003; Zakariassen et al. 2009). Dette skyldes dannelse av hydrofobiske interaksjoner mellom residuene og substratet, slik at sakkariidpolymeren assosieres til kitinasen og ”glir” langs den substratbindende kløften under produktiv binding. Disse aminosyrene er av dette viktige når enzymet katalyserer prosessiv hydrolyse av substrat (Sorlie et al. 2012; van Aalten et al. 2000).

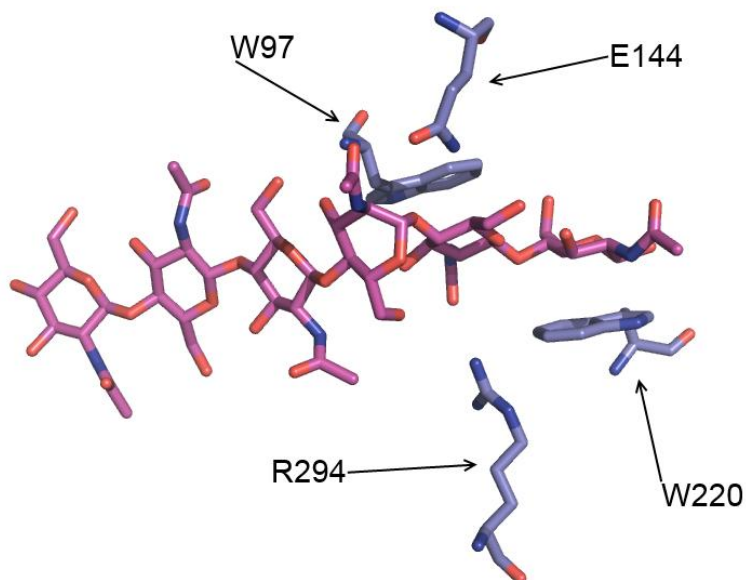
Det har tidligere blitt gjort studier på grad av prosessivitet i ChiA, der det hydrofobe residuet Trp 167 har vist seg å spille en viktig rolle (Zakariassen et al. 2009). Det er også vist at residuene Arg 172 og Thr 276 i -3 subsetet interagerer med substratpolymeren (Norberg et al. 2011; Reppert 2013). Thr 276 bidrar til substratbindingsfrienergien og prosessiviteten mens Arg 172 deltar i korrekt posisjonering av *N*-acetylgruppen inn mot -1 subsetet. Trp 275 og Phe 396 er lokalisert i henholdsvis +1 og +2 subsetet og er involvert i initiell binding av substratet og i produktfrigjøring under den prosessive hydrolysen. For å studere disse residuenes interaksjoner mot substratet ble de endret til alanin og benyttet i ulike assays (se avsnitt senere). I tillegg ble Phe 396 også forandret til tryptofan for å se effekten av en større hydrofobisk overflate i subsete +2. I figur 19 vises de ulike residuene som ble mutert og deres posisjon i forhold til substratet.

I ChiB er det gjort studier på aromatiske residuer, henholdsvis Trp 97 og Trp 220, som er lokalisert i +1 og +2 subsetet (figur 20) som er viktige residuer for at enzymet forblir bundet til substratet etter endt katalyse av hydrolysering- hvor det også ble vist at disse er viktige for prosessivitet (Horn et al. 2006a). Videre er Arg 294 (figur 20) en polar aminosyre som er lokalisert i +1 subsetet og finnes i flere familie 18 kitinaser og har vist seg å være viktig for balanse mellom katalysering av hydrolyse og transglykosylering (Madhuprakash et al. 2012). Videre er residuene i subsetene +1 og +2 i både ChiA og ChiB mest sannsynlig viktige i forhold til direksjonaliteten i den enzymatiske nedbrytningen av kitin siden disse er i produktfrigjøringssubseter i ChiA og substratbindende subseter i ChiB.

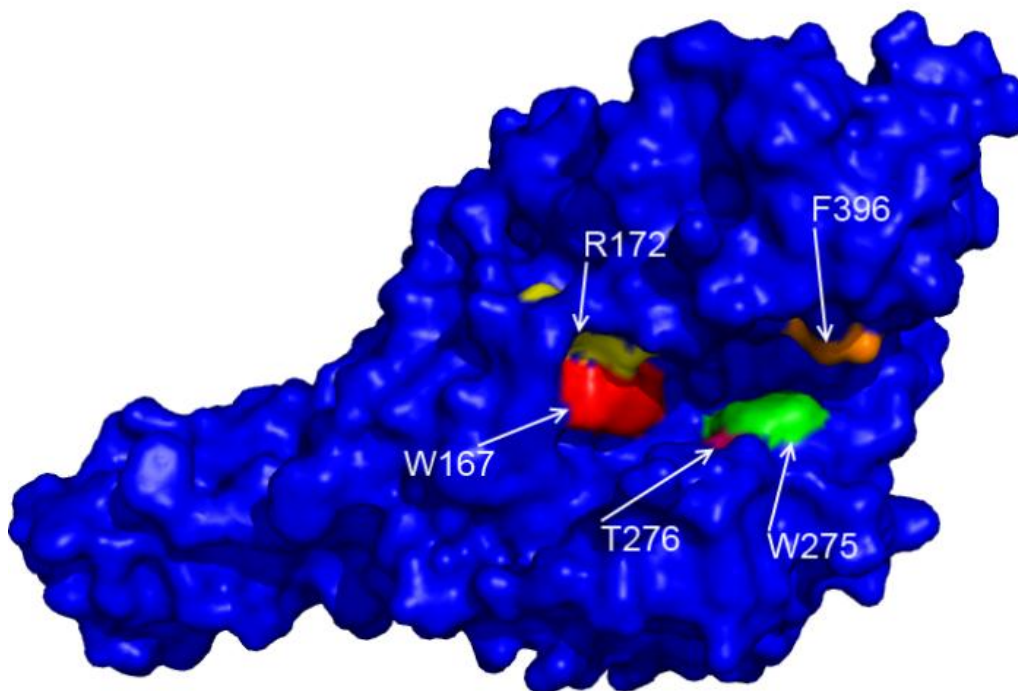
Som i ChiA, ble residuene i ChiB mutert til alanin. I figur 20 vises de ulike residuene som ble mutert og deres orientering rundt substratet.



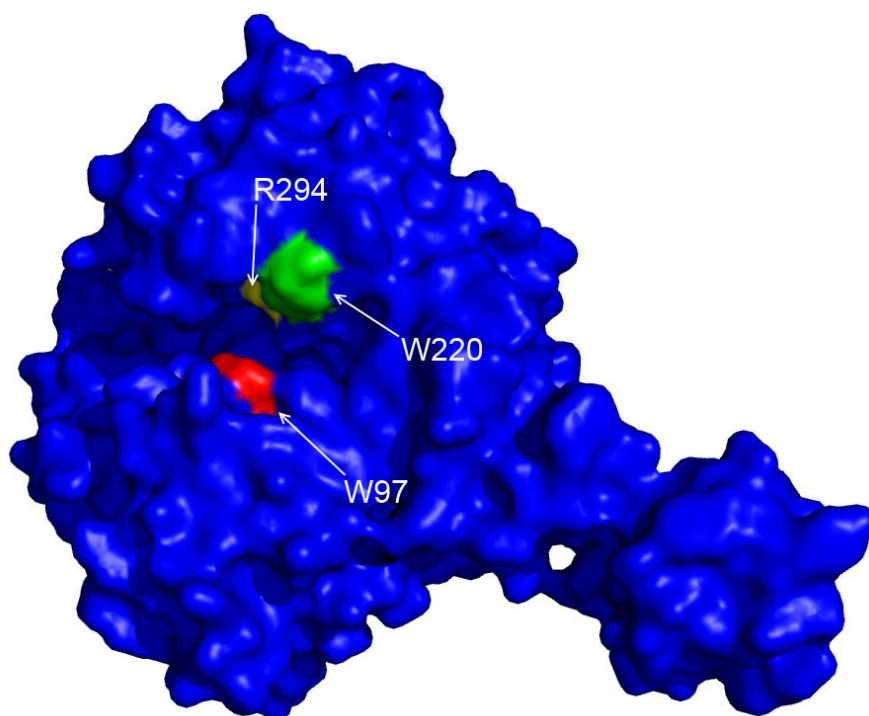
**Figur 19.** Oversikt over de studerte ChiA-residuene, W167, R172, W275, T276, E315, F396, i kompleks med [GlcNAc]<sub>6</sub> (Papanikolaou et al. 2001). Residuene er farget blå, mens substratet er farget rosa. Pdb kode: 1EHN.



**Figur 20.** Oversikt over de studerte ChiB-residuene, W97, E144, W220 og W294, i kompleks med [GlcNAc]<sub>6</sub> (van Aalten et al. 2001). Residuene er farget blå, mens substratet er farget rosa. Pdb kode: 1E6N.



**Figur 21.** Overflatestrukturen til ChiA, der aromatiske og polare residuer er vist (Papanikolau et al. 2001). ChiA er et eksoenzym som hydrolyserer kitin fra den reduserende ende. Pdb kode:1CTN.



**Figur 22.** Presentasjon av proteinstrukturen til ChiB, hvor posisjonen de studerte residuene er markert (van Aalten et al. 2001). ChiB er et eksoenzym som hydrolyserer kitin fra den ikke-reduserende ende. Pdb kode: 1E15.

## 4.1.1 ChiA

### 4.1.1.1 Trp 167

Tryptofan (Trp/W) i posisjon 167 er i -3 subsetet til ChiA. Dette residuet interagerer med sukkerenheten i substratet via en stacking interaksjon (Papanikolau et al. 2001). I tillegg til å spille en viktig rolle i prosessivitet er det vist at tryptofanresiduet er viktig i å guide substratet fra løsning og inn i det aktive setet (Horn et al. 2006b; Norberg et al. 2011).

### 4.1.1.2 Arg 172

Arginin (Arg/R) i posisjon 172 er lokalisert i -3 subsetet til ChiA. Residuet er polart og danner en vegg i den substratbindende kløften. Arg 172 danner interaksjoner med polymeren i subsetene -4, -3 og -2. I -4 subsetet danner residuet (sammen med Glu 473) interaksjoner med karbonyloksygenet, mens i -3 dannes det en hydrogenbinding mellom Arg 172, Glu 473 og O<sub>6</sub> på sukkerpolymeren. I tillegg interagerer residuet med karbonyloksygenet i -2 subsetet (Papanikolau et al. 2001).

### 4.1.1.3 Thr 276

Treonin (Thr/T) i posisjon 276 i aminosyresekvensen er lokalisert i -3 subsetet til ChiA. Thr 276 danner hydrogenbindinger med karbonyloksygenet på *N*-acetylgruppen til substratet. I tillegg til å danne hydrofobe interaksjoner med metylgruppen som sitter på *N*-acetyl gruppen.

### 4.1.1.4 Trp 275

Tryptofan (Trp/W) i posisjon 275 finnes i +1 subsetet som er et produktbindende sete i ChiA. Tidligere studier har vist at residuet ikke er like viktig for prosessivitet som for eksempel Trp 167. Residuet er involvert i dissosiering av dimere samt i å dra polymerkjeden 2 sukkerenheter fram etter den katalytiske hydrolysen. I tillegg til å danne stacking interaksjoner med en sukkerenhet så danner residuet også hydrogenbinding med oksygenatomet som er på posisjon 6 i sukkermolekylet (Papanikolau et al. 2001).

#### **4.1.1.5 Phe 396**

Fenylalanin (Phe/F) i posisjon 396 finnes i +2 subsetet i ChiA og danner en stacking interaksjon med substratet med en mindre overflate enn tryptofan. Residuet er som Trp 275 ikke like viktig for prosessivitet som Trp 167. Derimot kan det spille en rolle i direksjonalitet. Aminosyren er involvert i frigjøring av dimere og forflytting av polymerkjeden etter hver katalytisk reaksjon. Videre er det tidligere vist at fenylalanin residuet i +2 binder sukkerakseptor tregere enn et tryptofan residu i en transglykosyleringsreaksjon (Zakariassen et al. 2011).

#### **4.1.2 ChiB**

##### **4.1.2.1 Trp97:**

Tryptofan (Trp/W) er i posisjon 97 og ligger mellom -1 og +1 subsetet til ChiB. Ved denne posisjonen forekommer den enzymatiske hydrolysen, og residuet er viktig for prosessivitet i nedbrytningen av krystallinsk kitin (Sorlie et al. 2012). Residuet danner hydrofobe interaksjoner med substratet og ligger parallelt med sakkaridenhetene som er bundet i subsetene +1 og +2. Trp 97 og Asp 316 danner et "tak" over det aktive setet slik at enzymet får en tunneltopologi når enzymet binder substrat.

##### **4.1.2.2 Trp 220**

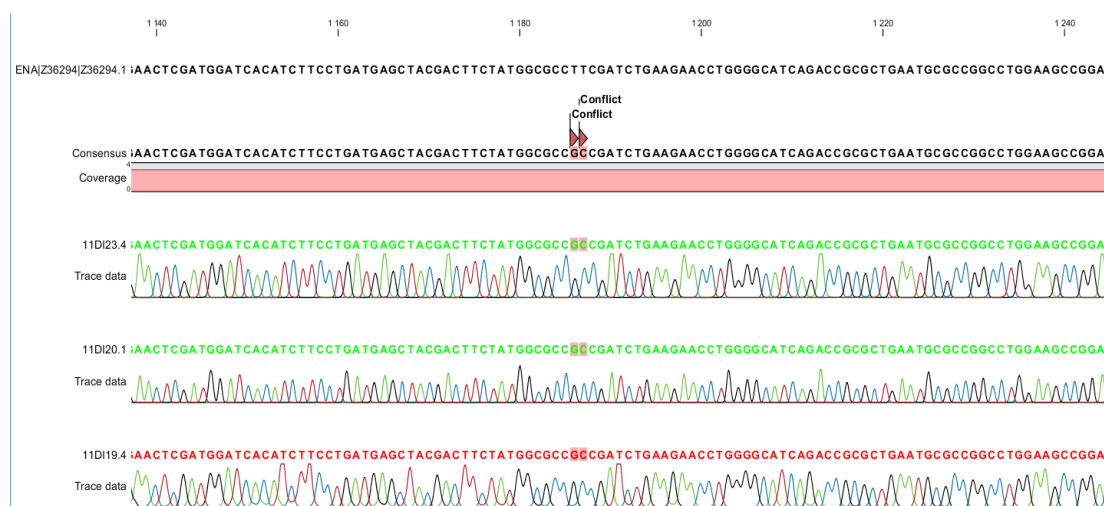
Tryptofan (Trp/W) i posisjon 220 ligger i +2 subsetet til ChiB. Residuet er viktig for prosessivitet i nedbrytningen av krystallinsk kitin, men i mindre grad enn Trp 97 (Sorlie et al. 2012). Residuet ligger parallelt og inntil sukkeret i +2 og danner en stor kontaktflate med sukkeret og resulterer i dannelse av mange hydrofobe interaksjoner. I tillegg danner karbonyloksygenet på hovedkjeden til Trp 220 hydrogenbinding med oksygenet på *N*-acetylgruppen i +3 subsetet.

##### **4.1.2.3 Arg 294**

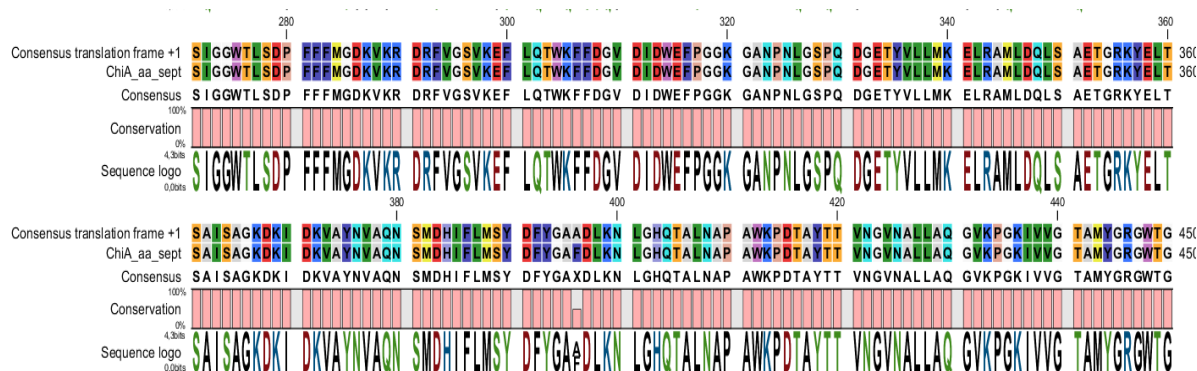
Arginin (Arg/R) i posisjon 294 i aminosyresekvensen er lokalisert i +1 subsetet til ChiB. Arg 294 danner hydrogenbinding med karbonyloksygenet på *N*-acetylgruppen i +1 subsetet. Dette residuet har vist seg å være viktig for balanse mellom hydrolyse og transglykosylering (Madhuprakash et al. 2012).

## 4.2 Seterettet mutagenese

For å vite om det muterte plasmidet inneholdt riktig mutasjon ble plasmidet sendt til sekvensering ved GATC Biotech i Constance, Tyskland. Analyse av resultatene ble utført ved bruk av CLC DNA Workbench. I programmet ble villtype sekvensen sammenliknet med det muterte plasmidet. Disse nukleotidsekvensene skal være like med unntak av der mutasjonen forekommer. Områder med forskjellig nukleotidsekvens i forhold til villtype vises som ”conflict”. I figur 23 vises et eksempel på hvordan mutasjonen ble verifisert ved hjelp av dataprogrammet. I figur 24 vises aminosyresekvensen til både villtype og mutant, der aminosyreposisjon 396 har blitt mutert fra fenylalanin til alanin.



**Figur 23.** Nukleotidsekvensen til ChiA sammenliknet med det muterte plasmidet til ChiA F396A. Nukleotidene merket med ”conflict” indikerer at mutasjonen fra fenylalanin [TTC] til alanin [CCC] var utført.



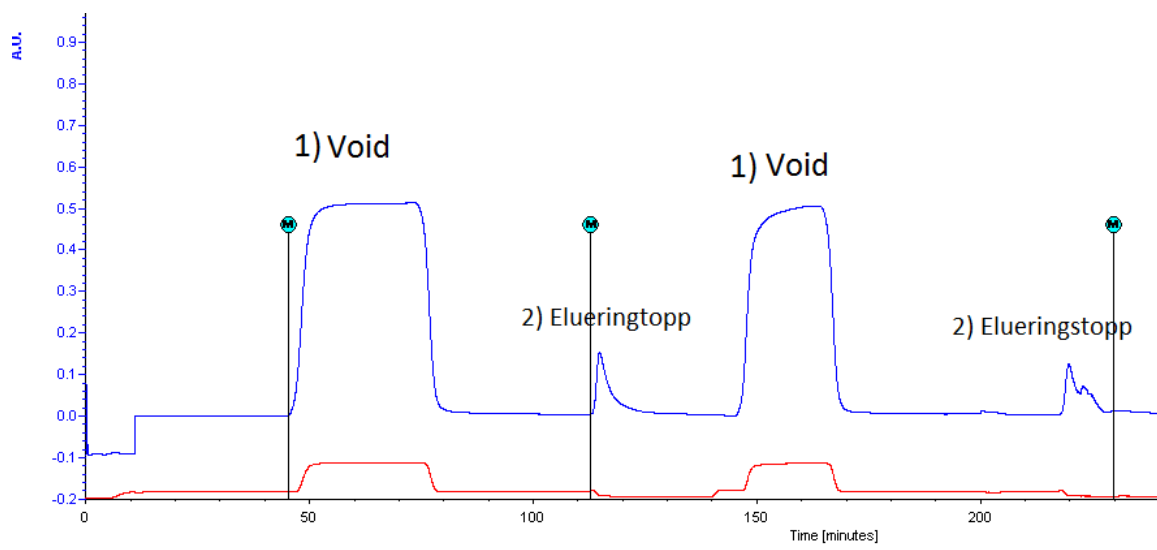
**Figur 24.** Aminosyresekvensen til ChiA villtype sammenliknet med ChiA F396A. I aminosyre posisjon 396 har fenylalanin (F) blitt byttet ut med alanin (A).

Øverst i figur 23 vises nukleotidsekvensen til ChiA villtype, mens under vises det muterte plasmidet til ChiA F396A. Som vist i figuren oppstår det ”conflict” ved kodonet [TTC], og dette kodonet samsvarer med aminosyren fenylalanin (F). Kodonet i det muterte plasmidet ble mutert ved hjelp av seterettet mutagenese til [CCC], noe som tilsvarer aminosyren alanin (A). Denne metoden ble brukt for å kontrollere at alle de muterte plasmidene inneholdt riktig mutasjonen.

### 4.3 Isolering av aktive enzymer

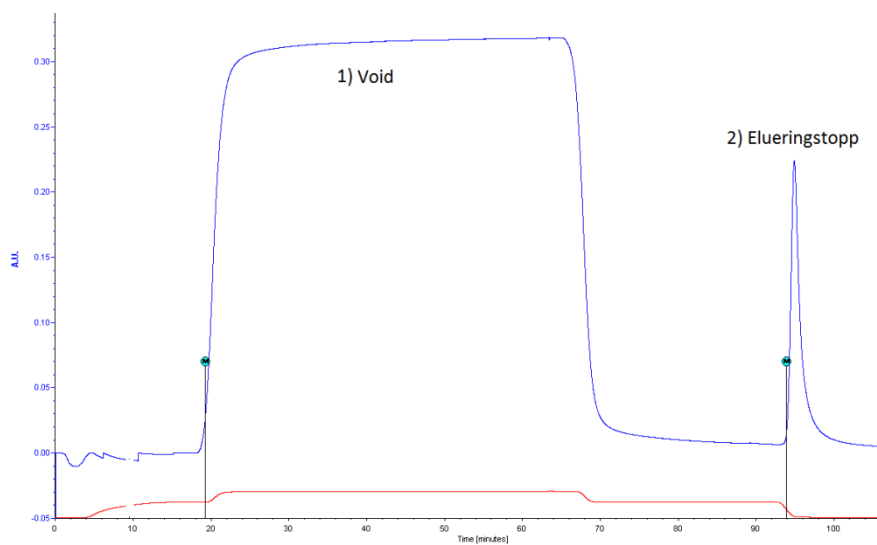
#### 4.3.1 Rensing av aktive mutanter på kitinkuler

Periplasmatiske ekstrakter inneholdende ønskede enzymer ble applisert på kitinkolonne og rent protein ble eluert ut som beskrevet i avsnitt 3.3.4. Mengde enzym som ble isolert er vist i tabell 9. Figurene nedenfor (25-33) viser kromatogrammene fra rensingen av de ulike enzymene. Kromatogrammene viser voidtopp, der forskjellige forbindelser fra det periplasmatiske ekstraktet elueres ut. Elueringsbuffer ble tilsatt kitinkolonne etter at voidtoppen var fraksjonert ut. Bufferen forandret tilstanden i kolonnen slik at kitinasene ble frigjort fra kitinkulene.

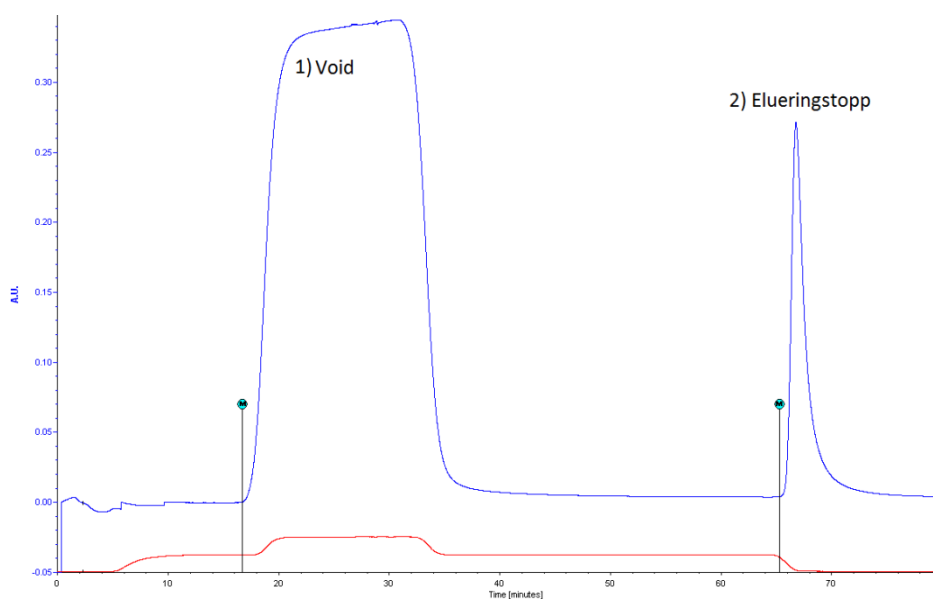


**Figur 25.** Kromatogrammet for rensingen av ChiA WT på kitinkolonne. 1) voidtoppen kom først og inneholdt forskjellige komponenter fra det periplasmatiske ekstraktet. 2) dernest kom elueringstoppen som inneholdt rent protein. Det periplasmatiske ekstraktet ble delt opp i to fraksjoner som ble rensert etter hverandre for å hindre overload på kitinkolonne.

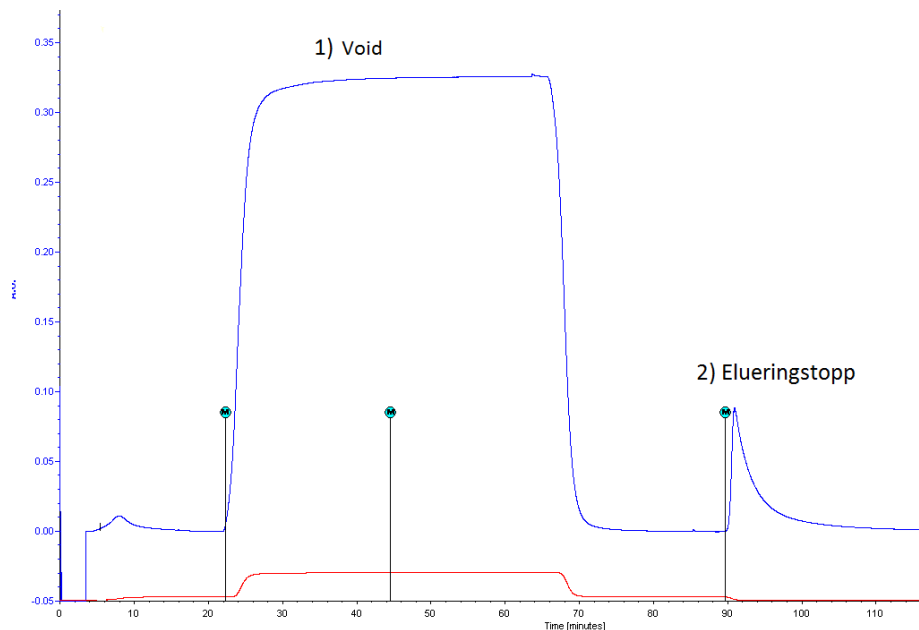




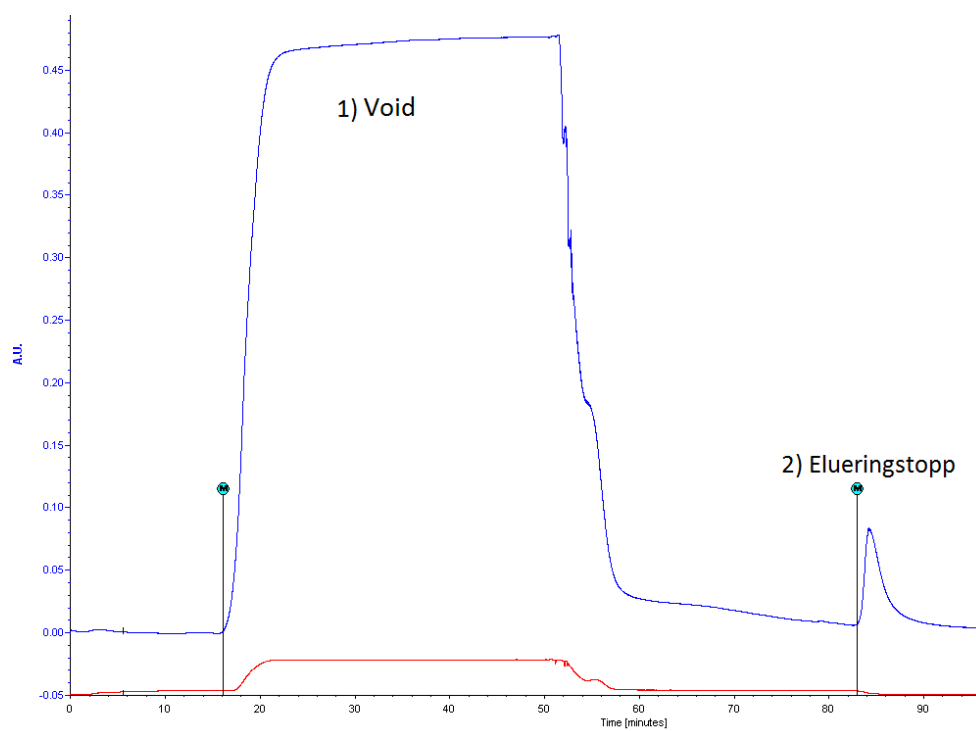
**Figur 26.** Kromatogrammet for rensingen av ChiA W167A på kitinkolonne. 1) voidtoppen kom først og inneholdt forskjellige komponenter fra det periplasmatiske ekstraktet. 2) dernest kom elueringstopp som inneholdt rent protein.



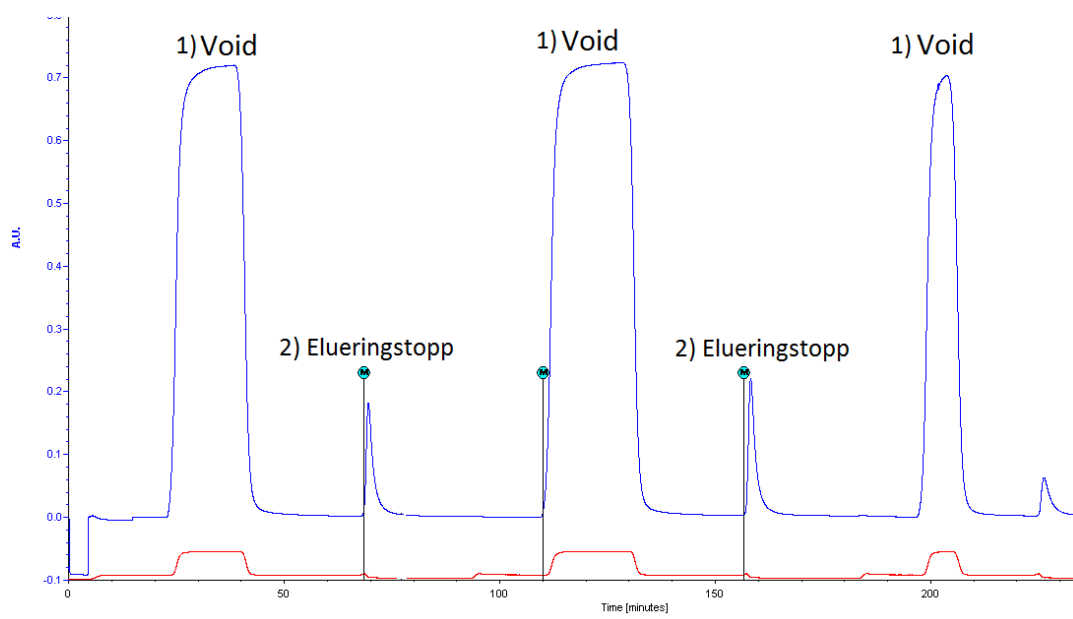
**Figur 27.** Kromatogrammet for rensingen av ChiA W275A på kitinkolonne. 1) voidtoppen kom først og inneholdt forskjellige komponenter fra det periplasmatiske ekstraktet. 2) dernest kom elueringstopp som inneholdt rent protein.



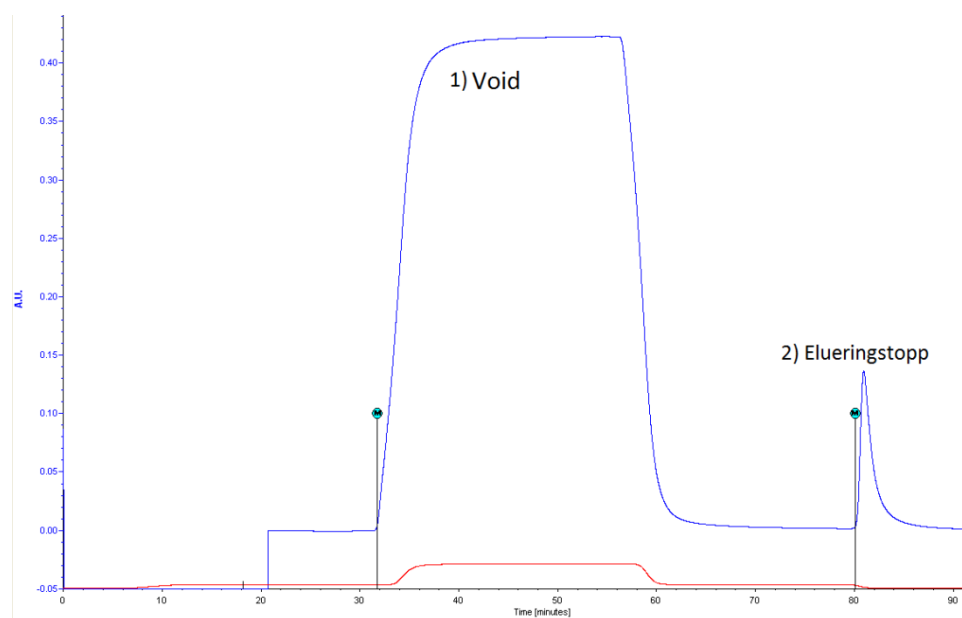
**Figur 28.** Kromatogrammet for rensingen av ChiA F396A på kitinkolonne. 1) voidtoppen kom først og inneholdt forskjellige komponenter fra det periplasmatiske ekstraktet. 2) dernest kom elueringstoppen som inneholdt rent protein.



**Figur 29.** Kromatogrammet for rensingen av ChiA F396W på kitinkolonne. 1) voidtoppen kom først og inneholdt forskjellige komponenter fra det periplasmatiske ekstraktet. 2) dernest kom elueringstoppen som inneholdt rent protein.

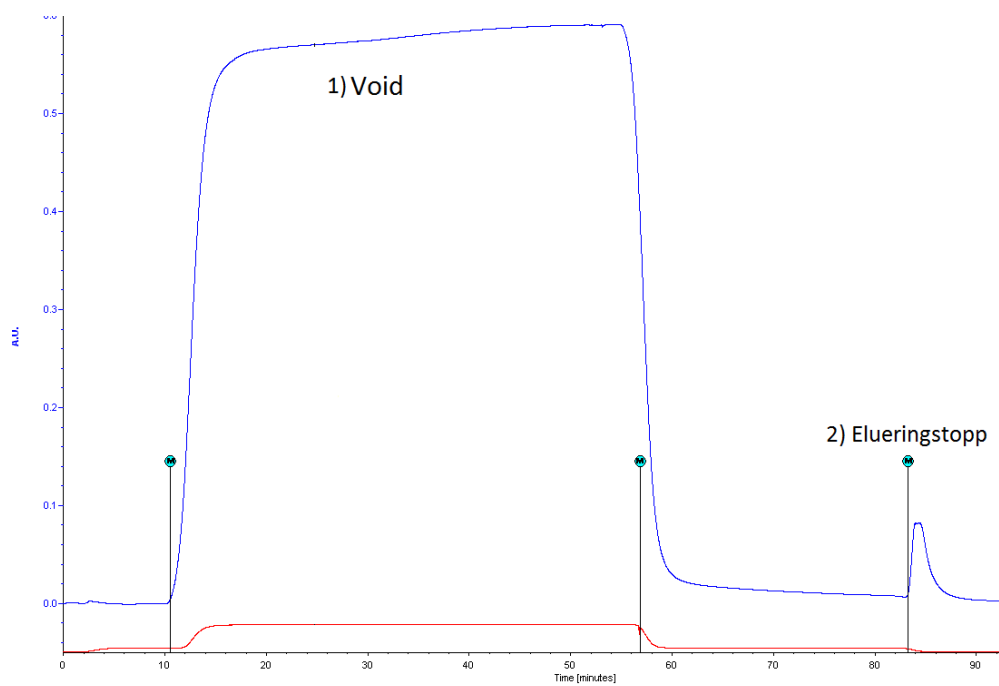


**Figur 30.** Kromatogrammet for rensingen av ChiB WT på kitinkolonne. 1) voidtoppen kom først og inneholdt forskjellige komponenter fra det periplasmatiske ekstraktet. 2) dernest kom elueringstoppen som inneholdt rent protein. Det periplasmatiske ekstraktet ble delt opp i tre fraksjoner som ble rensset etter hverandre for å hindre overload på kitinkolonnen.

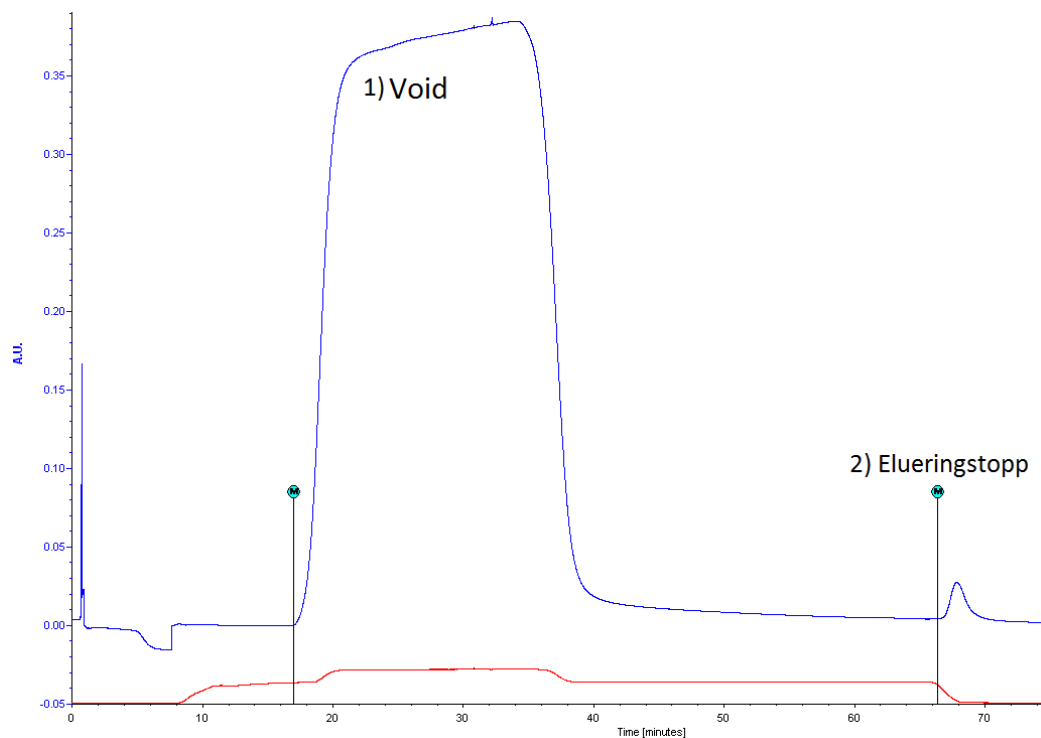


**Figur 31.** Kromatogrammet for rensingen av ChiB W97A på kitinkolonne. 1) voidtoppen kom først og inneholdt forskjellige komponenter fra det periplasmatiske ekstraktet. 2) dernest

kom elueringstoppen som inneholdt rent protein.



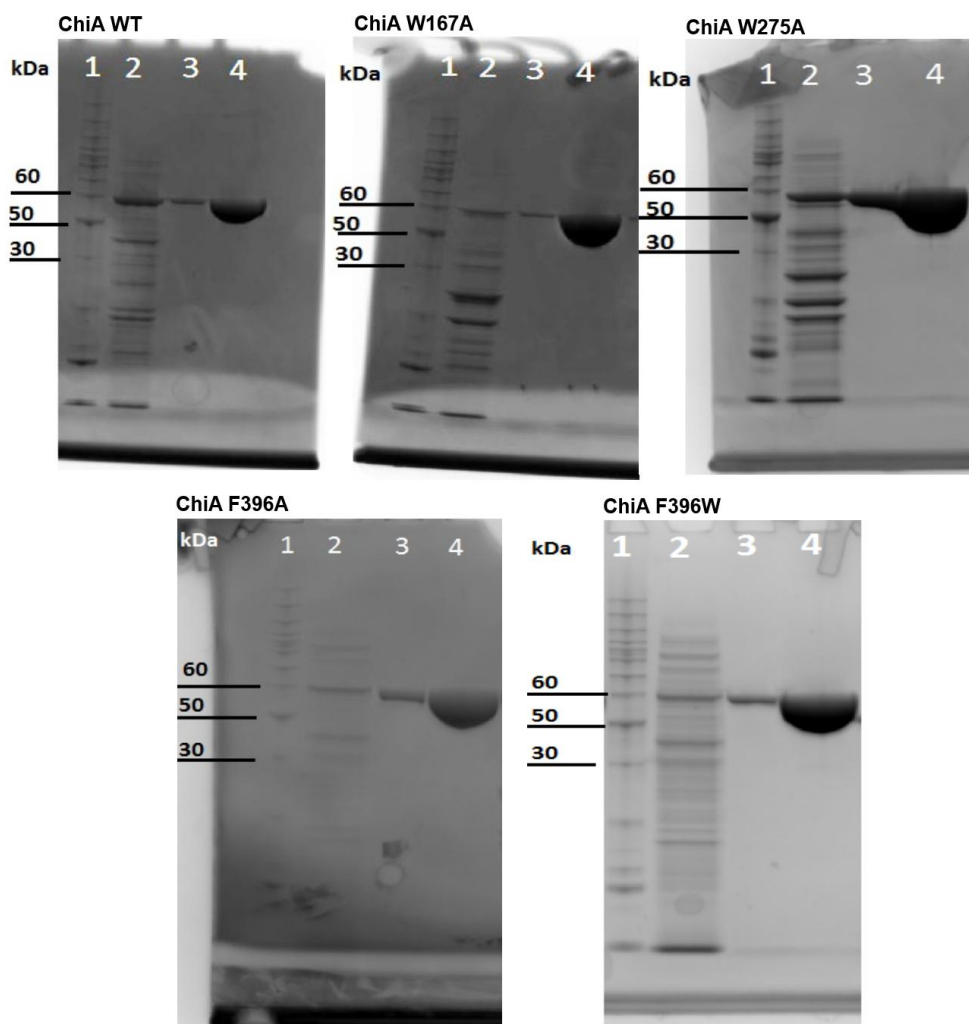
**Figur 32.** Kromatogrammet for rensingen av ChiB W220A på kitinkolonne. 1) voidtoppen kom først og inneholdt forskjellige komponenter fra det periplasmatiske ekstraktet. 2) dernest kom elueringstoppen som inneholdt rent protein.



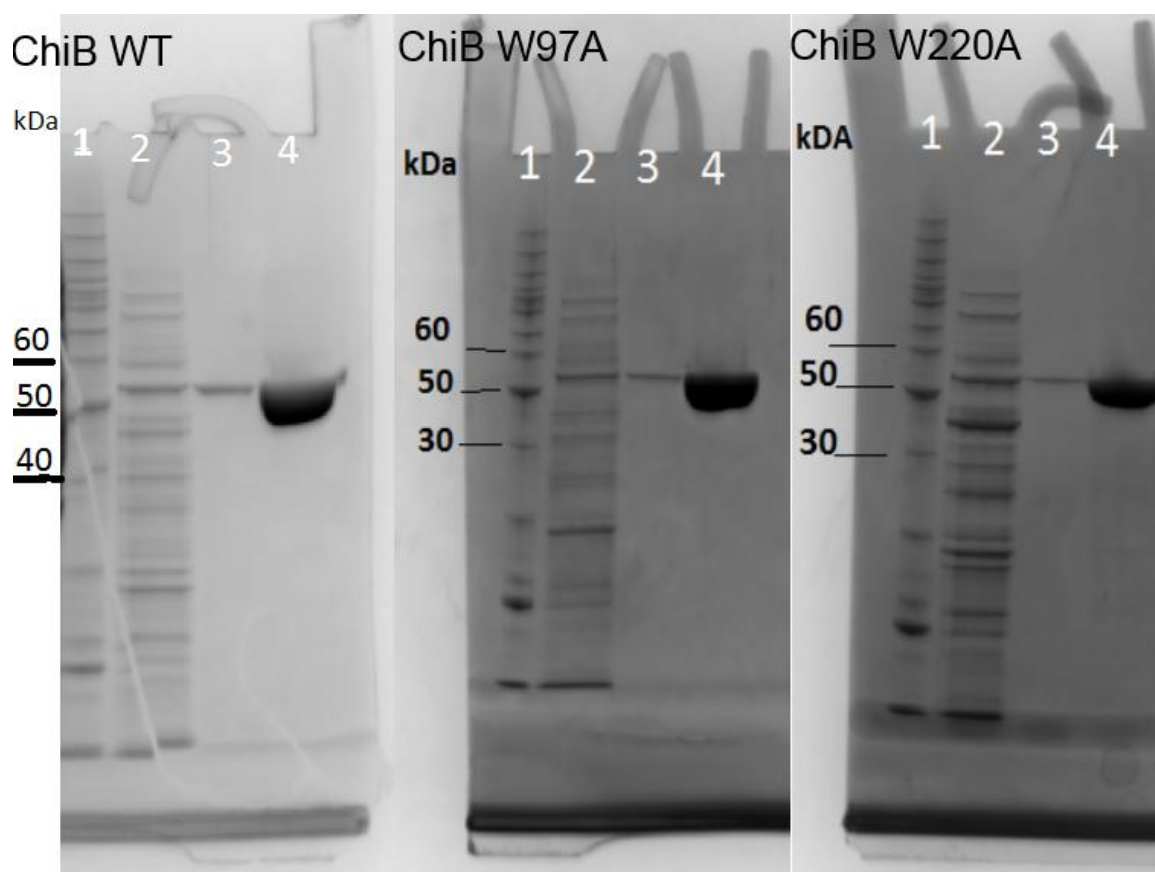
**Figur 33.** Kromatogrammet for rensingen av ChiB W97A/W220A på kitinkolonne. 1) voidtoppen kom først og inneholdt forskjellige komponenter fra det periplasmatiske ekstraktet. 2) dernest kom elueringstoppen som inneholdt rent protein.

### 4.3.2 SDS-PAGE av aktive enzymer

For å kontrollere at isoleringen av protein ikke inneholdt kontamineringer ble elueringsfraksjonene analysert på SDS-PAGE som beskrevet i avsnitt 3.3.2. ChiA og dens mutanter har en molekylvekt på 58,7 kDa, mens ChiB og dens mutanter har en molekylvekt på 55,5 kDa. En proteinladder med kjente størrelser ble brukt til sammenligning. Bånd som lå rundt molekylvektene til ChiA og ChiB bekreftet at proteinet med riktig størrelse er tilstede. Etter at protein med riktig størrelse var identifisert ble fraksjonen oppkonsentrert som beskrevet i avsnitt 3.3.5. Deretter ble en ny SDS-PAGE gel analysert. Denne inneholdt proteinladder, periplasmatiske ekstrakt, rensset protein og oppkonsentrert protein. Under (figur 34 og 35) vises gelbilder fra rensingene av kitinaser på kitinkolonne. De oppkonsentrerte proteinprøvene viste at løsningene ikke inneholdt kontamineringer.



**Figur 34.** SDS-PAGE etter isolering av ChiA WT, ChiA W167A, ChiA W275A, ChiA F396A, ChiA F396W. Brønn 1 inneholder proteinladder, brønn 2 det periplasmatiske ekstraktet, brønn 3 rensset protein, mens brønn 4 er oppkonsentrert protein. Brønn fire er overloadet for å vise at ingen andre kontamineringer var tilstede i proteinprøven.



**Figur 35.** SDS-PAGE etter isolering av ChiB villtype, ChiB W97A, ChiB W220A. Brønn 1 inneholder proteinladder, brønn 2 det periplasmatiske ekstraktet, brønn 3 rensset protein, mens brønn 4 er oppkonsentrert protein. Brønn fire er overloadet for å vise at ingen andre kontamineringer var tilstede i proteinprøven.

#### 4.3.3 Fluorometrisk bestemmelse av proteinkonsentrasjonen til aktive enzymer

Fraksjonene som inneholdt rent protein etter den kromatografiske rensingen ble oppkonsentrert som beskrevet i avsnitt 3.3.5. Proteinkonsentrasjonene til de ulike mutantene ble bestemt ved bruk av Bradford Bio-Rad Protein Assay eller Quant-iT™ Protein Assay Kit. I tabell 9 vises de ulike mutantene med utbytte og sluttvolum etter proteinbestemmelsen. Antall liter som ble brukt til å fremstille disse proteinene er også vist i tabellen.

**Tabell 9.** Oversikt over proteinkonsentrasjoner for enkeltmutanter til ChiA og ChiB oppgitt i mg/mL.

<b>Kitinase</b>	<b>Mutant</b>	<b>Proteinkonsentrasjon [mg/mL]</b>	<b>Sluttvolum [mL]</b>	<b>Vekstmedium [Liter]</b>
<b>ChiA</b>	Villtype	1,1	1	3
	W167A	1,7	0,75	3
	R172A <sup>a</sup>	0,8	1	3
	W275A	4,7	0,75	3
	T276A	18,4	0,75	3
	F396A	0,9	1	3
	F396W	1,5	0,6	3
<b>ChiB</b>	Villtype	0,9	0,75	3
	W97A	1,3	0,75	3
	W220A	2,0	0,75	3
	R294A <sup>b</sup>	0,7	0,75	3
	W97A/W220A	0,5	0,75	3

<sup>a</sup> Laget av (Hamre 2013).

<sup>b</sup> Laget av (Lorentzen 2013).

#### 4.3.4 Spesifikk enzymaktivitet

Som forklart i avsnitt 3.3.8 ble spesifikk enzymaktivitet målt fluorometrisk. Det lineære området til denne metoden ligger i området 0-5000 nm. For å få et nøyaktig og presist svar ble oppkonsentrerte proteinprøver fortynnet, slik at de falt innenfor det lineære området.

Resultatene fra aktivitetmålingen vises i tabell 10.

**Tabell 10.** Oversikt over den spesifikke enzymaktiviteten til ChiA og ChiB villtype og deres mutanter.

<b>Kitinaser</b>	<b>Mutant</b>	<b>Gjennomsnittlig absorbans (fortynning)</b>	<b>Spesifikk aktivitet (nm/min/mg)</b>	<b>Aktivitet relativt til villtype i %</b>
<b>ChiA</b>	Villtype	3086 (1:1000)	11536	100
	W167A	426 (1:1000)	1402	12
	R172A	2540 (1:1000)	12700	111
	W275A	974 (1:1000)	599	5
	T276	738 (1:1000)	3280	28
	F396A	369 (1:1000)	991	9
	F396W	742 (1:10000)	19919	173
<b>ChiB</b>	Villtype	927 (1:1000)	3819	100
	W97A	961 (1:1000)	3068	80
	W220A	247 (1:1000)	27444	718
	R294A	367 (1:1000)	753	20
	W97A/W220A	591 (1:1000)	3377	88

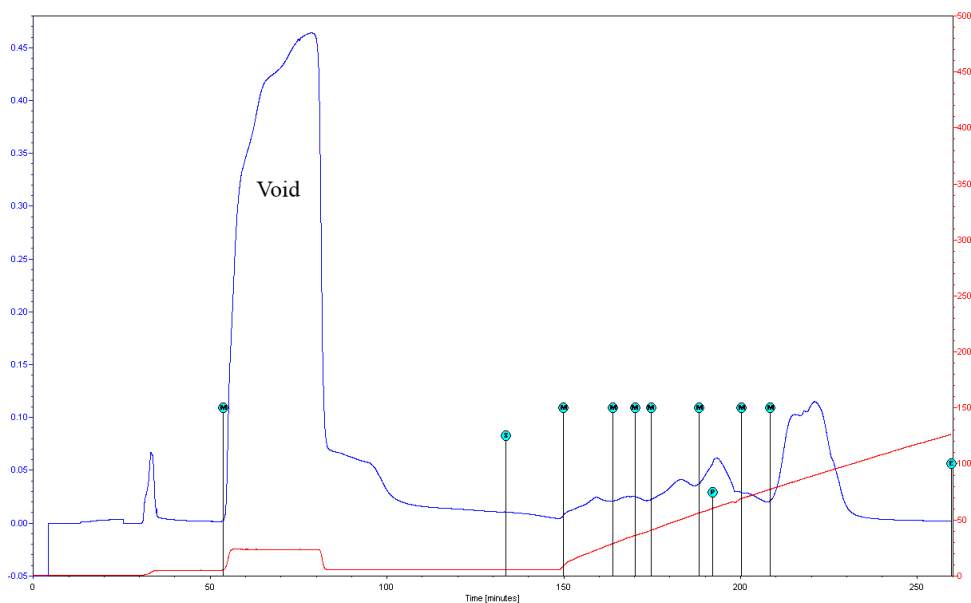
#### 4.4 Isolering av enzymer med katalytisk syre Glu mutert til Gln

##### 4.4.1 Rensing av enzymer med katalytisk syre Glu mutert til Gln

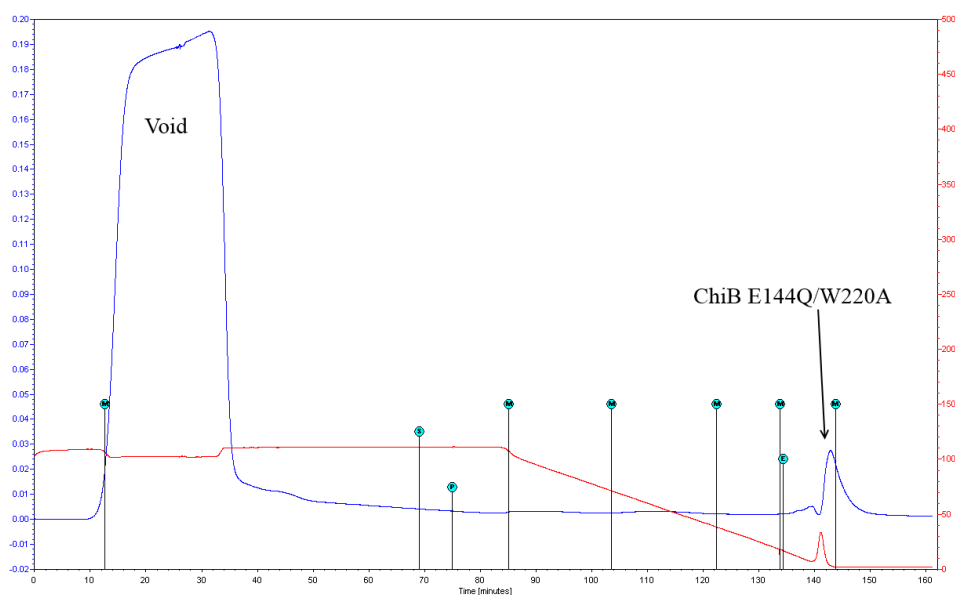
Enzymer hvor den katalytiske syren var mutert ble isolert ved hjelp av IEC og HIC. Rensing ved bruk av IEC og HIC er beskrevet i avsnitt 3.3. Det periplasmatiske ekstraktet ble først rensert ved bruk av ionebytterkromatografi, der de ulike toppene ble samlet i fraksjoner. Deretter ble disse analysert på SDS-PAGE for å finne ut hvilken fraksjon som inneholdt protein med riktig størrelse. Denne fraksjonen ble deretter rensert ved bruk av HIC. Eluert protein ble analysert ved SDS-PAGE for å finne ut hvilken fraksjon inneholdt rent protein med riktig størrelse. Fraksjonen ble til sist oppkonsentrert som beskrevet i avsnitt 3.3.5.



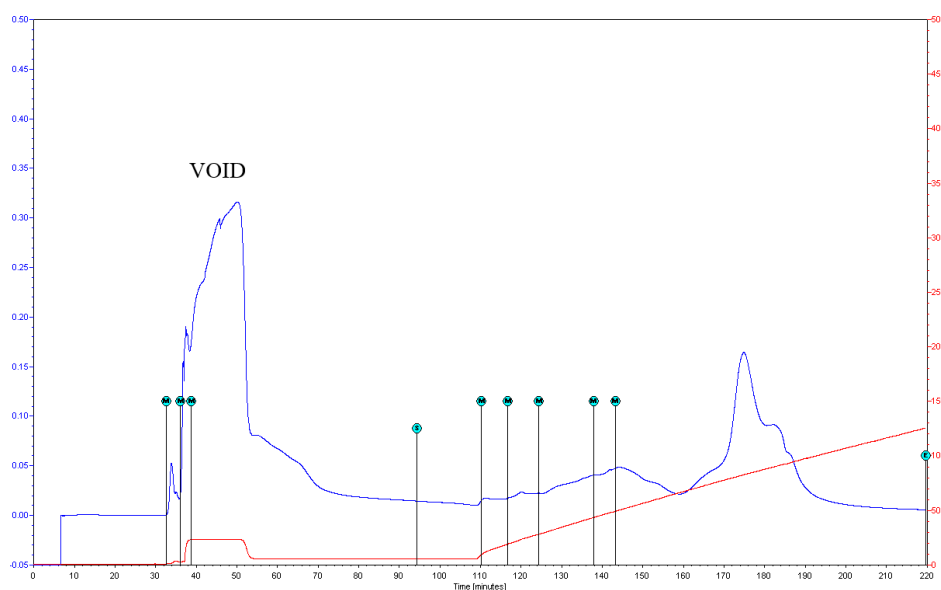
I figur 36 og 37 vises kromatogrammene fra rensing av ChiB E144Q/W220A på henholdsvis ionebytter- og hydrofob interaksjonskolonne. I figur 38 vises kromatogrammet for rensingen av ChiA E315Q/W275A på ionebytterkolonne.



**Figur 36.** Kromatogram for rensing av ChiB E144Q/W220A ved hjelp av ionebytterkromatografi. Det ble samlet fraksjoner som deretter ble analysert på SDS-PAGE for identifikasjon.



**Figur 37.** Kromatogram for rensing av ChiB E144Q/W220 ved hjelp av hydrofob interaksjonskromatografi. Det ble samlet fraksjoner som ble analysert på SDS-PAGE for proteinidentifikasjon.



**Figur 38.** Kromatogram for renging av ChiA E315Q/W275A ved hjelp av ionebrytterkromatografi. Det ble samlet fraksjoner som ble analysert på SDS-PAGE for proteinidentifikasjon.

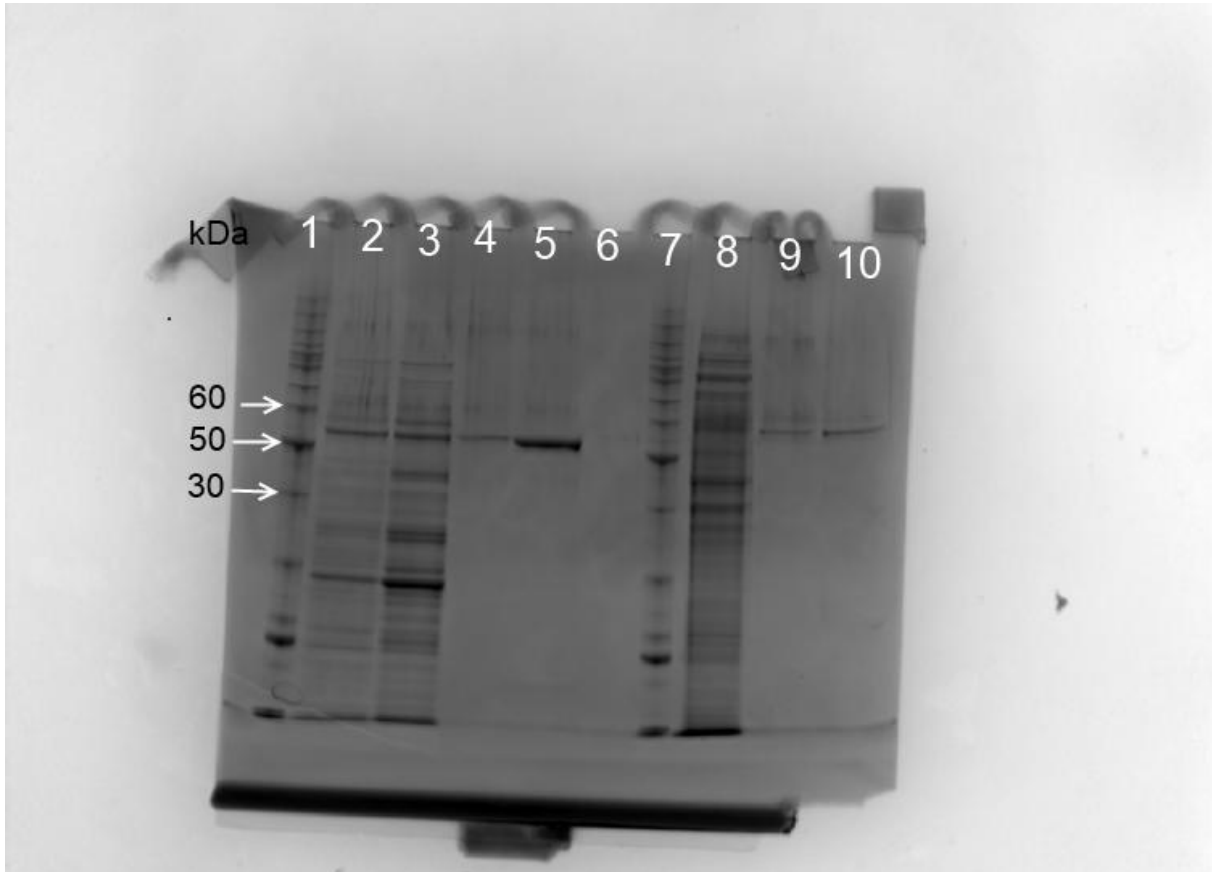
ChiA E315Q/W275A ble ikke renset ved bruk av HIC. Dette skyldtes at proteinfraksjonen fra IEC gav rent protein.

#### 4.4.2 SDS-PAGE av enzymer med katalytisk syre Glu mutert til Gln

For å vite om rensingen av enzymene hvor den katalytiske syren var mutert ikke inneholdt kontaminering fra andre proteiner, ble void- og elueringsfraksjonene analysert på SDS-PAGE. SDS-PAGE gav svar på hvilken fraksjon som inneholdt protein med riktig størrelse. Denne metoden er beskrevet i avsnitt 3.3.2. ChiA og dens mutanter har en molekylvekt på 58,7 kDa, mens ChiB og dens mutanter har molekylvekt på 55,5 kDa. En proteinladder med kjente størrelser brukes for å identifisere protein med rett størrelse.

Når SDS-PAGE etter HIC viste at proteinet med ønsket størrelse var isolert, ble prøven oppkonsentrert som beskrevet i avsnitt 3.3.5. En ny SDS-PAGE ble deretter analysert. Denne inneholdt proteinladder, periplasmatiske ekstrakt, fraksjon med protein med riktig størrelse fra IEC, renset fraksjon fra HIC og oppkonsentrert protein.

Under vises gelbildet (figur 39) fra rensing med ionebytter- og hydrofob interaksjonskromatografi. De oppkonsentrerte proteinprøvene viste at løsningene ikke inneholdt kontamineringer.



**Figur 39.** SDS-PAGE etter isolering av ChiB E144Q/W220A og ChiA E315Q/W275A. For ChiB E144Q/W220A viser brønn 1 proteinladder, brønn 2 det periplasmatiske ekstraktet, brønn 3 fraksjon fra IEC, brønn 4 rensset protein med HIC og brønn 5 oppkonsentrert protein. For ChiA E315Q/W275A viser brønn 7 proteinladder, brønn 8 det periplasmatiske ekstraktet, brønn 9 rensset protein fra IEC og brønn 10 oppkonsentrert protein.

Det ble ikke utført isotermisk titreringskalorimetri forsøk på de inaktive dobbeltmutantene. Dette skyldtes at bakteriestammen ikke produserte store nok mengder med protein, samt at renseprosedyren for ionebytter- og hydrofob interaksjonskromatografi ikke var optimaliserte. En tredje feilkilde som førte til lave utbytter var at filteret på oppkonsentreringsrørene absorberte protein, slik at de oppkonsentrerte prøvene inneholdt mindre protein enn antatt.

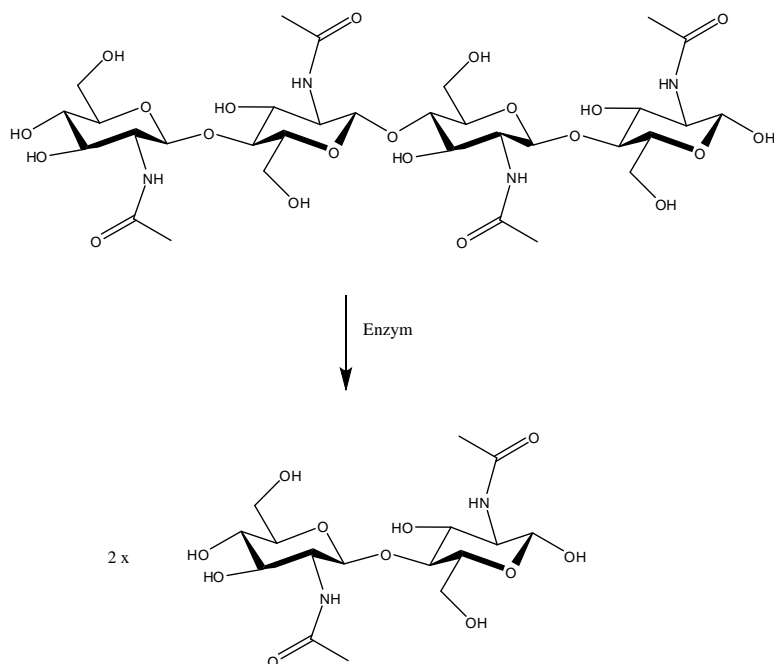
I tabell 11 vises kitinasene som ble prøvd rensset på IEC og HIC. For ChiA E315Q/W275A var konsentrasjonen 0,05 mg/mL og for ChiB E144Q/W220A var konsentrasjonen 0,08 mg/mL. Det ble brukt 3 liter vekstmedium for å få uttrykt proteinene. Andre dobbeltmutanter (ChiA E315Q/W167A, ChiA E315Q/F396W, ChiB E144Q/W97A) ble også dyrket og rensset, men utbyttene var lave og rensingene ikke vellykkede så disse resultatene er ikke vist.

**Tabell 11.** Oversikt over utbytter for de inaktive kitinasene som ble isolert ved bruk av IEC og HIC. Konsentrasjon, mengde enzym og mengde vekstmedium for hvert protein er vist.

Kitinase	Mutant	Proteinkonsentrasjon [mg/mL]	Sluttvolum [mL]	Vekstmedium [Liter]
ChiA	E315Q/W275A	0,05	0,75	3
ChiB	E144Q/W220A	0,08	1	3

#### 4.5 Bestemmelse av $k_{cat}$ og $K_M$ ved bruk av et HPLC assay

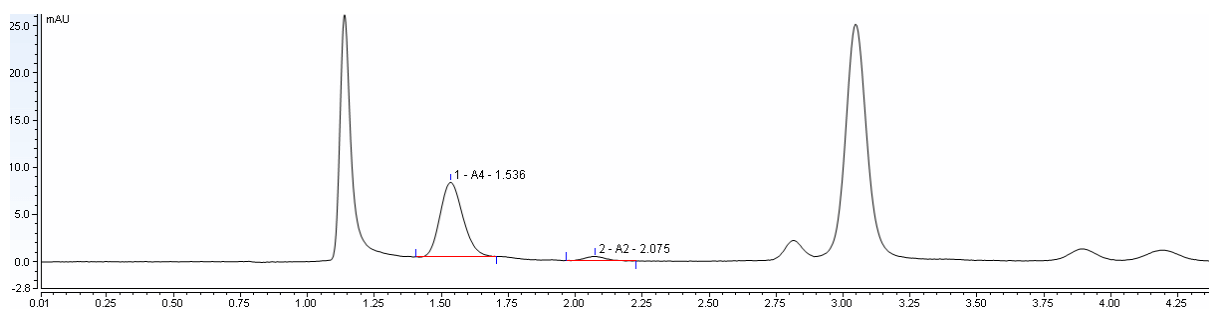
ChiA og ChiB er eksokitinaser som hydrolyserer kitin og kitosan fra henholdsvis den reduserende- og ikke-reduserende enden. Ved å bruke [GlcNAc]<sub>4</sub> som substrat vil det være produktiv binding fra -2 til +2 subsetene i både ChiA og ChiB. Disse kitinasene vil produsere 2 [GlcNAc]<sub>2</sub> enheter (figur 40) som ikke vil hydrolyseres til mindre deler (Horn et al. 2006d). [GlcNAc]<sub>4</sub> brukes som substrat fordi oligomerer av lengre størrelse vil gi flere produktive bindingssteder og vil gjøre den kinetiske analysen komplisert (Krokeide et al. 2007). Videre kan både [GlcNAc]<sub>2</sub> og [GlcNAc]<sub>4</sub> konsentrasjon detekteres og kvantifiseres ved hjelp av et tilpasset HPLC assay (avsnitt 3.5). Det er tidligere vist at enzymatisk hydrolyse av [GlcNAc]<sub>4</sub> for ChiA og ChiB følger Michaelis-Menten kinetikk. Ved bruk av en ikke-lineær regresjonsfunksjon ble  $k_{cat}$  og  $K_M$  verdier på henholdsvis  $33 \text{ s}^{-1} \pm 1 \text{ s}^{-1}$  og  $9 \text{ }\mu\text{M} \pm 1 \text{ }\mu\text{M}$  for ChiA og  $28 \text{ s}^{-1} \pm 2 \text{ s}^{-1}$  og  $4 \text{ }\mu\text{M} \pm 2 \text{ }\mu\text{M}$  for ChiB bestemt (Krokeide et al. 2007). I denne oppgaven ble  $k_{cat}$  og  $K_M$  funnet for syv ulike enzymer.



**Figur 40.** Generell hydrolyse av  $[\text{GlcNAc}]_4$  til  $[\text{GlcNAc}]_2$ .

#### 4.5.1 ChiA R172A

Etter fullført  $[\text{GlcNAc}]_4$  assay, ble prøvene analysert på HPLC. Et eksempel på et kromatogram fra denne analysen vises i figur 41.

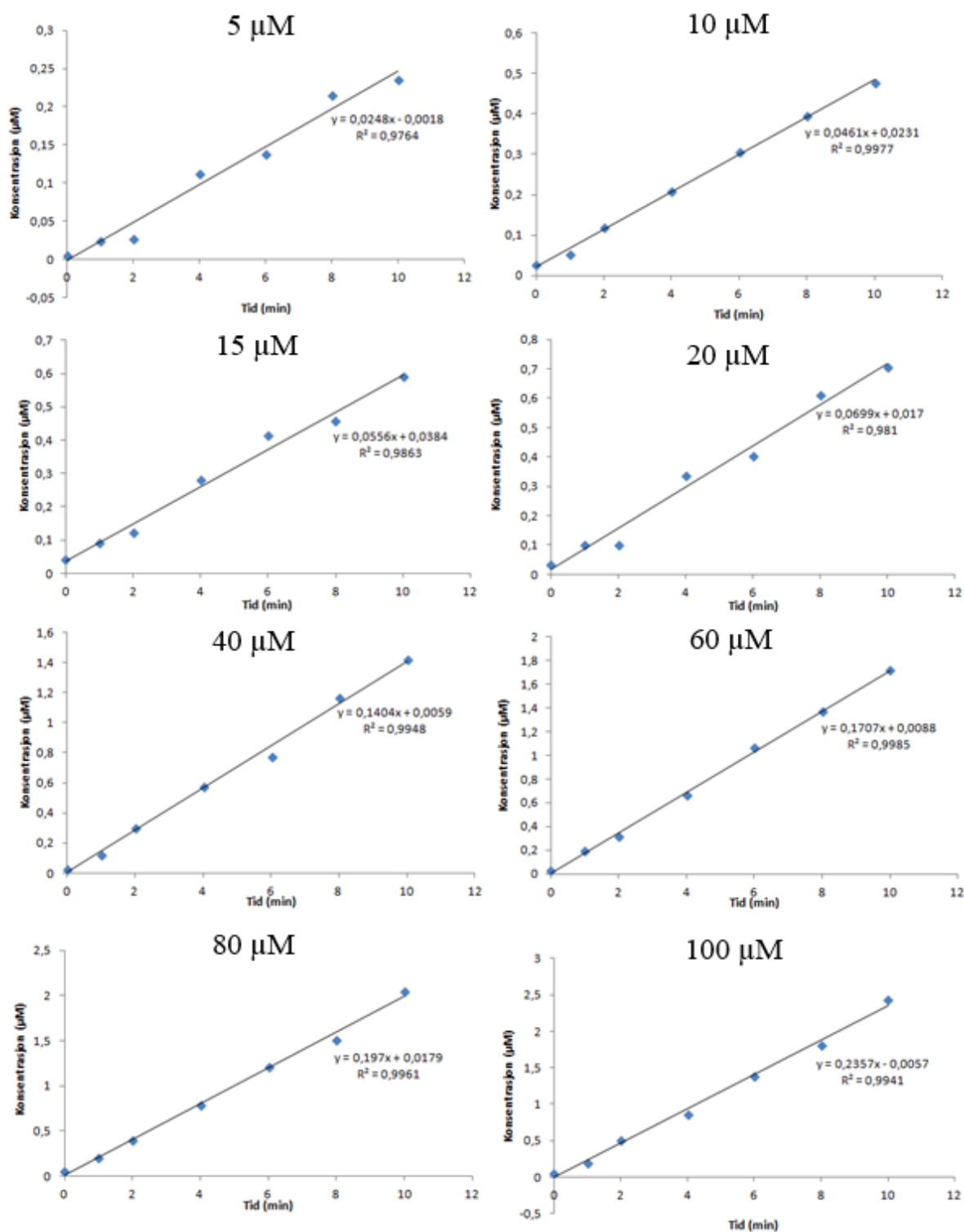


**Figur 41.** Kromatogram etter hydrolyse av  $[\text{GlcNAc}]_4$  med ChiA R172A.

Utgangskonsentrasjonen til  $[\text{GlcNAc}]_4$  var  $20 \mu\text{M}$ , enzymkonsentrasjonen  $0,2 \text{ nM}$ , pH 6.1 og temperaturen  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Kromatogrammet viser separasjon av  $[\text{GlcNAc}]_4$  (retensjonstid 1,6 min) og  $[\text{GlcNAc}]_2$  (retensjonstid 2,1 min) etter 10 minutter med nedbrytning av substrat.

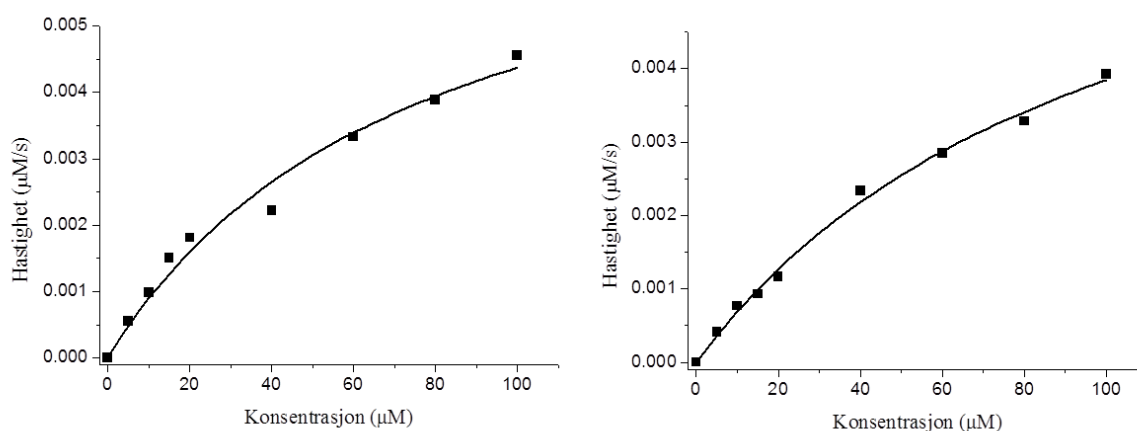
Kromatogrammene fra HPLC-analysen ble analysert med hjelp av programvaren Chromeleon 7.0. En standardkurve med kjente konsentrasjoner av [GlcNAc]<sub>4</sub> og [GlcNAc]<sub>2</sub> ble laget og brukt til å bestemme konsentrasjonen av substrat og produkt i de ulike prøvene.

Ved å plote produktkonsentrasjonen mot tid gav dette reaksjonshastigheten til enzymet etter lineær regresjonsanalyse, som vist i figur 42. Hydrolysehastighetene ble plottet mot substratkonsentrasjon i et Michaelis-Menten plott. De eksperimentelle dataene ble tilpasset Michaelis-Menten likningen ved bruk av ikke-lineær tilpasning i Origin 7.0. Origin 7.0 ga parametrene  $k_{\text{cat}}$  og  $K_{\text{M}}$ , slik at  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$  kunne beregnes. Michaelis-Menten plottene for ChiA R172A er vist som et eksempel i figur 43.



**Figur 42.** Grafene viser  $[\text{GlcNAc}]_2$  konsentrasjonen mot tid for ChiA R172A, der stigningstallet tilsvarer reaksjonshastigheten til enzymet. Utgangskonsentrasjonen til  $[\text{GlcNAc}]_4$  er henholdsvis 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{M}$ .

Den kinetiske analysen av ChiA R172A gav  $k_{cat}$ - og  $K_M$ - verdier på  $39 \text{ s}^{-1} \pm 5 \text{ s}^{-1}$  og  $90 \text{ }\mu\text{M} \pm 19 \text{ }\mu\text{M}$ .  $k_{cat}/K_M$  ble  $0,4 \text{ }\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Resultatet fra HPLC analysen er oppsummert i tabell 12.



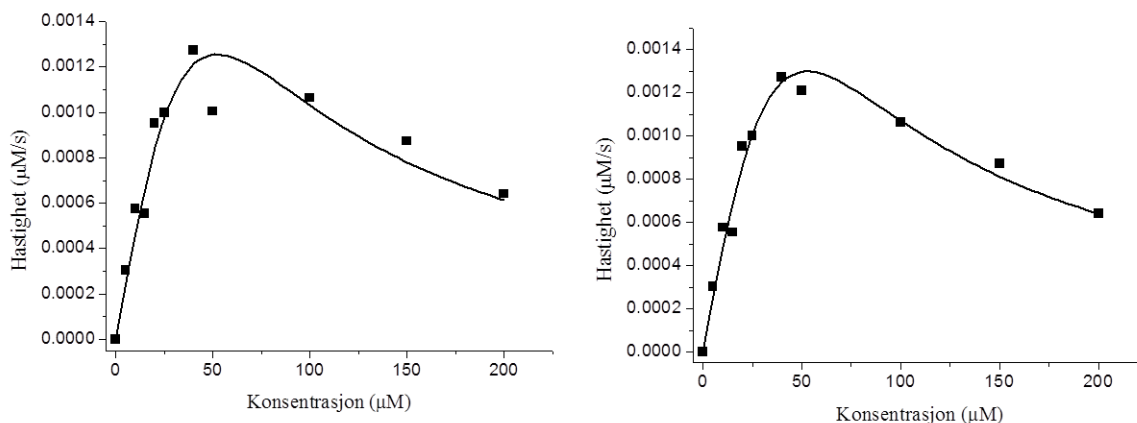
**Figur 43.** Michaelis-Menten plott fra hydrolyse for ChiA R172A. Hydrolyseringshastigheten er plottet mot substratkonsentrasjonen. Grafene er tilpasset en ikke-lineær funksjon ved bruk av Michaelis-Menten likningen.

Av plasshensyn er et eksempel på et HPLC kromatogram og grafene for  $[\text{GlcNAc}]_2$  konsentrasjonen mot tid kun vist for ChiA R172A.

#### 4.5.2 ChiA W275A:

Under den kinetiske analysen av ChiA W275A ble det observert at hastighet for hydrolyse begynte å avta for substratkonsentrasjoner over  $50 \text{ }\mu\text{M}$  (figur 44). Det ble antatt at dette skyldes substratinhibering (diskutert i diskusjonsdelen) og teoretiske data ble tilpasset med Michaelis Menten likning tilpasset dette (avsnitt 3.5.1). Denne tilpasningen gav  $k_{cat}$ - og  $K_M$ - verdier på henholdsvis  $7 \text{ s}^{-1}$  og  $126 \text{ }\mu\text{M}$  hver for seg (tabell 12), med en  $k_{cat}/K_M$  på  $0,06 \text{ }\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Videre ble  $K_i$  for substratinhiberingen estimert til å være  $25 \text{ }\mu\text{M}$  (tabell 12). Det er knyttet stor usikkerhet til standardavvikene og skyldes at 3 parametere tilpasses i inhiberingslikningen.

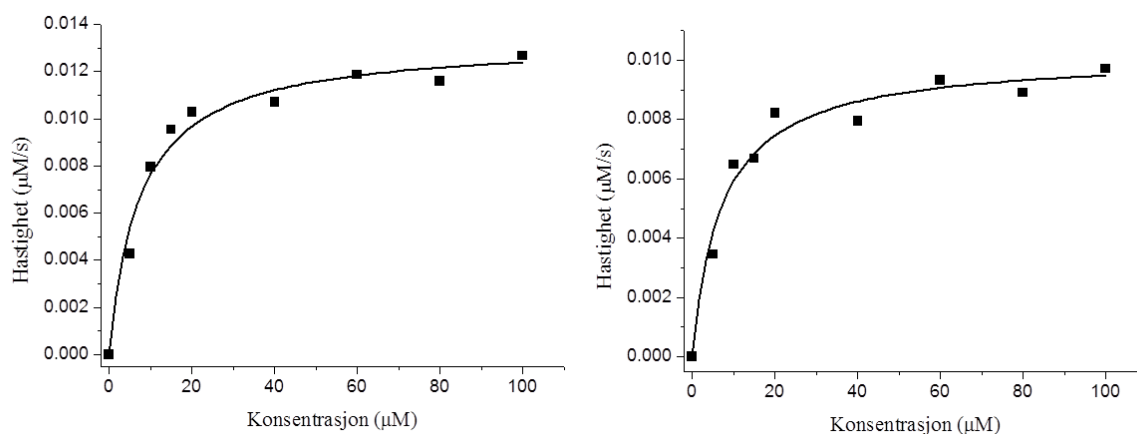




**Figur 44.** Michaelis-Menten plott fra hydrolyse for ChiA W275A. Hydrolyseringshastigheten er plottet mot substratkonsentrasjonen. Grafene er tilpasset en ikke-lineær funksjon ved bruk av Michaelis-Menten likningen.

#### 4.5.3 ChiA T276A

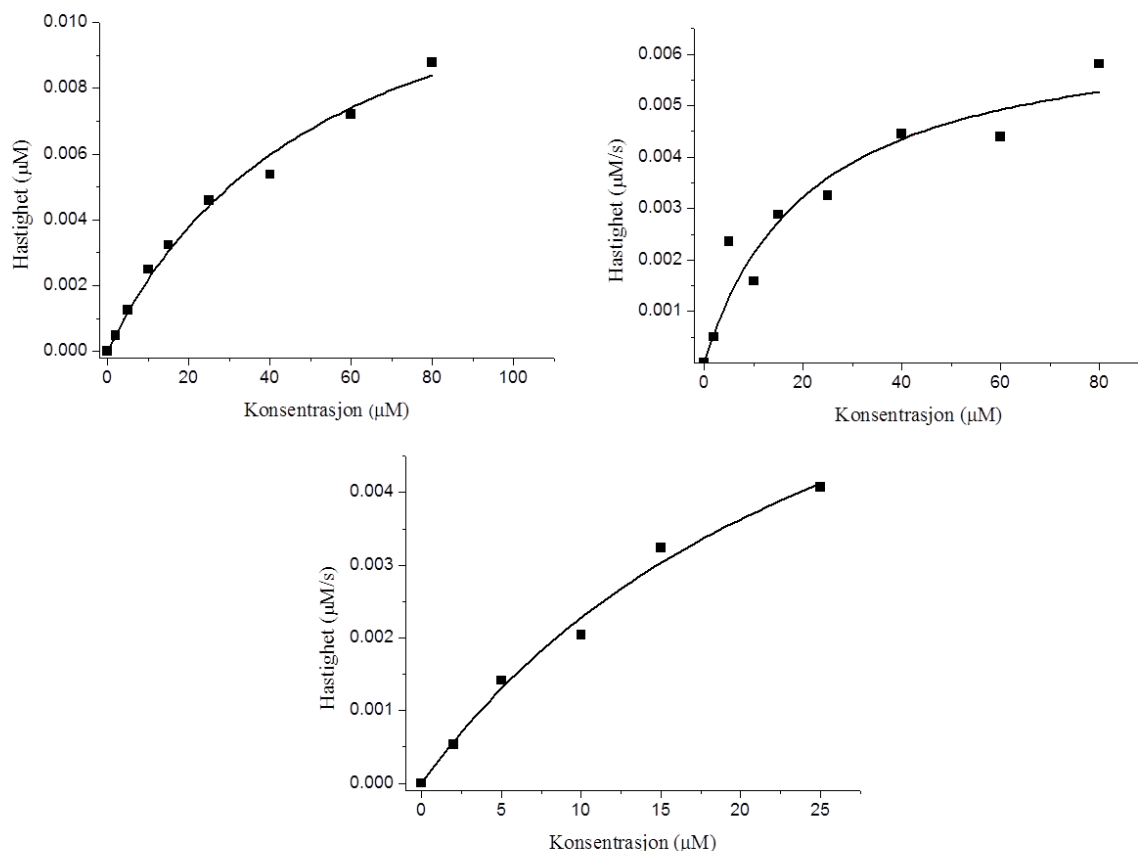
Den kinetiske analysen av ChiA T276A gav  $k_{cat}$ - og  $K_M$ - verdier på  $12 \mu\text{M} \pm 0,5 \mu\text{M}$  og  $7 \text{s}^{-1} \pm 1 \text{s}^{-1}$ .  $k_{cat}/K_M$  ble  $1,7 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (tabell 12). Michaelis-Menten plottene til ChiA T276A er vist i figur 45.



**Figur 45.** Michaelis-Menten plott fra hydrolyse for ChiA T276A. Hydrolyseringshastigheten er plottet mot substratkonsentrasjonen. Grafene er tilpasset en ikke-lineær funksjon ved bruk av Michaelis-Menten likningen.

#### 4.5.4 ChiA F396A:

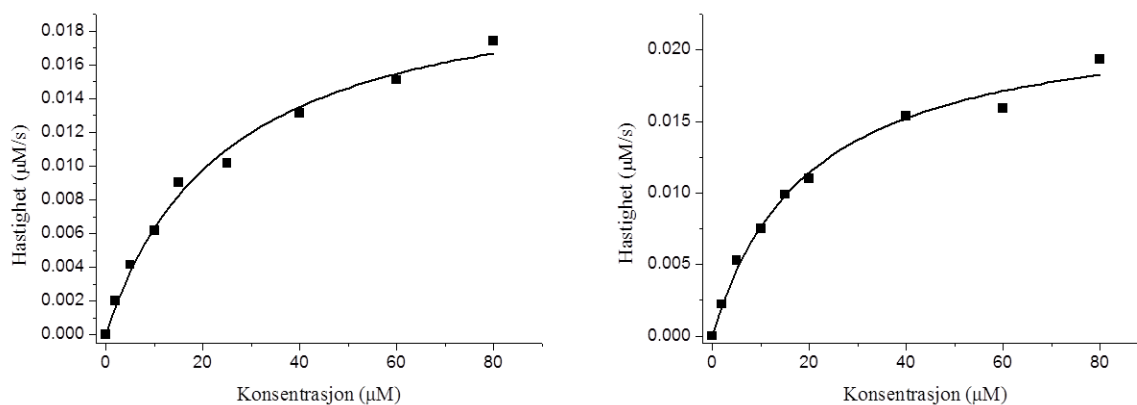
Den kinetiske analysen av ChiA F 396A gav  $k_{cat}$ - og  $K_M$ - verdier på  $20 \mu\text{M} \pm 2 \mu\text{M}$  og  $35 \text{ s}^{-1} \pm 9 \text{ s}^{-1}$ .  $k_{cat}/K_M$  ble  $0,6 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Alle parameterene er oppsummert i tabell 12. Michaelis-Menten plottene til ChiA F396A er vist i figur 46.



**Figur 46.** Michaelis-Menten plott fra hydrolyse for ChiA F396A. Hydrolyseringshastigheten er plottet mot substratkonsentrasjonen. Grafene er tilpasset en ikke-lineær funksjon ved bruk av Michaelis-Menten likningen.

#### 4.5.5 ChiA F396W:

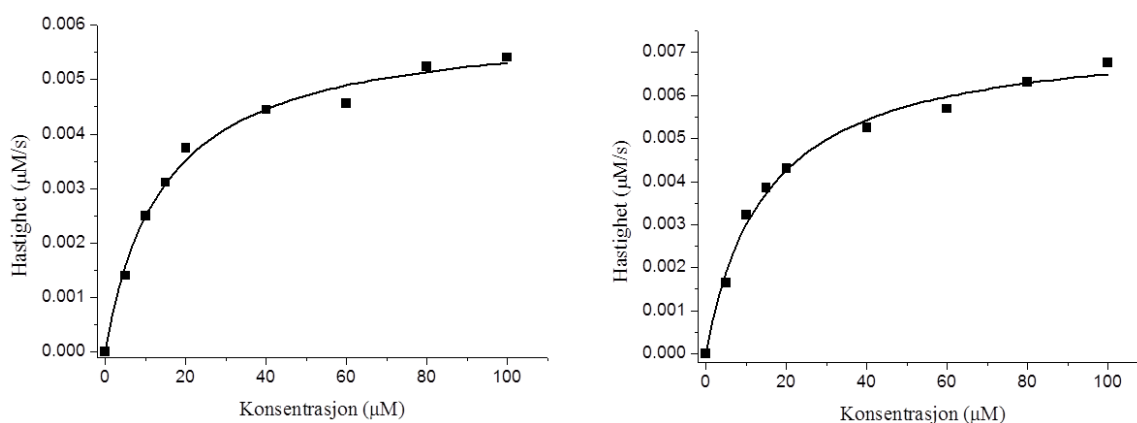
Den kinetiske analysen av ChiA F396W gav  $k_{cat}$ - og  $K_M$ - verdier på  $89 \mu\text{M} \pm 5 \mu\text{M}$  og  $23 \text{ s}^{-1} \pm 3 \text{ s}^{-1}$ .  $k_{cat}/K_M$  ble  $4 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Alle parameterene er oppsummert i tabell 12. Michaelis-Menten plottene til ChiA F396W er vist i figur 47.



**Figur 47.** Michaelis-Menten plott fra hydrolyse for ChiA F396W. Hydrolyseringshastigheten er plottet mot substratkonsentrasjonen. Grafene er tilpasset en ikke-lineær funksjon ved bruk av Michaelis-Menten likningen.

#### 4.5.6 ChiB R294:

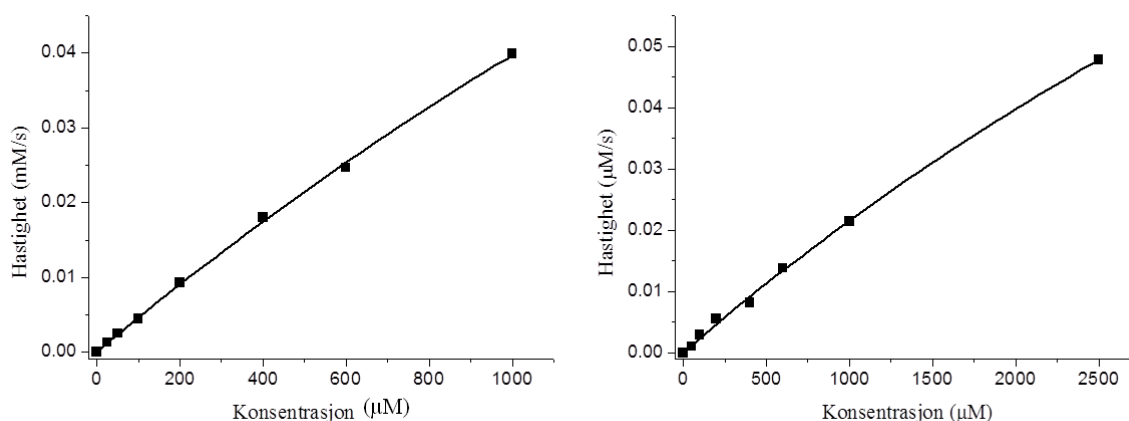
Den kinetiske analysen av ChiB R294A gav  $k_{cat}$ - og  $K_M$ - verdier på  $18 \mu\text{M} \pm 3 \mu\text{M}$  og  $15 \text{s}^{-1} \pm 2 \text{s}^{-1}$ .  $k_{cat}/K_M$  ble  $1,2 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ . Alle parameterene er oppsummert i tabell 12. Michaelis-Menten plottene til ChiB R294A er vist i figur 49.



**Figur 48.** Michaelis-Menten plott fra hydrolyse for ChiB R294A. Hydrolyseringshastigheten er plottet mot substratkonsentrasjonen. Grafene er tilpasset en ikke-lineær funksjon ved bruk av Michaelis-Menten likningen.

#### 4.5.7 ChiB W97A/W220A:

Den kinetiske analysen av ChiB W97A/W220A gav  $k_{\text{cat}}$ - og  $K_M$ - verdier på  $125 \mu\text{M} \pm 23\mu\text{M}$  og  $7850 \text{ s}^{-1} \pm 1800 \text{ s}^{-1}$ .  $k_{\text{cat}}/K_M$  ble  $0,02 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Alle parameterene er oppsummert i tabell 12. Michaelis-Menten plottene til ChiA R172A er vist i figur 49.



**Figur 49.** Michaelis-Menten plott fra hydrolyse for ChiB W97A/W220A.

Hydrolyseringshastigheten er plottet mot substratkonsentrasjonen. Grafene er tilpasset en ikke-lineær funksjon ved bruk av Michaelis-Menten likningen.

De kinetiske konstantene  $k_{\text{cat}}$  og  $K_M$  ble funnet for sju ulike enzymer som katalyserte hydrolysen av  $[\text{GlcNAc}]_4$ . Disse parametrene samt  $k_{\text{cat}}/K_M$ ,  $R^2$  og  $K_i$  er vist i tabell 12.  $K_i$  er inhiberingskonstanten til enzymet.

**Tabell 12.** Kinetiske signaturer til ChiA og ChiB villtype samt noen av deres mutanter.

Mutanter	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_M$ (μM)	$k_{cat}/K_M$	$R^2$	$K_i$
<b>ChiA WT<sup>a</sup></b>	33 ± 1	9 ± 1	3,67		
<b>ChiA R172A</b>	39 ± 5	76 ± 20	0,5	0,98	
	39 ± 4	103 ± 17	0,38	0,99	
<b>ChiA W275A<sup>b</sup></b>	8	157	0,05	0,97	17
	6	95	0,06	0,75	32
<b>ChiA T276A</b>	13.3 ± 0.5	7 ± 1	1,9	0,98	
	10.2 ± 0.4	7 ± 1	1,5	0,97	
<b>ChiA F396A</b>	28 ± 2	55 ± 11	0,5	0,99	
	13 ± 2	21 ± 8	0,6	0,92	
	18 ± 3	29 ± 9	0,6	0,99	
<b>ChiA F396W</b>	87 ± 5	25 ± 3	3,5	0,99	
	91 ± 4	20 ± 3	4,6	0,99	
<b>ChiB WT<sup>a</sup></b>	28 ± 2	4 ± 2	7		
<b>ChiB W294A</b>	16.4 ± 0.5	14 ± 1	1,2	0,99	
	20.2 ± 0.6	15 ± 2	1,3	0,99	
<b>ChiB</b>	127 ± 24	5400 ± 1200	0,02	1	
<b>W97A/W220A</b>	123 ± 22	10300 ± 2400	0,01	1	

<sup>a</sup> Resultat hentet fra (Krokeide et al. 2007)

<sup>b</sup> Stor usikkerhet knyttet til standardavviket til ChiA W275. Dette skyldes usikkerheten gitt av den ikke-lineære analyselikningen. Standardavviket er ikke tatt med i tabellen.

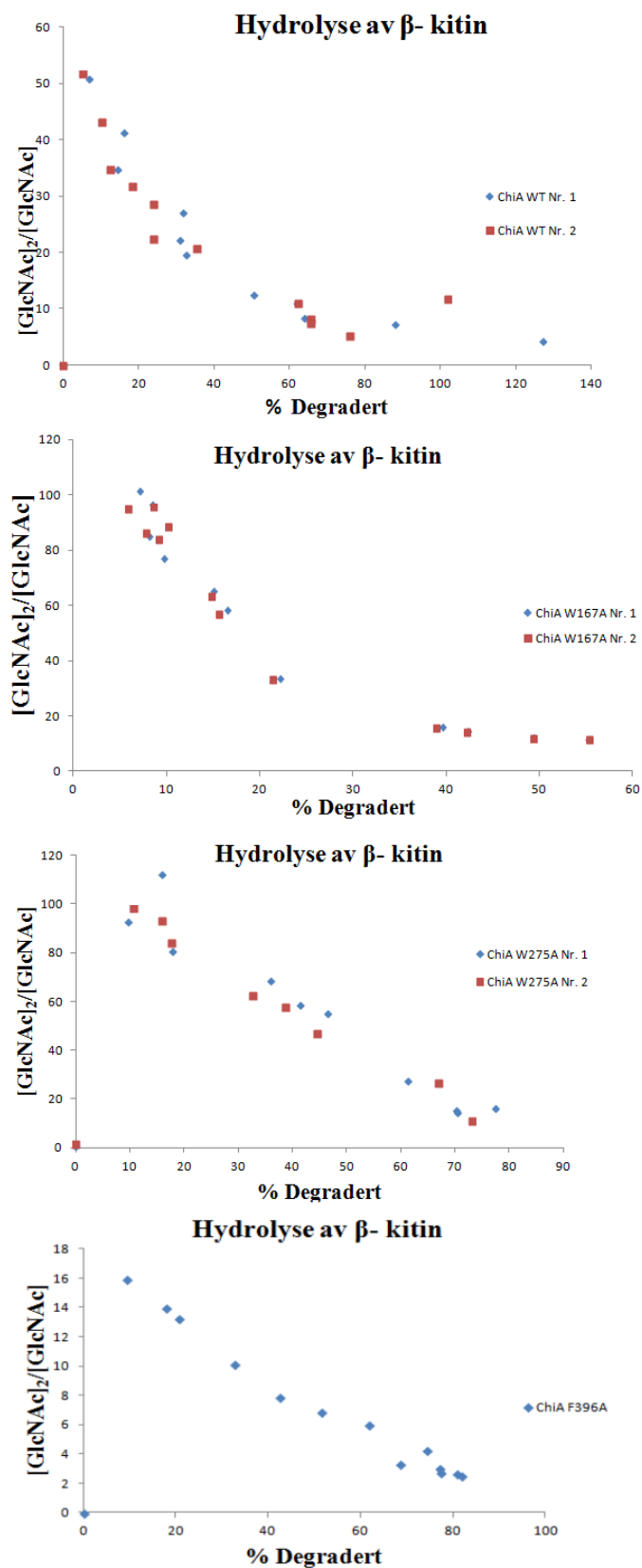
## 4.6 Hydrolyse av $\beta$ -kitin

Som beskrevet i avsnitt 3.4 kan enzymets prosessivitet bli analysert ved å se på nedbrytningen av kitin hvor andel dimer versus monomer vil være proporsjonalt med grad av prosessivitet. Hver produktive binding vil hos prosessive enzymer kun gi et oddetallsprodukt, mens de resterende produktene fra den samme initielle bindingen vil være  $[\text{GlcNAc}]_2$  enheter.

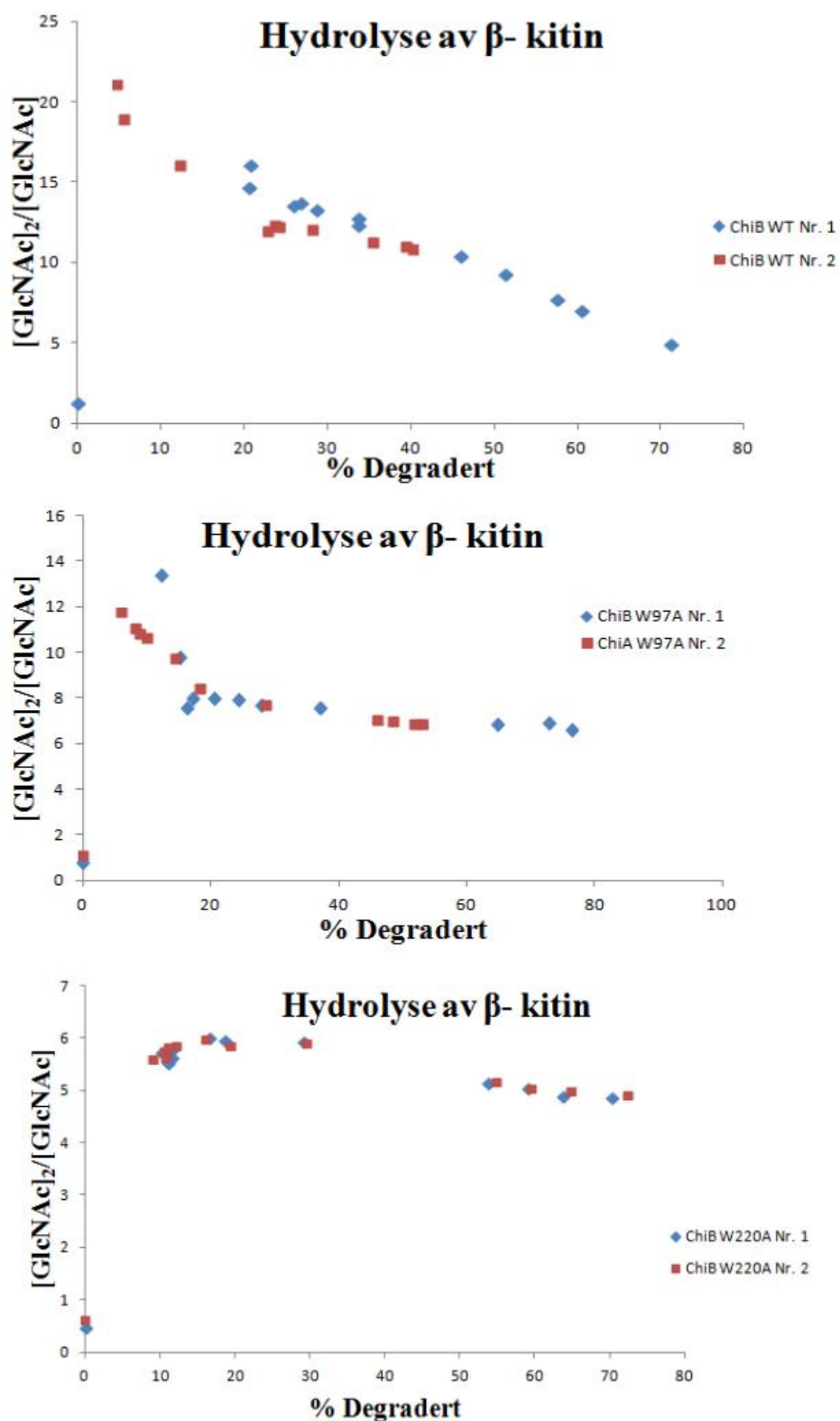
Metoden går ut på å se på forholdet mellom produktene som dannes etter hydrolyse, altså  $[\text{GlcNAc}]_2/[\text{GlcNAc}]$ . Etter nedbrytning ble prøvene analysert på HPLC.

$[\text{GlcNAc}]_2/[\text{GlcNAc}]$  konsentrasjonene ble funnet ved å integrere toppene. Deretter ble dimer/monomer konsentrasjonene plottet mot prosent nedbrutt substrat. Figurene 50 og 51 viser forholdet mellom  $[\text{GlcNAc}]_2/[\text{GlcNAc}]$  ved prosent degradert  $\beta$ -kitin.

Eksempel på utregninger av konsentrasjoner samt prosent degradert vises i tabell 18. Nedenfor vises resultatene for hydrolysering av  $\beta$ -kitin for sju ulike enzymer. Den enzymatiske hydrolyseringen av  $\beta$ -kitin er en metode som brukes for å se på grad av prosessivitet i forskjellige enzymer.



**Figur 50.** Oversikt over den enzymatiske hydrolysen av  $3\mu\text{m}$   $\beta$ -kitin for ChiA WT, ChiA W167A, ChiA W275A og ChiA F396A.  $[GlcNAc]_2/[GlcNAc]$  forholdet er plottet mot prosent degradert kitin.



**Figur 51.** Oversikt over hydrolysen av  $3\mu\text{m}$   $\beta$ -kitin for ChiB WT, ChiB W97A og ChiB W220A.  $[\text{GlcNAc}]_2/[\text{GlcNAc}]$  forholdet er plottet mot prosent nedbrutt kitin.



I tabell 13 og 14 vises de ulike kitinasenes  $[\text{GlcNAc}]_2/[\text{GlcNAc}]$  forhold mot prosent nedbrutt substrat.

**Tabell 13.** Oversikt over  $[\text{GlcNAc}]_2/[\text{GlcNAc}]$  forholdet mot prosent degradert  $3\mu\text{m}$   $\beta$  kitin for ChiA WT, ChiA W167A, ChiA W275A og ChiA F396A.

% degradert	ChiA WT	W167A	W275A	F396A
10	43	77	92	15
20	31	33	80	13
30	20	$\geq 33$	68	10
40	$\geq 20$	16	58	8
50	$\geq 20$	12	54	7
60	11	11	14	3
70	5	$\geq 11$	16	3

**Tabell 14.** Oversikt over  $[\text{GlcNAc}]_2/[\text{GlcNAc}]$  forholdet mot prosent nedbrutt  $3\mu\text{m}$   $\beta$  kitin for ChiB WT, ChiB W97A, ChiB W220A.

% degradert	ChiB WT	W97A	W220A
10	16	10	6
20	12	8	5,9
30	11	8	5,9
40	10	7	5,1
50	10	7	5

## 5 Diskusjon

I denne oppgaven ble det utført kinetikksanalyser på residuer som er lokalisert rundt det aktive setet til ChiA og ChiB som er involvert i direksjonalitet og prosessivitet. I ChiA ble spesielt W275 (+1) og F396 (+2) studert. Samme eller tilsvarende aromatiske residuer finnes også i ChiB med W97 i +1 og W220 i +2. I ChiA er residuene assosiert med produktet, [GlcNAc]<sub>2</sub>, etter en prosessiv hydrolyse mens i ChiB er de involvert i binding av substrat under prosessiv hydrolyse.

Videre ble det foretatt kinetikkanalyse for tre polare residuer, ChiA R172, ChiA T275 og ChiB R294 hvor en av disse (ChiA T276) er blitt funnet til å være viktig for prosessivitet. Målet for kinetikkanalysene var å se om direksjonalitet og grad av prosessivitet gjenspeiles i de kinetiske signaturene.

Tilslutt ble det foretatt en prosessivitetsanalyse på de fem aromatiske residuene beskrevet i avsnitt 3.4.1 med bruk av [GlcNAc]<sub>2</sub>/[GlcNAc] etter degradering av β-kitin som mål for grad av prosessivitet. Dette for å se om et slikt mål ga samme observasjoner som bruk av kitosan som vist i Horn *et al* (PNAS 2006) og Zakariassen *et al* (J Biol Chem 2009).

### 5.1 Kinetisk signatur på direksjonalitet og prosessivitet for aromatiske residuer

Kinetikkverdier for aromatiske residuer i de aktive setene for ChiA og ChiB er vist i tabell 15. Siden aromatiske residuer som er i substratbindende sub seter (W167 for ChiA og W97 og W220 i ChiB) har vist seg å være viktige for prosessivitet, er det interessant å se om de kinetiske signaturene også gir informasjon om direksjonalitet. Tabellen viser verdiene  $k_{cat}$ ,  $K_M$  og  $k_{cat}/K_M$ . Verdiene for ChiA W167A er hentet fra Norberg *et al.* (FEBS Letters 2011) og ChiB W97A samt ChiB W220 er hentet fra Krokeide *et al.* (Thermochim Acta 2007).

**Tabell 15.** Kinetikkverdier for residuer som antas å være involvert i direksjonalitet til ChiA og ChiB

Kitinaser	Mutant	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_M$ ( $\mu M$ )	$k_{cat}/K_M$
ChiA	WT <sup>a</sup>	33 ± 1	9 ± 1	4
	W167A <sup>b</sup>	97 ± 9	333 ± 44	0,3
	W275A	7 ± 1	126 ± 8	0,06
	F396A	13 ± 2	21 ± 8	0,6
ChiB	WT <sup>a</sup>	28 ± 2	4 ± 2	7
	W97A <sup>a</sup>	126 ± 4	807 ± 40	0,2
	W220A <sup>a</sup>	45 ± 2	71 ± 3	0,6

<sup>a</sup> Resultatene hentet fra (Krokeide et al. 2007).

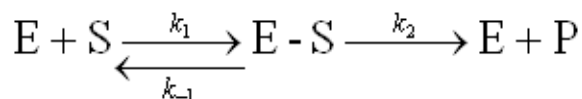
<sup>b</sup> Resultater hentet fra (Norberg et al. 2011).

Kinetikkdataene viser at  $k_{cat}$  øker kraftig i forhold til villtype for de residuene som har vist seg å være viktigst for prosessivitet (W167 og W97). Disse dataene viser at  $k_{cat}$  øker ~3 x og ~5 x for henholdsvis W167 og W97. Videre er det også en dramatisk økning i  $K_M$ , der det ble observert 37 x og 200 x høyere  $K_M$  enn villtype. Det forventes at verdiene for W167 er lavere enn for W97 siden en GlcNAc gruppe ikke er direkte assosiert til W167 ved produktiv binding av [GlcNAc]<sub>4</sub>, men er allikevel viktig for å trekke substratet ut av løsningen og inn i det aktive setet (Norberg et al. 2011). W220 som også har vist å være viktig for prosessivitet, men i mindre omfang enn W97, viser samme tendens bare i mindre grad.

Videre observeres det at  $k_{cat}$  faktisk blir redusert i forhold til villtype for residuer som er i produkt dissosiasjons sub seter med ~4 x og ~3 x for hhv. W275 og F396. I tillegg er økningen i  $K_M$  meget mindre for disse residuene (17 x og 2 x) enn for residuer som er i substratbindende sub seter. De observerte forskjeller tyder på at det er forskjellen i direksjonalitet til ChiA og ChiB som reflekteres.

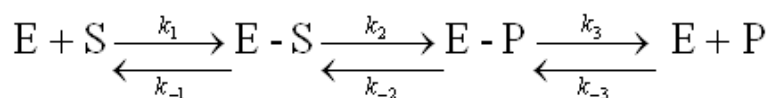
Mindre drastiske endringer for residuer i +2 (W220 og F396) ser ut til å være forbundet med avstanden fra den katalytiske syren og med det mindre påvirkning for substratbinding og produkt dissosiasjon.

Substrataffinitet til enzymet kan til en viss grad reflekteres i  $K_M$ . Dersom katalysen av den kjemiske reaksjonen ( $E-S \rightarrow E + P$ ) er det hastighetsbestemmende trinn til en enzymkatalysert reaksjon, vil  $K_M$  være lik dissosiasjonskonstanten til enzym-substratkomplekset ( $K_S$ ) (Fersht 1985). Den klassiske Michaelis-Menten reaksjon er vist i figur 51.



**Figur 51.** Klassisk Michaelis Menten reaksjon.

Videre vil  $k_{cat}$  være lik hastighetskonstanten av katalysen av den kjemiske reaksjonen. Det finnes å tilfeller hvor  $K_M$  er forskjellig fra  $K_S$ . Dersom hastigheten for dannelsen av Michaeliskomplekset ( $E + S \rightarrow E-S$ ) eller nedbrytningen av Michaeliskomplekset tilbake til fritt enzym og substrat ( $E-S \rightarrow E + S$ ) blir liten og hastigheten til katalysen av den kjemiske reaksjonen ( $E-S \rightarrow E + P$ ) er raskere enn nedbrytning til fritt enzym og substrat ( $E-S \rightarrow E + S$ ), vil  $K_M$  være større enn  $K_S$  (Fersht 1985). Det kan være mer hensiktsmessig å uttrykke en enzymreaksjon som vist i figur 52.

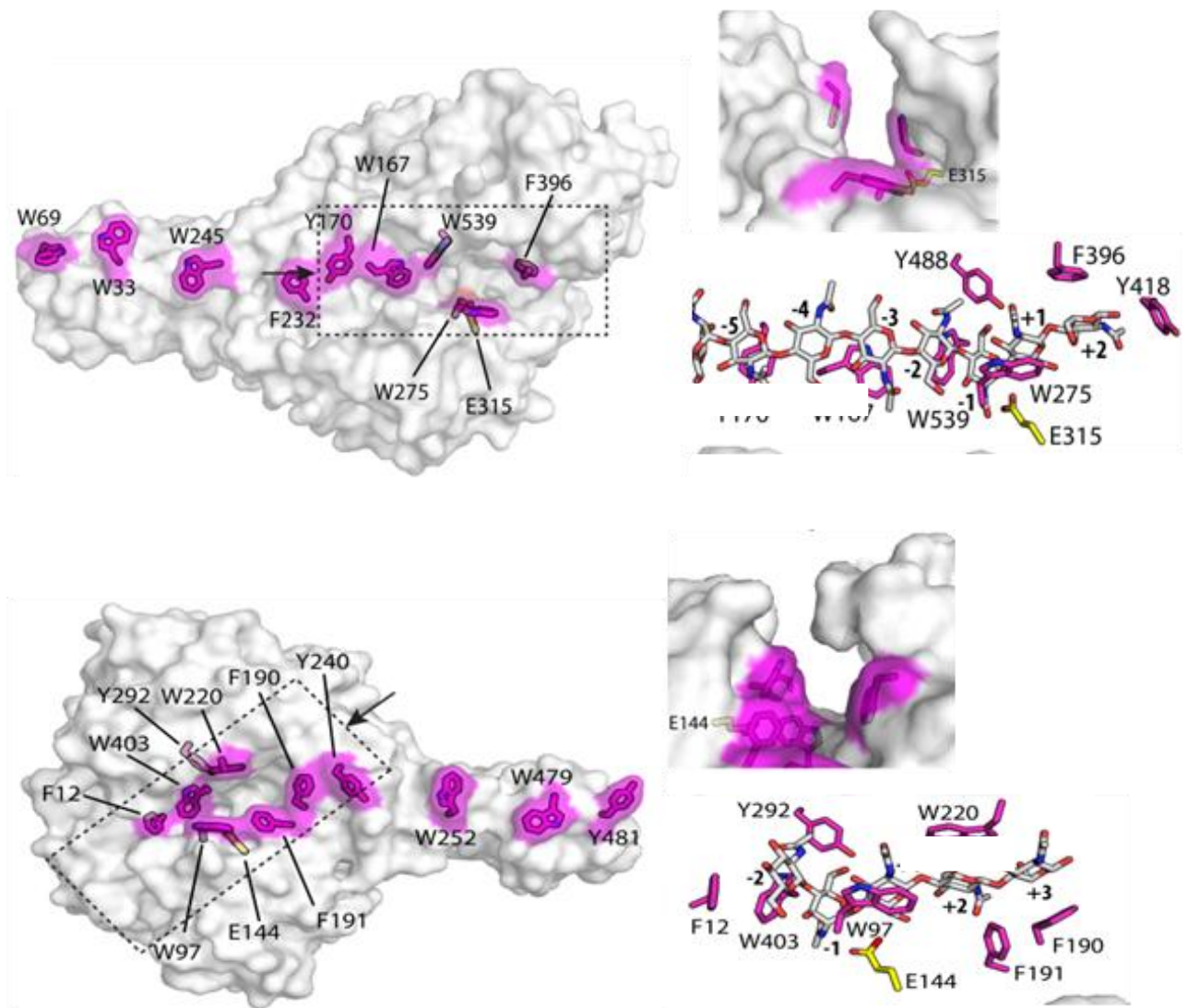


**Figur 52.** Utvidet Michaelis Menten reaksjon.

Videre vil  $K_M$  ofte være mindre enn  $K_S$  dersom produkt dissosiasjon ( $E-P \rightarrow E + P$ ) er hastighetsbestemmende trinn. I tillegg vil hastighetskonstanten for produkt dissosiasjon inngå i  $k_{cat}$  og kunne dominere denne dersom denne er mye lavere enn hastigheten til katalysen av den kjemiske reaksjonen. Temperaturavhengigheten til initiell katalytisk hastighetskonstant for ChiA nedbrytning av fast kitin viser en stor entropisk aktiveringsbarriere (Zakariassen et al. 2010). Dette er i overensstemmelse med at substratassosiasjon for enzymet er det hastighetsbestemmende trinn. Videre viste samme studie at når substratet er vannløselig så er produkt dissosiasjon hastighetsbestemmende trinn.

Siden W275 observerte  $k_{cat}$  er markant lavere enn for villtype, støtter dette opp under at produkt dissosiasjon er hastighetsbestemmende trinn for hydrolyse av  $(GlcNAc)_4$ . W275 er et sentralt residu når produktet kitobiose dissosierer fra det aktive setet. Ved at produkt dissosiasjon er hastighetsbestemmende trinn så vil observert  $K_M$  være lavere enn  $K_S$ .

Dette kan være årsaken til at verdien for ChiA W275A er så drastisk mye lavere enn for ChiB W97A. De utvalgte residuene til ChiA og ChiB er vist i figur 53.



**Figur 53.** Strukturene til ChiA og ChiB (Papanikolau et al. 2001; van Aalten et al. 2001). De utvalgte aromatiske residuene i ChiA og ChiB som antas å være involvert i direksjonalitet er W275/F396 og W97/W220. Bildet er hentet fra (Vaaje-Kolstad et al. 2013).

## 5.2 Kinetisk signatur på prosessivitet for et polart residu

De kinetiske signaturene til villtype samt polare residuer i ChiA vises i tabell 16. Tabellen viser parametrene  $k_{\text{cat}}$ ,  $K_M$  og  $k_{\text{cat}}/K_M$ , der verdiene for ChiA villtype er tatt fra et annet studie.

**Tabell 16.** De kinetiske signaturene til polare residuer og villtype.

Kitinaser	Mutant	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}/K_M$
ChiA	WT <sup>a</sup>	$33 \pm 1$	$9 \pm 1$	4
	R172A	$39 \pm 5$	$90 \pm 19$	0,4
	T276A	$12 \pm 0,5$	$7 \pm 1$	1,7

<sup>a</sup> Resultatene hentet fra (Krokeide et al. 2007).

Det polare residuet T276 i ChiA interagerer med sukkerpolymeren i både  $-2$  og  $-3$  subsetene og har vist seg å ha en rolle i prosessiv hydrolyse av kitin (Reppert 2013). Kinetikkdataene viser at  $K_M$  er lik som for villtype mens  $k_{\text{cat}}$  er  $\sim 3$  x lavere enn det som er observert for villtype. Det mest slående er at disse verdiene er meget forskjellig i forhold til de for W167A som også har en viktig rolle i prosessivitet (tabell 15). Årsaken til dette er ikke enkel å rasjonalisere, men dette tyder på at selv om begge residuer (T276 og W167A) er viktig for at enzymet forblir bundet til uløselig substrat under prosessiv hydrolyse, så har de ulike roller i det hastighetsbestemmende trinn under hydrolyse av et løselig substrat.

R172 som befinner seg i  $-3$  subsetet har vist å være viktig for å posisjonere substratet slik at *N*-acetylgruppene er riktig orientert før den substrat-assisterte hydrolysen som skjer i  $-1$  subsetet. Videre er det vist at dette residuet ikke bidrar til prosessivitet. Verdien til  $k_{\text{cat}}$  er tilnærmet lik den til villtypen mens  $K_M$  viser en økning på 10 x. Det er heller ikke enkelt å rasjonalisere disse verdiene i forhold til de som ble observert for T276, men viser igjen at selv om interaksjonene T276 og R172 har med substratet så er deres roller meget forskjellige.

### 5.3 Andre residuer

Kinetiske verdier for residuer som spiller en rolle i prosessivitet og direksjonalitet er vist i tabell 17. Tabellen viser parametrene  $k_{\text{cat}}$ ,  $K_M$  og  $k_{\text{cat}}/K_M$ , der verdiene for ChiA og ChiB villtype er tatt fra et annet studie.

**Tabell 17.** Kinetiske signaturer for residuer som spiller en rolle i enzymets prosessivitet og direksjonalitet.

Kitinase	Mutant	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}/K_M$
ChiA	WT <sup>a</sup>	$33 \pm 1$	$9 \pm 1$	4
	F396A	$13 \pm 2$	$21 \pm 8$	0,6
	F396W	$89 \pm 5$	$23 \pm 3$	4
ChiB	WT <sup>a</sup>	$28 \pm 2$	$4 \pm 2$	7
	R294A	$18 \pm 3$	$15 \pm 2$	1,2
	W97A/W220A	$125 \pm 23$	7850	0,02

<sup>a</sup> Resultatene hentet fra (Krokeide et al. 2007).

Ut i fra resultatene gav ChiA F396W en relativ lik  $K_M$  som ChiA F396A, noe som tyder på at for ChiA så er ikke  $K_M$  nødvendigvis lik  $K_S$ . For F396W vises en markant økning i  $k_{\text{cat}}$  som tyder på at en større aromatisk overflate er mer gunstig for produkt dissosiasjon (jfr. tidligere diskusjon).

ChiB W97A/W220A har samme  $k_{\text{cat}}$  som for ChiB W97A, men har en mye kraftigere økning i  $K_M$ . Det kan antydes at for ChiB så reflekterer  $K_M$  mer  $K_S$  enn hva tilfelle er for ChiA.

ChiB R294 er et residu som er relativt konservert i familie 18 kitinaser og har vist seg å være viktig for tuning av pH til den katalytiske syren (Synstad et al. 2004) og for grad av transglykosyleringsevne. Ved å mutere arginin til alanin økte transglykosyleringsevnen og verdiene for denne er relativt like som de for villtypen (Madhuprakash et al. 2012). Det har også blitt vist at bindingsstyrke i positive sub seter er en viktig parameter for økt transglykosyleringsevne (Zakariassen et al. 2011). Dersom  $K_M$  reflekter  $K_S$  så medfører dette at R294 er viktig for transglykosylering på en annen måte enn via substratbindingsstyrke.

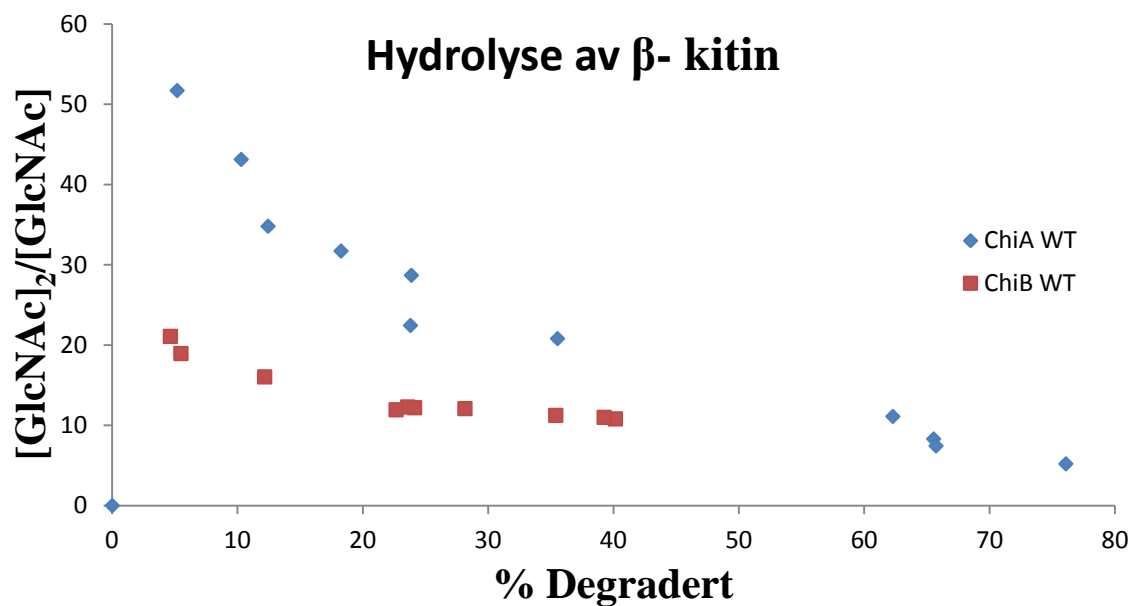
## 5.4 Forholdet mellom $[\text{GlcNAc}]_2/[\text{GlcNAc}]$ som et mål på grad av prosessivitet

Resultatene i nedbrytning av  $\beta$ -kitin viser forholdet mellom  $[\text{GlcNAc}]_2/[\text{GlcNAc}]$  og prosent degradert kitin. Studier av  $[\text{GlcNAc}]_2/[\text{GlcNAc}]$  gir et bilde på prosessiviteten og kan benyttes til å sammenlikne ulike enzymer mot hverandre.

Sammenlikning av  $[\text{GlcNAc}]_2/[\text{GlcNAc}]$  for ChiA WT og ChiB WT viser at grad av prosessivitet, spesielt for ChiA WT forandres over tid. Mest sannsynlig reflekterer dette ikke enzymet, men substratet. Tidligere forsøk og studier har vist at denne konklusjonen er mest sannsynlig (Igarashi et al. 2011; Kurasin & Valjamae 2011b). Studiene konkluderte med at enzymene ble sittende fast på substratet, slik at dette ble det hastighetsbestemmende trinnet. Jo oftere enzymet blir sittende fast på substratet og samtidig kommer seg løs, jo mindre sannsynlighet er det for at enzymet vises å være prosessivt. For ChiB WT vises en mye mindre tendens, men også her forekommer begrensningen.

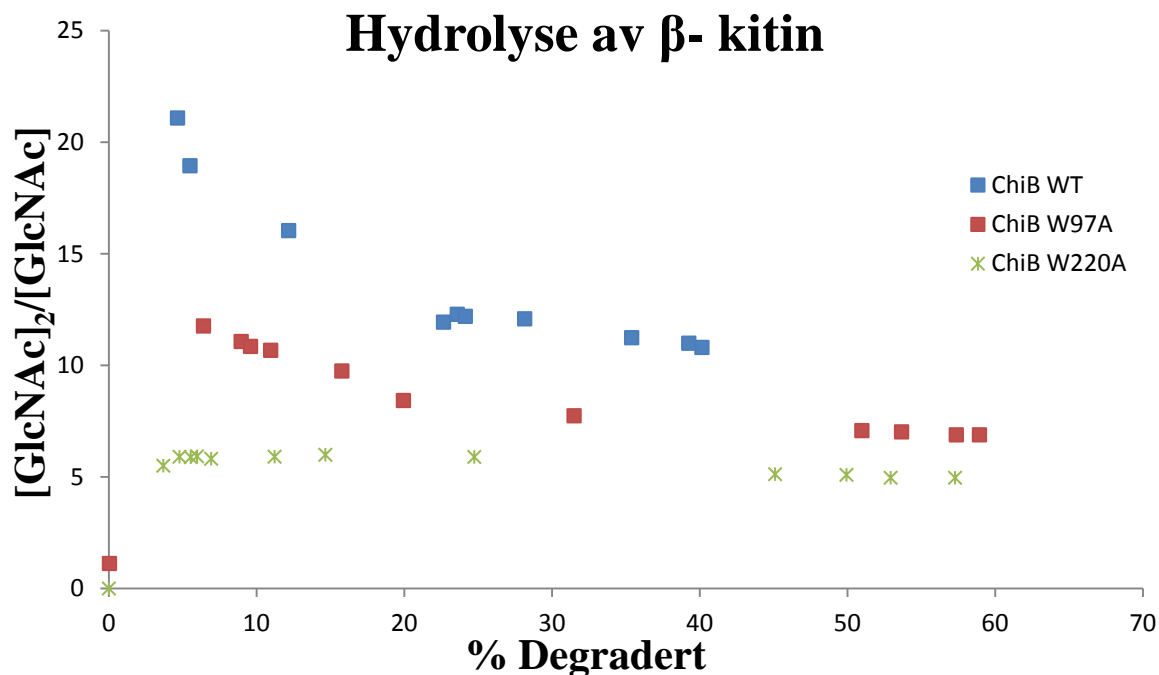
Studie av ChiA WT og ChiB WT viste at ChiB villtype var mer prosessivt enn ChiA villtype (Horn et al. 2006d). Konklusjonen ble diskutert frem ved å se på  $[\text{GlcNAc}]_2/[\text{GlcNAc}]$  forholdet mellom villtypene ved endepunktene i eksperimentene. Men observasjonene fra  $[\text{GlcNAc}]_2/[\text{GlcNAc}]$  forsøkene indikerer at ChiA villtype er mer prosessiv enn ChiB villtype ved de initielle forsøkspunktene. Ved måling på grad av prosessivitet for proteinene ville det være hensiktsmessig å se på de initielle punktene ved 10 % degradert kitin, og ikke ved endepunktene.  $[\text{GlcNAc}]$  konsentrasjonen under 10 % vil ha større sannsynlighet for å inneholde feil, fordi konsentrasjonene er ved deteksjonsgrensen i HPLC forsøkene. I figur 54 vises sammenlikningen av ChiA WT og ChiB WT.





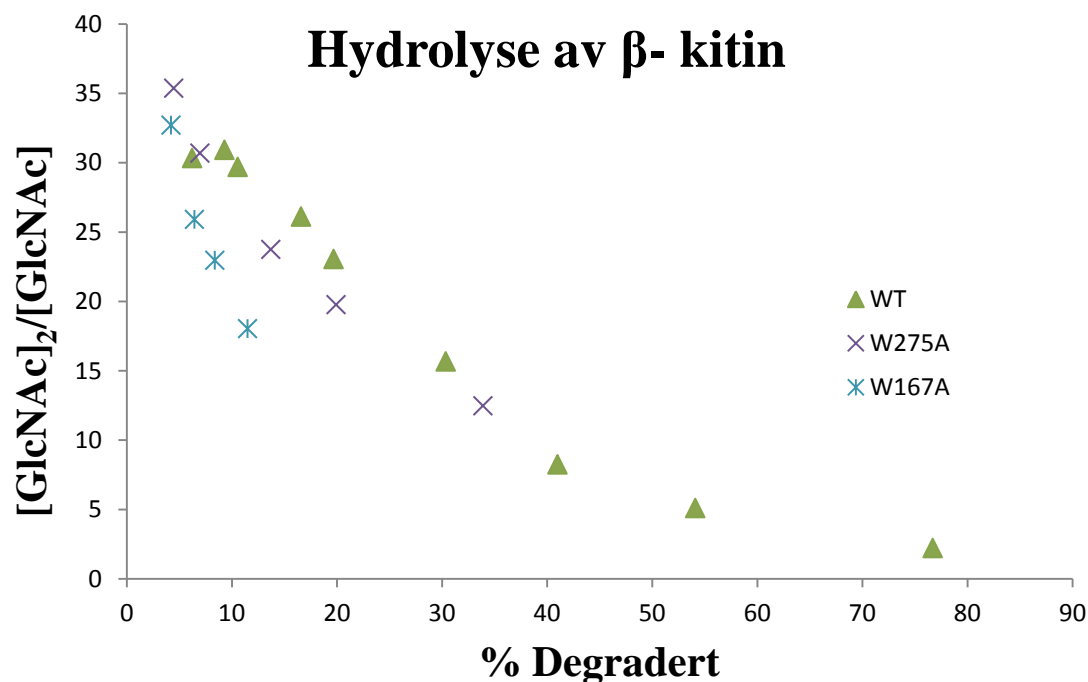
**Figur 54.** Et degraderingsplott av 3  $\mu\text{m}$   $\beta$ -kitin, der ChiA WT og ChiB WT ble sammenliknet.  $[\text{GlcNAc}]_2/[\text{GlcNAc}]$  forholdet er plottet mot prosent degradert kitin.

ChiB WT er et prosessivt eksoenzym og degraderer  $\beta$ -kitin til rundt 40-50 %. En teori som kan forklare hvorfor ChiB WT ikke greier å bryte ned mer enn dette, kan være at enzymet sitter fast på det krystallinske substratet. Sammenlikning av ChiB W97A og ChiB W220A med villtype viser at prosessiviteten til mutantene blir redusert. Dette er i overensstemmelse med resultatene og en samlet oversikt over ChiB villtype og dens mutanter er vist i figur 55. Som figuren viser så er dette en egnet metode for å se på forskjell i grad av prosessivitet. Videre er det interessant å observere at selv om ChiB W97A og ChiB W220A er mindre prosessiv enn villtypen, så er de allikevel mer effektive i nedbrytningen av kitin. Dette kan ha en sammenheng med at en stor bindingsflate (tryptofan) er borte i disse enzymene og med det setter seg mindre fast i kitinet under degradering.

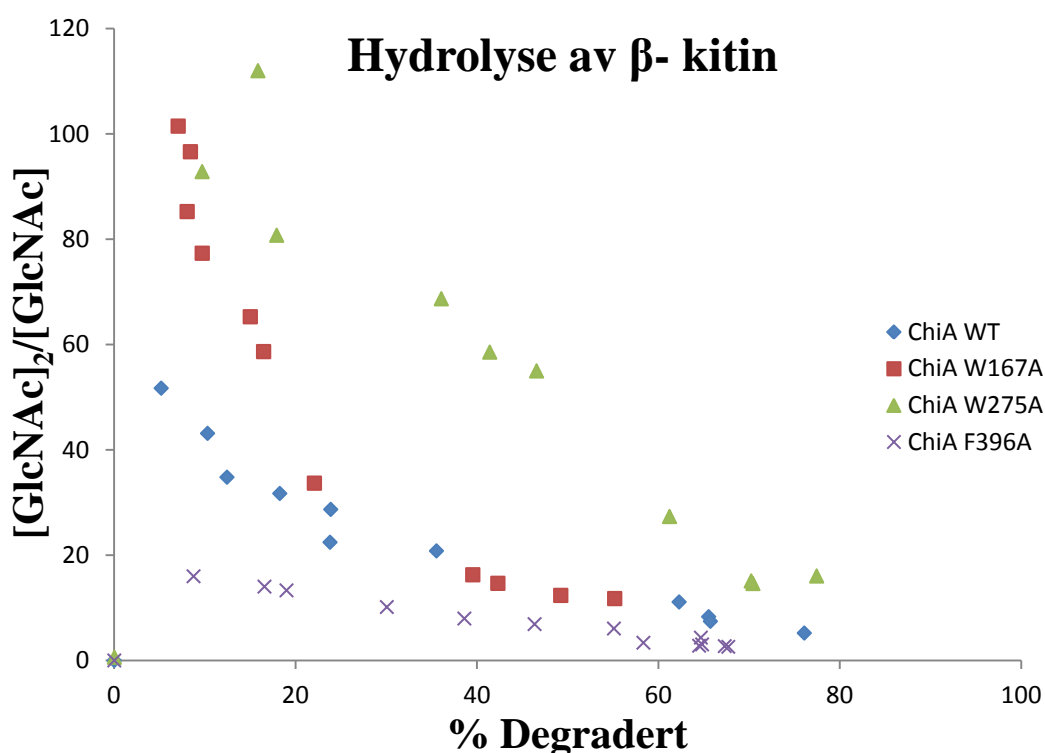


**Figur 55.** Samlet oversikt over hydrolyse av 3  $\mu\text{m}$   $\beta$ -kitin for ChiB villtype, ChiB W97, ChiB W220A.  $[\text{GlcNAc}]_2/[\text{GlcNAc}]$  forholdet er plottet mot prosent degradert kitin.

Ved sammenlikning av ChiA W167A og ChiA W275A mot villtype, ser det ut til at mutantene er like prosessive som villtypen (figur 57). Dette er ikke i overensstemmelse med andre målinger hvor kitosan har vært substrat. En forklaring kan være at substratet er lite krystallinsk (amorft) og dermed øker sannsynligheten for at endoaktivitet blir viktigere i den enzymatiske hydrolysen. Det har vist seg at ChiA villtype er endoaktiv og at ChiA W167A har en høyere endoaktivitet enn villtype (Norberg et al. 2011). En av fallgruve ved bruk av denne metoden kan dermed være at antall endokutt i forhold til prosessive kutt blir større, som kan gjøre at estimeringen blir feil. Når man tar samme enzym på mer krystallinsk substrat, så ser vi at trenden blir mer riktig i forhold til det vi intuitivt tror (Hamre 2013). Eksperimentelle forsøk på 180  $\mu\text{m}$   $\beta$ -kitin (figur 56) viser en mer forventet grad av prosessivitet i forhold til tidligere observerte resultater (Zakariassen et al. 2009).



**Figur 56.** Samlet oversikt over hydrolyse av 180  $\mu\text{m}$   $\beta$ -kitin for ChiA villtype, ChiA W167A, ChiA W275A.  $[\text{GlcNAc}]_2/[\text{GlcNAc}]$  forholdet er plottet mot prosent degradert kitin. Plottet er hentet fra ikke publiserte data (Hamre 2013).



**Figur 57.** Samlet oversikt over hydrolyse av 3  $\mu\text{m}$  for ChiA villtype, ChiA W167A, ChiA W275A og ChiA F396A.  $[\text{GlcNAc}]_2/[\text{GlcNAc}]$  forholdet er plottet mot prosent degradert kitin.

## 5.5 Veien videre

Kinetikkdata i denne oppgaven antyder at  $K_M$  ikke nødvendigvis representerer  $K_S$ . Det ville være interessant å sammenlikne de bestemte  $K_M$  verdier med estimer for  $K_S$  verdier. Best mulig estimat for disse er å måle bindingsstyrke ( $K_d$ ) til [GlcNAc]<sub>4</sub> til inaktive versjoner av de mutantene som har blitt studert i denne oppgaven. Slike inaktive versjoner får normalt ved å mutere den katalytiske syren (E315 i ChiA og E144 i ChiB) til et glutamin residu.

Bindingsstyrken kan således bestemmes ved hjelp av isotermisk titreringskalorimetri.

Siden nedbrytningsassayet for  $\beta$ -kitin viste seg å være en god metode for å måle grad av prosessivitet, vil denne fremgangsmåten kunne brukes for å se på andre enzymeres prosessivitet i degraderingen av krystallinske polymerer, slik som  $\beta$ -kitin.

## 6 Referanser

- Agilent Technologies. (2013). *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit*. Tilgjengelig fra: <http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/200521.pdf>.
- Agilent Technologies. (2013). *qPCR Tools and Links*. Tilgjengelig fra: <http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pagelid=2191>.
- Bank, H. S. D. (2013). *Ampicillin*, 30.07.2013.
- Beckham, G. T. S., J.; Knott, B.C.; Himmel, M.E.; Crowley, M.F.; Sandgren, M.; Sørli, M.; Payne, C.M. (2013). Towards a molecular-level theory of carbohydrate processivity in glycoside hydrolases. *Submitted Curr. Biotechnol.*
- Bio-Rad. (2013). *Quick Start Bradford Protein Assay*. Tilgjengelig fra: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4110065A.pdf> (lest 24.07.2013).
- Brurberg, M. B., Nes, I. F. & Eijsink, V. G. (1996). Comparative studies of chitinases A and B from *Serratia marcescens*. *Microbiology*, 142 ( Pt 7): 1581-9.
- Brurberg, M. B., Synstad, B., Klemsdal, S.S., van Aalten, D.M.F., Sundheim, L., Eijink, V. (2000). Chitinases from *Serratia marcescens*. *Recent Research Developments in Microbiology*.
- Carbohydrate Active Enzymes (CAZy). (2013). *Welcome to the Carbohydrate-Active enZymes Database*. Tilgjengelig fra: <http://www.cazy.org/>.
- CLC Bio. (2013). *CLC Main Workbench*. Tilgjengelig fra: <http://www.clcbio.com/products/clc-main-workbench/> (lest 17.12.2013).
- Davies, G. & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3 (9): 853-9.
- Davies, G. J., Wilson, K. S. & Henrissat, B. (1997). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem J*, 321 ( Pt 2): 557-9.
- Divne, C., Stahlberg, J., Reinikainen, T., Ruohonen, L., Pettersson, G., Knowles, J. K., Teeri, T. T. & Jones, T. A. (1994). The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Science*, 265 (5171): 524-8.
- Eijsink, V. G., Vaaje-Kolstad, G., Varum, K. M. & Horn, S. J. (2008). Towards new enzymes for biofuels: lessons from chitinase research. *Trends Biotechnol*, 26 (5): 228-35.
- Expression Technologies Inc. (2013). *Commonly used bacterial E.coli culture media in microbiology or molecular biology*. Tilgjengelig fra: <http://www.exptec.com/Reagents/Common%20Media.htm>.
- Fersht, A. (1985). *Enzyme structure and mechanism*. New York: Freeman. XXI, 475 s. : ill. s.
- Fukamizo, T. (2000). Chitinolytic enzymes: catalysis, substrate binding, and their application. *Curr Protein Pept Sci*, 1 (1): 105-24.
- Gilbert, H. J. (2012). Methods in Enzymology. Preface. *Methods Enzymol*, 510: xxi-xxii.
- Hamre, A. G. (2013). *Ikke publiserte data*. Upublisert manuskript.
- Hart, H. (2007). *Organic chemistry: a short course*. Boston: Houghton Mifflin. XXIV, 577 s. : ill. s.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, 280 ( Pt 2): 309-16.
- Hickey, G. I., Fletcher, H. L. & Winter, P. C. (2007). *Genetics*. New York: Taylor & Francis. VI, 379 s. : ill., fig. s.

- Horn, S. J., Sikorski, P., Cederkvist, J. B., Vaaje-Kolstad, G., Sorlie, M., Synstad, B., Vriend, G., Varum, K. M. & Eijsink, V. G. (2006a). Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (48): 18089-94.
- Horn, S. J., Sikorski, P., Cederkvist, J. B., Vaaje-Kolstad, G., Sorlie, M., Synstad, B., Vriend, G., Varum, K. M. & Eijsink, V. G. H. (2006b). Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (48): 18089-18094.
- Horn, S. J., Sorbotten, A., Synstad, B., Sikorski, P., Sorlie, M., Varum, K. M. & Eijsink, V. G. (2006c). Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. *FEBS J*, 273 (3): 491-503.
- Horn, S. J., Sorlie, M., Vaaje-Kolstad, G., Norberg, A. L., Synstad, B., Varum, K. M. & Eijsink, V. G. H. (2006d). Comparative studies of chitinases A, B and C from *Serratia marcescens*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 24 (1-2): 39-53.
- Igarashi, K., Uchihashi, T., Koivula, A., Wada, M., Kimura, S., Okamoto, T., Penttila, M., Ando, T. & Samejima, M. (2011). Traffic Jams Reduce Hydrolytic Efficiency of Cellulase on Cellulose Surface. *Science*, 333 (6047): 1279-1282.
- Jollès, P. & Muzzarelli, R. A. A. (1999). *Chitin and chitinases*. Basel: Birkhäuser. XI, 340 s. : ill. s.
- Kipper, K., Valjamae, P. & Johansson, G. (2005). Processive action of cellobiohydrolase Cel7A from *Trichoderma reesei* is revealed as 'burst' kinetics on fluorescent polymeric model substrates. *Biochem J*, 385 (Pt 2): 527-35.
- Klug, W. S. (2009). *Concepts of genetics*. San Francisco, Calif.: Pearson/Benjamin Cummings. XXX, 779, [86] s. : ill. s.
- Krokeide, I. M., Synstad, B., Gaseidnes, S., Horn, S. J., Eijsink, V. G. & Sorlie, M. (2007). Natural substrate assay for chitinases using high-performance liquid chromatography: a comparison with existing assays. *Anal Biochem*, 363 (1): 128-34.
- Kurasin, M. & Valjamae, P. (2011a). Processivity of cellobiohydrolases is limited by the substrate. *J Biol Chem*, 286 (1): 169-77.
- Kurasin, M. & Valjamae, P. (2011b). Processivity of Cellobiohydrolases Is Limited by the Substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 286 (1): 169-177.
- Laura Brinas, M. Z., Yolanda Saenz, Fernanda Ruiz-Larrea and Carmen Torres. (2002). Beta-Lactamases in Ampicillin-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Foods, Humans and Healthy Animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
- Lesk, A. M. (2010). *Introduction to protein science: architecture, function, and genomics*. Oxford: Oxford University Press. XIX, 455 s. : ill. s.
- Life Technologies. (2013a). *BenchMark Protein Ladder*. Tilgjengelig fra: <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/10747012>.
- Life Technologies. (2013b). *BL21*. Tilgjengelig fra: <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/C602003>.
- Life Technologies. (2013c). *Invitrogen Custom DNA Oligos*. Tilgjengelig fra: <http://www.lifetechnologies.com/no/en/home/products-and-services/product-types/primers-oligos-nucleotides/invitrogen-custom-dna-oligos.html>.
- Life Technologies. (2013d). *One Shot TOP10 Chemically Competent E.coli*. Tilgjengelig fra: <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/C404006>.

- Life technologies. (2013e). *Qubit 2.0 Fluorometer*. Tilgjengelig fra: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Product-Brand/Qubit/qubit-fluorometer.html>.
- Lorentzen, S. (2013). Effekt utvalgte polare residuer som er posisjonert i det aktive setet i ChiB har på prosessivitet, aktivitet, effektivitet og substratposisjonering.
- Madhuprakash, J., Tanneeru, K., Purushotham, P., Guruprasad, L. & Podile, A. R. (2012). Transglycosylation by chitinase D from *Serratia proteamaculans* improved through altered substrate interactions. *J Biol Chem*, 287 (53): 44619-27.
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E., Appling, D. R. & Anthony-Cahill, S. J. (2013). *Biochemistry*. Toronto, Ont.: Pearson. XXVI, 1342 s. : ill. s.
- Miller, J. M. (2005). *Chromatography: concepts and contrasts*. Hoboken, N.J.: Wiley. XXVI, 490 s. : ill. s.
- Millipore, M. (2013a). *Amicon Ultra- 15 Centrifugal Filter Units*. Tilgjengelig fra: <http://www.millipore.com/catalogue/module/c7715#0>.
- Millipore, M. (2013b). *Pellet Paint® Co-Precipitant* Tilgjengelig fra: [http://www.emdmillipore.com/life-science-research/pellet-paint-co-precipitant/EMD\\_BIO-69049/p\\_AJKb.s1O9eQAAAEjHRx9.zLX](http://www.emdmillipore.com/life-science-research/pellet-paint-co-precipitant/EMD_BIO-69049/p_AJKb.s1O9eQAAAEjHRx9.zLX).
- NCBI. (2013). *Escherichia coli*. Tilgjengelig fra: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/167>.
- New England Biolabs Inc. (2013). *Dpn I*. Tilgjengelig fra: <https://www.neb.com/products/r0176-dpni>.
- Norberg, A. L., Dybvik, A. I., Zakariassen, H., Mormann, M., Peter-Katalinic, J., Eijsink, V. G. & Sorlie, M. (2011). Substrate positioning in chitinase A, a processive chito-biohydrolase from *Serratia marcescens*. *FEBS Lett*, 585 (14): 2339-44.
- Omega-biotek. (2013). *E.Z.N.A Plasmid Mini Kit I and Mini Kit II*. Tilgjengelig fra: <http://www.omegabiotek.com/files/resource/Handbook/53126500.pdf>.
- Papanikolau, Y., Prag, G., Tavlas, G., Vorgias, C. E., Oppenheim, A. B. & Petratos, K. (2001). High resolution structural analyses of mutant chitinase A complexes with substrates provide new insight into the mechanism of catalysis. *Biochemistry*, 40 (38): 11338-43.
- Papezova, K., Nemeč, T., Chaloupkova, R. & Glatz, Z. (2007). Study of substrate inhibition by electrophoretically mediated microanalysis in partially filled capillary. *J Chromatogr A*, 1150 (1-2): 327-31.
- Payne, C. M., Baban, J., Horn, S. J., Backe, P. H., Arvai, A. S., Dalhus, B., Bjoras, M., Eijsink, V. G., Sorlie, M., Beckham, G. T., et al. (2012). Hallmarks of processivity in glycoside hydrolases from crystallographic and computational studies of the *Serratia marcescens* chitinases. *J Biol Chem*, 287 (43): 36322-30.
- Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A. B., Chet, I., Wilson, K. S. & Vorgias, C. E. (1994). Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. *Structure*, 2 (12): 1169-80.
- Quioco, F. A., Wilson, D. K. & Vyas, N. K. (1989). Substrate specificity and affinity of a protein modulated by bound water molecules. *Nature*, 340 (6232): 404-7.
- Reece, J. B. (2012). *Campbell biology: concepts & connections*. San Francisco, CA: Pearson/Benjamin Cummings. XXXVII, 779 s. : ill. s.
- Reppert, N. (2013). Studie av polare aminosyrer i det katalytiske setet til ChiA.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31 (7): 603-632.
- Rouvinen, J., Bergfors, T., Teeri, T., Knowles, J. K. & Jones, T. A. (1990). Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science*, 249 (4967): 380-6.

- Russell, P. J. (2006). *iGenetics: a molecular approach*. San Francisco: Pearson. XXI, 842 s. : ill. + CD-ROM s.
- Rye, C. S. & Withers, S. G. (2000). Glycosidase mechanisms. *Curr Opin Chem Biol*, 4 (5): 573-80.
- Silberberg, M. (2009). *Chemistry: the molecular nature of matter and change*. Boston: McGraw-Hill. XXVII, 1108, [95] s. : ill. s.
- Sorlie, M., Zakariassen, H., Norberg, A. L. & Eijsink, V. G. H. (2012). Processivity and substrate-binding in family 18 chitinases. *Biocatalysis and Biotransformation*, 30 (3): 353-365.
- Stahlberg, J., Divne, C., Koivula, A., Piens, K., Claeysens, M., Teeri, T. T. & Jones, T. A. (1996). Activity studies and crystal structures of catalytically deficient mutants of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *J Mol Biol*, 264 (2): 337-49.
- Suzuki, K., Sugawara, N., Suzuki, M., Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N. & Watanabe, T. (2002). Chitinases A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: enzymatic properties and synergism on chitin degradation. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66 (5): 1075-83.
- Synowiecki, J. & Al-Khateeb, N. A. (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 43 (2): 145-71.
- Synstad, B., Gaseidnes, S., Van Aalten, D. M., Vriend, G., Nielsen, J. E. & Eijsink, V. G. (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): 253-62.
- Tews, I., Terwisscha van Scheltinga, A. C., Perrakis, A., Wilson, K. S., Dijkstra, B. W.,. (1997). Substrate-assisted catalysis unifies two families of chitinolytic enzymes. *J. Am. Chem. Soc*, 119 (34): 7954-7959.
- Thermo Scientific. (2008). *NanoDrop 1000 Spectrophotometer v3.7 User's Manual*. Tilgjengelig fra: <http://www.nanodrop.com/library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf>.
- Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N., Nonaka, T., Sugiyama, J. & Watanabe, T. (2001). Roles of the exposed aromatic residues in crystalline chitin hydrolysis by chitinase A from *Serratia marcescens* 2170. *J Biol Chem*, 276 (44): 41343-9.
- Umezawa, Y. & Nishio, M. (1998). CH/pi interactions as demonstrated in the crystal structure of guanine-nucleotide binding proteins, Src homology-2 domains and human growth hormone in complex with their specific ligands. *Bioorg Med Chem*, 6 (4): 493-504.
- Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Horn, S. J., Liu, Z., Zhai, H., Sorlie, M. & Eijsink, V. G. (2010). An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science*, 330 (6001): 219-22.
- Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., Sorlie, M. & Eijsink, V. G. (2013). The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens*--a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *FEBS J*, 280 (13): 3028-49.
- van Aalten, D. M., Synstad, B., Brurberg, M. B., Hough, E., Riise, B. W., Eijsink, V. G. & Wierenga, R. K. (2000). Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1.9-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (11): 5842-7.
- van Aalten, D. M. F., Komander, D., Synstad, B., Gaseidnes, S., Peter, M. G. & Eijsink, V. G. H. (2001). Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (16): 8979-8984.



- Velleste, R., Teugjas, H. & Valjamae, P. (2010). Reducing end-specific fluorescence labeled celluloses for cellulase mode of action. *Cellulose*, 17 (1): 125-138.
- Wan, A. C. & Tai, B. C. (2013). CHITIN - A promising biomaterial for tissue engineering and stem cell technologies. *Biotechnol Adv.*
- Watanabe, T., Ariga, Y., Sato, U., Toratani, T., Hashimoto, M., Nikaidou, N., Kezuka, Y., Nonaka, T. & Sugiyama, J. (2003). Aromatic residues within the substrate-binding cleft of *Bacillus circulans* chitinase A1 are essential for hydrolysis of crystalline chitin. *Biochemical Journal*, 376: 237-244.
- Withers, S. G. (2001). Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydrate Polymers*, 44 (4): 325-337.
- Zakariassen, H., Aam, B. B., Horn, S. J., Varum, K. M., Sorlie, M. & Eijsink, V. G. (2009). Aromatic residues in the catalytic center of chitinase A from *Serratia marcescens* affect processivity, enzyme activity, and biomass converting efficiency. *J Biol Chem*, 284 (16): 10610-7.
- Zakariassen, H., Klemetsen, L., Sakuda, S., Vaaje-Kolstad, G., Varum, K. M., Sorlie, M. & Eijsink, V. G. H. (2010). Effect of enzyme processivity on the efficacy of a competitive chitinase inhibitor. *Carbohydrate Polymers*, 82 (3): 779-785.
- Zakariassen, H., Hansen, M. C., Joranli, M., Eijsink, V. G. & Sorlie, M. (2011). Mutational effects on transglycosylating activity of family 18 chitinases and construction of a hypertransglycosylating mutant. *Biochemistry*, 50 (25): 5693-703.
- Zees, A. C., Pырpassopoulos, S. & Vorgias, C. E. (2009). Insights into the role of the (alpha plus beta) insertion in the TIM-barrel catalytic domain, regarding the stability and the enzymatic activity of Chitinase A from *Serratia marcescens*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1794 (1): 23-31.

## 7 Vedlegg

### 7.1 Utregning av prosent teoretisk nedbrytning av $\beta$ -kitin

#### Mengde $\beta$ -kitin:

2 mg 3 $\mu$ m  $\beta$ -kitin

#### Molekylvekt [GlcNAc]<sub>2</sub>:

C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub> = 424,40 g/mol

#### 100 % nedbrutt i antall mol:

$$\begin{aligned} \text{Stoffmengde (mol)} &= \frac{\text{Masse (g)}}{\text{Molekylvekt (M}_M)} = \frac{0,002\text{g}}{424,40 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} \\ &= 4,7 \times 10^{-6} \text{ mol} \end{aligned}$$

$$\text{Konsentrasjon (C)} = \frac{\text{mol}}{\text{Volum}} = \frac{4,7 \times 10^{-6}}{0,001 \text{ L}} = 0,0047 \text{ M} = 4712,5 \mu\text{M}$$

$$100 \% \text{ teoretisk nedbrutt} = 4712,5 \mu\text{M}$$

## 7.2 Resultater fra nedbrytningsassay ved hjelp av HPLC

**Tabell 18.** ChiB W97As rådata fra hydrolyse av  $\beta$ -kitin, viser parameterene som ble brukt til å lage nedbrytningsplottet til  $\beta$ -kitin ( $[A2]/[A1]$  plottet mot prosent nedbrutt  $\beta$ -kitin).

Mutant ChiB	Tid	A2	A1	[A2]	[A1]	[A2]/[A1]	[A2]+[A1]	% nedbrutt
W97A	0 min	0,0489	0,0239	1	0,8917	1,121339	1,891791	0,0401
	4 min	13,6049	0,6338	278,218	23,649	11,76438	301,8681	6,4056
	10 min	18,391	0,9373	387,137	34,973	11,06932	422,1109	8,9572
	15 min	20,2352	1,0222	413,807	38,141	10,8492	451,9496	9,5904
	20 min	23,0807	1,185	471,998	44,216	10,67472	516,2144	10,954
	60 min	32,9613	1,8534	674,055	69,156	9,746779	743,2119	15,771
	90 min	41,0763	2,6721	840,006	99,705	8,424896	939,7114	19,940
	5t	64,2715	4,551	1314,34	169,81	7,739939	1484,159	31,494
	24t	102,9243	7,9723	2104,79	297,47	7,07555	2402,265	50,976
	32t	108,2463	8,4521	2213,62	315,37	7,018986	2529,003	53,665
	48t	115,434	9,1895	2360,61	342,89	6,884427	2703,505	57,368
	53t	118,592	9,4386	2425,19	352,18	6,886118	2777,385	58,936



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
67 23 00 00  
[www.nmbu.no](http://www.nmbu.no)