





## **Forord**

Denne masteroppgaven er utført ved Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap ved Universitetet for miljø- og biovitenskap. Oppgaven ble utført under bioorganisk forskningsgruppe ledet av Professor Morten Sørli.

Jeg må først og fremst takke min fantastiske veileder Morten Sørli, for god oppfølging, faglig innspill, tålmodighet, motivasjon og for at du har hatt troen på meg. Du har gjort det mulig for meg å fullføre denne oppgaven.

Takk til alle mine gode venner og familie som har støttet meg underveis. Setter utrolig stor pris på dere alle.

Mamma og Pappa takk for at dere alltid har troa på meg. Uten dere hadde jeg ikke vært der jeg er i dag.

En spesiell takk til barna mine Tine Emilie, Synne Elisabeth, Linus Leonard og Ludvig Herberth, dere betyr alt. Marcus takk for at du er den du er. Sammen med deg blir alt lett.

Ås, juni 2014

---

Silje Thoresen Lundmark

---

# Innholdsfortegnelse

Forord .....	i
Sammendrag .....	iv
Abstract.....	v
Forkortelser .....	vi
<b>1. Introduksjon .....</b>	<b>1</b>
1.1 Polysakkarider .....	1
1.1.1 Kitin.....	2
1.1.2 Cellulose .....	4
1.2 Glykosylhydrolaser .....	5
1.2.1Klassifisering .....	5
1.2.2 Struktur.....	5
1.2.3 Mekanisme .....	7
1.2.3.1 Inverterende mekanisme .....	7
1.2.3.2 Bevarende mekanisme .....	8
1.3 Kitinaser.....	9
1.3.2 Substrat assistert mekanisme for familie 18 kitinaser.....	10
1.3.3 Humane kitinaser .....	11
1.3.3.1 Human Chitotriosidase (HCHT).....	11
1.3.3.2 Acidic mammalian chitinase (AMCase).....	12
1.4 Inhibering av Humane kitinaser .....	13
1.4.1 Inhibering av kitinaser med allosamidin .....	13
1.5 CBP 21.....	14
1.5.1 Strukturen til CBP21 .....	14
1.5.2 Mekanisme .....	15
1.6 Termodynamikk og kinetikk ved protein – ligandinteraksjoner.....	16
1.6.1 Assosiasjonskonstanten $K_A$ .....	16
1.6.2 Gibbs energi.....	17
1.6.3 Bindingentalpi (H).....	17
1.6.4 Bindingsentropi (S) .....	18
1.6.5 Varmekapasitet ( $\Delta C_p$ ).....	18
1.7 Isotermisk titreriskkalorimetri (ITC) .....	19
1.8 Mål med oppgaven.....	22
<b>2. Materialer.....</b>	<b>23</b>

---

2.1 Laboratorieutstyr.....	23
2.2 Kjemikalier.....	24
2.3 Proteiner og enzymer.....	25
2.4 Kit/System.....	25
<b>3. Metoder .....</b>	<b>26</b>
3.1 Tillaging av human chitotriosidase (39kDa) .....	26
3.1.1 Vekst og rensing av HCHT.....	26
3.2 Oppkonsentrering og bufferbytte på ferdig rensset HCHT.....	26
3.3 Proteinkonsentrasjonsbestemmelse, fluorometrisk metode .....	27
3.4 Overekspressjon av CBP 21 i <i>E.coli</i> .....	28
3.4.1 Vekst av celler.....	28
3.4.2 Tillaging av periplasmatisk ekstrakt .....	29
3.4.3 Rensing av CBP 21 på kitinkolonnes. ....	30
3.5 Måling av proteinkonsentrasjon .....	32
3.5.1 Kalibrering av Biophoto med Bradford Microassey .....	32
3.5.2 Måling av proteinkonsentrasjonen .....	33
3.6 Sodium Dodecyl Sulfate-Polyakrylamid Gel Elektroforese (SDS-PAGE).....	34
3.7 Isotermisk titreringskalorimetri (ITC) .....	36
3.7.1 Binding av allosamidin til HCHT.....	36
3.7.2 Binding av metaller til CBP21 .....	37
<b>4. Resultater .....</b>	<b>38</b>
4.1.1 Binding av allosamidin til HCHT.....	38
4.1.2 Effekt av bufferionisering .....	40
4.1.3 Parameterisering av entropidelen.....	42
4.2 Rensing av CBP 21 .....	43
4.2.1 Rensing av CBP 21 på kitinkolonnes .....	43
4.2.2 SDS-PAGE.....	44
4.2.3 Bestemmelse av proteinkonsentrasjon. Fluorometrisk metode.....	45
4.3 Binding av metaller til CBP21 .....	46
<b>5. Diskusjon .....</b>	<b>48</b>
<b>6. Videre arbeid .....</b>	<b>53</b>
<b>7. Referanser: .....</b>	<b>54</b>

---

---

## Sammendrag

Human chitotriosidase (HCHT) er en av to familie 18 kitinaser, som er produsert av mennesker. Den andre er AMCase. Enzymet er antatt å være en del av det humane immunforsvaret mot sopp og parasitter. Nylig har det blitt vist at nivåene av HCHT bioaktivitet, og proteiner er signifikant økt i sirkulasjon og lunger hos pasienter som lider av systemisk sklerose, og av denne grunn forslått som et terapeutisk mål. Det er foretatt en detaljert termodynamisk undersøkelse ved hjelp isotherm titreringskalorimetri med binding av den velkjente familie18 inhibitoren allosamidin til HCHT. Bindingen er vist å være sterkt med en  $K_d = 0.20 \pm 0.03 \text{ uM}$  og  $\Delta G_r^\circ = -38,9 \pm 0,4 \text{ kJ/mol}$ , og drevet av gunstige endringer i entalpi ( $\Delta H_r^\circ = -50,2 \pm 1,2 \text{ kJ / mol}$ ) og solvatiseringsentropi ( $-T\Delta S_{\text{solv}}^\circ = -41,8 \pm 4,4 \text{ kJ / mol}$ ). Det vises i tillegg en stor straff i konformasjons entropiendring ( $-T\Delta S_{\text{konf}}^\circ = 43,1 \pm 4,2 \text{ kJ/mol}$ ).

---

## Abstract

Human chitotriosidase (HCHT) is one of two active family 18 chitinases produced by humans, the other being acidic mammalian chitinase (AMCase). The enzyme is thought to be part of the innate human defense mechanism against fungal parasites. Recently, it has been shown that levels of HCHT bioactivity and protein are significantly increased in the circulation and lungs of systemic sclerosis patients and for this reason is a suggested therapeutic target. For this reason, we have undertaken a detailed thermodynamic investigation using isothermal titration calorimetry of the binding interaction of HCHT with the well-known family 18 chitinase inhibitor allosamidin. The binding is shown to be strong ( $K_d = 0.20 \pm 0.03 \mu\text{M}$  and  $\Delta G_r^\circ = -38.9 \pm 0.4 \text{ kJ/mol}$ ) and driven by favorable changes in enthalpy ( $\Delta H_r^\circ = -50.2 \pm 1.2 \text{ kJ/mol}$ ) and solvation entropy ( $-T\Delta S_{\text{solv}}^\circ = -41.8 \pm 4.4 \text{ kJ/mol}$ ). It is accompanied with a large penalty in conformational entropy change ( $-T\Delta S_{\text{conf}}^\circ = 43.1 \pm 4.2 \text{ kJ/mol}$ ).

## Forkortelser

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gamma
AMCase	Acidic mammalian chitinase
ChBD	Kitinbindende domene
ChiA	Kitinase A fra <i>Serratia marcescens</i>
ChiB	Kitinase B fra <i>Serratia marcescens</i>
ChiC	Kitinase C fra <i>Serratia marcescens</i>
CBP21	Kitinbindende protein fra <i>Serratia marcescens</i>
$\Delta$	Delta
Da	Dalton
dH <sub>2</sub> O	Sterilt vann av Milli-Q kvalitet
EDTA	Etylendiamintetraacetatsyre
GlcN	D-glukosamin
GlcNAc	N-acetyl-D-glukosamin
ITC	Isotermisk titeringskalorimetri
HCHT	Human chitotriosidase
KA	Assosiasjonskonstanten
ka	Assosiasjonsraten
KD	Dissosiasjonskonstanten
kd	Dissosiasjonsraten
R	Den generelle gasskonstanten, 8,3145 J/(Kmol)
Rpm	Antall omdreininger per minutt
RU Resonance Unit	
SDS-PAGE	Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
Å	ångstrøm
$\Delta C_p$	Endring i varmekapasitet
$\Delta G$	Endring i Gibbs fri energi
$\Delta H$	Endring i entalpi
$\Delta S$	Endring i entropi



# 1. Introduksjon

---

## 1. Introduksjon

### 1.1 Polysakkarider

Polysakkarider er store polymerer bestående av mange monosakkarider bundet sammen via en glykosidbinding mellom det anomere karbonatomet i det ene monosakkaridet, og hydroksylgruppen i det neste monosakkaridet. Utgangsposisjonen til hydroksylgruppen på det anomere karbonet avgjør om glykosidbindingen er  $\alpha$  eller  $\beta$ -bundet. Dersom monosakkaridene er like, er det et homopolysakkarid, mens ulike monosakkarider bundet sammen kalles heteropolysakkarid.

Polysakkarider varierer i kjedelengde, molekylvekt og forgreninger, og opprettholder dermed en rekke viktige funksjoner i levende organismer (Mathews *et al.* 2000). De er ofte struktur og lagringskomponenter.

Cellulose og kitin er eksempler på to viktige strukturelle polysakkarider. Cellulose stiver opp celleveggen hos planter og er dermed den vanligste biopolymeren i verden. Kitin blir benyttet som et strukturelt polysakkarid i eksoskjelettet til krepsdyr, insekter og sopp, samt grønne alger og gjær. Kitin og cellulose er beskrevet i henholdsvis avsnitt 1.1.1 og 1.1.2

Stivelse fungerer som et energilager for planter og er forskjellige fra cellulose kun ved stereokjemien til glykosidbindingen. Den er også hovedkomponenten i poteter, ris, og mais. Stivelse består av amylose, med  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4)-bindinger, og amylopektin som i tillegg til  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4)-bindingene også har  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6)-bindinger, hvor de sistnevnte bindingene skaper forgreninger i molekylet. Glykogen er energilageret hos dyr og likner på amylopektin i struktur, men har flere forgreninger (Mathews *et al.*, 2000).

Nedbrytning av stivelse og glykogen til glukose er viktige prosesser for å skaffe energi i form av ATP til cellene. Denne energien brukes i utallige viktige biokjemiske reaksjoner *in vivo*. Både stivelse og glykogen er polymerer av glukoseenheter.

# 1. Introduksjon

---

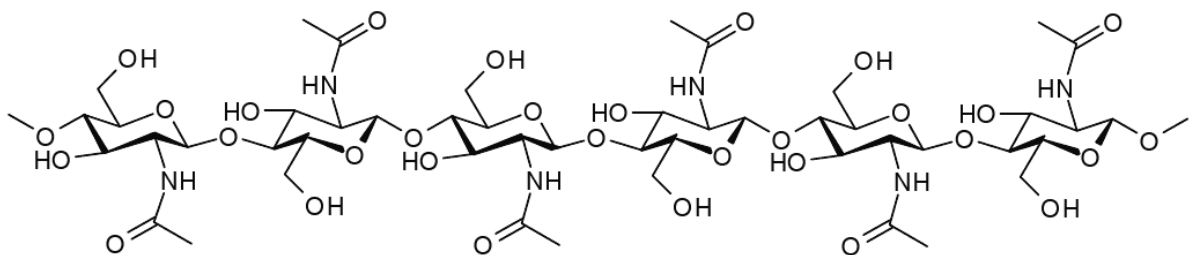
## 1.1.1 Kitin

Foruten cellulose, er kitin den biopolymeren det finnes mest av i naturen. Den skiller hovedsakelig ut som støttevev i insekter, sopp, skalldyr, og andre marine organismer. Kitin og dens derivater er av stor interesse i både kjemisk og bioteknologisk industri, og den kommersielle verdien er økende (Synowiecki & Al-Khateeb 2003). Årlig produksjon estimeres til 1 milliard tonn, men kitin akkumuleres ikke i naturen (forlesningsnotater av Eijsink, 2012). Dette fordi kitindegradering kan utføres av sopp og bakterier som utnytter kitin som sin karbon- og nitrogenkilde. Videre antas det at kitindegradering i dyr og planter, å være et forsvar mot patogener.

Polysakkaridet er en uløselig, lineær homopolymer av  $\beta$ -1,4 linket *N*-acetylglukosamin (GlcNAc). (figur 1.1)

Monomerene er bundet sammen slik at de enkelte *N*-acetyl-glukosamin (GlcNAc)-enhetene er rotert  $180^\circ$  i forhold til hverandre, dette gjør at annenhver acetoamidgruppe peker motsatt vei (Horn et. alt, 2006). På denne måten vil den strukturelle og funksjonelle enheten i disse polymerene være et disakkarid (Horn *et al.* 2006a).

Lengden av kitin fragmentene varierer etter hvilken organisme som har syntetisert det, fra 100 *N*-acetyl-D-glucosamin enheter i en del gjær opp til 5000-8000 enheter i krabbe (Synowiecki & Al-Khateeb 2003).



**Figur 1.1** Kitin: uløselig homopolymer av  $\beta$ -(1,4)-*N*-acetyl-D-glucosamin (GlcNAc). (Kumar 2000)

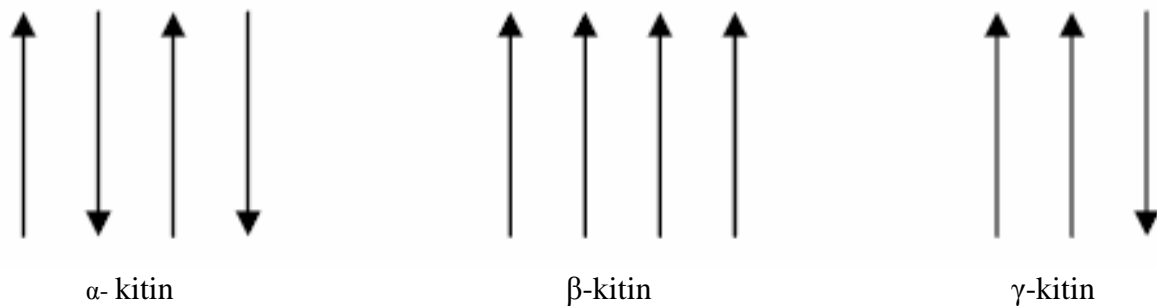
# 1. Introduksjon

---

Tre ulike typer kitin er beskrevet som henholdsvis  $\alpha$ ,  $\beta$  og  $\gamma$  kitin. (figur 1.2) I  $\alpha$ -kitin ligger N-acetylglukosamin kjedene antiparallelt som fører til at det dannes sterke intramolekylære hydrogenbindinger mellom kjedene. De intramolekylære hydrogenbindingene i kitinkjedene som fører til at polymeren er uløselig i vann (Horn *et al.* 2006a).

I  $\beta$ -kitin ligger kjedene parallelt, mens  $\gamma$  kitin består av to parallelle og en antiparallell kjede. Eksistensen til  $\gamma$  kitin, synes i dag å være kontroversiell. (Synowiecki & Al-Khateeb 2003).

Den parallelle organiseringen av kjedene i  $\beta$ -kitin, gjør at de intramolekylære kreftene blir svakere, som gjør at kitinet er mer tilgjengelig for enzymatisk degradering enn for  $\alpha$ -kitinet.



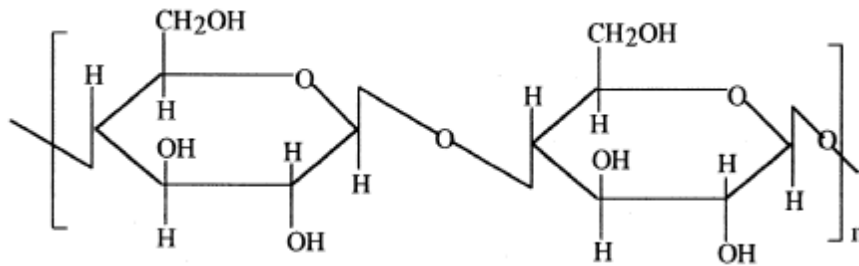
**Figur 1.2** Former av kitin. Til venstre,  $\alpha$ -kitin med antiparallele kjeder, i midten  $\beta$ -kitin med parallelle kjeder og til høyre,  $\gamma$ -kitin med to parallelle og en antiparallell kjede.

# 1. Introduksjon

---

## 1.1.2 Cellulose

Cellulose er den viktigste polysakkarid-komponenten i plante celleveggene og den mest utbredte biopolymeren i universet. Den årlige produksjonen er estimert til rundt  $10^{11-12}$  tonn. Polymeren er bygget opp av repeterende enheter av  $\beta$ -D-glukose residuer linket sammen i  $\beta$  (1-4) glykosidbindinger (figur 1.3) (Eijsink *et al.* 2008).



**Figur 1.3:**  $\beta$ -D-glukose residuer linket sammen i  $\beta$ (1-4) glykosidbindinger, cellulose (Kumar, 2000)

Cellulose eksisterer i to ulike krystallinske former. I cellulose I er polysakkarid kjedene pakket parallelt, lik  $\alpha$  kitin, og har alle reduserende ender pekende i samme retning. Cellulose II har kjeder som er pakket antiparallele, lik  $\beta$ - kitin, det vil si at i begge ender av polymeren vil det finnes reduserende ender. (Eijsink *et al.* 2008)

I naturen produseres det store mengder kitin og cellulose, noe som gjør dem til nesten utømmelige kilder av miljøvennlig råmateriale til produksjon av biodrivstoff og andre biovennlige produkter. (Zakariassen *et al.* 2009)

Enzymatisk degradering av disse polysakkaridene, er av stor biologisk og økonomisk interesse (Zakariassen, 2010). Utvikling av enzymer som effektivt omgjør uløselige biopolymerer er derfor et av hovedmålene i nåværende forskning på biodrivstoff. (Zakariassen *et al.* 2009)

# 1. Introduksjon

---

## 1.2 Glykosylhydrolaser

Glykosylhydrolaser (glykosidaser) er en fellesbetegnelse på enzymer som katalyserer hydrolyse av glykosidbindinger. Levende organismer benytter disse enzymene for utnyttelse av karbohydrater som energikilde. Defekter i gener som koder for glykosidaser fører til genetisk arvelige sykdommer (Davies & Henrisat, 1995).

### 1.2.1 Klassifisering

The International Union Of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) har på bakgrunn av den enorme diversiteten av enzymer, konstruert et klassifiseringssystem som baseres på substratspesifisitet. Klassene tildeles et EC- nummer. Det har vist seg at systemet som er enkelt, skaper problemer for de enzymene som hydrolyserer flere ulike substrater. En klassifisering av glykosylhydrolaser med hensyn på aminosyresekvens er dermed mer hensiktsmessig, (Davies *et al.* 1997). Den direkte sammenhengen mellom sekvens og struktur, kan gi informasjon om blant annet struktur. Innenfor hver enzymfamilie er strukturen og den katalytiske mekanismen lik (Davies *et al.* 1997). Informasjonen om aminosyresekvensen lagres i en database kalt CaZy (CarbohydrateActive Enzymes). Per dags dato (august 2013) er det klassifisert 132 familier.

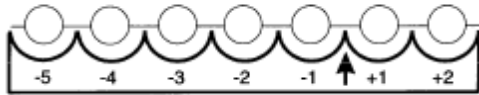
### 1.2.2 Struktur

Som regel består glykosylhydrolaser av et katalytisk domene, og en eller flere ikke-katalytiske domener. I det aktive setet i det katalytiske domenet, foregår hydrolysen, mens i det ikke-katalytiske domene, kan ha en substratbindende funksjon som bidrar til mer effektiv hydrolyse (Davies & Henrissat, 1995).

Videre består det aktive setet av flere subenheter hvor suktermolekylene bindes. Disse nummereres fra  $-n$  til  $+n$ , hvor de representerer henholdsvis den ikke reduserende enden og reduserende enden av sukkeret (figur 1.4). Glykosidbindingen til substratet kuttes alltid mellom subsetene  $+1$  og  $-1$ . De resterende subsetene binder substratet og hjelper til med å stabilisere konformasjonsendringer (Davies & Henrissat, 1995).

# 1. Introduksjon

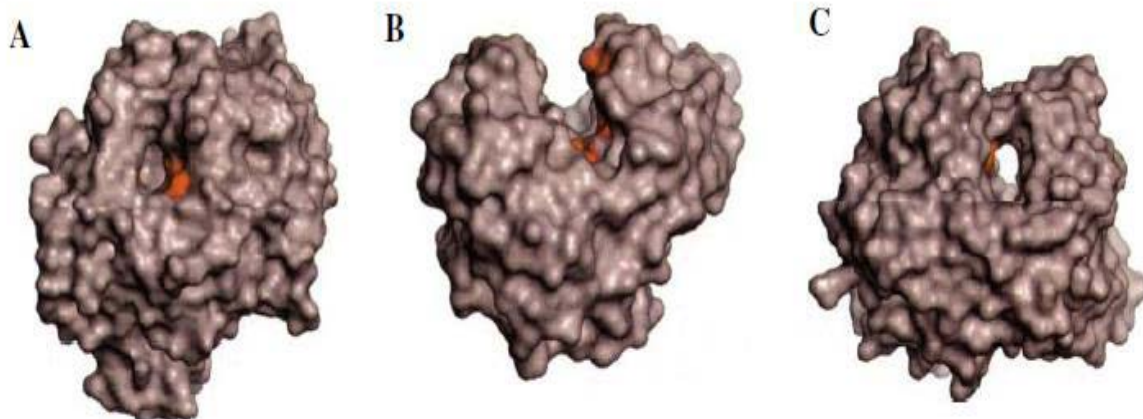
---



**Figur 1.4** Et eksempelet på et system, hvor et enzym kutter disakkaridene fra den reducerende enden til substratet (Davies *et al.* 1997.)

Glykosylhydrolasene kan virke på ulike deler av sukkerkjeden. Ekso-aktivitet, katalyserer kutting av glykosidbindinger i enden av en sukkerkjede, mens endo-aktivitet, katalyserer kutting midt i kjeden (Henrissat & Davies 1997; Mathews *et al.* 2000)

Med kjent struktur kan glykosylhydrolaser deles opp i tre klasser ut i fra topologien i det aktive setet. Krater, kløft og tunnel kalles disse og vises i figur 1.5. Krater er optimal for gjenkjennelse av den ikke-reducerende enden til sukkerkjeden, og dermed tilpasset substrater med mange tilgjengelige ender (eksoaktivitet)(Davies & Henrissat, 1995). Kløften har et mer åpent aktivt setet, som muliggjør en mer tilfeldig binding av sukkerenheter (endoaktivitet). Tunnelen dannes fra en kløft hos enzymer som har utviklet lange loops som dekker over deler av kløften og bindes sammen til en tunnel (Davies & Henrissat 1995). Enzymet tillates å frigjøre produktet mens det fortsatt er bundet til substratet (Davies & Henrissat 1995).



**Figur 1.5** Topologien til det aktive setet hos glykosidaser : A) Krater, B) Kløft, C) Tunnel. Aktive residuer er merket røde. (Davies&Henrissat, 1995)

# 1. Introduksjon

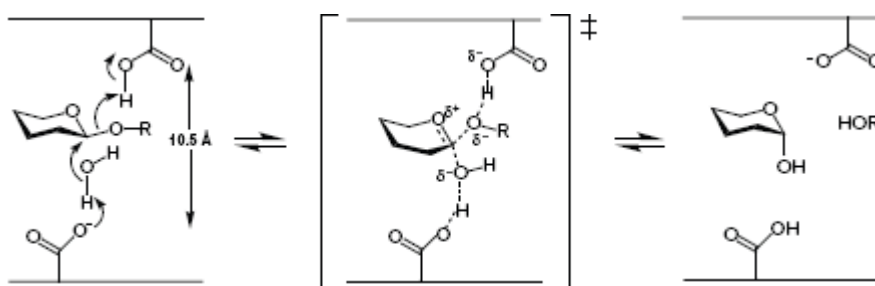
---

## 1.2.3 Mekanisme

I tillegg til å være klassifisert i familier, er glykosylhydrolaser også delt inn i to klasser med hensyn på hydrolysemekanisme. Disse kalles inverterende mekanisme og bevarende mekanisme. Enzymatisk hydrolyse av glykosidbindinger forekommer ved en generell syrekatalyse som krever to residuer: en proton donor/syre og en nukleofil/base (Jitonnom *et al.* 2011). I begge mekanismene er posisjonen av protondonoren lik, med en slik avstand til glykosylbindingen som gjør det mulig for protonet å danne en hydrogenbinding til glykosidoksygenet (Davies & Henrissat 1995).

### 1.2.3.1 Inverterende mekanisme

I den inverterende mekanismen forgår hydrolysen i et trinn. Dette skjer ved protonering av glykosidoksygenet i sure katalytiske residuet, mens det samtidig skjer et nukleofilt angrep på det anomere karbonet fra et aktivert vannmolekyl, i det andre basiske katalytiske residuet. (Figur 1.6). Avstanden mellom residuene er på 10 Å. Hydrolyse av  $\beta$ - glykosidbinding fører til et produkt med  $\alpha$ -konfigurasjon, mens hydrolyse av  $\alpha$ - glykosidbinding gir et produkt med  $\beta$ -konfigurasjon.



**Figur 1.6:** Inverterende reaksjonsmekanisme for glykosylhydrolaser, som er en ett-trinn mekanisme (Rye and Withers 2000 ).

# 1. Introduksjon

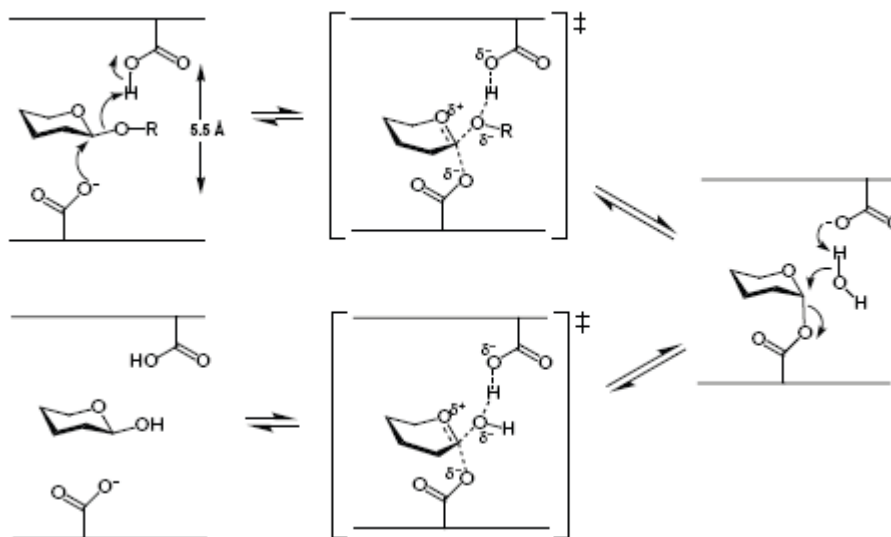
## 1.2.3.2 Bevarende mekanisme

Hos enzymer som benytter den bevarende mekanismen er avstanden mellom residuene 5,5 Å.

Det er da ikke plass til et vannmolekyl direkte, så mekanismen utføres i to trinn.

1. Glykosidoksygenet blir protonert i det sure katalytiske residuet, dette fører til at glykosidbindingen brytes, og det dannes en positiv ladning på det anomere karbonet. Deretter utføres en nukleofil substitusjon på det anomerske karbonet slik at det dannes et glykosidenzym intermediat.
2. Glykosidenzym intermediet hydrolyseres av et vannmolekyl. (figur 1.7)

Hydrolyseprodukt dannes med lik konfigurasjon som substratet (Rye & Withers, 2000; Davies & Henrissat, 1995).



**Figur 1.7:** Bevarende reaksjonsmekanisme for glykosylhydrolaser, som er en to-trinns mekanisme (Rye and Withers 2000 )



# 1. Introduksjon

---

## 1.3 Kitinaser

Kitinaser er en fellesbetegnelse på enzymer som bryter ned kitin og dets derivater. Kitinaser tilhører glykosylhydrolasefamilie 18 og 19 (Ohnuma *et al.* 2011). Disse to familiene har ulik struktur og mekanisme og er ikke evolusjonært beslektet. Kitinasene i familie 18 finnes i mennesker, bakterier, sopp, virus og dyr samt i noen planter, mens familie 19 kitinasene i hovedsak består av kitinaser fra planter (Boot *et al.* 1995)

Kitinaser kan også bli klassifisert som endo- eller ekso-kitinaser. Endo-kitinaser kutter kitin tilfeldig ved interne seter. Ekso-kitinaser katalyserer hydrolyse av kitin progressivt fra enten den reduserende eller ikke-reduserende enden (Chou *et al.* 2006).

Det katalytiske domenet til familie 18 kitinaser har en ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> TIM-barrel fold som inneholder et konserverte motiv, DXXDXDXE, og er lokalisert på  $\beta$ -strand 4 i det aktive setet. Den katalytiske syren/basen er glutamat residuet E i sekvensmotivet (Brurberg *et al.*, 2000; Vaaje-Kolstad *et al.* 2013; Boot *et al.* 2001; Chou *et al.* 2006:).

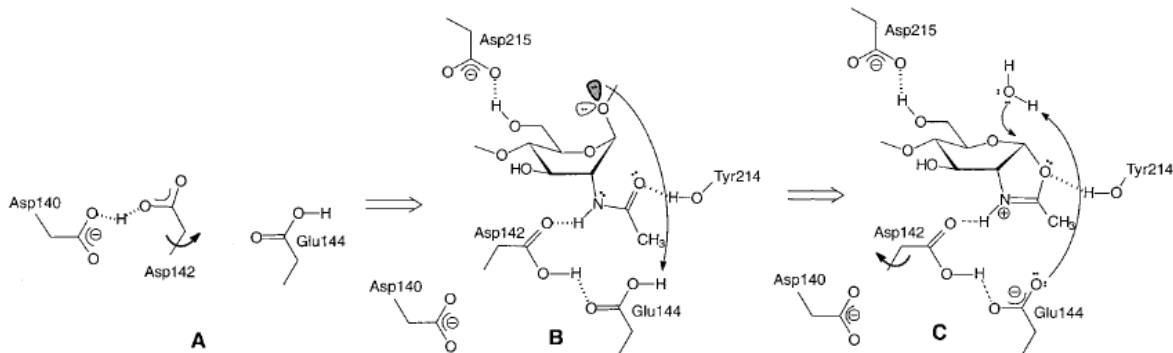
Familie 18 kitinaser benytter en substrat-assistert reaksjonsmekanisme som fører til bevaring av den anomere konfigurasjonen. (beskrevet i avsnitt 1.3.2). Kitinaser tilhørende familie 19 anvender en inverterende mekanisme som endrer den anomere konfigurasjonen.

I organismer som inneholder kitin spiller kitinasene en viktig rolle for opprettholdelse av normal livssyklus, i form av celledeling og tidlig utvikling (Brurberg *et al.*, 2000), mens andre organismer produserer kitinaser som en beskyttelse mot patogener som inneholder kitin, og utgjør dermed en viktig del av det medfødte immunforsvaret (Elias *et al.* 2005). Kitin finnes som nevnt i celleveggen tilsopp, og kitinaser er derfor en viktig bestanddel ved medfødt respons mot soppinfeksjon

# 1. Introduksjon

## 1.3.2 Substrat assistert mekanisme for familie 18 kitinaser.

I familie 18 glykosylhydrolaser, benytter kitinasene en variant av den bevarende mekanismen kalt substratassistert mekanisme.(van Aalten *et al.*2001) (figur 1.8). Grunnen til dette er at disse kitinasene mangler det andre nukleofile residuet i det aktive setet som er nødvendig for stabilisering av oksokarbeniumion intermedietet som vanligvis dannes i den bevarende mekanismen(Brurberg *et al.* 2000). I stedet benyttes N-acetylgruppen som er bundet til C2 på sukkerresiduet i subseite -1, som base og intermedietet stabiliseres.



**Figur 1.8:** Substratassistert mekanisme for familie 18 kitinaser (van Aalten *et al.* 2001).

# 1. Introduksjon

---

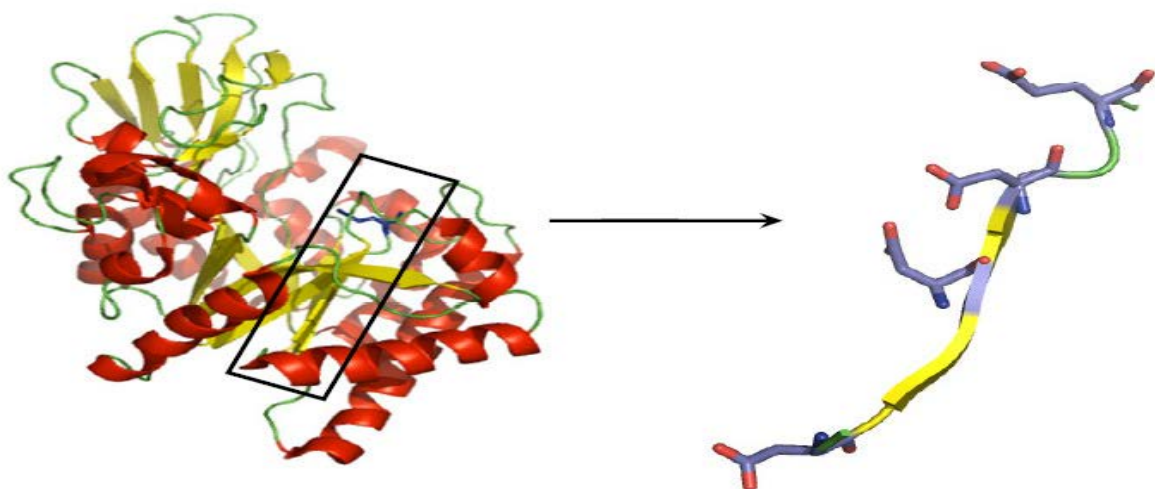
## 1.3.3 Humane kitinaser

To humane kitinaser har vist enzymatisk aktivitet, *human-chitotriosidase* (HCHT) (Hollak *et al.*, 1994) og *Acidic Mammalian Chitinase* (AMCase) (Boot *et al.* 2001). Begge disse kitinasene er en del av vårt medfødte immunforsvar. Videre finnes kitinaser i kroppen hvor det har oppstått en infeksjon, som igjen tyder på at humane kitinaser spiller en vesentlig rolle i forsvaret mot parasitter og infeksjoner i kroppen (Elias *et al.* 2005)

### 1.3.3.1 Human Chitotriosidase (HCHT)

HCHT er én av to aktive humane familie 18-kitinaser. Det var i plasmaet hos mennesker som lider av Gauchers sykdom, at HCHT først ble oppdaget. Dette fordi det ble påvist stor økning av HCHT-aktivitet hos disse pasientene (Hollak *et al.* 1994) Enzymet har senere vist seg å være en velegnet markør for denne sykdom og brukes derfor som målparameter i behandlingen (Hollak *et al.* 1994). I tillegg blir enzymet assosiert med flere lysosomale sykdommer, kroniske betennelsestilstander og malaria (Kzhyshkowska *et al.* 2007).

HCHT kan opptre i to isoformer; 39kDa og 50kDa, hvor pI er henholdsvis 8 og 7,2. Ved posttranslasjonelle modifikasjoner eller ved RNA prosessering kan 50kDa isoformen omdannes til 39kDa isoformen (Renkema *et al.* 1995). 39 kDa-formen har kitinolytisk aktivitet og det tyder på at den 50 kDa store isoformen i tillegg har et kitinbindende domene (Fusetti *et al.* 2002). Det antas at HCHT er en endo kitinase basert på krystallstrukturen (Chou *et al.* 2006).



**Figur 1.9** Krysallstrukturen til HCHT vises til venstre, og et utsnitt av  $\beta$ -strand 4 med det konserverte DXXDXDXE-motivet til familie 18-kitinaser vises til høyre (Fusetti *et al.* 2002).

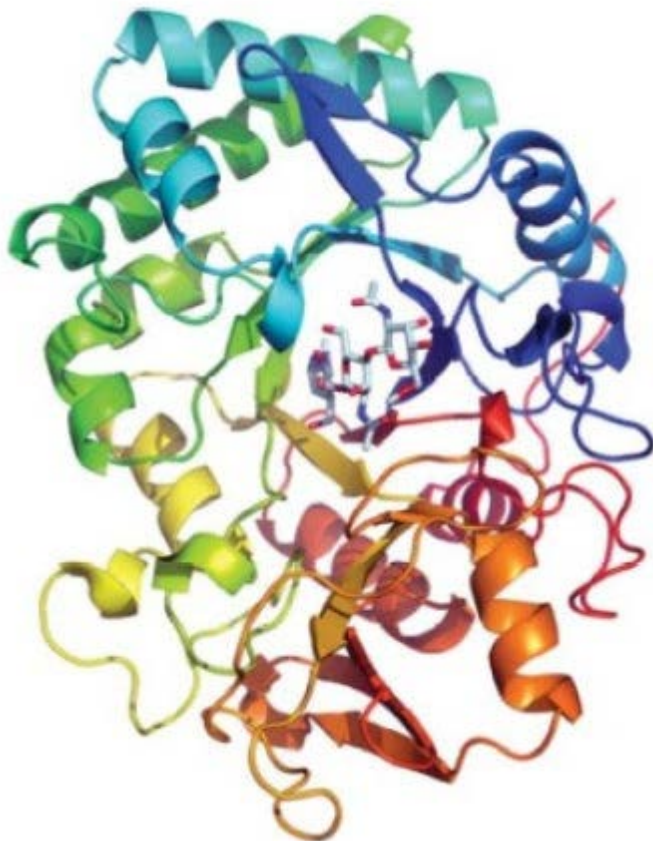
# 1. Introduksjon

---

## 1.3.3.2 Acidic mammalian chitinase (AMCase)

AMCase er én av to aktive humane familie 18-kitinaser, og har 57% sekvenslikhet med human HCHT (Chou *et al.* 2006). I mennesker uttrykkes AMCase (figur 1.10) i mage og lunger (Chou *et al.* 2006). Hos personer med astma er det i lungecellene betydelige mengder med AMCase, mens hos friske mennesker ikke er målbare mengder (Elias *et al.* 2005).

Som HCHT består AMCase av et 50 kDa protein med et C-terminalt kitinbindende domene, en hengselsregion og et N-terminalt katalytisk domene på 39 kDa. (Chou *et al.* 2006). I motsetning til HCHT som har nøytralt eller basisk isoelektrisk punkt (pI) så har AMCase surt isoelektrisk punkt (pI) (Chou *et al.* 2006)



**Figur 1.10** Det katalytiske domenet til AMCase. En disulfidbinding binder sammen den C-terminale enden (rød) med den N-terminale loopen (blå). (Olland *et al.* 2009).

# 1. Introduksjon

---

## 1.4 Inhibering av Humane kitinaser

Det er av stor medisinsk interesse å kunne inhibere de humane kitinasene. I tillegg vil det være gunstig å kunne utvikle pesticider, fungicider og antimalaria forbindelser, hvor det er fordelaktig at inhibitoren ikke er giftig og lett tilgjengelig til en fornuftig pris.

Som en behandlingsmåte for astma har det blitt foreslått inhibering av AMC<sub>ase</sub>, men det derimot vil ha en negativ effekt på immunforsvaret å inhibere HCHT på grunn av dens veksthemmede effekt på sopp (Eide *et al.* 2012; van Eijk *et al.* 2005). For å kunne finne en selektiv inhibitor for AMC<sub>ase</sub>, vil det være viktig å finne ut hvordan HCHT inhiberes.

### 1.4.1 Inhibering av kitinaser med allosamidin

Allosamidin er et pseudosakkarid, og er en av de best studerte kitinase inhibitorene, som har vist seg å være effektive mot alle kitinasene i familie 18. De vil binde til det aktive setet i subsete -1, med festede NAG-sukkere som strekker seg inn i subsetene -2 og -3. (Olland *et al.* 2009; van Aalten *et al.* 2001)

Allosamidin er en kompetativ inhibitor som blokkerer substratet fra bindingsetet.

# 1. Introduksjon

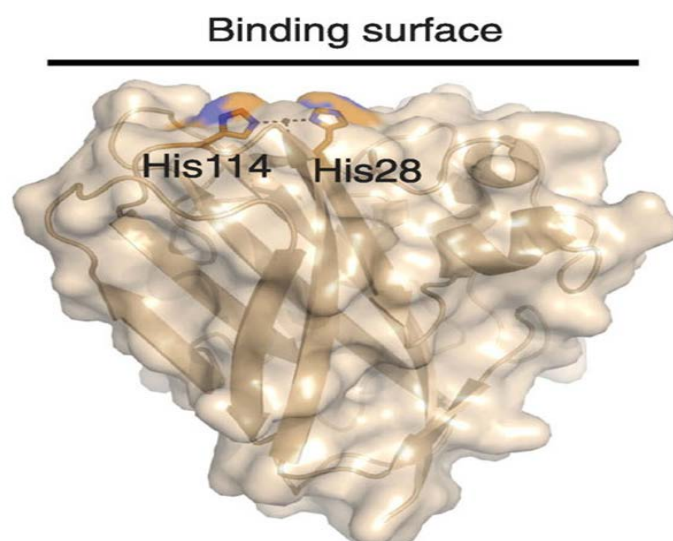
---

## 1.5 CBP 21

CBP21 som er et ikke-katalytisk kitinbindende protein fra jordbakterien *Serratia marcescens* tilhører CBP familie 33. Dette enzymet er av stor kommersiell og forskningsmessig interesse, da proteinet kun binder til  $\beta$ -kitin, som er en av de mest utbredte polymerer i verden. Det har vist seg at CBP21 er med på å bryte ned det uløselig polysakkaridet..

### 1.5.1 Strukturen til CBP21

Krystallstrukturen til CBP21 ble først løst ved Vaaje-Kolstad *et al* i 2005 og vises i figur 1.11. Dette er et lite kitinbindende protein med størrelsen 21kDa. Enzymet består av en  $\beta$ - sandwich som er bygd opp av to  $\beta$ -plater som stabiliseres av disulfidbroer og den hydrofobe kjerne. Kjernen består hovedsakelig av aromatiske aminosyrer som tryptofan. Tre  $\alpha$ -helikser utgjør det meste av overflaten av enzymet og de ligger mellom  $\beta$ -platene. Disse  $\alpha$ -heliksene består av konserverte residuer som er viktige for substratbindingen i det aktive setet. Det finnes også flere polare residuer som har vist seg å være viktig for substratbindingen (Vaaje-Kolstad *et al.* 2005) Videre har det vist seg at CBP21 har et konservert bindingssetet for toverdige metallioner som består av His 114 og His28.



**Figur 1.11:** Strukturen til CBP21. De to histidinresiduenes His114 og His128, som binder kobber, er markert når bindingsoverflaten (Vaaje-Kolstad *et al* 2010).

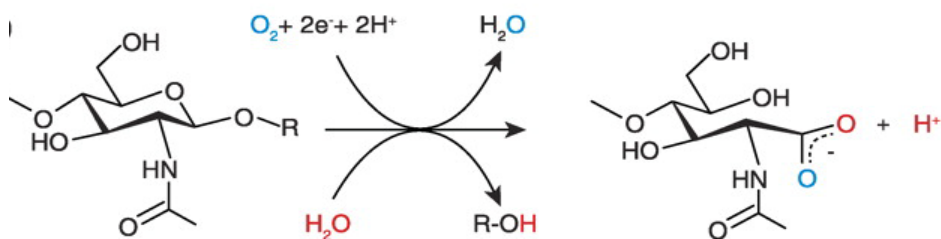
# 1. Introduksjon

---

## 1.5.2 Mekanisme

Mekanismen og funksjonen til CBP21 var lenge ikke kjent, men gjennom studier utført av Vaaje-kolstad *et al.* i tidsperioden 2005 og 2010 ble begge deler kjent (Vaaje-Kolstad *et al.* 2010)

Gjennom to trinn bryter CBP21 glykosidbindinger, henholdsvis i et oksiderende og et i hydrolyserende trinn. Det har vist seg at oksygenatomet som benyttes i det oksiderende trinnet kommer fra et molekylært oksygen, mens et oksygen blir inkorporert ved hydrolyse. Dette fører til en oksidert ende ved C1-karbonetsom vist i figur 1.12



**Figur 1.12:** Den enzymatiske reaksjonen katalysert av CBP21. To oksygenatomer kreves i det oksiderende trinnet, hvor et stammer fra molekylært oksygen, og et blir inkorporert ved hydrolyse (Vaaje-Kolstad *et al.* 2010)

# 1. Introduksjon

---

## 1.6 Termodynamikk og kinetikk ved protein – ligandinteraksjoner

Binding av ligander til proteiner er et universelt fenomen i levende organismer. Det krevers en komplett karakterisering av bindingsenergiene som er involvert for forståelsen av de molekylære prosessene mellom små ligander og biologiske makromolekyler. De termodynamiske parametere må bestemmes for en kvantitativ beskrivelse av kreftene bak de molekylære interaksjoner. Dette inkluderer likevektskonstanten ( $K_A$ ), endring i Gibbs frie energi ( $\Delta G$ ), endring i entalpi ( $\Delta H$ ), endring i entropi ( $\Delta S$ ), og endring i varmekapasitet ( $\Delta C_p$ ). (Perozzo, Folker & Scapozza 2004). De termodynamiske parametere er beskrevet nedenfor.

### 1.6.1 Assosiasjonskonstanten $K_A$

En reversibel assosiasjon mellom et protein (P) og en ligand (L) er den enkleste formen for protein-ligand interaksjon og kan beskrives slik:



For denne bindingsreaksjonen er hastighetsratene for assosiasjon og dissosiasjons henholdsvis  $k_a$  og  $k_d$ .  $K_A$  har benevnning Ms mens for  $K_d$  er benevningen  $sM^{-1}$ .

Ved å måle dissosiasjonskonstanten  $K_D$ , kan en finne affiniteten mellom et protein og ligand ved likevekt. Sammenhengen mellom  $\frac{1}{k_D} = K_A$  gir assosiasjonskonstanten. Denne assosiasjonskonstanten kan også uttrykkes ved hastighetsratene  $k_a$  og  $k_d$ . En sterk binding mellom protein og ligand ses ved en høy  $K_A$  og en lav  $K_D$ . Likevektkonstanten,  $K_A$  uttrykkes slik:

$$K_A = \frac{[PL]}{[P]+[L]} = \frac{k_a}{k_d} \quad (1.6.2)$$

Dersom assosiasjonskonstanten  $K_A$  er større enn 1, vil reaksjonslikevekten være forskjøvet mot produktsiden.



# 1. Introduksjon

---

## 1.6.2 Gibbs energi

Den viktigste termodynamiske parameteren er Gibbs bindingsenergi da den beskriver stabiliteten til et gitt biologisk kompleks.

$$\Delta G = -RT \ln K_A = RT \ln K_D \quad (1.6.3)$$

R er den generelle gasskonstanten ( $8,31447 \text{ J K}^{-1}\text{mol}^{-1}$ ) og T er temperaturen i kelvin. Er  $\Delta G$  negativ, vil reaksjonen være spontan, det vil si når  $K_A > 1$

Gibbs – Helmholtz likningen (1.6.4) uttrykker Gibbs frie energi ved hjelp av et entropisk og et entalpatisk ledd.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1.6.4)$$

$\Delta H$  er endringen i entalpi (kap. 1.6.3), og  $\Delta S$  er endringen i entropi (kap. 1.6.4). Dette fører til at betydningen av endringen i entalpi og entropi er viktig for å få økt forståelse av Gibbs fri energi (Perozzo *et al.* 2004). For en spontan prosess er  $\Delta G$  negativ.

## 1.6.3 Bindingentalpi (H)

Endring i bindingsentalpi,  $\Delta H$ , ved protein-ligand interaksjoner reflekterer endringer i ikke-kovalente interaksjonene, som hydrogenbindinger, dipol-dipol og elektrostatiske interaksjoner mellom ligand og protein. Bindingsentalpien er en kombinasjon av tre ledd.

$$\Delta H_{\text{observert}} = \Delta H_{\text{intrinsic}} + \Delta H_{\text{konformasjon}} + \Delta H_{\text{protonering}} \quad (1.6.5)$$

$\Delta H_{\text{intrinsic}}$  er som regel det viktigste bidraget til  $\Delta H$ , og assosieres med interaksjonene mellom protein, ligand og løsemiddel. Dersom protein og ligand har samme konformasjon i fri og bundet tilstand, vil  $\Delta H_{\text{intrinsic}}$  vært tilsvarende entalpiforandringen.  $\Delta H_{\text{konformasjon}}$  kommer fra eventuelle endringer i konformasjonen til proteinet ved binding til Ligand, mens  $\Delta H_{\text{protonering}}$  er eventuelle protoneringer/ deprotoneringer av komplekset ved ligandbinding.

# 1. Introduksjon

---

## 1.6.4 Bindingsentropi (S)

Alle andre krefter som enten virker positivt eller negativt inn på den frie energien til en reaksjon uttrykkes ved bindingsentropi, S. Entropiforandringen,  $\Delta S$  for en bindingsreaksjon kan uttrykkes av tre ledd.

$$\Delta S_{\text{reaksjon}} = \Delta S_{\text{solvatisering}} + \Delta S_{\text{konformasjon}} + \Delta S_{\text{mix}} \quad (1.6.6)$$

$\Delta S_{\text{solv}}$  er ofte det viktigste bidraget til den totale entropiforandringen og beskriver endringen i entropi som kan observeres når vann frigjøres i en reaksjon.

$\Delta S_{\text{konformasjon}}$  tilsvarer endringen i rotasjonsfrihet hos proteinet og liganden, og eventuelt andre strukturforandringer som induseres ved ligandbinding.  $\Delta S_{\text{mix}}$  representerer endring i entropi når det dannes et kompleks fra to molekyler som er frie i løsning.

## 1.6.5 Varmekapasitet ( $\Delta C_p$ )

Varmekapasiteten,  $\Delta C_p$  er den termodynamiske parameteren som kan gi viktig informasjon i en bindingsreaksjon. Verdien av denne kan bestemmes ut fra temperaturavhengigheten til  $\Delta H$  og  $\Delta S$  (Perozzo *et al*, 2004).

$$\Delta C_p = \frac{\partial \Delta H}{\partial T} \quad (1.6.7)$$

$$\Delta C_p = \frac{\partial \Delta S}{\partial \ln T} \quad (1.6.8)$$

Endringer i varmekapasiteten,  $\Delta C_p$  er viktig i forståelsen av hydratiseringen av et system.

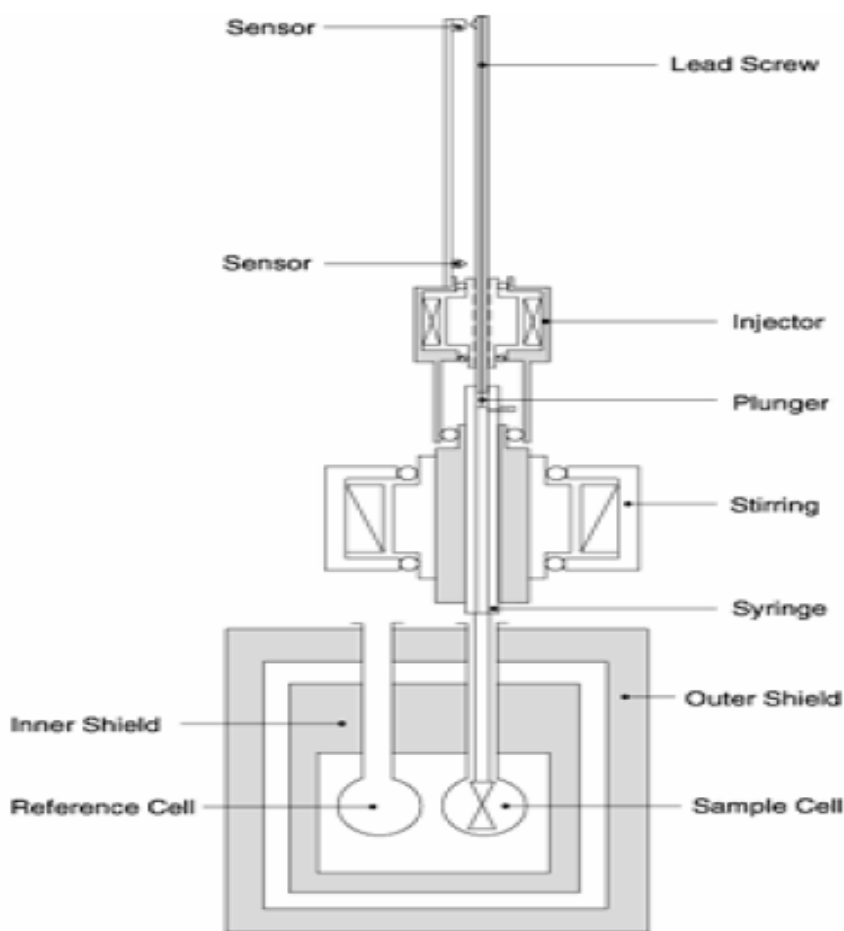
# 1. Introduksjon

---

## 1.7 Isotermisk titeringskalorimetri (ITC)

Ultrasensitiv isotermisk titeringskalorimetri (ITC) kan detektere svært små varmemendringer, assosiert med bindingsreaksjoner. Da nærmest alle molekylære interaksjoner absorberer eller genererer varme, kan ITC sees på som en universell detektor for slike interaksjoner. Fra et enkelt ITC forsøk får man direkte  $\Delta H$  og  $K$ , og dermed også  $\Delta G$  og  $\Delta S$ , i tillegg til bindingsstøkiometrien  $n$ .

I figur 1.13 vises en skjematisk skisse av hvordan et ITC instrument er bygd opp. I prøvecellen forgår bindingsprosessene, hvor temperaturen kontinuerlig blir sammenlignet med temperaturen i referansecellen, som kun inneholder vann. For å hindre varmeutveksling mellom cellene er det et varmeskjold som holder sammen temperatur som cellene, for å holde varmeutvekslingene mellom cellene på et minimumsnivå. Et ytre varmeskjold, skal kompensere for eventuelle temperaturforandringene i romtemperaturen.



**Figur 1.13:** Skjematisk skisse av et VP-ITC instrument (MicroCal ,2001).

# 1. Introduksjon

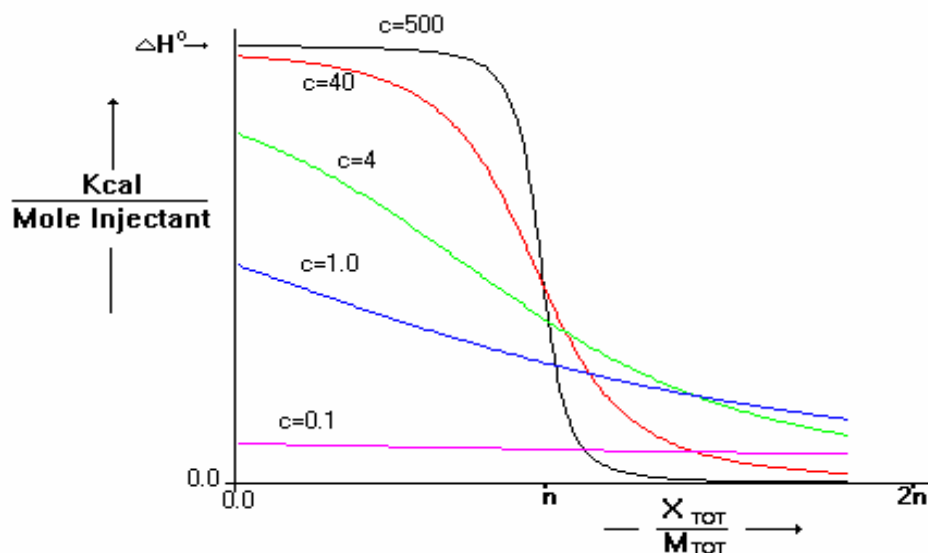
---

Under forsøket vil mengde varmeenergi i prøvecellen i forhold til referansecellen gi tilgang til reaksjonsvarmen.

Computer kontrollerte injeksjoner av liganden til prøvecellen med proteinløsningen, utføres gjennom en sprøyte. Sprøyten sørger for kontinuerlig røring og dermed rask blanding av reaktantene. Varmeutviklingen etter hver injeksjon registreres og plottes mot den molare rationen mellom ligand og protein. Ut ifra formen på kurven som dannes, kan  $K$  og  $\Delta G$  beregnes. Formen på kurven avhenger av parameteren  $c$ , som er produktet av assosiasjonskonstanten  $K_A$  og proteinkonsentrasjonen  $[P]$ .

$$c = K_A \times [P] \quad (1.7.1)$$

For en nøyaktig bestemmelse av  $K$ , bør  $c$  verdien være mellom 10 og 1000 (Wiseman *et al*, 1989). Det vil være større usikkerhet ved beregning av  $K_A$  dersom  $c$ -verdien er lavere.

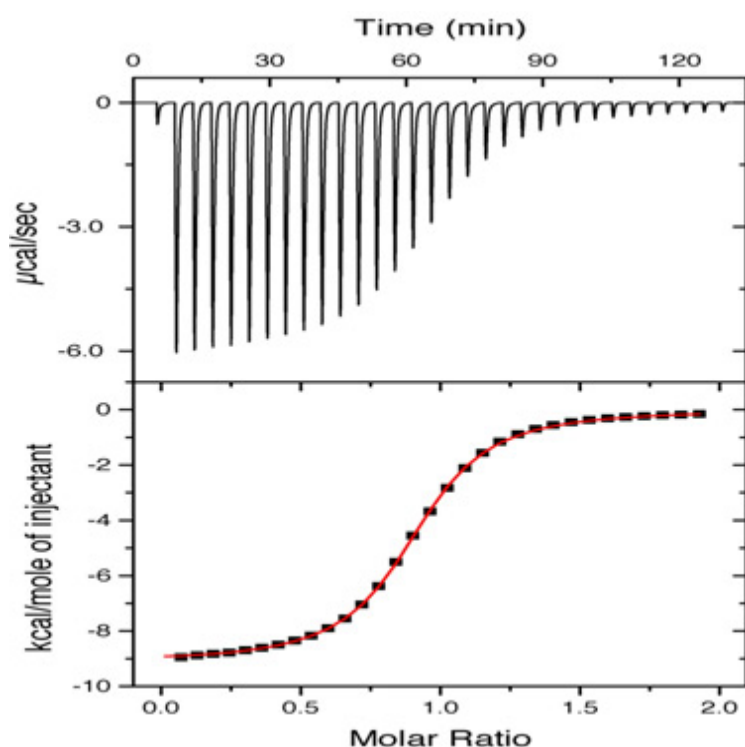


**Figur 1.14:** Ulik  $c$ -verd,i gir forskjell i formen på kurven( Microcal, 2001)

# 1. Introduksjon

---

Et typisk termogram og isotherm fra et ITC forsøk er vist i figur 1.15. En oversikt over varmemeforandringene underveis i bindingsreaksjonene gis i termogrammet. Summen av alle varmemeforandringene gir  $\Delta H$ , og  $\Delta S$  kan da regnes ut ved hjelp av likning 1.6.4. Fra et enkelt forsøk fås  $\Delta H$ , i motsetning til van't Hoff's analyse, hvor det må utføres flere forsøk ved ulike temperaturer for å finne entalpiendringen. Forandringen i varmekapasitet for reaksjonen,  $\Delta C_p$ , kan beregnes fra temperaturavhengigheten til  $\Delta H$  (likning 1.6.7).



**Figur 1.15** Typisk termogram fra et ITC-forsøk. (Avacta)

For bindingstudier, er ITC en velbrukt metode.

Utfordringen ved bruk av ITC, kan være at det trengs mye biologisk materialet. Ved lav  $\Delta H$ , trengs det ekstra mye biologisk material, da den lave varmeutviklingen gjør at man trenger mer materiale for å få nok varmeutslag til å kunne detektere det. Bidrag fra ikke spesifikke faktorer inngår i entalpiendringen, da entalpiendringene som måles ved ITC er globale egenskaper til hele systemet.

Hastighetskonstanter og aktiveringsparametere for bindingsreaksjoen kan heller ikke bestemmes ved ITC teknikken.

# 1. Introduksjon

---

## **1.8 Mål med oppgaven.**

I denne oppgaven er målet todelt, men knyttet sammen ved bruk av isotermisk titreringskalorimetri (ITC).

Et av målene er å bestemme de termodynamiske parameterene ved binding av den velkjente familie 18 inhibitoren allosamidin til HCHT, og sammenligne disse med andre allosamidin-kitinsystemer. Det overordnede målet er å kunne inhibere de humane kitinase med tanke på ulike sykdommer, da både HCHT og AMCase har en forhøyet verdi hos mennersker med ulike alvorlige sykdommer.

Den andre delen av oppgaven er knyttet til et større forskningsprosjekt for å bedre forståelsen av mekanismen til CPB21.

## 2. Materialer

---

## 2. Materialer

### 2.1 Laboratorieutstyr

Utstyr:	Spesifikasjon:	Leverandør:
Amiconrør	10000MW	Millipore
Automatpipetter	Finnpipetter	Thermo Labsystem
Avtrekkskap	AV-100	Telstar
Begerglass		Fisher Brand
Blåkorkflasker		Scott Duran
Dyrkningskolber		Duran
Elektrofereseutstyr: <ul style="list-style-type: none"><li>➤ Gelkjøringskammer</li><li>➤ Gelspenningskilde</li><li>➤ Gelniv</li></ul>		Invitrogen
Eppendorfrør	1,5 mL	Axygen
Filter	0,22µm	Millipore
Inkubator	Classic Series	New Brunswick-Scientific
ITC	VP ITC MicroCalorimetri Thermo Vac Micro Calorimetri kontrollenhet	MircoCal
Microvekt		Sartorius
Målekolber		Scott Duran
Målesylinder		Scott Duran
Nupage SDS geler og buffere		Invitrogen
Oppkonsentratorfilter	10000 MVCO	Sigma-Aldrich
Petriskåler		Heger
pH-meter	MP220 WTW	Metler Toledo Inolab
Pipettespisser		Thermo Scientific
Sentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf

## 2. Materialer

---

Utsyr	Spesifikasjon	Levrandør
Sentrifugerotor	JA 14	Beckman
Sterile tannpirkere		Jordan
Sterilbenk		Merck
Vannbad	Eco Temp TW12	Julabo
Vekt	IC621P	Stuart Scientific
Qubit™ Fluorometer		Invitrogen

### 2.2 Kjemikalier

Alt vann som ble brukt i forsøkene var av Milli-Q kvalitet og er betegnet som destillert vann av dH<sub>2</sub>O

Kjemikalier:	Leverandør:
Amipicillin	Sigma
Ammoniumsulfat (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ,	Sigma
Bacto™ Agar	Becton Dickinson
Bacto™ –gjærekstrakt	Becton Dickinson
Bacto™ Peptone	Becton Dickinson
Bacto™ Tryptone	Becton Dickinson
Biotin C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	Sigma-Aldrich
Eddiksyre, CH <sub>3</sub> COOH	Sigma-Aldrich
EDTA, etylendiamin tetra-acetic acid	Merck
Gjærekstrakt	Difco
Glyserol, C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	Merck
Hydrogenklorid (HCl)	Merck
Imidazol (C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> )	Sigma
Kaliumfosfat K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
Kaliumhydrogenfosfat, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Aplichem
Kitinkuler	Biolabs Inc
Magnesiumklorid heksahydrat (MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O)	Merck
Metanol (CH <sub>3</sub> OH)	
Natriumklorid, NaCl	Merck
PIPES	



## 2. Materialer

---

PMSF, phenyl-methyl sylfonylfluorid	Sigma
Sukrose, C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	AnalaR
Trisbase, C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	Sigma

### 2.3 Proteiner og enzymer

Proteiner:	Leverandør:
Bovine Serum Albumin (BSA) 10 mg/ml	Promega
BSA purified 100x, 10 mg/mL	New England BioLabs Inc
HCHT	Kristine B Eide
-80 frysestokk	Anne Cathrine Bunæs
Proteinstandard:	Leverandør
Benchmark Ladder	Invitrogen
SDS PAGE standard, low range	Bio Rad

### 2.4 Kit/System

System	Komponenter	Leverandør
NuPAGE® elektroferesesystem	NuPAGE® Sample reducing agent (10X)	Invitrogen
	MOPS SDS Running buffer	
	NuPAGE® Sampelbuffer (4X)	
	NuPAGE® 10% Bis-Tris Mini Gels	
Quant iT™ Protein Assay Kit	Protein reagent	Invitrogen
	Protein buffer	
	Protein Standard (0 ng/μL, 200ng/μ, 400ng/μ)	

## 3. Metoder

---

### 3. Metoder

#### 3.1 Tillaging av human chitotriosidase (39kDa)

##### 3.1.1 Vekst og rensing av HCHT

Mottok ferdig dyrket og rensset HCHT (39kDa) av Kristine B Eide, som hadde fått ut mye protein ved fermentering. Den oppgitte konsentrasjonen var angitt til å være 1mg/ml.

##### 3.2 Oppkonsentrering og bufferbytte på ferdig rensset HCHT

Ved å benytte Amiconrør (Ultra-15, 10kDa) som er et sentrifugefilter, så kan en om ønskelig både bytte buffer og oppkonsentrere ulike prøver samtidig. Dette fordi filteret slipper bare igjennom forbindelser som har molekylvekt mindre enn 10000 Da. Det betyr at de molekylene som har høyere molekylvekt forblir i filteret, mens mindre molekyler vil passere. HCHT, som har en molekylvekt på 39kDa forblir dermed i filteret. Det er dermed mulig å bytte buffer og oppkonsentrere den utvalgte proteinløsningen.

##### Materialer

- Amiconrør (Ultra-15, 10kDa)
- Proteineulat fra rensing
- Storage buffer
  - Kaliumfosfatbuffer 20mM pH6,0

##### Metode

Til amiconrør ble utvalgte fraksjoner overført og sentrifugert ved 4300 rpm ved 4 °C. Deretter ble 20 mM kaliumfosfatbuffer, pH 6,0, tilsatt rørene i flere omganger for å bytte ut bufferen til proteinløsningen. Løsningen ble så oppkonsentrert til omtrent 1mg/ mL, før eluatet ble overført til cryorør. Røret med proteinløsningen ble så merket og oppbevart i kjøleskap (4°C).

## 3. Metoder

---

### 3.3 Proteinkonsentrasjonsbestemmelse, fluorimetrisk metode

For konsentrasjonsbestemmelse kan en benytte Quant-iT proteinassay. Denne metoden går ut på at Quant-IT™ protein reagent bindes til proteiner slik at det dannes et kompleks.

Dette komplekset eksiteres ved ~ 470 nm og emitterer lys ved ~ 570 nm. I et Qubit™ fluorometer, detekteres mengde emittert lys. Quant-iT proteinassay har et deteksjonsområde på 0,25-5 µg, og dersom konsentrasjonen på prøven faller utenfor deteksjonsgrensen, bør prøven fortynnes eller oppkonsentreres (Invitrogen 2007).

#### Materialer

- Løsning med oppkonsentrert protein
- Quant-IT™ Protein Assay Kit 0,25-5 µg
- Quant-IT™ protein buffer
- Quant-IT™ protein reagent

#### Metode

En arbeidsløsning bestående av 1x n µl Quant-IT™ protein reagent blandet med 199x n µl Quant-IT™ protein buffer ble laget (n er antall prøver og eventuelle standarder som skal måles). Det ble laget 3 paralleller av proteinprøvene i blandingsforholdet 2µl proteinprøve og 198 arbeidsløsning, Prøvene ble blandet godt på vortex og inkubert i romtemperatur i 15 min, før de ble målt i Quant-IT™-fluorometeret. Proteinkonsentrasjonen blir vist direkte med benevnningen µg/mL. For å finne konsentrasjonen må en multiplisere med fortynningsfaktoren. (x 100)

## 3. Metoder

---

### 3.4 Overekspresjon av CBP 21 i *E.coli*

#### 3.4.1 Vekst av celler

Fikk utlevert *E.coli* av Anne Cathrine Bunæs. Cellene ble dyrket i LB-medium og ampicillin ble tilført for å hemme vekst av uønskede mikroorganismer.

#### Materialer:

- Ampicillin, 50mg/ml
- Frysestokk med CBP21
- LB agar
  - 10 gram Bacto tryptone
  - 5 gram Bacto gjærekstrakt
  - 10 gram NaCl
  - 15 gram Bactoagar
  
- LB- medium:
  - 10 g Trypton
  - 5 g Gjærekstrakt
  - 10 g NaCl
  - 1 L dH<sub>2</sub>O

#### Metode:

*E. Coli* celler ble strøket ut på støpte LB-agar plater tilsatt 50mg/ml ampincillin og inkubert over natten i varmeskap på 30 °C. Fra skålene ble det laget en forkultur med utvalgte kolonier som ble overført i 5 ml LB-medium med 5 µL ampicillin for oppdyrking. Det er viktig å plukke en ren koloni. Bakteriekulturen stod over natten.

300 µL autoklavert 50 % glyserol ble overført til et eppendorfrør og tilsatt 700µL av cellekulturen og satt i – 80 °C fryseren for langtidsoppbevaring (frysestock)

Avskrap fra den nylagde frysestocken med CBP21 ble pirket løs med en steril tannpirker, og strøket ut på LB- agarplater og i varmeskap 30 °C over natten.

## 3. Metoder

---

Utvalgte kolonier ble pirket løs med steril tannpirker før den ble sluppet opp i 2 liters dyrkningskolbe som var tilsatt 300mL LB- medium og 300 $\mu$ L ampicillin. Kolbene ble satt på 225 rpm risting i 16 timer i 37°C. Arbeidet ble fortatt i et sterilt avtrekkskap for å unngå kontaminering.

Cellene høstes ved å sentrifugere kulturene i en JA -rotor 8000 rpm i 10 minutter på 4°C

### 3.4.2 Tillaging av periplasmatisk ekstrakt

CBP21 lokaliseres i periplasmaet i cellene og kan frigjøres ved å gi cellene osmotisk sjokk.

Da vil de periplasmatiske komponentene gå ut i løsning (Vaaje-Kolstad et al. 2005).

Dette kan oppnås ved først å tilsette en løsning som øker gjennomtrengeligheten til cellene, og deretter tilsette magnesiumklorid som fører til frigjøring av komponentene i det periplasmatiske rommet. PMSF fungerer som en proteasehemmer.

#### Materialer:

- 20 mM MgCl<sub>2</sub>
- Spheroplastbuffer:
  - 30 mL Tris/HCl pH 8,0
  - 51,3 g sukrose
  - 300 $\mu$ l 0,5 M EDTA pH 8,0
  - 600 $\mu$ l PMSF
  - Fylles opp til 300mL med dH<sub>2</sub>O

#### Metode:

Den aktuelle bakteriekulturen ble fordelt i 500 ml sentrifugerør og spunnet ned ved 8000 rpm i en Ja-14 rotor i 10 min ved 4 °C. Supernatanten ble fjernet og pelleten ble resuspendert i kald spheroplastbuffer. Dette ble gjort for at sukkerkonsentrasjonen skulle være høyere inne i cellene enn utenfor, slik at når man i neste omgang tilsetter kaldt vann vil cellene få et osmotisk sjokk.

### 3. Metoder

---

Rørene ble videre sentrifugert på samme måte som beskrevet over. Supernatanten ble igjen fjernet og pelleten varmet opp til romtemperatur. Det ble tilsatt kaldt dH<sub>2</sub>O for lysing av cellene ved osmotisk sjokk. Deretter ble løsningen resuspendert. Det ble videre tilsatt MgCl<sub>2</sub> for å stabilisere proteinene, deretter spunnet ned igjen. Supernatanten ble sterilfiltrert i et 0,22 µm filter ved hjelp av vakuumsug. Det ble avslutningsvis tilsatt PMSF, en proteasehemmer, som forhindrer spaltning proteinene. Det periplasmatiske ekstraktet ble oppbevart ved 4 °C.

#### 3.4.3 Rensing av CBP 21 på kitinkolonnen.

Det periplasmatiske ekstraktet ble rensed ved hjelp av affinitetskromatografi. Dette er en teknikk hvor enzymet som skal renses spesifikk adsorberes til en ligand som er kovalent bundet til et kolonnematriks (Harris 2007) Metoden er godt egnet for aktive enzymer men uegnet for inaktive enzymer da de binder irreversibelt til kitin kolonnen. (Synstad *et al.*, 2008).

Det periplasmatiske ekstraktet applikeres kitinkolonnen ved pH 8,0 slik at proteinet binder seg til kitinkolonnen. Proteiner som ikke binder til kolonnen blir vasket ut. Ved å tilsette syre i dem mobile fasen, i dette tilfellet eddiksyre pH 3,6, vil det bundet protein frigjøres fra kitinkolonnen.

#### Materialer

- Renses på kitinperler ved Biologic rensesystem.
- Periplasmatisk ekstrakt
- Buffer A
  - Ammoniumsulfat ( (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 1M
  - 50mM TrisHCl pH 8,0
- Buffer B
  - 20mM Eddiksyre, pH3,6

#### Metode:

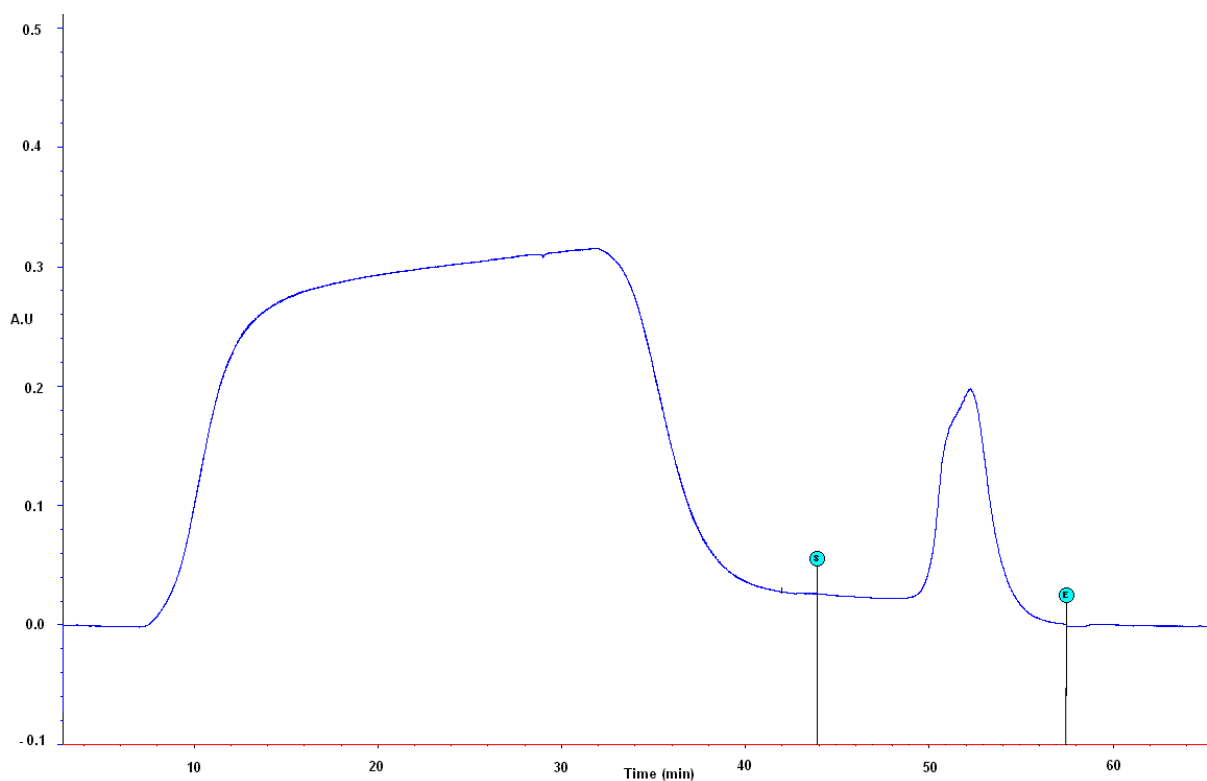
Kolonnen ble pakket med 10 mL kitinperler og koblet til BioLogic system med UV- detektor. Det periplasmatiske ekstraktet ble justert til samme konsentrasjon og pH som i buffer A. Dette ble utført ved å tilsette buffer A. Deretter ble buffer A påført kolonnen med en flow på 2,0 mL/min til baselinjen var stabil. 50 mL av det justerte periplasmatiske ekstraktet ble så tilført

### 3. Metoder

---

kolonnen. På grunn av det store volumet til det periplasmatiske ekstraktet, og fordi det ofte er et stort utbyttet, ble det valgt å rense det periplasmatiske ekstraktet i to omganger, for å unngå overbelastning av kolonnen. Buffer A ble påført kolonnen igjen til baselinjen var stabil, før buffer B tilført for å eluere ut proteinet. Proteinfraksjonene ble samlet i blåkorkrør og oppbevart i 20mM Tris/HCl pH 8 ved 4°C, til det ble konsentrasjonen ble sjekket ved Bradford Microassey (avsnitt 3.1.4) og renheten ved SDS-PAGE(avsnitt3.1.6) et typisk termogram er vist i figur 3.1

Lut(NaOH) ble brukt for å regenerere kolonnen, og kitinperlene oppbevares i 20 % EtOH ved 4°C.



**Figur 3.1:** Typisk kromatogram for rensing av CBP21. Y-aksen viser absorbans ,mens x-aksen viser tid. Den store toppen (waste toppen) elueres ut mellom 0 og 40 ml og CBP21 på den lille toppen som er avgrenset på figuren på ca 50 ml.

## 3. Metoder

---

### 3.5 Måling av proteinkonsentrasjon

#### 3.5.1 Kalibrering av Biophoto med Bradford Microassey

Ved hjelp av en standardkurve kan proteinkonsentrasjonen av en ukjent prøve bestemmes, da standardkurver uttrykker en sammenheng mellom konsentrasjon og absorbanse.

Standardkurven blir laget av proteinmålinger av forskjellige konsentrasjoner av et kjent protein, bovin serum albumin (BSA)

#### Materialer:

- Purified BSA
- 20mM TrisHCl
- BRPAD

#### Metode:

To paralleller av fortynningsrekke beskrevet i tabell 1 ble laget, i tillegg til to 1 mL blankprøver.

Før målingene ble tatt, ble apparatet nullstilt ved hjelp av en blankprøve. Det er viktig å måle fortyningene etter stigende konsentrasjon. Disse målingene ble brukt til å lage en standardkurve. Det ble kjørt to paralleller. Det ble observert et avvik på 6,5 %.

Tabell 1. Oversikt over fortynningsrekke ved kalibrering av Bradford Microassey-

Fortynningsrekke, µg/ml	BSA, µl	20mM TrisHCl, µl	BRPADR, µl	Totalvolum, Ml
1,25	10	790	200	1
2,50	20	780	200	1
5,00	40	760	200	1
7,50	60	740	200	1
15,00	120	680	200	1
Blankprøve	0	800	200	1



## 3. Metoder

---

### 3.5.2 Måling av proteinkonsentrasjonen

Bradford eller Bio-Rad metoden som den kalles, er en metode for å bestemme proteinkonsentrasjonen ved hjelp av spektrofotometri og et fargestoff.

Proteinløsningen tilsettes coomassie brilliant blått som er et fargestoff som har et absorpsjonsmaksimum ved 465nm. Fargestoffet danner et kompleks med peptidbindingen i proteinet og absorpsjonsmaksimumet forskyves til 595nm. Mengde protein øker dermed med proporsjonalt med absorpsjon ved 595nm

#### Materialer:

- 20mM TrisHCl
- BPADR (BioRad Protein Assay dye reagent)
- Renset CBP21

#### Metode:

Det ble laget 4 paralleller og prøvene ble tilsatt 200µl BPADR. Løsningen ble blandet godt og inkubert i romtemperatur i minimum 10 minutter, maksimum en time da absorbansen øker over tid. Som blank prøve ble 800µl 20mM TrisHCl brukt. Proteinkonsentrasjonen blir vist direkte med benevningen µg/mL

For utregning ble gjennomsnittet fra absorbansmålingene dividert på fortynningsfaktoren. Under hele prosedyren ble det arbeidet med hansker og i avtrekksskap.

## 3. Metoder

---

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

Dette er en rask og enkel metode som separerer proteinene med hensyn på molekylvekt. Med dette kan en kontrollere at fraksjonene fra rensingene er rene nok til videre bruk. Sodium dodecyl sulfate (SDS) er en anionisk detergent som består av en hydrofob og en hydrofil del. Den binder seg sterkt til proteinene og denaturerer dem. Dette skjer ved at den hydrofobe delen av SDS binder seg til den hydrofobe delen av proteinet, mens den hydrofile delen vender seg mot vann. Proteinene får da en negativ ladning. Denne negative ladningen vil få proteinene til å vandre mot den positive elektroden når proteinene blir plassert i et elektrisk felt. Gelen består av et nettverk av kopolymerer, og molekylenes vandringshastighet vil dermed være avhengig av størrelse.

#### Materialer:

- Proteinløsning til analysering
- Proteinstandard: Bench Mark Ladder
- NuPAGE® 10 % Bis-Tris Gel 1,0 mm x 10 well
- NuPAGE® Sæmpelbuffer (4x)
- NuPAGE® Sæmpel reducing agent (10x)
- MOPS SDS Running Buffer
- Proteinstandard
  
- Færgeløsning:
  - 0,1 % Coomassie Brilliant Blue
  - 10 % metanol
  - 10 % eddiksyre
  
- Avfærgingsløsning:
  - 10 % metanol
  - 10 % eddiksyre

### 3. Metoder

---

#### Metode

I et eppendorfrør ble 5 µL NuPAGE® Sampelbuffer (4x), 2 µL NuPAGE® Sample reducing agent(10x) og 10 µL proteinløsning fra de rensede proteinprøvene blandet sammen. For å denaturer proteinene ble prøven varmet opp ved 90C° i 10 minutter.

Den ferdig støpte gelen ble sammen med en veggplate satt direkte i elektroferesekammeret som et indre bufferkammer. Dette indre kammeret ble fylt til randen med MOPS SDS Running Buffer, mens det ytre kammeret kun ble fylt halvfullt med samme bufferen.

20 µl av de aktuelle prøvene ble applisert til hver sin gelbrønn med pipette før spenningen ble justert til 200V i 45 min.

Etter endt separering av proteinløsningen ble gelen inkubert i fargeløsning på risteinkubator i om lag 40 minutter. Deretter ble fargeløsningen fjernet før gelen ble avfarget ved hjelp av avfargingsløsning, også det på risteinkubator. Etter endt avfarging ble gelen skylt med vann og fotografert.

## 3. Metoder

---

### 3.7 Isotermisk titreringskalorimetri (ITC)

Kalorimetrimålingene ble utført på et VP-ITC instrument fra MicroCal, Wisman *et al.*(1989) har beskrevet dette instrumentet nærmere.

#### 3.7.1 Binding av allosamidin til HCHT

##### Materialer

HCHT, 15 $\mu$ M

Allosamidin 250  $\mu$ M

Kaliumfosfatbuffer (KPi), 20mM pH 6,0

PIPES, 20mM pH6,0

Imidazol, 20mM pH6,0

##### Metode

Prøvecellen ble skylt med dH<sub>2</sub>O 3-5 ganger både før og etter hver titrening, og i tillegg vasket med 0,1 M NaOH jevnlig. For å hindre dannelse av luftbobler ved titrering, ble proteinløsningene avgasset i om lag 20 min.

1,8 mL av proteinløsningene ble injisert i prøvecellen. Gjennom den roterende injeksjonssprøyta som har en rør hastighet på 260 rpm, ble 8,0  $\mu$ L av liganden injisert i proteinløsningen. Det ble satt til ligand helt til løsningen var mettet, det vil si mellom 22-27 injeksjoner. Intervallet mellom hver injeksjon var på 180 sekunder. Det ble gjennomført minst 3 paralleller av hver forsøksserie.

For HCHT ble forsøkene utført i henholdsvis kaliumfosfatbuffer pH6,0 ved 4 ulike temperaturer fra 15°C til 37°C for å studere temperaturavhengigheten. Det ble i tillegg utført forsøk i PIPES og imidazolbuffer ved pH6,0 ved 30°C for å studere buffereffekt.

Dataene ble analysert ved hjelp av ORGIN 7.0, og for å tilpasse dataene ble standard 1:1 bindingsmodell benyttet.

## 3. Metoder

---

### 3.7.2 Binding av metaller til CBP21

#### Materialer

CBP21 10 $\mu$ M

MgCl<sub>2</sub> 250  $\mu$ M

Cu 250  $\mu$ M

20 mM Trishbuffer pH 80

#### Metode:

Prøvecellen ble skylt med dH<sub>2</sub>O 3-5 ganger både før og etter hver titrening, og i tillegg vasket med 0,1 M NaOH jevnlig. For å hindre dannelse av luftbobler ved titrering, ble proteinløsningene avgasset i om lag 20 min.

1,8 mL av proteinløsningene ble injisert i prøvecellen. Gjennom den roterende injeksjonssprøyta som har en rør hastighet på 260 rpm, ble 8,0  $\mu$ L av liganden injisert i proteinløsningen. Det ble satt til ligand helt til løsningen var mettet, det vil si mellom 22-27 injeksjoner. Intervallet mellom hver injeksjon var på 180 sekunder. Det ble gjennomført minst 3 paralleller av hver forsøksserie.

For CBP21 mot magnesiumioner (Mg<sup>2+</sup>) ble forsøkene utført i Trishbuffer pH 8,0 ved 25°C. For CBP21 mot kopperioner (Cu<sup>2+</sup>) ble forsøkene utført under betingelsen  $t = 30$  °C med samme buffer og pH.

Dataene ble analysert ved hjelp av ORIGIN 7.0, og for å tilpasse dataene ble standard 1:1 bindingsmodell benyttet.

## 4. Resultater

---

### 4. Resultater

Innenfor bindingsstudier, er isotermisk titerings kalorimetri (ITC) en vel anvendt metode for å studere interaksjoner mellom protein-ligand, protein-protein, ligand-ligand, nukleinsyrelipid og antibody-antigen.

Ut i fra et ITC forsøk blir  $K_A$  og  $\Delta H$  gitt direkte, mens  $\Delta G$ ,  $\Delta S$  og  $K_D$  beregnes ved hjelp av termodynamiske likninger (se seksjon 1.6) og fra forholdet  $K_A=1/K_D$ . I forsøk utført ved forskjellige temperaturer kan endringen i varmekapasiteten ( $\Delta C_p$ ) for bindingsreaksjonen bestemmes.

#### 4.1.1 Binding av allosamidin til HCHT.

HCHT er som nevnt tidligere en av to kitinaser som produseres av mennesker. Dette enzymet ser ut til å være en del av det menneskelige immunforsvaret mot sopp. Da det nylig er vist at nivåene av HCHT bioaktivitet og proteiner blir signifikant økt i lunger hos pasienter som lider av systemisk sklerose, er dette et foreslått behandlingsområde. På bakgrunn av dette er det av interesse å studere det termodynamiske uttrykket til HCHT ved binding til den velkjente familie18 inhibatoren allosamidin.

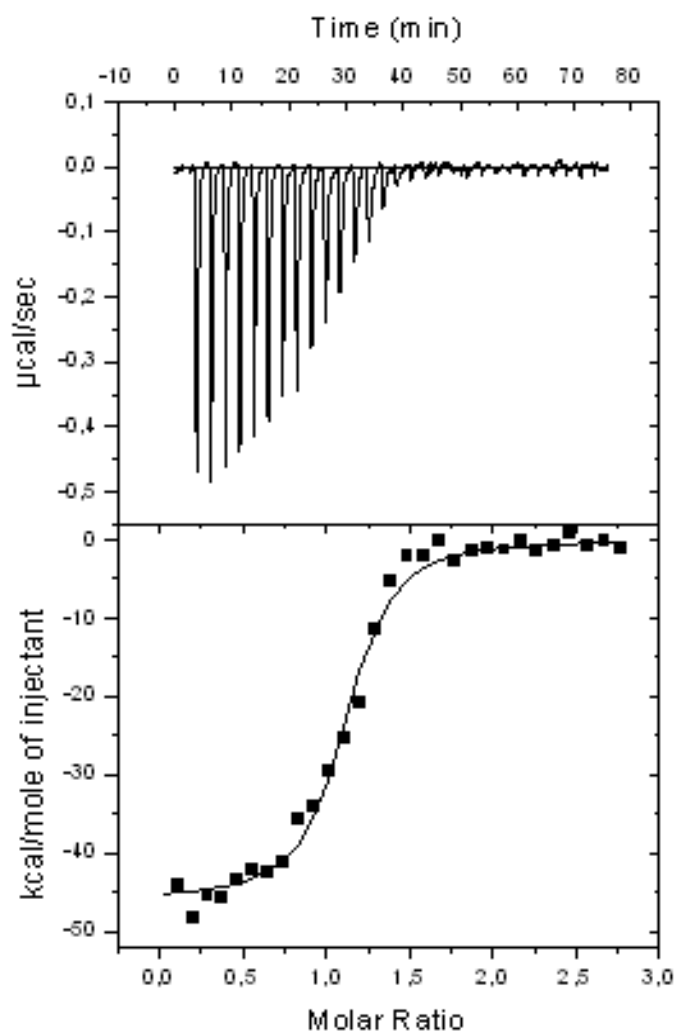
Ved bruk av ITC så ble binding av allosamidin til HCHT studert ved forskjellige temperaturer (20-37°C). Målingene ble utført i kaliumfosfatbuffer med konsentrasjon på 20mM ved pH 6.0.

Et typisk ITC termogram og en teoretisk tilpasning til forsøksdataene ved 30°C er vist i figur 4.1. Ved denne temperaturen bindes allosamidin relativt sterkt til HCHT med en  $K_d = 0,20 \pm 0,03 \mu\text{M}$  og  $\Delta G_r^\circ = -38,9 \pm 0,4 \text{ kJ/mol}$ . Bindingen er drevet av en gunstig entalpiforandring ( $\Delta H_r^\circ$ ) på  $-50,2 \pm 1,2 \text{ kJ/mol}$ , og en entropiforandring ( $\Delta S_r^\circ$ ) på  $-37 \pm 4 \text{ J/Kmol}$ .

Varmeendringen til reaksjonen ble bestemt til  $-602 \pm 63 \text{ J/K mol}$ , ved hjelp av likning 1.6.7.

## 4. Resultater

---



**Figur 4.1:** Toppanelet viser termogram, bunnepanelet viser bindings isothermen for titrering av allosamidin ved betingelsene  $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 20 mM kaliumfosfat buffer ved pH 6.0).

## 4. Resultater

---

### 4.1.2 Effekt av bufferionisering

Den potensielle protonoverføringen som er koblet til binding av allosamidin til HCHT ble undersøkt ved å teste et mulig bidrag fra bufferionisering på den observerte bindingsentalpien.

Det ble utført ITC målinger med reaksjonsbufferne pipes, imidazole og kaliumfosfatbuffer ved pH 6,0. Konsentrasjonen til disse bufferne var lik, mens ioniseringsentalpien var ulik ved 30°C.

Den eksperimentelle bindingsentalpien ble plottet som en funksjon av ioniseringsentalpien til bufferen (Figur 4.2) og tilpasset likning 4.1.1,

$$\Delta H_{\text{obs}} = \Delta H_{\text{bind}} + nH^+ \Delta H_{\text{ion}} \quad (4.1.1)$$

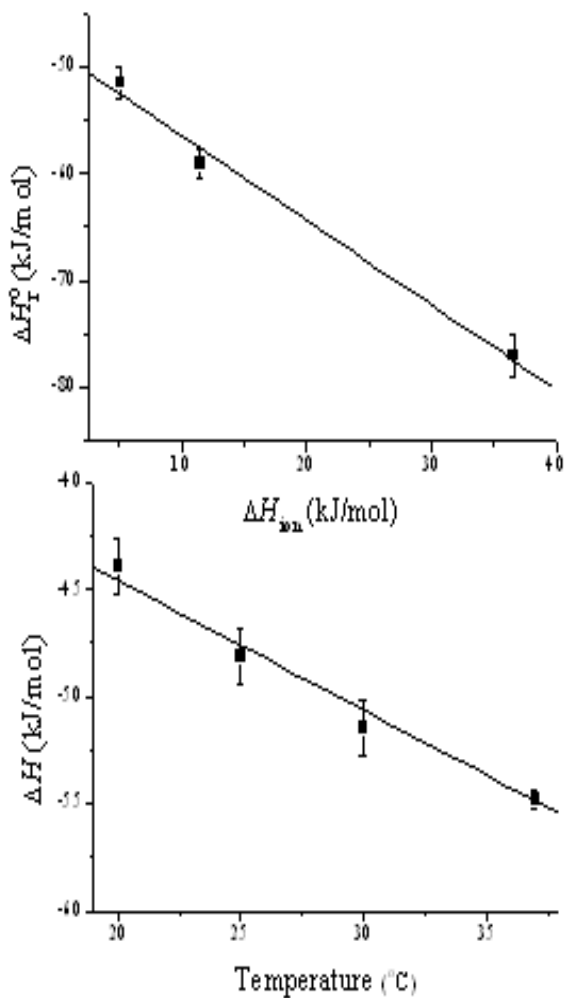
hvor  $\Delta H_{\text{bind}}$  omfatter den reelle bindingsvarmen, og  $nH^+$  er antall protoner tatt opp, eller frigitt av bufferen ved binding. (Baker, Murphy 1996)  $\Delta H_{\text{bind}}$  omfatter  $\Delta H_{\text{int}}$  og  $\Delta H_{\text{konf}}$  i likning 1.6.5 seksjon 1.6.3

Lineær regresjonsanalyse av resultatene gir et stigningstall på  $0,79 \pm 0,07$ . Dette indikerer at det blir frigitt 0,79 protoner fra enzym-ligand komplekset til bufferen ved pH 6.0.(figur 4.2). Skjæringspunktet angir  $-48.5 \pm 1.4$  kJ/mol. Dette forteller oss at den buffer avhengige entalpiforandringen er  $\Delta H_{\text{bind}} = -48.5 \pm 1.4$  kJ/mol.



## 4. Resultater

---



**Figur 4.2:** Toppanelet viser entalpiendringen for reaksjonen plottet mot ioniseringsentalpiforandringen ved forskjellige buffere ved pH 6. Forsøkene ble utført ved 30 °C i henholdsvis 20 mM kaliumfosfat, PIPES, og imidazolebuffer, noe som gir en overføring av  $0,79 \pm 0,07$  protoner ved etableringen av HCHT-allosamidin kompleks. Dette gir en bufferavhengig entalpi forandring på  $\Delta H_{ion}^{\circ}$  of  $-48,5 \pm 1,4$  kJ/mol. Den nederste panelet viser, temperatur avhengighet av allosamidin binding til HCHT ved pH 6,0. entalpiendringen  $\Delta H_r^{\circ}$  plottet mot temperatur gir endring av varmekapasitet ( $\Delta C_{p,r}$ ). Verdien av  $\Delta C_{p,r}$  er  $-602 \pm 63$  J/K mol.

## 4. Resultater

---

### 4.1.3 Parameterisering av entropidelen

Entropiforandringen,  $\Delta S$ , for en bindingsreaksjon kan uttrykkes som summen av solvering, konformasjons og translasjons endringer for reaksjonen. (likning 1.6.6). En kan ved en slik parameterisering se hvilke gunstige og ugunstige entropiske bidrag som til sammen utgjør reaksjonsentropien. Dette kan gi oss verdifull informasjon om endringer i struktur og solvering som skjer ved kompleksdannelse.

$\Delta S_{\text{solv}}$  er den observerte forandringen når vann frigjøres ved binding, og dette er spesielt viktig for hydrofobe grupper. Endringer i solveringsentropien er som nevnt et resultat av solvatisering(hydrering)/desolvatisering(dehydrering) ved binding, og er tilnærmet lik null ved 385,15 K.  $\Delta C_{p,r}$  vil da være relatert til endringer av solvatiseringsentropien i bindingsreaksjonen ved  $t = 30$  som beskrevet i likning 4.1.2

$$\Delta S_{\text{solv}} = \Delta C_{p,r} \ln\left(\frac{303K}{385K}\right) \quad (4.1.2)$$

Ved å benytte seg av forholdene over, kan en beregne  $-T \Delta S_{\text{solv}}$  som gir en verdi på  $-41 \pm 4,4$  kJ/mol av den totale frie energiforandringen, ( $\Delta G$ ) på  $-38,9$  kJ/mol for bindingsreaksjonen. Dette på bakgrunn av verdien til  $\Delta S_{\text{solv}}$  som i dette tilfelle er  $138 \pm 15$  J/K mol.

Siden binding av allosamidin til kitinaser er assosiert med delvis protonoverføring, så er det viktig å vurdere temperaturavhengigheten til  $\Delta H_{\text{ind}}$ . Ved pH 6.0 (hvor det er protonoverføring) så er denne den samme innen for eksperimentelle feil som når kaliumfosfat er buffer.

Videre så kan forandring i translasjonsentropi,  $\Delta S_{\text{mix}}$  til reaksjonen bli beregnet som en «cratic term», en statistisk korreksjon, som reflekterer blandingen mellom buffer og protein-ligand kompleks, og forandring i translasjons/rotasjons frihetsgrader. Se likning 4.1.3 (Baker, Murphy 1997)

$$\Delta S_{\text{mix}} = R \ln\left(\frac{1}{55,5}\right) \quad (4.1.3)$$

Ved å bruke denne tilnærmingen, så vil  $\Delta S_{\text{mix}}$  med verdien  $-33$  J/Kmol, beregnes til  $-T \Delta S_{\text{mix}}$  på  $10,0$  kJ/mol. Dette åpner for beregning av konformasjons entropiforandringen ( $\Delta S_{\text{konf}}$ ) som blir  $-144 \pm 14$  J/K mol, som beskrevet i likning 4.1.1, som svarer til en  $-T \Delta S_{\text{konf}}$  på  $43,1 \pm 14$  kJ/mol

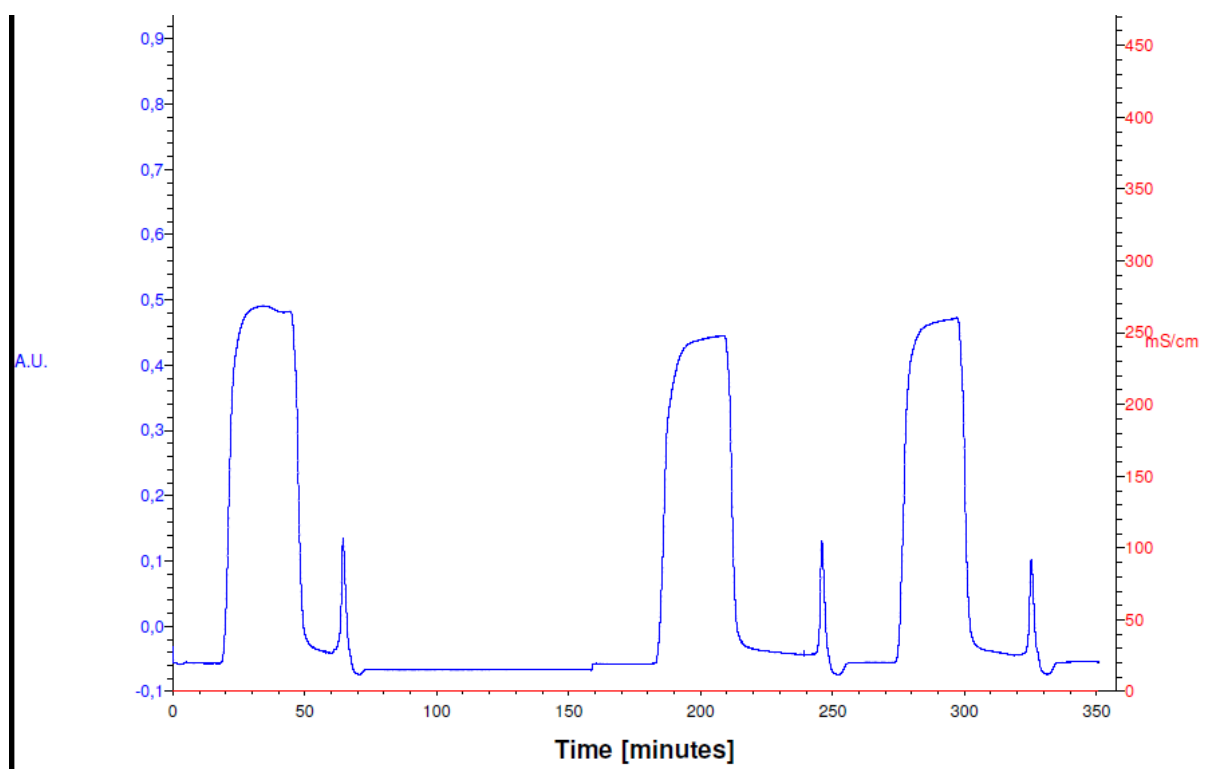
## 4. Resultater

---

### 4.2 Rensing av CBP 21

#### 4.2.1 Rensing av CBP 21 på kitinkolonner

CBP 21 ble renset på kitinkolonner, dette er beskrevet i avsnitt 3.2. I figur 4.3, vises kromatogrammet fra rensingen. Ulike komponenter fra det periplasmatiske ekstraktet vises i voidtoppen, mens det er i den mindre toppen at CBP 21 blir eluert ut fra kolonnen.



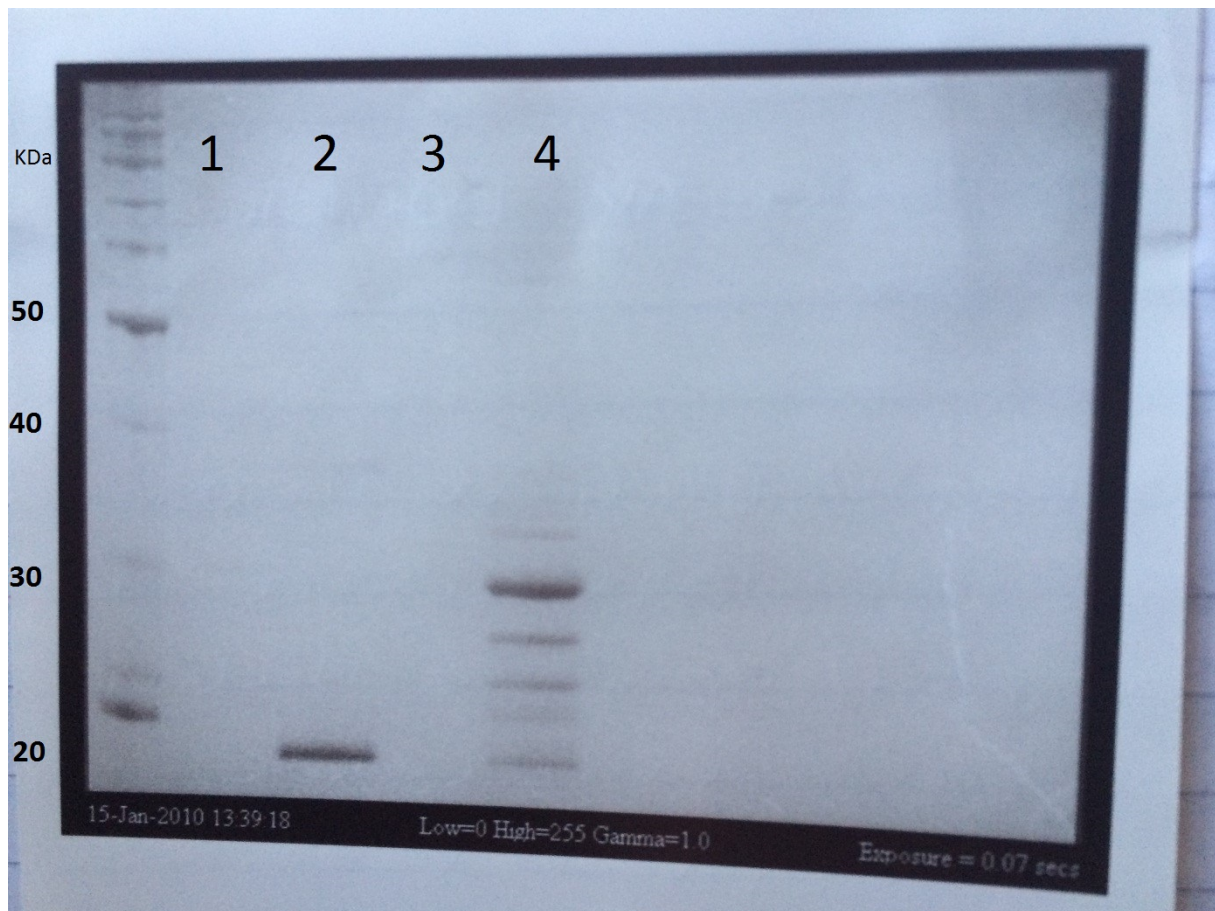
**Figur 4.3:** Kromatogram fra rensing av CBP21 ved hjelp av kitinkuler. De store toppene er void topper, de små toppene er rent proteineulat.

## 4. Resultater

---

### 4.2.2 SDS-PAGE

For å kontrollere renheten av de eluerte fraksjonene etter rensingen, ble fraksjonene analysert ved bruk av SDS-PAGE som beskrevet i avsnitt 3.2.4. CBP21 har en molekylvekt på 39 KDa. Bånd på gelen rundt 39 KDa bekrefter da at dette er protein med rett størrelse. Under vises gelbilde fra en utvalgt analyse.



**Figur 4.4:** SDS-page gel av CBP21 etter rensing på kitinkolonne. Brønn 1 viser ladder, brønn 3 viser klar bånd for protein med rett størrelse og brønn 4 viser periplamatisk ekstrakt.

Rent proteineluat ble deretter oppkonsentrert som beskrevet i avsnitt 3.2.5.

## 4. Resultater

---

### **4.2.3 Bestemmelse av proteinkonsentrasjon. Fluorimetrisk metode.**

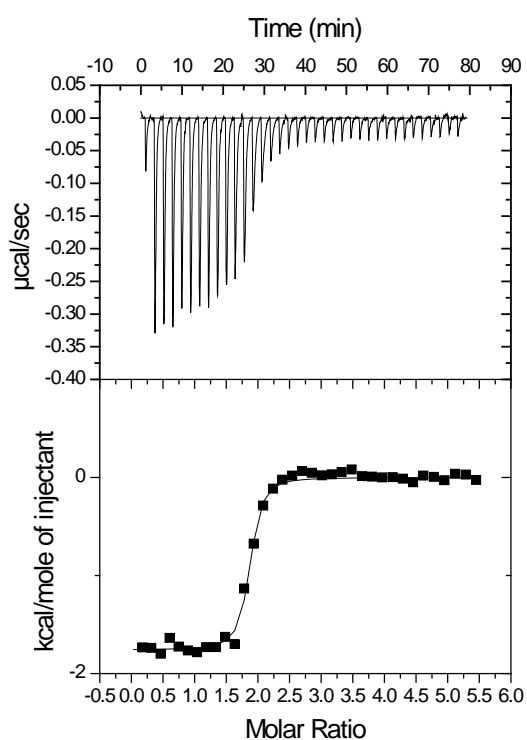
Proteinkonsentrasjonen ble som tidligere nevnt i avsnitt 3.2.6, bestemt ved hjelp av Bradford metoden som er en fluorimetrisk metode for bestemmelse av proteinkonsentrasjon. En typisk gjennomsnitts konsentrasjon ble målt til å være 5,6 mg/ml CBP21 i batch.

## 4. Resultater

### 4.3 Binding av metaller til CBP21

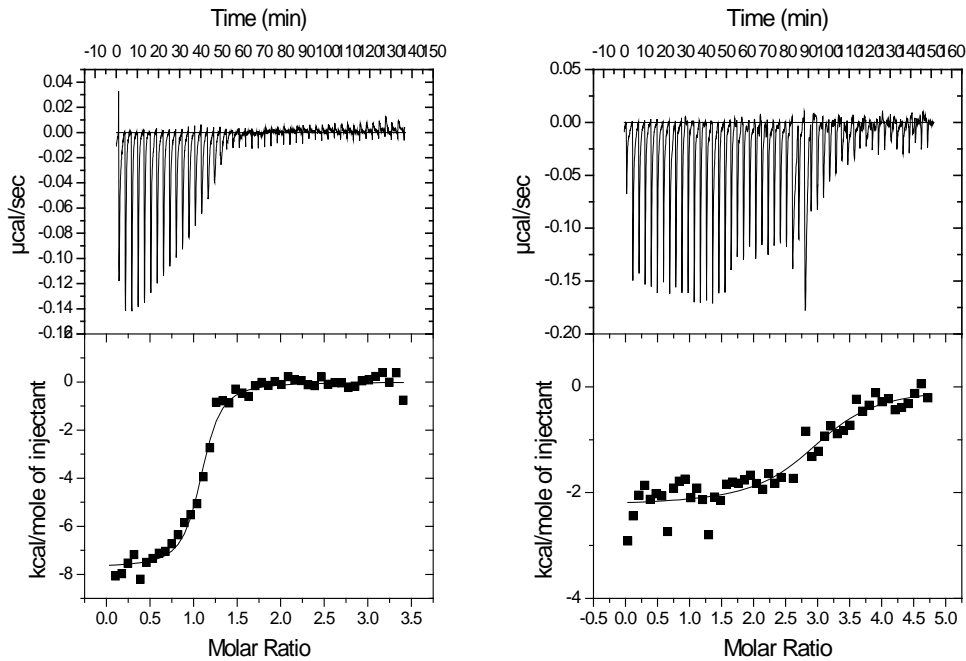
CBP21 er som tidligere nevnt et kitinbindende protein som skiller ut sammen med kitinasene når *S.marcescens* bryter ned kitin (Suzuki *et al* 1998). Det har vist seg at CBP21 kun er med på nedbrytningen av  $\beta$ -kitin. Vaaje-Kolstad *et al.* (2005a) har nylig bestemt strukturen til CBP21 og at dette enzymet fremmer kitinasenes nedbrytning av kitin. Dette fordi bindingen av CBP21 til det uløselige substratet, fører til strukturendringer i kitin, slik at substratet blir mer tilgjengelig. Videre er det kjent at toverdige metall er viktig for enzymaktiviteten til en rekke enzymer. CBP21 er funnet til å bli inhibert av EDTA, (EDTA binder og fjerner toverdige metaller i bindingssetet til CBP21) og at aktiviteten kan gjenopprettes ved tilsetning av toverdige kation slik som  $Mg^{2+}$  eller  $Zn^{2+}$  (Vaaje-Kolstad *et al.* 2010).

På bakgrunn av artikkelen til Vaaje-Kolstad *et al.* (2010) ble metallet  $Mg^{2+}$  titrert mot CBP21 ved bruk av isotermisk titreringskalorimetri. Termogram og bindingsisoterm for titreringen vises i figur 4.5. Bindingen viste seg å ha en støkiometri høyere enn 2:1.



**Figur 4.5:** Binding av  $Mg^{2+}$  til CBP21 ved 0,25 mM og  $t = 25^{\circ}C$ . pH 8,0

## 4. Resultater



**Figur 4.6:** Binding av  $\text{Cu}^{2+}$  til CBP21 ved 5  $\mu\text{M}$  og  $t = 6^{\circ}\text{C}$  (venstre) og 20  $\mu\text{M}$  og  $t = 30^{\circ}\text{C}$  (høyre). Figurene viser at ved høyere temperatur og konsentrasjon av CBP21 gir en økt støkiometri for bindingsreaksjonen.

I Quinland *et al.* (2011) ble det vist at LPMO enzymer er kobberenzymmer. På bakgrunn av dette ble  $\text{Cu}^{2+}$  titrert mot CBP21. Termogram og bindingsisoterm for  $\text{Cu}^{2+}$  mot CBP21 vises i figur 4.6.

Ved betingelsen  $t = 30^{\circ}\text{C}$  og CBP21konsentrasjon 20 $\mu\text{M}$ , vises det også her en bindings støkiometri som var høyere 1:1. Disse forsøkene ble gjort mot slutten av arbeidet mitt, det var ikke tid for flere forsøk.

Morten Sørлие jobbet videre med å finne riktige betingelser for ITC forsøk. Dette ble oppnådd under betingelsene  $t = 6^{\circ}$  og CBP21 konsentrasjon på 5 $\mu\text{M}$ . Her viser binding av  $\text{Cu}^{2+}$  en 1:1: en støkiometri som er i overensstemmelse med NMR og EPR resultater (Aachmann *et al* 2012; Forsberg *et al.* 2012)

Resultatene vil ikke bli diskutert videre i oppgaven.

## 5. Diskusjon

---

### 5. Diskusjon

I naturen forkommer kitinaser i organismer som selv produserer kitin, eller i organismer som utnytter kitin som næringskilde. Det var lenge antatt at menneskekroppen ikke produserte kitinaser, på grunn av manglende substrater. I dag vet vi at det humane genomet koder for 8 familie kitinaser (Bussink *et al.* 2007), hvor HCHT og AMCCase har vist enzymatisk aktivitet. Begge disse kitinasene er en del av vårt medfødte immunforsvar (Elias *et al.* 2005), og assosieres med en rekke sykdommer.

Inhibering av humane kitinaser er dermed av stor medisinsk interesse.

#### 5.1 Binding av allosamidin til HCHT

I den senere tid er det oppdaget at økt nivå av HCHT bioaktivitet og protein i sirkulasjon og lunger hos mennesker som lider av systemisk sklerose, og er forslått som et terapeutisk mål (Lee *et al.* 2012).

På bakgrunn av dette er det av interesse å studere det termodynamiske uttrykket til HCHT ved binding til den velkjente familie 18 inhibitoren allosamidin. Dette for å oppnå en bedre forståelse av enzymmekanismen til HCHT.

Ved å bestemme de termodynamiske parametere ved binding av allosamidin til HCHT, har vi kunnet sammenligne disse med termodynamiske parameter for andre kitinasesystemer ved binding til allosamidin, som nylig har blitt studert (Cederkvist *et al.* 2007; Baban *et al.* 2010) (tabell 5.1)

ChiA og ChiB fra den gramnegative kitinolytiske jordbakterien, *Serratia marcescent*, er begge prosessive enzymer, som binder på endene av polymeren i motsatte retninger. ChiA bindes fra den reduserende enden, mens ChiB bindes fra den ikke reduserende enden (Horn *et al.* 2006; Zakariassen *et al.* 2009). Prosessivitet er enzymets evne til å katalysere de påfølgende reaksjonene uten å slippe substratet. For at enzymet skal være prosessivt, må enzymet holdes nært substratet mellom de hydrolytiske gruppene.



## 5. Diskusjon

**Tabell 5.1.** Termodynamiske parametre for binding av allosamidin til HCHT ved  $t = 30^\circ \text{C}$ , bestemt av isoterm titrering kalorimetri.

$\Delta G_r^{\text{oa}}$	$\Delta H_r^{\text{oa}}$	$-T\Delta S_r^{\text{oa}}$	$-T\Delta S_{\text{solv}}^{\text{oa,b}}$	$-T\Delta S_{\text{conf}}^{\text{oa,c}}$	$-T\Delta S_{\text{mix}}^{\text{oa,d}}$	$\Delta C_{p,r}^{\text{oe,f}}$
<u>HCHT-allosamidin</u>						
$-38.9 \pm 0.4$	$-50.2 \pm 1.2$	$11.3 \pm 1.2$	$-41.8 \pm 4.4$	$43.1 \pm 4.2$	10.0	$-602 \pm 63$
<u>ChiA-allosamidin<sup>g</sup></u>						
$-39.3 \pm 0.9$	$-23.4 \pm 0.9$	$-15.9 \pm 1.7$	$-20.4 \pm 3.1$	$-5.2 \pm 3.5$	10.0	$-255 \pm 52$
<u>ChiB-allosamidin<sup>h</sup></u>						
$-38.0 \pm 1.0$	$18.5 \pm 0.9$	$-56.5 \pm 1.7$	$-21.0 \pm 1.1$	$-45.2 \pm 2.0$	10.0	$-263 \pm 16$

<sup>a</sup> (kJ/mol);

<sup>b</sup>  $\Delta S_{\text{solv}}^\circ = \Delta C_p \ln(T_{293 \text{ K}}/T_{385 \text{ K}})$  (Baker *et al.* 1996; Baker *et al.* 1997) ;

<sup>c</sup> derived using  $\Delta S_r^\circ = \Delta S_{\text{solv}}^\circ + \Delta S_{\text{mix}}^\circ + \Delta S_{\text{conf}}^\circ$ ;

<sup>d</sup>  $\Delta S_{\text{mix}}^\circ = R \ln(1/55.5) = -33 \text{ J/K mol}$  ("cratic" term) (Fusetti *et al.*)

<sup>e</sup> (J/K mol);

<sup>f</sup> disse dataene er regnet ut fra tempersturvhengigheten til  $\Delta H_r^\circ$ ;

<sup>g</sup> fra Baban *et al.* 2010

<sup>h</sup> fra Cederkvist *et al.* 2007

## 5. Diskusjon

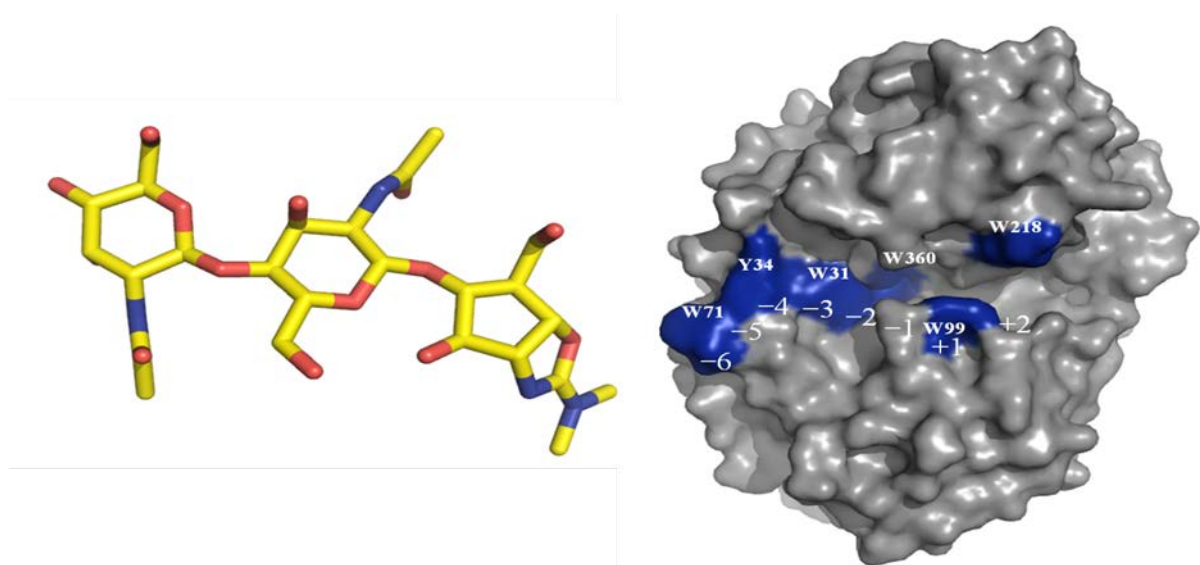
---

På overflaten av disse to enzymene (ChiA og ChiB), så er det eksponerte aromatiske aminosyrer som starter fra det kitin-bindende domenet, og som strekker seg inn i det katalytiske doment. Inn i det aktive setet så har ChiA et Phe-Tyr-Trp-Trp-Trp-Phe motiv som strekker seg fra subsetet -6 til subsetet +2 (Perrakis *et al.* 1994) hvor Trp<sup>167</sup> i subsetet -3 er viktig for enzymets prosessive karakter (Zakariassen *et al.* 2009).

HCHT er lik ChiA ved at den har et Trp-Tyr-Trp-Trp-Trp-Trp motiv i tillegg til å være prosessivt (Fusetti *et al.* 2002; Eide *et al.* 2012). ChiB viser seg å være lik HCHT ved at de tre siste aminosyrene (Trp-Trp-Trp) går fra subsete -1 til subsetet +2 (van Aalten *et al.* 2003). For den prosessive mekanismen til enzymet viser det seg at subsetet +1 (Trp<sup>97</sup>) og subsetet +2 (Trp<sup>220</sup>) er viktige (Horn *et al.* 2006).

Allosamidin binder fra -3 til -1 i ChiA, ChiB og HCHT. I ChiA så bindes allosamidin til substratbindingssetet (hvor substratet vil forbli bundet etter en prosessive hydrolyse), mens i ChiB så binder allosamidin seg i produktbindingssetet (hvor kitobiose blir frigitt fra enzymet etter en prosessiv hydrolyse) (Nordberg *et al.* 2010).

Alle tre kitinasene binder allosamidin fra subsete -3 til -1 med lik bindingsstyrke, ( $\Delta G_r^\circ \approx -39 \text{ kJ/mol}$ ) (tabell 5.1) (figur 5.1) allikevel vises det stor forskjell i den termodynamiske signatur til hver av disse tre kitinasene.



**Figur 5.1:** Krystallstrukturen til allosamidin, vises til venstre (Fusetti *et al.* 2002), og HCHT vises til høyre. Allosamidin binder i subsete -3 til -1.

## 5. Diskusjon

---

HCHT og ChiA er like ved at de har en entalpi og solvatiseringsentropiendring som gir det mest gunstige bidraget til endring i den frie energien, riktignok i større grad for HCHT enn for ChiA. Interaksjonene med residuene som er ansvarlige for substratbindingen gjennom den prosessive hydrolysen, viser seg gunstige for entalpiforandringen når allosamidin bindes til ChiA (Baban *et al.* 2010) i f.eks. Trp<sup>167</sup>. I ChiB bindes allosamidin som nevnt tidligere i produktbindingssetet, med en medfølgende ugunstig entalpiforandring ( $\Delta H_r^\circ = 18,5$  kJ/mol).

På bakgrunn av dette foreslås det at HCHT kutter kitin i samme retning som ChiA, fra den reduserende enden, og at subsetene +1 (Trp<sup>99</sup>) og +2 (Trp<sup>218</sup>) er delaktige i produktfrigjøring slik som Trp<sup>275</sup> og Phe<sup>396</sup> gjør i ChiA.

Med tanke på å bruke inhibering som et medisinsk middel, så viser Freire (2008) at det er fordelaktig med en binding som er entalpi drevet sammenlignet med en binding som er entropidrevet. Hvilket er tilfelle for binding mellom HCHT og allosamidin.

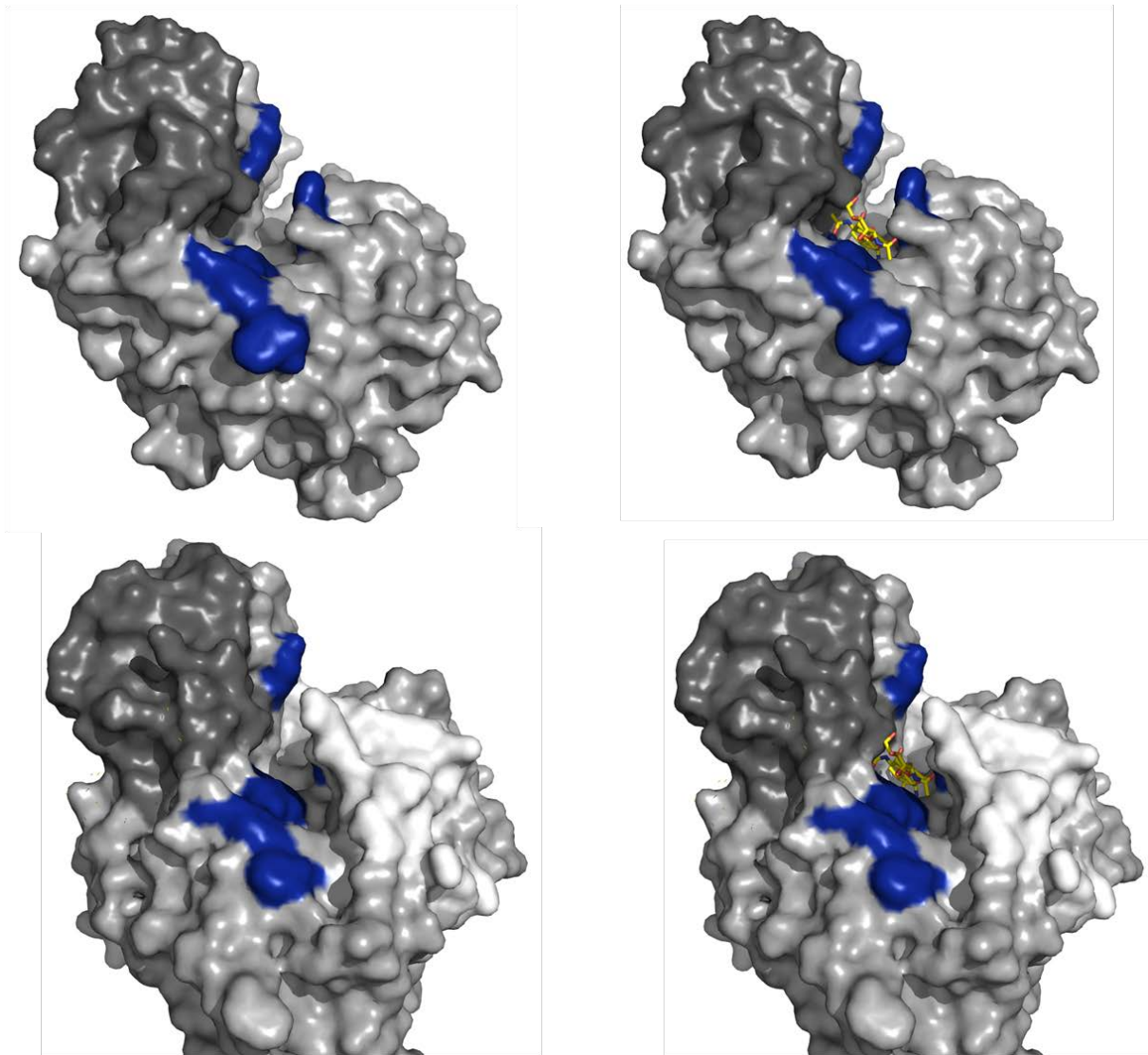
Den mest overraskende observasjonen er den store forskjellen i konformasjons entropiforandringen mellom HCHT og ChiB på hele 88,3 kJ/mol. Den mest gunstige endringen i konformasjonsentropien viste seg for bindingen mellom ChiB og allosamidin ( $-T\Delta S_{\text{konf}} = -45,2 \pm 2,0$  kJ/mol) og den mest ugunstige endringen i konformasjonsentropien vistes for binding mellom HCHT og allosamidin ( $-T\Delta S_{\text{konf}} = 43,1 \pm 4,2$  kJ/mol)

Dette tyder på at residuene som interakterer med allosamidin, i både HCHT og ChiB, har forskjellige roller med tanke på substratbindingen.

Selv om HCHT og ChiA begge er prosessive enzymer, med likt aromatisk motiv i det aktive setet og at det degraderer substratet i lik retning, viser det seg at det er en merkbar forskjell i solvatiseringsentropien. HCHT har dobbelt så stor observert solvatiseringsentropi i forhold til den hos ChiA ( $-T\Delta S_{\text{sol}} = -41,8$  kJ/mol for HCHT og  $-T\Delta S_{\text{sol}} = -20,4$  kJ/mol for ChiA). Ved å studere det aktive setet i fra det negative subsetet (figur 5-2) så ser en at begge enzymer har en substratkløft med et  $\alpha/\beta$  innskuddsdomene som utgjør den venstre vegg i kløften. Allikevel er det en klar forskjell, ved at ChiA har to små  $\alpha$ -helikser som går fra Gly<sup>196</sup> til Glu<sup>222</sup>. Disse former en rett vegg i kløften. De to aminosyrene Tyr<sup>418</sup> og Thr<sup>419</sup> danner er vegg ved enden av det aktive setet som ikke ses hos HCHT. Dette fører til at det aktive setet hos HCHT er mer åpent sammenliknet med det aktive setet hos ChiA.

## 5. Diskusjon

---



**Figur 5.2:** Krystallstrukturen til HCHT (topp) og ChiA (bunn) med og uten allosamidin. Ved å sammenligne strukturen til disse to kitinasene ser en tydelig at det aktive setet i HCHT er mer åpent enn i ChiA (Papanikolaou *et al.* 2003)

Det har også vist seg at den observerte forandringen i solvatiseringsentropien for HCHT er lik ChiC som viser  $-T\Delta S_{\text{sol}} = -39,3$  kJ/mol (Baban *et al.* 2010). ChiC er en endokitinase med et grunt og åpent aktivt sete (Payne *et al.* 2012). Dette antyder at HCHT har mer endo-aktivitet enn ChiA. Begge enzymer har nylig vist seg å ha endo-aktivitet mot den vannløslige kitosan (Eide *et al.* 2012). Endo-aktivitet kan fremme økt substratbinding fordi enzymet ikke trenger å være avhengig av å finne endene.

## 6. Videre arbeid

---

### **6. Videre arbeid**

Inhibering av humane kitinaser er av stor medisinsk interesse. Etersom de humane kitinasene er en viktig del av immunforsvaret er det viktig å kjenne til mekanismene ved inhibering av disse kitinasene. Et mål for videre studier vil være å foreta en detaljert termodynamisk undersøkelse av AMC<sub>1</sub> med binding til allosamidin.

## 7. Referanser

---

### 7. Referanser:

Aachmann, F. L., Sørli, M., Skjåk-Bræk, G., Eijsink, V. G. H., and Vaaje-Kolstad, G. (2012) NMR structure of a lytic polysaccharide monooxygenase provides insight into copper binding, protein dynamics, and substrate interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 18779–18784.

Avacta analytical <http://www.avactaanalytical.com/analytical-services/technical-capabilities/isothermal-titration-calorimetry> (lest 05 aug 2013)

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

Baker, B.M, Murphy, K.P, Evaluation of linked protonation effects in protein binding reactions using isothermal titration calorimetry, *Biophys. J.* 71 (1996) 2049-2055

Baker, B.M, Murphy, K.P, Dissecting the energetics of a protein-protein interaction: the binding of ovomucoid third domain to elastase, *J. Mol. Biol.* 268 (1997) 557-569

Boot, R.G., E.F. Blommaart, E. Swart, K. Ghauharali-van der Vlugt, N. Bijl, C. Moe, A. Place, and J.M. Aerts, (2001) *Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. J Biol Chem*, 276(9): p. 6770-8.

Brurberg, M. B., B. Synstad, S.S. Klemsdal, D.M. Van Aalten, L. Sundheim, and, and Eijsink, V. G. H., 2000, "Chitinases from *Serratia marcescens*," *Recent Research Development in Microbiology*

Bussink, A. P., Speijer, D., Aerts, J. M. F. G., Boot, R. G.. (2007) Evolution of Mammalian Chitinase(-Like) Members of Family 18 Glycosyl Hydrolases. *The Genetics Society of America*. **177**: 959-970

CAZy (2006). *Glycoside Hydrolase family classification*. Tilgjengelig fra: <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html> (Lest: 03.08.2013).

Cederkvist, F.H, S.F.Saua, V.Karlsen, V.G.H.Eijsink, M.Sørli, Thermodynamic analysis of allosamidin binding to family 18 chitinase, *Biochemistry* 46(2007)12347-12354

Chou, Y. T., Yao, S., Czerwinski, R., Fleming, M., Krykbaev, R., Xuan, D., Zhou, H., Brooks, J., Fitz, L., Strand, J., et al. (2006). Kinetic characterization of recombinant human acidic mammalian chitinase. *Biochemistry*, 45 (14): 4444-54.

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

Dewick, P. M. (2009). *Medicinal natural products; A biosynthetic approach* b. 3: John Wiley & Sons Ltd.

## 7. Referanser

---

- Eide, K.B., Norberg, A. L., Heggset, E. B., Lindbom, A. R., Vårum, K. M., Eijsink, V. G. H., Sørli, M. Human Chitotriosidase-Catalyzed Hydrolysis of Chitosan. *Biochemistry*. 51(2011) 487-495.
- Eide, K.B., Norberg, A. L., Heggset, E. B., Lindbom, A. R., Vårum, K. M., Eijsink, V. G. H., Sørli, M.. (2011) The action of the human chitriosidase on chitosan, *Biochemistry* 51 (2012) 487-495
- Eijsink, V. G., Vaaje-Kolstad, G., Varum, K. M. & Horn, S. J. (2008). Towards new enzymes for biofuels: lessons from chitinase research. *Trends in Biotechnology*, 26 (5): 228-35.
- Elias, J. A., Homer, R. J., Hamid, Q. & Lee, C. G. (2005). Chitinases and chitinase-like proteins in T(H)2 inflammation and asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 116 (3): 497-500.
- Forsberg Z., Åsmund Kjendseth Røhr, ‡ Sphanit Mekasha, K. Kristoffer Andersson, ‡ Vincent G. H. Eijsink, Gustav Vaaje-Kolstad, and Morten Sørli «Comparative Study of Two Chitin-Active and Two Cellulose-Active AA10-Type Lytic Polysaccharide Monooxygenases» *Biochemistry* 2014, 53, 1647–1656
- Fusetti, F., von Moeller, H., Houston, D., Rozeboom, H. J., Dijkstra, B. W., Boot, R. G., Aerts, J. & van Aalten, D. M. F. (2002). Structure of human chitotriosidase - Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (28): 25537-25544.
- Freire, E. Do enthalpy and entropy distinguish first class from best in the class, *Drug Discov. Today* 13(2008)867-874
- Harris, D. C. (2007). *Quantitative Chemical Analysis, seventh edition*, W.H. Freeman and Company, New York.
- Henrissat, B. & Davies, G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycosidehydrolases. *Curr Opin Struct Biol*, 7 (5): 637-44.
- Hollak, C.E., S. van Weely, M.H. van Oers, and J.M. Aerts, *Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease*. *J Clin Invest*, 1994. 93(3): p. 1288-92.
- Horn, S. J., Sikorski, P., CCederkvist, J.B., Vaaje-Kolstad, G., Sørli, M., Synstad, B., Vriend, G. Vårum, K.M, Eijsink.. (2006) Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *Proc Natl Acad Sci* **103**:18089-18094.
- Horn, S. J., Sorbotten, A., Synstad, B., Sikorski, P., Sørli, M., Varum, K. M. & Eijsink, V. G. (2006a). Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratiamarcescens*. *FEBS J*, 273 (3): 491-503.



## 7. Referanser

---

Invitrogen. (200). *Quant-iT™ Protein Assay Kit*. 9 s.

Jitonnom, J., Lee, V. S., Nimmanpipug, P., Rowlands, H. A. & Mulholland, A. J. (2011).

Quantum mechanics/molecular mechanics modeling of substrate-assisted catalysis in family 18 chitinases: conformational changes and the role of Asp142 in catalysis in ChiB. *Biochemistry*, 50 (21): 4697-711.

Kumar, M. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, 46(1): 1-27.

Kzhyshkowska, J., Gratcher, A., Goerdt, S., (2007) Human Chitinases and chitinase-like protein as indicator for inflammation and cancer. *Biomarker Insights*:2

Lee, C.G, Chitinase 1 is a biomarker for and therapeutic target in scleroderma-associated interstitial lung disease that augments TGF- $\beta$ 1 signaling, *J. Immunol.* 189(2012) 2635-2644

Mathews, C.K., Van Holde, K.E. & Ahern, K.G. (2000) *Biochemistry – 3rd edition*; Benjamin/Cummings, San Francisco, CA, USA.

MicroCal. [www.microcalorimetry.com](http://www.microcalorimetry.com)

MicroCal. 2001. VP-ITC MicroCalorimeter User's Manual. MicroCal Inc.

Olland, A. M., Strand, J., Presman, E., Czerwinski, R., Joseph-McCarthy, D., Krykbaev, R., Schlingmann, G., Chopra, R., Lin, L., Fleming, M., Kriz, R., Stahl, M., Somers, W., Fitz, L. & Mosyak, L. (2009). Triad of polar residues implicated in pH specificity of acidic mammalian chitinase. *Protein Sci*, 18 (3): 569-78.

Ohnuma, T., Morten Sørli, Tatsuya Fukuda, Noriko Kawamoto, Toki Taira and Tamo Fukamizo (2011) Chitin oligosaccharide binding to a family GH19 chitinase from the moss *Bryum coronatum*. *FEBS Journal* 278, 3991–4001

Payne, C.M., Baban, J., Horn, S.J., Backe, P.H., Arvai, A.S., Dalhus, B., Bjørås, M., Eijsink, V.G., Sørli, M., Beckman, G.T., Vaaje-kolstad. (2012) Hallmarks of processivity in glycoside hydrolases from crystallographic and computational studies of the *Serratia marcescens* chitinases. *J. Biol. Chem.* 287.36322-36330

Papanikolaou, G.Y, Tavlas, G, Vorgias, C.E, Petratos, K, De novo purification scheme and crystallization conditions yield high-resolution structures of chitinase A and its complex with the inhibitor allosamidin, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 59(2003) 400-403

Perrakis, A, I. Tews, Z. Dauter, A.B. Oppenheim, I. Chet, K.S. Wilson, C.E. Vorgias, - Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution, *Structure* 2(1994) 1169-1180

Perozzo, R., Folkers, G., and Scapozza, L. 2004 Thermodynamics of protein-ligand interactions: History, presence and future aspects. *Journal of Receptors and Signal Transduction* 24:1-52

Quinlan, R.J., et al. (2011) Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proc Natl Acad Sci USA*



## 7. Referanser

---

108(37):15079–15084.

Renkema, G.H., R.G. Boot, A.O. Muijsers, W.E. Donker-Koopman, and J.M. Aerts, Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. *J Biol Chem*, 1995. 270(5): p. 2198-202.

Rye, C. S. & Withers, S.G. (2000). Glycosidase mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4 (5): 573-80

Sorbotten, A., Horn, S. J., Eijsink, V. G. H. & Varum, K. M. (2005). Degradation of chitosans with chitinase B from *Serratia marcescens* - Production of chito-oligosaccharides and insight into enzyme processivity. *Febs Journal*, 272 (2): 538-549.

Suzuki.K. Suzuki.M. Taiyoi-M. Nikaidou.N and Watanabe.T (1998) Chitin binding protein(CBP21) in the culture supernatant of *Serratia marcescens*. 2170.

*Biosci, Biotechnol, Biochem*- 62-(1): 128- 35

Synowiecki, J. & Al-Khateeb, N. A. (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43 (2): 145-171.

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

Vaaje-Kolstad.G., Westereng.B., Horn.S.J Liu.Z.,Zhai.H.Sorlie.M and Eijsink.V.G.(2010) An oxidative enzyme boosting thr enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides.*Science*,330(6001);219-22

Vaaje-Kolstad, G., Houston, D. R., Riemen, A. H., Eijsink, V. G. & van Aalten, D. M. (2005). Crystal structure and binding properties of the *Serratia marcescens* chitin-binding protein CBP21. *J Biol Chem*, 280 (12): 11313-9.

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

van Aalten. D.M., Komander., Synstad. B., Gaseidnes.S., Peter M.G and Eijsink.V.G (2001) Structural insight into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 98:8979-8984

van Aalten DMF, Synstad B, Brurberg MB, Hough E, Riise BW, Eijsink VGH, Wierenga RK( 2003). Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1.9-angstrom resolution. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 97 (11): 5842-5847

Wiseman,T., Williston,S., Brandts,JF., and Lin,LN.1989. Rapid Measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter.*Analytical Biochemistry* 179:131-137

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*

## 7. Referanser

---

affect processivity, enzyme activity, and biomass converting efficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (16): 10610-7.

Zakariassen, H., Klemetsen, L., Sakuda, S., Vaaje-Kolstad, G., Vårum, K. M., Sørli, M. & Eijsink, V. G. (2010). Effect of enzyme processivity on the efficacy of a competitive chitinase inhibitor. *Carbohydrate Polymers*, 82: 779-785.