





## Forord

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

Jeg vil først og fremst takke min hovedveileder Morten Sørli for veiledning og oppmuntring gjennom oppgaven. Jeg vil rette en stor takk til min medveileder, Anne Grethe Hamre, som har vært til stor hjelp og støtte. Jeg vil også takke alle som har vært på laboratoriet og bidratt til et kjempe godt miljø og god stemning. Jeg vil takke alle som har kommet med støttende ord og oppmuntring igjennom hele oppgaven. Til slutt vil jeg takke venner, familie og kjæreste for støtte og oppmuntring.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Ås, august 2015

Emil Ebbestad Frøberg

# Innholdsfortegnelse

Forord.....	I
Innholdsfortegnelse .....	II
Sammendrag.....	VI
Abstract .....	VII
Forkortelser .....	IX
1. Introduksjon .....	1
1.1 Karbohydrater.....	1
1.2 Kitin.....	1
1.2.1 Struktur.....	2
1.2.2 Anvendelser.....	3
1.3 Glykosylhydrolaser.....	4
1.3.1 Struktur.....	4
1.3.2 Mekanisme .....	6
1.4 Kitinaser.....	8
1.4.1 Substrat-assistert mekanisme .....	9
1.4.2 Kitinaser fra <i>Serratia marcescens</i> .....	10
1.4.3 ChiB .....	12
1.5 Termodynamikk ved protein-ligand interaksjoner .....	14
1.5.1 Likevektskonstanten ( $K_a$ ) og Gibbs fri energi.....	15
1.5.2 Bindingsentalpi ( $\Delta H$ ) .....	16

1.5.3	Bindingsentropi ( $\Delta S$ ) .....	16
1.5.4	Endring i varmekapasitet ( $\Delta C_p$ ) .....	17
1.6	Isoterm titreringskalorimetri (ITC).....	18
1.7	Mål med oppgaven .....	19
2	Materialer: .....	21
2.1	Laboratorieutstyr .....	21
2.2	Programvare til dataanalyse.....	23
2.3	Kjemikalier .....	23
2.4	Proteiner og substrater .....	24
2.5	Medier.....	25
2.5.1	Selvlagde medier .....	25
2.5.2	Ferdige medier.....	25
2.6	Kit .....	26
2.7	Buffere og løsninger .....	27
3	Metoder .....	28
3.1	Mutant design .....	28
3.1.1	Primer design.....	28
3.1.2	Oppdyrking av bakteriestamme .....	29
3.1.3	Isolering av plasmid ved bruk av E.N.Z.A. ® Plasmid Miniprep Kit I Spin Protocol. ....	29
3.1.4	Måling av DNA-konsentrasjon med Qubit® .....	31
3.1.5	Seterettet mutagenese .....	31

3.1.6	PCR og DpnI behandling .....	33
3.1.7	Utfelling av plasmid .....	34
3.1.8	Transformering av plasmid inn i OneShot® BL21 Star™ (DE3) celler .....	35
3.1.9	Oppdyrking av transformanter .....	35
3.1.10	Tillaging av frysestocker .....	36
3.1.11	Isolering og konsentrasjonsmåling av plasmid til sekvensering .....	36
3.1.12	Tillagning av sekvenseringsreaksjoner .....	36
3.2	Uttrykking av his-taggede kitinaser .....	37
3.2.1	Overekspresjon .....	38
3.2.2	Tillaging av periplasmatisk ekstrakt .....	39
3.2.3	Cytoplasmatisk ekstrakt .....	39
3.3	Rensing av his-taggede ChiB-mutanter .....	40
3.3.1	Rensing av his-taggede kitinaser med nikkelkolonne .....	40
3.3.2	Natriumdodecylsulfat polyakrylamid gel elektroforese (SDS-PAGE) .....	41
3.3.3	Oppkonsentrering og bytting av buffer .....	43
3.3.4	Konsentrasjonsmåling med Bradford-metoden .....	43
3.4	Isoterm titreringskalorimetri (ITC) .....	44
4	Resultater .....	46
4.1	Residuanalyse .....	46
4.1.1	Residuer for prosessivitet og tunneldannelse .....	46
4.1.2	Residuer for katalyse .....	47

4.2	Seterettet mutagenese .....	49
4.3	Rensing av his-taggede kitinaser .....	50
4.3.1	Rensing av his-taggede kitinaser med nikkelkolonne .....	50
4.3.2	Bestemmelse av proteinkonsentrasjon med Bradford-metoden.....	56
4.4	Binding av (GlcNAc) <sub>6</sub> til ChiB-mutanter .....	57
4.4.1	Residuer i den substratbindende kløften .....	57
4.4.2	Katalytiske residuer.....	65
5	Diskusjon.....	68
5.1	Termodynamiske signaturer for binding av (GlcNAc) <sub>6</sub> mot mutanter –antatte bindingsresiduer .....	68
5.2	Termodynamiske signaturer for binding av (GlcNAc) <sub>6</sub> mot mutanter –antatte katalytiske residuer.....	70
5.3	Oppsummering og videre arbeid .....	72
6	Referanser.....	74

## Sammendrag

Denne oppgaven er skrevet som en del av et større forskningsprosjekt der målet er å tilegne seg kunnskap om enzymer som katalyserer hydrolyse av den uløselige polymeren kitin. Kitin består av  $\beta$ -(1,4)-bundet N-acetyl-D-glukosaminenheter og er den nest vanligste biopolymeren etter cellulose. Det kitinolytiske maskineriet til den gramnegative jordbakterien *Serratia marcescens* er et av de mest studerte enzymesystem for nedbrytning av kitin. Enzymsystemet består av tre kitinaser; kitinase A (ChiA), kitinase B (ChiB) og kitinase C (ChiC). ChiB er et prosessivt eksoenzym som katalyserer hydrolysen av kitin fra den ikke-reduserende enden. Ved substratbinding dannes det en delvis tunnel som omslutter substratet under hydrolyse, typisk for prosessive glykosyl hydrolaser.

I denne oppgaven har sentrale residuer i denne tunnelen blitt mutert og de termodynamiske signaturene ved binding av  $(\text{GlcNAc})_6$  til enzymet har blitt bestemt og sammenlignet mot villtype. Dette er gjort for å utdype deres rolle ved substratbinding. Det ble valgt ut fem residuer som antatt å være viktige for prosessivitet og dannelse av tunnel ved det aktive setet og to residuer med katalytiske egenskaper. De utvalgte residuene for substratbinding var D316, E221, F190, W97 og W220, mens de katalytiske residuene valgt var R294 og Y145. For å kunne studere bindingen av  $(\text{GlcNAc})_6$  til enzym med ITC, må enzymet inaktiveres. Dette gjøres ved å mutere den katalytiske syren E144 til glutamin (Q).

For de utvalgte residuene for tunneldannelse og binding er det en tydelig trend hvor alle mutantene binder svakere enn villtype. Det var ikke tilstrekkelig reproduserbarhet i dataene for å kunne regne ut de termodynamiske parameterene til W220A. Av de resterende mutantene hadde alle relativt lik entalpiendring. Mutasjonene E221A, F190A og W97A viser tilsvarende endringer i både solvatiseringsentropi og konformasjonsentropi i forhold til villtype. Verdiene for de tre mutantene, E221A, F190A og W97A, tyder på at residuene er viktig for å tilrettelegge tunnelen og/eller bindingsskløften før binding. Videre tyder mye på at D316 har stor konformasjonsfrihet før residuet låses ved binding av substrat. Dette samsvarer godt med «umbrella sampling».

Når det kommer til de katalytiske residuene kan det tyde på at Y145 også er et viktig residu for å tilrettelegge bindingsskløften før substratbinding. Mutasjonen R294A viser liten endring sammenliknet med villtype, noe som tyder på at residuet har liten effekt på binding. Residuet er vist å være viktig for hydrolyse av substrat.



## Abstract

This thesis is written as part of a larger research project where the main goal is to acquire knowledge of enzymes that catalyse the hydrolysis of the insoluble polymer chitin. Chitin consists of  $\beta$ -1,4-linked N-acetyl-glucosamine (GlcNAc) units and is the second most abundant biopolymer in nature after cellulose. The chitinolytic machinery of the gram-negative soil bacterium *Serratia marcescens* is one of the most studied enzyme systems for chitin degradation. The enzyme system consists of three different chitinases; Chitinase A (ChiA), Chitinase B (ChiB) and Chitinase C (ChiC). ChiB is a processive exo-enzyme that catalyses the hydrolysis of chitin from the non-reducing end. Upon substrate binding a partial tunnel is formed by the catalytic site, enclosing the substrate during hydrolysis. This is typical for processive glycoside hydrolases (GHs).

In this thesis, key residues in the catalytic domain been mutated and thermodynamic signatures by the binding of (GlcNAc)<sub>6</sub> to the enzyme have been determined and compared to wild type. This was done to deepen their role in formation of the deep substrate binding cleft upon substrate binding. Five residues were selected which were thought to be important for processivity and forming tunnel at the active site, and two residues with catalytic properties. The selected residues for substrate binding were D316, E221, F190, W97 and W220, while the catalytic residues selected were R294 and Y145. In order to study the binding of (GlcNAc)<sub>6</sub> to enzyme with ITC, the enzyme must be inactivated. This was accomplished by mutating the catalytic acid E144 to glutamine (Q).

The selected residues along the cleft showed a clear trend where all mutants showed a weaker binding than wild type. It was not sufficient reproducibility of the sensor data to calculate the thermodynamic parameters of W220A. Of the remaining mutants, all had relatively equal binding enthalpy. The mutations E221, F190A and W97A showed corresponding changes in both solvation entropy and conformational entropy relative to wild type. Values for the three mutants, E221, F190A and W97A, indicate that these residues are important for arranging the catalytic cleft before binding. Moreover, it seems that D316 has great conformational freedom before the residue is locked upon substrate binding. This corresponds well with the «umbrella sampling».

When it comes the catalytic residues, it may indicate that Y145 is also an important residue to arrange the binding cleft before substrate binding. The mutation R294A shows minor change compared to the wild type, suggesting that the residue has little effect on substrate binding. The residue is shown to be important for hydrolysis of substrate.

## Forkortelser

<b>(GlcNAc)<sub>6</sub></b>	Heksa-N-acetylglukosamin
<b>µg</b>	Mikrogram
<b>µL</b>	Mikroliter
<b>µM</b>	Mikromolar
<b>aa</b>	Aminosyrer
<b>Ala (A)</b>	Alanin
<b>bp</b>	Basepar
<b>CBM</b>	Karbohydrat bindingsmodul
<b>ChiA</b>	Kitinase A fra <i>Serratia marcescens</i>
<b>ChiB</b>	Kitinase B fra <i>Serratia marcescens</i>
<b>ChiC</b>	Kitinase C fra <i>Serratia marcescens</i>
<b>ChiD</b>	Kitinase D fra <i>Serratia proteamaculans</i>
<b>Da</b>	Dalton
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Sterilt vann av Milli-Q kvalitet
<b>DNA</b>	Deoksyribonukleinsyre
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>g</b>	Gram
<b>Gln (Q)</b>	Glutamin
<b>Glu (E)</b>	Glutamat
<b>His</b>	Histidin
<b>IMAC</b>	Immobilisert metallaffinitetskromatografi
<b>IPTG</b>	Isopropyl-1-tio-β-D-tiogalaktopyranosid
<b>ITC</b>	Isoterm titreringskalorimetri
<b>K</b>	Kelvin
<b>K<sub>a</sub></b>	Assosiasjonskonstanten
<b>k<sub>a</sub></b>	Assosiasjonsraten
<b>K<sub>b</sub></b>	Kilobasepar
<b>K<sub>d</sub></b>	Dissosiasjonskonstanten
<b>k<sub>d</sub></b>	Dissosiasjonsraten
<b>KOS</b>	Kitooligosakkarider
<b>L</b>	Liter
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>LPMO</b>	Lytisk polysakkarid monooxygenase
<b>M</b>	Molar
<b>mg</b>	Milligram
<b>mL</b>	Milliliter
<b>mM</b>	Millimolar
<b>MOPS</b>	3-(N-morfolin) propansvovelsyre
<b>MW</b>	Molekylvekt
<b>NaAc</b>	Natriumacetat
<b>NI-NTA</b>	Nikkel-nitrilotrieddiksyre
<b>nm</b>	Nanometer
<b>OD</b>	Optisk tetthet
<b>PCR</b>	Polymerase kjedereaksjon
<b>Phe (F)</b>	Fenylalanin
<b>PMSF</b>	Fenylmetylsulfonylfluorid
<b>R</b>	Den generelle gasskonstanten, 1,987 cal/K mol

<b>RNA</b>	Ribonukleinsyre
<b>RPM</b>	Antall omdreiningar per minutt
<b>SDS-PAGE</b>	Natirumdodecylsulfat polyakrylamid gelelektroforese
<b>Trp (W)</b>	Tryptofan
<b>WT</b>	Villtype
<b>Å</b>	Ångstrøm
<b><math>\Delta C_p</math></b>	Endring i varmekapasitet
<b><math>\Delta G</math></b>	Endring i Gibbs fri energi
<b><math>\Delta H</math></b>	Endring i entalpi
<b><math>\Delta S</math></b>	Endring i entropi

# 1. Introduksjon

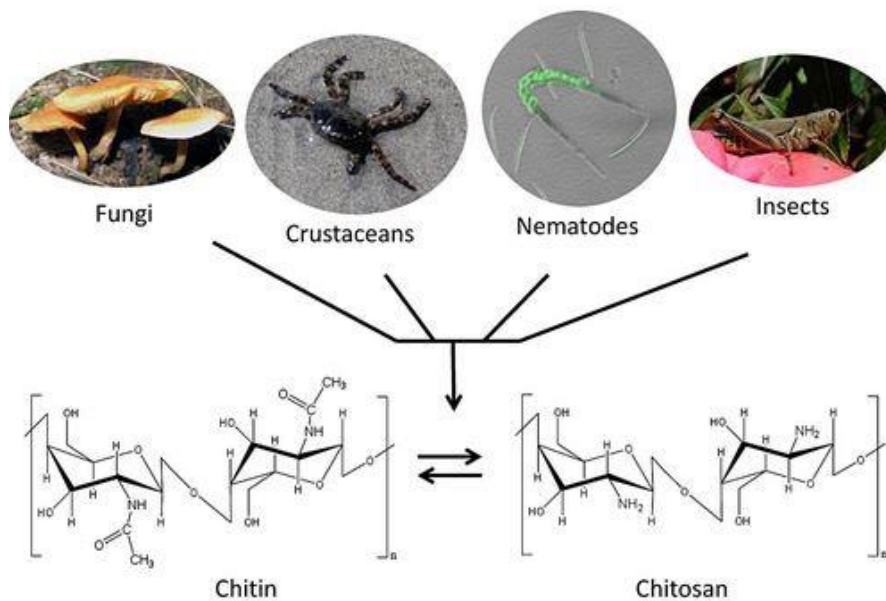
## 1.1 Karbohydrater

De fleste karbohydrater har den generelle formelen  $(\text{CH}_2\text{O})_n$ . Allikevel finnes det derivater som inneholder andre grunnstoffer som nitrogen, svovel og/eller fosfor. Karbohydrater kan deles inn i fire grupper; monosakkarider, disakkarider, oligosakkarider og polysakkarider. Monosakkaridene er den minste enheten og kan ikke hydrolyseres videre. De består av fire til seks karbonatomer, i tillegg til et oksygenatom som sammen danner en ringstruktur. Disakkaridene består av to monosakkarider koblet sammen ved hjelp av en glykosidbinding. Oligosakkarider er sukkerkjeder bestående av mellom to og ti monosakkarider, mens polysakkarider er kjeder som inneholder mer enn ti monosakkarideneheter. I tillegg har disse en tredimensjonal struktur, avhengig av egenskapene til monosakkaridene de er bygget opp av (Hart et al. 1994). Polysakkarider er delt inn i to ulike klasser: hetero- og homopolysakkarider. Homopolysakkarider består av like monosakkarider, mens heteropolysakkarider består av forskjellige typer monosakkarider. Kitin og cellulose strukturelle polysakkarider som også er homopolymere.

## 1.2 Kitin

Kitin er en lineær, uløselig homopolymer som består av  $\beta$ -1,4 linkede *N*-acetyl-D-glukosamineneheter (GlcNAc). Disse enhetene er rotert  $180^\circ$  relativt til hverandre (Rinaudo 2006). Utenom cellulose er kitin den mest vanlige biopolymeren på jorden med en årlig produksjon rundt 10 gigatonn (Harish Prashanth & Tharanathan 2007). Kitin finnes i virvelløse dyr, insekter, alger og sopp (Horn, Svein Jarle et al. 2006). De største kommersielle kildene til kitin er krabbe og rekeskall (Rinaudo 2006).

Et viktig derivat av kitin er kitosan, som består av de-N-acetyllert kitin med varierende deacetyleringsgrad. Også for kitosan er sukkerenhetene rotert  $180^\circ$  relativt til hverandre. (Horn, Svein Jarle et al. 2006). Struktur og opphav for kitin og kitosan er vist i figur 1.2.1.



Figur 1.2.1 Skisse av ulike kilder til kitin samt kitin- og kitosanstruktur. Det vises kun et utsnitt av kitosan, her med deacetylt enhet. Kitosan kan ha ulik deacetyleringsgrad. (Bueter et al. 2013).

### 1.2.1 Struktur

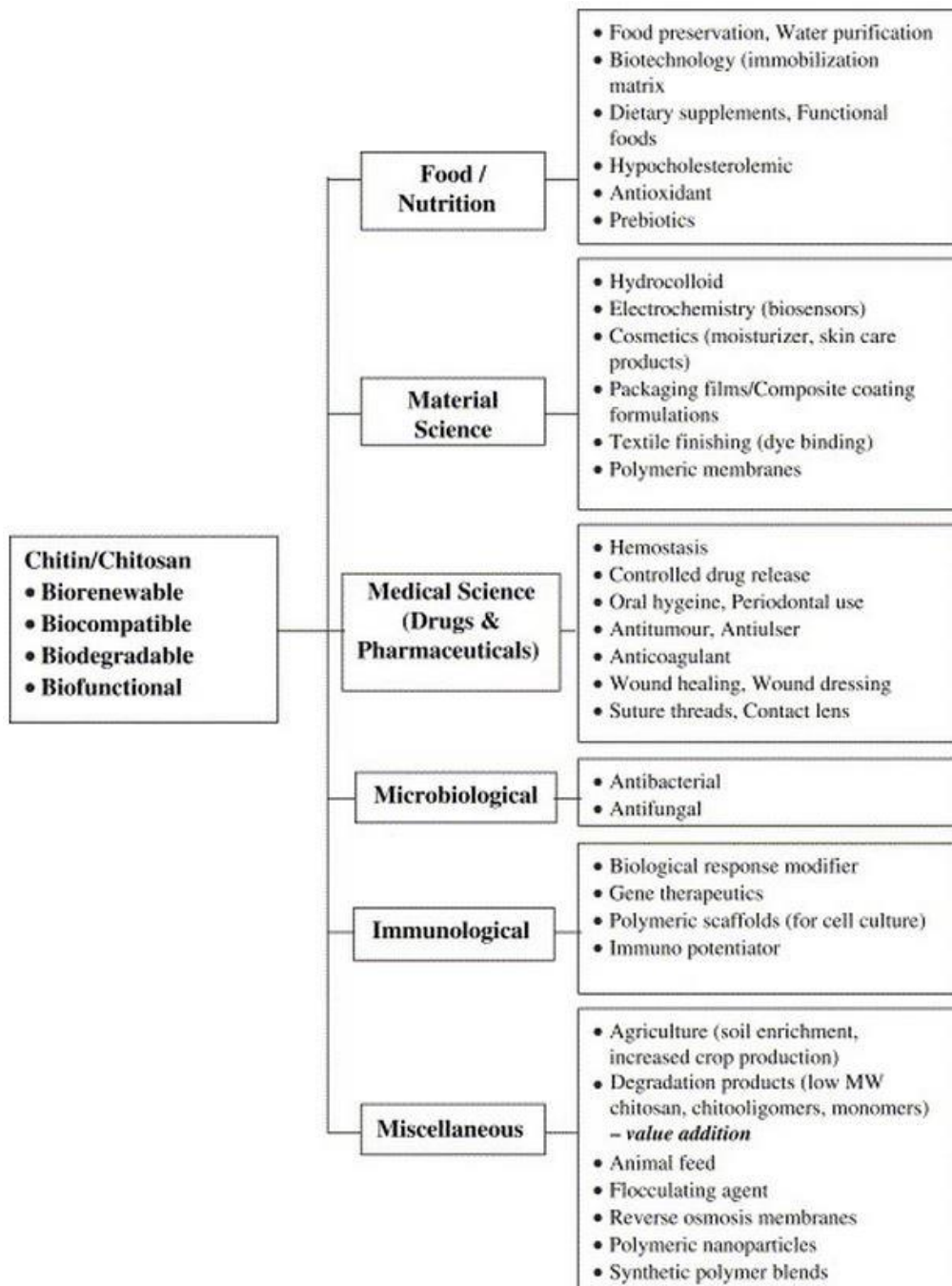
Kitin består av  $\beta$ -(1,4) linkede (GlcNAc) enheter som sitter  $180^\circ$  på hverandre. Dette medfører at den strukturelle og funksjonelle enheten til kitin er et disakkarid. Disakkaridene bindes sammen i lange kjeder. Disse kitinkjedene bindes sammen ved hydrogenbinding mellom  $\text{-NH-}$  og  $\text{C=O}$  grupper på motstående kjeder og danner den uløselige polymeren kitin (Synowiecki & Al-Khateeb 2003). Avhengig av kitinets opphav kan det primært dannes to former for kitin avhengig av kjedenes retning til hverandre,  $\alpha$ - og  $\beta$ -kitin. Det finnes også en tredje, omdiskutert variant;  $\gamma$ -kitin. Det tyder imidlertid på at dette er en variant av  $\alpha$ -kitin (Rinaudo 2006).

Den mest vanlige formen er  $\alpha$ -kitin. Her er kjedene orientert antiparallelt ( $\uparrow\downarrow\uparrow\downarrow$ ). Dette fører til at det dannes sterke intermolekylære hydrogenbindinger mellom kjedene som gjør  $\alpha$ -kitin svært stabilt (Minke & Blackwell 1978; Synowiecki & Al-Khateeb 2003).

$\beta$ -kitin er mindre vanlig. Kjedene er orientert parallelt med hverandre ( $\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow$ ). De parallelle kjedene fører til svakere interaksjoner og en mindre stabil struktur (Blackwell 1969; Synowiecki & Al-Khateeb 2003).

## 1.2.2 Anvendelser

Kitin og kitosan blir, som tidligere nevnt, produsert i stor skala og har et bredt bruksområde. Av kitosan kan det for eksempel dannes kitooligosakkarider (KOS) ved hydrolyse. KOS har et bredt spekter av bruksområder, eksempelvis i næringsmiddelindustrien, bioteknologi, materialvitenskap, genterapi og farmasøytiske applikasjoner som vist i figur 1.2.2 (Aam et al. 2010; Harish Prashanth & Tharanathan 2007).



Figur Feil! Bruk kategorien Hjem til å bruke 0 på teksten du vil skal vises her. 1.2.2. Oversikt over nåværende og potensielle bruksområder for kitin og kitosan (Harish Prashanth & Tharanathan 2007).

### 1.3 Glykosylhydrolaser

Glykosylhydrolaser er nøkkelenzymer i karbohydratmetabolismen. De katalyserer hydrolysen av glykosidbindinger mellom karbohydrater, eller mellom karbohydrater og ikke-karbohydratforbindelser. Nedbrytning av polysakkarider spiller en viktig rolle i flere biologiske funksjoner, blant annet i energisyklusen, celledisorganisering og for degradering i lysozymer (Davies & Henrissat 1995).

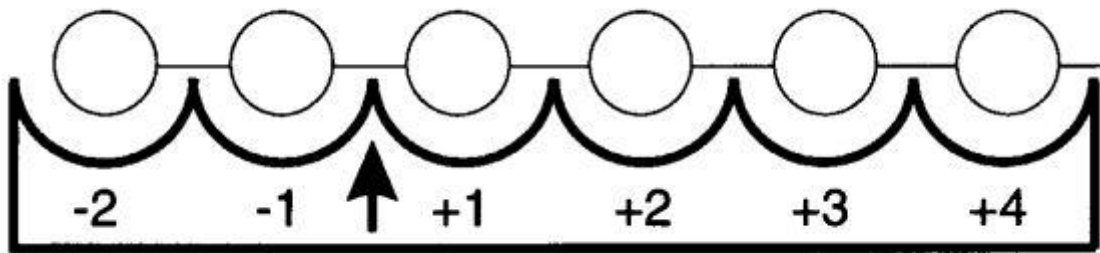
Selv om den kjemiske sammensetningen til karbohydrater kan være lik, er det store variasjoner ved stereokjemisk sammensetning. Dette skyldes de mange individuelle monosakkaridene som finnes og de ulike bindingene mellom sukkerenhetene. Laine (1994) har vist at et heksasakkarid kan ha hele  $10^{12}$  mulige isomerer.

Glykosylhydrolaser blir klassifisert basert på aminosyresekvensen, og per juli 2015 finnes det 133 ulike familier. Konservering av aminosyresekvensen fører til strukturelle likheter som gjør at klassifiseringen også tar hensyn til enzymenes struktur og funksjon (Henrissat 1991). Databasen klassifiseringene lagres i heter Carbohydrate Active enZYmes (CAZy) (Lombard et al. 2014).

#### 1.3.1 Struktur

Glykosylhydrolaser består som regel av et katalytisk domene og et eller flere ikke-katalytiske domener. Noen av de ikke-katalytiske domenene er involvert i substratbinding, men de fleste har ukjent funksjon. Det aktive setet til enzymet befinner seg i det katalytiske domenet (Davies & Henrissat 1995). Nomenklaturen på subsetene i det katalytiske domenet nummereres fra  $-n$  til  $+n$ , hvor  $-n$  representerer den ikke-reduserende enden mens  $+n$  representerer den reduserende enden. Hydrolyse av glykosidbindingen skjer mellom subsete  $-1$  og  $+1$  (Davies et al. 1997). Et eksempel på sukkerbindende subseter hos en glykosylhydrolase er vist i figur 1.3.1.

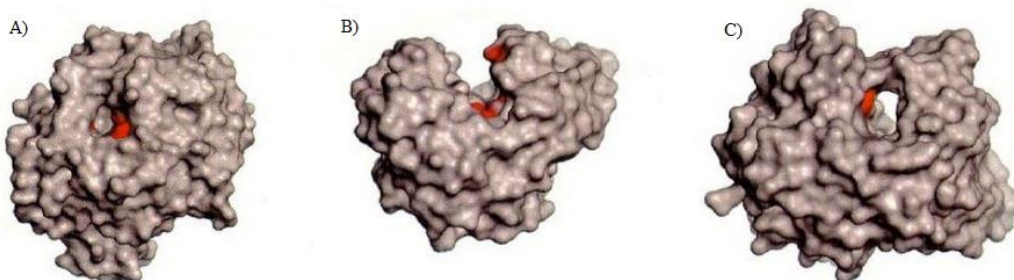




Figur 1.3.1 Skjematisk oversikt over sukkerbindende substeder for en type glykosylhydrolaser hvor  $-n$ ,  $+n$  nomenklatur er brukt (Davies et al. 1997).

Det aktive setet kan ha ulik topologi. Det kan ha lomme-/krater-, kløft-, eller tunnelstruktur vist i figur 1.3.2. Det er vist at det er en sammenheng mellom topologien til det aktive setet og substrat nedbrytning.

Glykosylhydrolaser kan ha ekso- og/eller endoaktivitet. Eksoaktive enzymer katalyserer nedbrytningen av substratet fra den reduserende eller ikke-reduserende enden. Disse glykosylhydrolasene har som regel en lukket topologi i det aktive setet. Endoaktive enzymer katalyserer hydrolysen av glykosidbindinger tilfeldig langs substratet. De endoaktive enzymene har ofte en mer åpen topologi i det aktive setet (Davies & Henrissat 1995).



Figur 1.3.2. Oversikt over de ulike topologiene til det aktive setet hos glykosylhydrolaser. A) viser lomme topologi, B) viser kløft topologi og C) viser tunnel topologi. De katalytiske residuene er markert med rødt (Davies & Henrissat 1995).

### **Lomme- eller kratertopologi**

Lomme- eller kratertopologi er den optimale strukturen for gjenkjennelse av sakkarider som har mange tilgjengelige ender på overflaten. Både ikke-reduserende og reduserende ender. Topologien finnes blant annet hos monosakkaridaser som  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glukosidase og  $\beta$ -amylase som alle vist seg å være eksoaktive. Topologien er egnet for substrater med et stort antall tilgjengelige kjedeender og er derfor lite effektiv for fiberlignende strukturer som for eksempel cellulose (Davies & Henrissat 1995).

### **Kløfttopologi**

Denne heller åpne strukturen i det aktive setet fører til tilfeldig binding av flere sukkerenheter i polymere substrater og finnes ofte i endoaktive enzymer som lysozymer, endocellulaser og kitinaser (Davies & Henrissat 1995).

### **Tunneltopologi**

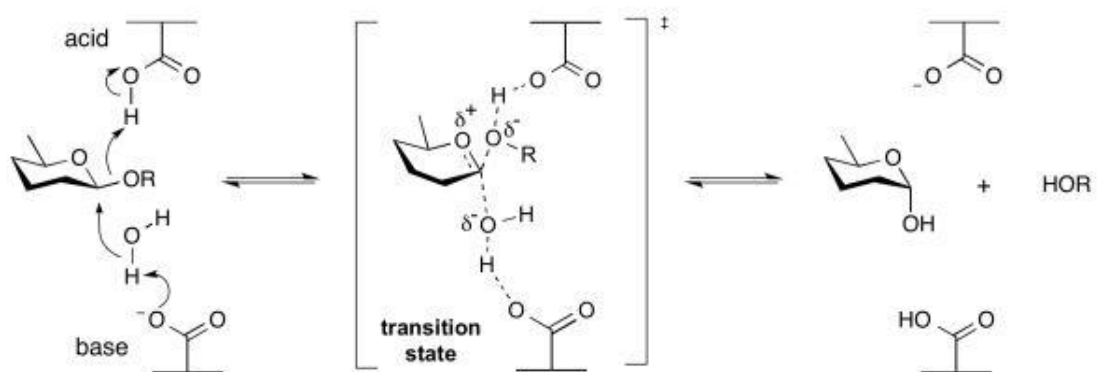
Tunneltopologien stammer fra kløfttopologien og er vist å være den mest gunstig for eksoaktive enzymer. Tunnelen gjør det mulig å tre igjennom en polysakkaridkjede ved det aktive setet. Dette fører til at substratet er bundet til enzymet samtidig som produkt frigis. Dette danner grunnlaget for prosessivitet som er en viktig egenskap hos enzymer som degraderer uløselige substrater som for eksempel kitin og cellulose (Davies & Henrissat 1995; Horn, Svein J. et al. 2006)

#### 1.3.2 Mekanisme

Glykosylhydrolaser kategoriseres i to hovedklasser når det kommer til mekanisme. Disse benevnes bevarende eller inverterende avhengig av endringen i den anomeriske oksygenkonfigurasjonen (Koshland 1953).

### 1.3.2.1 Inverterende mekanisme

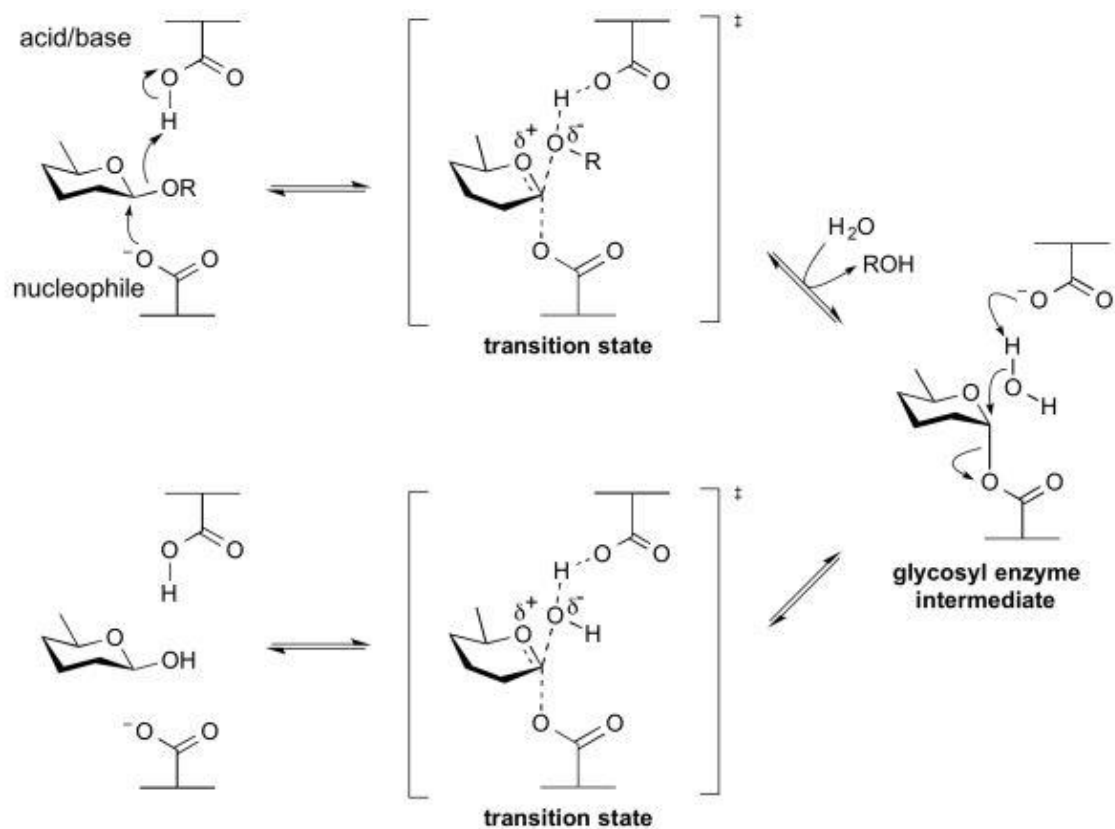
Hydrolyse ved inversjon av den anomere konfigurasjonen skjer normalt ved en ett-trinns mekanisme ofte referert til som en «*direct displacement mechanism*». Reaksjonen skjer ved at den katalytiske syren donerer et proton til oksygenet i glykosidbindingen. Et vannmolekyl polarisert av den nukleofile basen angriper deretter det anomere karbonatomet. Dette fører til invertering av den anomere konfigurasjonen. I denne mekanismen er det  $\sim 10\text{\AA}$  mellom de to residuene. En slik mekanisme er vist i figur 1.3.3 (McCarter & Withers 1994; Rye & Withers 2000).



Figur 1.3.3 Inverterende mekanisme for glykosylhydrolaser. Her endres den anomere konfigurasjonen. (McCarter & Withers 1994)

### 1.3.2.2 Bevarende mekanisme

For den bevarende mekanismen vil en aminosyre først fungere som en syre, deretter som base. Reaksjonen starter ved at den katalytiske syren protonerer glykosidoksygenet samtidig som det anomeriske karbonatomet angripes av det nukleofile residuet. Det dannes da et substrat-enzym intermediat. I neste trinn vil den opprinnelige katalytiske syren fungere som en base og aktivere et vannmolekyl som utfører et nukleofilt angrep på enzym-substrat intermediet og fullfører hydrolysen. Dette resulterer i bevaring av den anomere konfigurasjonen. Det er  $\sim 5\text{\AA}$  mellom residuene i den bevarende mekanismen. Mekanismen er vist i figur 1.3.4 (McCarter & Withers 1994; Rye & Withers 2000).



Figur 1.3.4 Bevarende mekanisme for glykosylhydrolaser. Den anomere konfigurasjonen bevares. (McCarter & Withers 1994).

## 1.4 Kitinaser

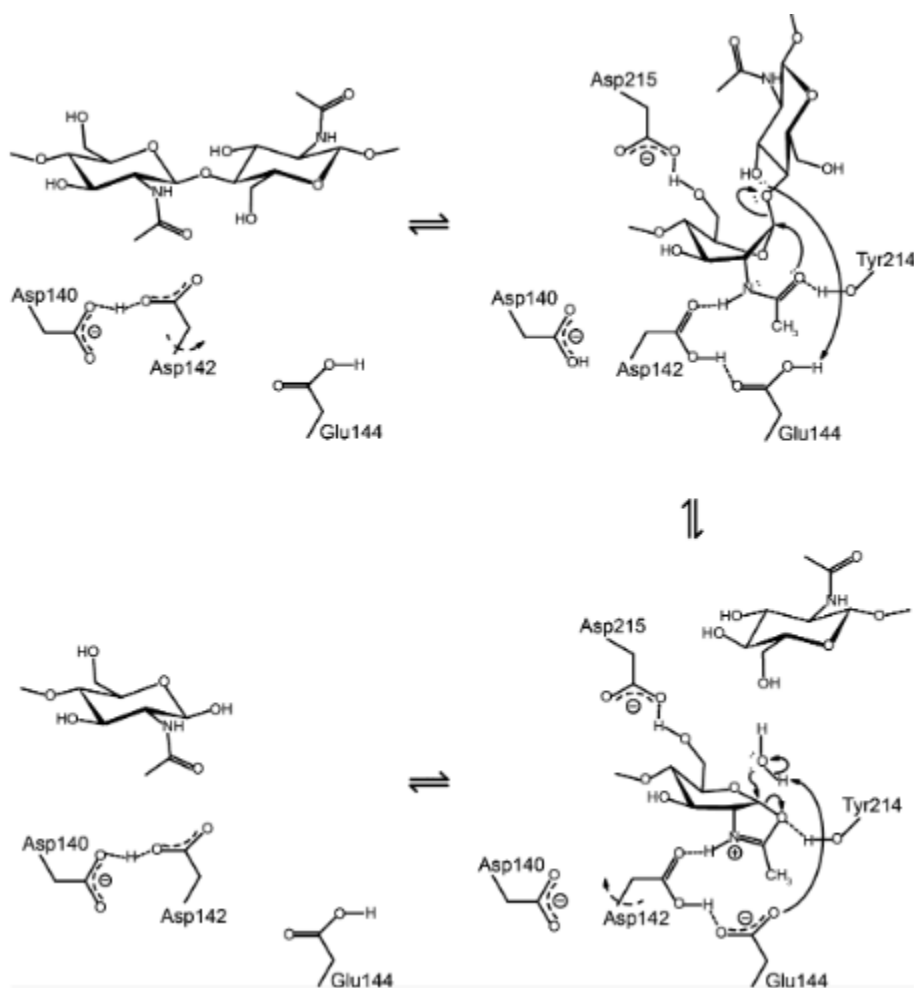
Kitinaser er en type glykosylhydrolaser som hydrolyserer kitins  $\beta$ -1,4-glykosidbindinger. Størrelsen på kitinasene varierer fra 20 kDa til rundt 90 kDa, og de finnes i flere ulike organismer som bakterier, sopp, planter og mennesker (Hamid et al. 2013). Som følge av sammenligning av aminosyresekvensene til kitinaser fra ulike organismer har det blitt foreslått fem klasser av kitinaser. Disse er fordelt på to familier; familie 18 og 19 glykosylhydrolaser (Henrissat & Bairoch 1993). Kitinasene i de to familiene har forskjellig aminosyresekvens, 3D-struktur og mekanisme, noe som tyder på forskjellig opphav (Hamid et al. 2013). Som tidligere nevnt benytter glykosylhydrolaser seg av to ulike mekanismer med tanke på hydrolyse. Familie 18 kitinaser benytter seg av substratassistert katalyse hvor den anomere konfigurasjonen til karbonatomet bevares. Familie 19 kitinaser katalyserer reaksjonen ved bruk av inverterende mekanismen (avsnitt 1.3.2.1) (Fukamizo 2000).

### 1.4.1 Substrat-assistert mekanisme

Kitinaser tilhørende familie 18 glykosylhydrolaser benytter seg av en bevarende substrat-assistert mekanisme. Forskjellen fra den vanlige bevarende mekanismen er at N-acetylgruppen på substratet blir benyttet som nukleofil istedenfor en karboksylsidekjede (Terwisscha van Scheltinga et al. 1995). Det er blitt gjort molekylær dynamiske simuleringer, og det er vist at hydrolysemekanismen for GH18 kitinaser involverer en vridning av  $-1$  sukkerringen fra en  ${}^4C_1$  stol konformasjon til en skjev  ${}^1,4B$  båtformasjon, som er nødvendig for dannelsen av oxazolinium intermedietet (Brameld & Goddard 1998). Denne konformasjonsendringen krever mye energi, nesten 8 kcal/mol (Biarnés et al. 2007).

Den substrat-assisterte mekanismen til kitinase B (ChiB) fra den gramnegative jordbakterien *S. marcescens* har tidligere blitt studert i detalj og det viser seg at det konserverte DXDXE-motivet er essensielt for substrat assistert katalyse. For ChiB tilsvarer dette de konserverte residuene aspartat 140 (D140), aspartat 142 (D142) og glutamat 144 (E144) (Synstad et al. 2004; Vaaje-Kolstad et al. 2004; van Aalten et al. 2000; van Aalten et al. 2001).

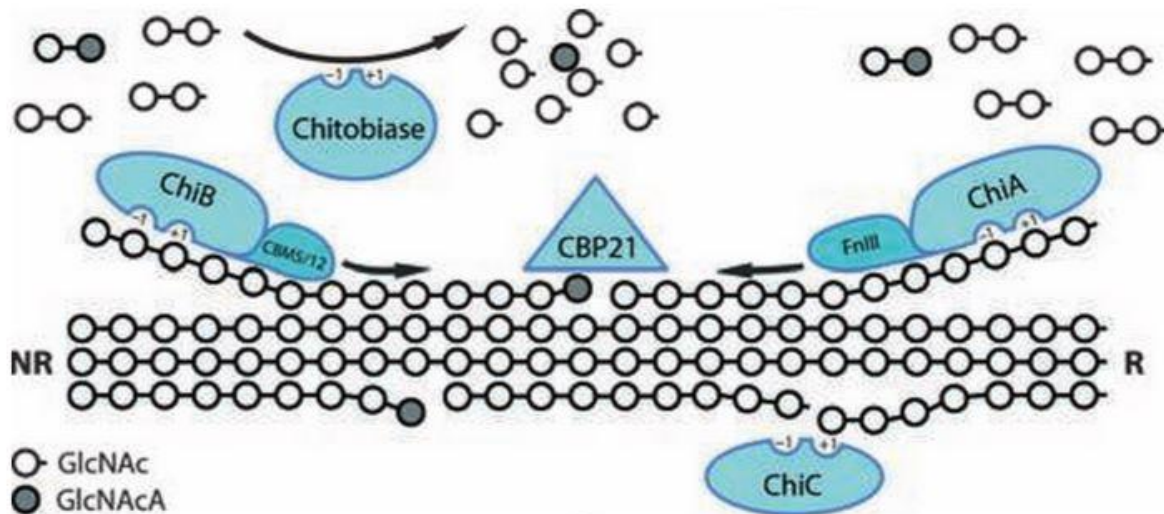
Når substratet ikke er bundet til enzymet vil D140 og D142 danne hydrogenbinding med hverandre. Ved dette stadiet er D142 for langt unna E144 for at det skal være en interaksjon. Når substrat bindes til enzymet vil sukkerenheten i  $-1$  subsetet endre konformasjon fra stol til båtformasjon. Samtidig vil hydrogenbindingen mellom D140 og D142 brytes. D142 vil rotere mot E144 og danne hydrogenbinding med E144 og acetamidogruppen på  $-1$  sakkardet. Det dannes et positivt ladd oxazoliniumionintermediat som følge av et nukleofilt angrep på det anomere karbonatomet. Den katalytiske syren (E144) virker som en syre-base katalysator ved først å protonere oksygenet ved glykosidbindingen og deretter deprotonere et nukleofilt vannmolekyl, slik at hydroksidionet angriper oxazoliniumintermediatet og hydrolysen fullføres. D142 roteres så tilbake og danner på ny hydrogenbinding med D140 (Synstad et al. 2004; Vaaje-Kolstad et al. 2004; Vaaje-Kolstad et al. 2013; van Aalten et al. 2000).



Figur 1.4.1. Bevarende substrat-assistert mekanisme for familie 18 kitinaser (Vaaje-Kolstad et al. 2013).

#### 1.4.2 Kitinaser fra *Serratia marcescens*

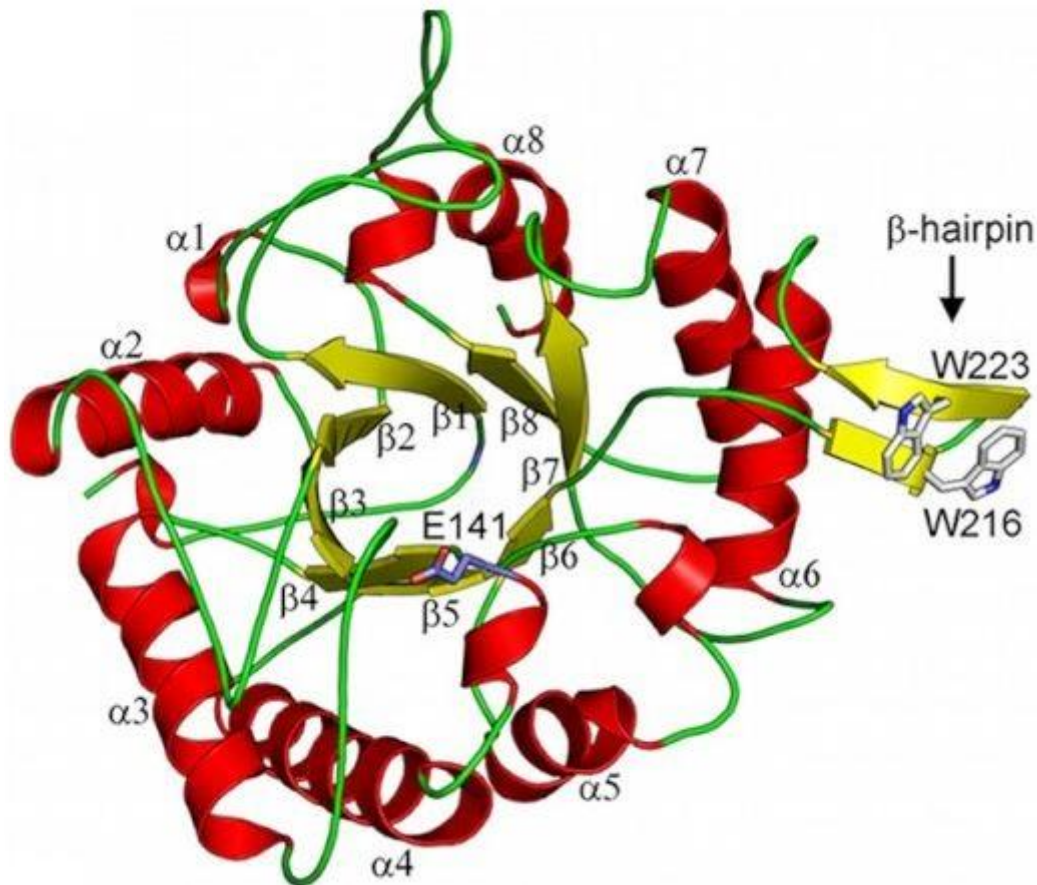
*Serratia marcescens* er en gramnegativ jordbakterie fra Enterobacteriaceae familien. Det kitinolytiske maskineriet til *S. marcescens* er et av de mest studerte systemene for nedbrytning av uløselige polysakkarider (Monreal & Reese 1969). Dette systemet består av tre kitinaser, ChiA, ChiB og ChiC, et kitinbindende enzym, CBP21 og en kitobiase. ChiA og ChiB er begge vist å være eksoaktive og prosessive, mens ChiC er endoaktiv og ikke-prosessiv. CBP21 er en overflateaktiv lytisk polysakkarid monooksygenase (LPMO). Kitobiasen hydrolyserer dimerer fra andre enzymer til monomerisk N-acetylglukosamin. ChiA, B og C tilhører alle glykosylhydrolase familie 18, mens kitobiasen tilhører familie 20. CBP21 plasseres i den relativt nye klassen auxiliary activities hvor den er klassifiseres som familie 10 (AA10) (Fuchs et al. 1986; Kless et al. 1989; Monreal & Reese 1969; Vaaje-Kolstad et al. 2013). En skjematisk fremstilling av det enzymatiske maskineriet til *S. marcescens* er vist i figur 1.4.2.



Figur 1.4.2. Skjematisk fremstilling av det kitinolytiske maskineriet til *S. marcescens*. ChiA og ChiB katalyserer kitinhydrolyse prosessivt fra henholdsvis reduserende og ikke-reduserende ende. ChiC er ikke-prosessiv og hydrolyserer tilfeldige områder på polysakkaridet. CBP21 lager nye ender for prosessive enzymer. Kitobiasen konverterer dimere til monomerer (Vaaje-Kolstad et al. 2013).

Felles for alle familie 18 kitinaser er et katalytisk domene med en konservert  $(\beta/\alpha)_8$  TIM-tønnestruktur. Denne tønnestrukturen er dannet av åtte loop-heliks enheter som er koblet sammen med en  $\alpha$ -loop mellom hver  $\beta$ -heliks. Det dannes en lukket sylindrisk struktur med  $\beta$ -kjedene inn mot midten og  $\alpha$ -heliksene som en ring på utsiden (Lesk 2010). TIM-tønnestrukturen er vist i figur 1.4.3.



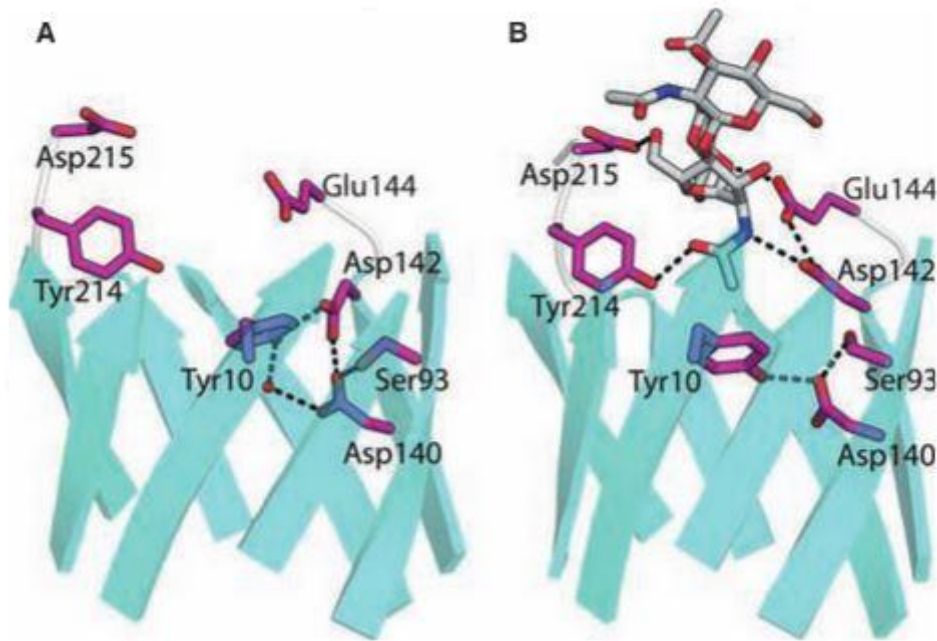


Figur 1.4.3. TIM-tønnestruktur ( $\alpha/\beta$ )s struktur fra ChiC2. Den katalytiske syren (Glu<sup>141</sup>) er mellom en  $\alpha$ -heliks og en  $\beta$ -tråd, og er vist med «stick» formasjon (Payne et al. 2012).

### 1.4.3 ChiB

ChiB består av et katalytisk domene, en «linker region» og et lite kitinbindende domene. Enzymet bygges opp av 498 residuer og har en molekylmasse på 55,4 kDa (van Aalten et al. 2000). Det katalytiske domenet har en TIM-tønne struktur samt et  $\alpha/\beta$  domene som danner en fleksibel loop ved det aktive setet. Den substratbindende kløften består av seks definerte subseter som går fra -3 til +3, hvor den katalytiske syren E144 er ved subsete +1. (van Aalten et al. 2001). Det konserverte DXXDXDXE motivet er lokalisert ved enden av den fjerde  $\beta$ -tråden ved TIM-tønne strukturen. D137, D140 og D142 er de resterende residuene i det konserverte motivet (van Aalten et al. 2000). Figur 1.4.4 illustrerer TIM-tønne strukturen til det katalytiske domenet til ChiB.

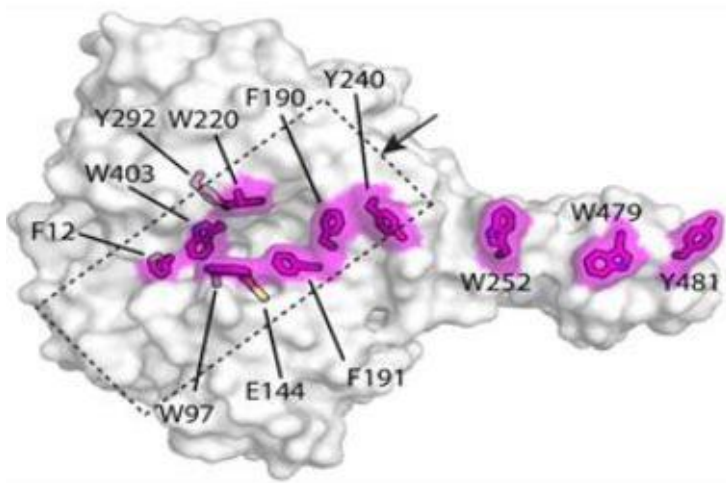




Figur 1.4.4. Nøkkelresiduer for det katalytiske maskineriet til familie 18 kitinaser, her vist ved ChiB. A viser hvordan D140 og D142 deler et proton før substratbinding. B viser hvordan D142 vrir ved substratbinding (Vaaje-Kolstad et al. 2013).

Som nevnt har ChiB en loop som dekker over den substratbindende kløften, denne kløften gir ChiB en tunneltopologi, typisk for eksoaktive enzymer. Av kitinasene fra *S. marcescens* er ChiB kitinasen med den mest karakteristiske tunneltopologien. ChiB har i tillegg et kitinbindende domene (ChBD) som kobles til det katalytiske domenet med en «linker». Denne linkerens går fra den siste  $\alpha$ -heliksen til TIM-tønne til det kitinbindende domenet. Dette domenet er formet av tre antiparallele  $\beta$ -tråder med aromatiske residuer som kan hjelpe til under binding av substrat. (van Aalten et al. 2000). Aromatiske residuer er fordelaktig for binding av substrat, det er typisk for prosessive enzymer med aromatiske residuer i den substratbindende kløften. ChiB er et prosessivt enzym som degraderer kitin fra den ikke-

reduserende enden av substratet (Sørliie et al. 2012). Figur 1.4.5 viser de aromatiske residuene som interagerer med substrat ved binding.



Figur 1.4.5 Krystallstruktur til ChiB fra *S. marcescens*. De aromatiske aminosyrene som interagerer med substratet er vist i magenta (Vaaje-Kolstad et al. 2013).

Ved enden av den substratbindende kløften er det en loop som refereres til som «porch loop». Denne loopen er mellom residu 14 og 26 og danner en barriere som hindrer binding av substrater i -4 subseite. Dette viser hvorfor ChiB ikke degraderer kitin fra den reduserende enden (van Aalten et al. 2000).

## 1.5 Termodynamikk ved protein-ligand interaksjoner

Forståelsen av molekylære gjenkjennelsesprosesser av biologiske makromolekyler krever en detaljert karakterisering av bindingstermodynamikken, samt korrelasjonen av strukturen til protein og ligand og termodynamiske parametere. Termodynamiske parametere inkluderer likevektskonstanten ( $K_a$ ), endring i Gibbs fri energi ( $\Delta G$ ), endring i entalpi ( $\Delta H$ ), endring i entropi ( $\Delta S$ ) og endringen i varmekapasitet ( $\Delta C_p$ ) (Perozzo et al. 2004). En god metode for å bestemme termodynamiske parametere for protein-ligand binding er isotherm titringskalorimetri (ITC). ITC måler varmeutvekslingen ved titrering av ligand til en proteinløsning. Ved å bruke ITC og termodynamiske parametere kan grad av binding mellom protein og ligand bestemmes (Freiburger et al. 2011).

### 1.5.1 Likevektskonstanten ( $K_a$ ) og Gibbs fri energi

En reversibel binding mellom protein (P) og ligand (L) kan beskrives med likevektsuttrykket:



Hastighetskonstantene  $k_a$  og  $k_d$ , henholdsvis assosiasjon og dissosiasjon, har benevnningen  $M^{-1}s^{-1}$ . Likevektskonstanten  $K_a$  karakteriserer bindingsreaksjonen:

$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{k_a}{k_d} \quad 1.5.2$$

$K_a$  har benevnningen  $M^{-1}$  og er et mål for hvor høy affinitet liganden har til proteinet. Jo høyere verdien  $K_a$  er, jo høyere affinitet har liganden til proteinet.

Den viktigste termodynamiske beskrivelsen av en bindingsreaksjon er i form av Gibbs fri bindingsenergi. Dette fordi den beskriver stabiliteten til alle biologiske komplekser.

Parameteren har blitt mye brukt for å forstå sammenhengen mellom struktur og funksjon (Laidler et al. 2003). Endringen i Gibbs frienergi ( $\Delta G$ ) kan ved standard betingelser relateres til likevektskonstanten  $K_a$  gjennom ligningen:

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad 1.5.3$$

$R$  er den generelle gasskonstanten (1,987 cal/K mol) og  $T$  er temperaturen i grader Kelvin (Laidler et al. 2003). Dersom  $\Delta G$  er negativ vil reaksjonen vil være spontan, det vil si når  $K_a > 1$ . Det er to faktorer som driver Gibbs frienergiendring. Endringen i bindingsenergi mellom protein og ligand og endring i grad av uorden i systemet. Dette kan uttrykkes ved hjelp av Gibbs-Helmholtz likningen:

$$\Delta G_r^\circ = \Delta H_r^\circ - T\Delta S_r^\circ \quad 1.5.4$$

$\Delta H$  beskriver endringen i entalpi, mens  $\Delta S$  er endring i entropi ved standard betingelser (Laidler et al. 2003). Entropi-entalpi kompensasjon som følge av varmekapasiteten ( $\Delta C_p$ ) (se kapittel 1.5.4), fører til at endringen i Gibbs frienergi ( $\Delta G$ ) ikke er så sensitiv for endringer ved protein-ligand interaksjonen. Dette fører til at endringen i entalpi og entropi er viktig for å få en forståelse av  $\Delta G$  (Chodera & Mobley 2013; Perozzo et al. 2004).

### 1.5.2 Bindingsentalpi ( $\Delta H$ )

Endringen i bindingsentalpi ( $\Delta H$ ) ved ligand-protein interaksjoner er et resultat av dannelsen og brytninger av ikke-kovalente bindinger. Entalpiendringen reflekterer tap av protein-løsning hydrogenbindinger og van der Waals interaksjoner, dannelsen av protein-ligand bindinger og van der Waals bindinger, samt reorganisering av løsemiddel nær proteinoverflaten (Perozzo et al. 2004).

### 1.5.3 Bindingsentropi ( $\Delta S$ )

Endring i bindingsentropi ( $\Delta S_r^\circ$ ) kan ses på som summen av tre faktorer; endring i konformasjon ved binding ( $\Delta S_{\text{conf}}^\circ$ ), solvatiseringsentropi ( $\Delta S_{\text{solv}}^\circ$ ) og translasjonsentropi ( $\Delta S_{\text{mix}}^\circ$ ) illustrert ved ligning 1.5.5 (Baker & Murphy 1997).  $\Delta S_{\text{solv}}^\circ$  er forandringen i entropi som observeres når vann blir frigjort ved protein-ligand binding. Ved interaksjon med ligand vil vann frigjøres fra enzymets overflate og entropien vil øke.  $\Delta S_{\text{conf}}^\circ$  er endring i konformasjonsentropien. En negativ endring i entropi kan observeres når enzymet binder med ligand og fleksibiliteten reduseres. Ved kompleksdannelse vil det alltid være et tap av translasjonsentropi ( $\Delta S_{\text{mix}}^\circ$ ).

$$\Delta S_r^\circ = \Delta S_{\text{mix}}^\circ + \Delta S_{\text{solv}}^\circ + \Delta S_{\text{conf}}^\circ \quad 1.5.5$$

Ved 385 K vil solvatiseringsentropien være tilnærmet lik 0, og endringen i varmekapasitet ( $\Delta C_{p,r}$ ) kan relateres til endring i solvatiseringsentropi ( $\Delta S_{\text{solv}}$ ) for en bindingsreaksjon ved  $t = 30^\circ\text{C}$  gjennom ligning 1.5.6 (Baker & Murphy 1997; Baldwin 1986; Murphy et al. 1990; Murphy 1994):

$$\Delta S_{\text{solv}}^\circ = \Delta C_{p,r}^\circ \ln \left( \frac{303\text{K}}{385\text{K}} \right) \quad 1.5.6$$

$\Delta S_{\text{mix}}^\circ$  blir kalkulert som en kratisk term, en statistisk korreksjon, som reflekterer blandingen av protein og løsemiddel, samt endringen av translasjons og rotasjonsfrihetsgrader (Baker & Murphy 1997). Dette kan illustreres ved følgende likning:

$$\Delta S_{\text{mix}}^\circ = R \ln \left( \frac{1}{55,5} \right) \quad 1.5.7$$

$R$  er gasskonstanten (1,987 cal/K mol).  $\Delta S_{\text{mix}}^\circ$  estimeres dermed til å være  $-8$  cal/K mol.

$\Delta S_{\text{conf}}^\circ$  kan regnes ut ved hjelp av ligning 1.5.5 og eksperimentelt bestemte  $\Delta S$  verdier, samt  $\Delta S_{\text{mix}}^\circ$  og  $\Delta S_{\text{sol}}^\circ$  fra ligning 1.5.6 og 1.5.7.

#### 1.5.4 Endring i varmekapasitet ( $\Delta C_p$ )

Varmekapasitet er definert som mengden energi nødvendig for å øke temperaturen til en substans med en grad Kelvin. For biomolekylære reaksjoner kan endringen i varmekapasitet ( $\Delta C_p$ ) kan defineres på ulike måter, hvor de vanligste definerer parameteren som temperaturavhengigheten til  $\Delta H$  (ligning 1.5.8) eller  $\Delta S$  (1.5.9)

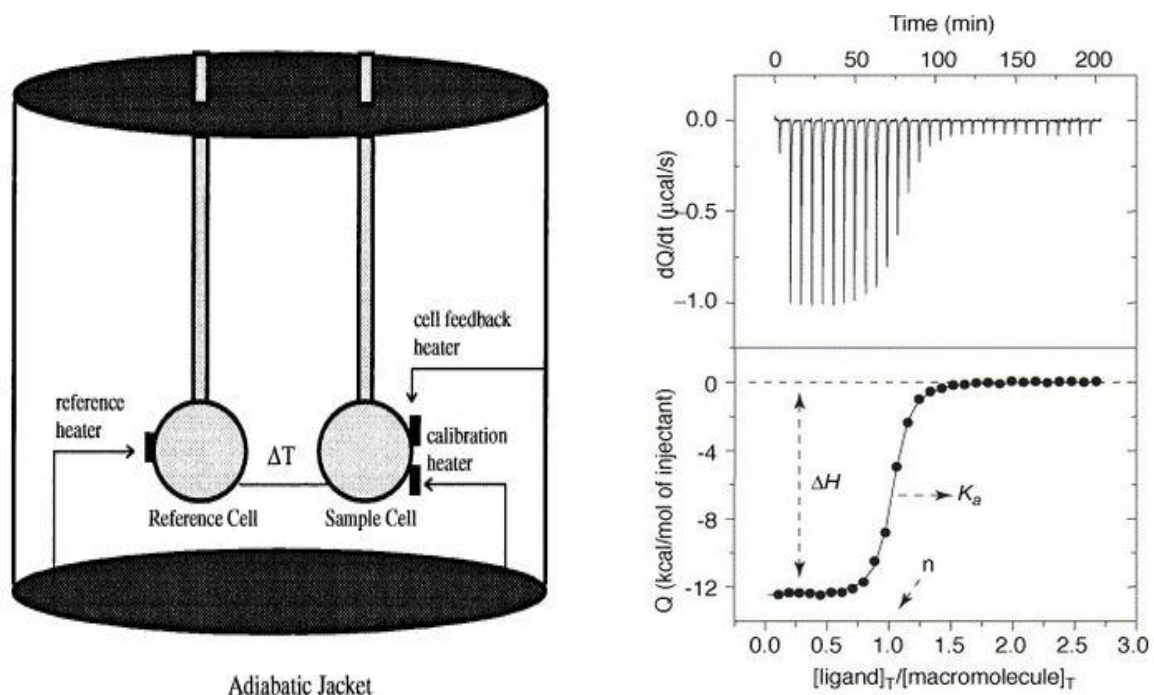
$$\Delta C_p = \frac{d\Delta H}{dT} \quad 1.5.8$$

$$\Delta C_p = \frac{\Delta S}{\ln T} \quad 1.5.9$$

Endring i varmekapasitet kan være forbundet med forandring i solvatisering av ligand og protein ved binding. Forskjellen i  $\Delta C_p$  og temperatur er ofte vanskelig å observere (Perozzo et al. 2004). Det er også blitt observert at fortegnet til  $\Delta C_p$  er ulik for polar (+) og upolar (-) solvatisering (Prabhu & Sharp 2005). En tidlig studie utført av Kauzmann (1959) viste at hydrofobe interaksjoner antas å være viktige for stabiliteten til flere protein-ligand komplekser og proteinstrukturer. Hydrofobe interaksjoner er et resultat av to prosesser, frastøtning av upolare grupper fra vann, og grupperingen av de upolare gruppene mot senteret av proteinet eller proteinkomplekset (Connelly & Thomson 1992). Resultatet av dette vil føre til en negativ endring i varmekapasitet som følge av assosiasjonen av hydrofobe grupper i vann ved konstant trykk (Syme et al. 2007).

## 1.6 Isoterm titreringskalorimetri (ITC)

Så og si alle molekylære interaksjoner genererer eller absorberer varme. ITC er en god metode for å detektere små varmemeforandringer, eksempelvis når et kompleks dannes ved konstant temperatur. ITC instrumentet består av to identiske celler, en prøvecelle og en referansecelle, bestående av et termisk ledende materiale (gull eller hasteloy) i et adiabatisk system som vist i figur 1.6.1. ITC systemet er basert på tilbakemelding fra meget sensitive kretser på hver av cellene. Det tilføres en konstant spenning som gir baselinjen til systemet. Om det er en eksoterm reaksjon vil «feedback power» deaktiveres til temperaturen er tilbake ved grunnlinjen, mens det ved en endoterm reaksjon vil tilføres mer energi for at cellen skal holde konstant temperatur (Pierce et al. 1999).



Figur 1.6.1. Til venstre: Skjematisk oversikt over et ITC instrument (Pierce et al. 1999). Til høyre - øverst: Typisk ITC termogram. Til høyre - nederst: Bindingsisotermesamt hvordan  $\Delta H$ ,  $K_a$  og  $n$  finnes (Freire 2004).

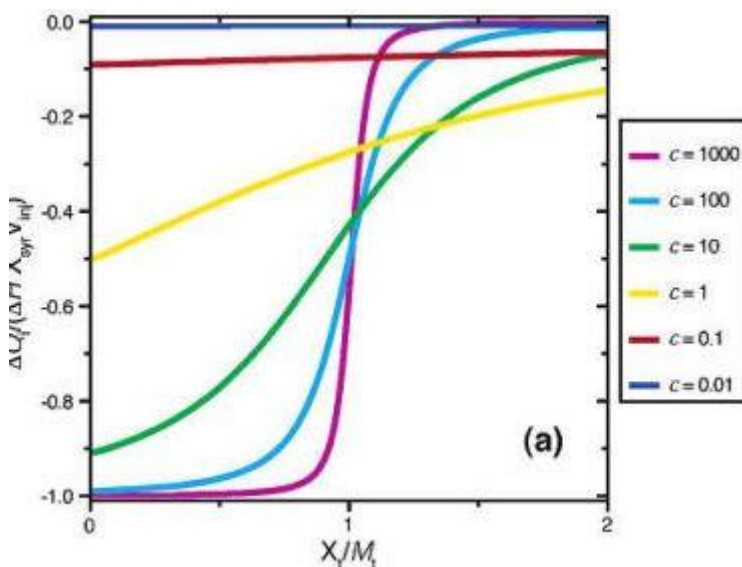
Det er viktig at både protein og ligand er i samme buffer samt at proteinløsningen er nøye degasset før den tilsettes cellen. Dette fører til at problemer grunnet ulikheter i buffer og uønskede luftbobler unngås. Referansecellen inneholder kun vann eller løsningsbuffer (Pierce et al. 1999)

Et ITC forsøk blir utført ved å titrere små mengder ligand inn i en proteinløsning under konstant omrøring. Varmeutviklingen fra hver injeksjon blir registrert og plottes mot molar ratio av protein og ligand. Ut i fra kurven kan  $K$  og  $\Delta H$  beregnes. Ved bruk av disse

parameterne kan reaksjonens  $\Delta G$  og  $\Delta S$  bestemmes (Perozzo et al. 2004; Wiseman et al. 1989). Formen på kurven avhenger av parameteren  $c$  som kan beregnes ved hjelp av likevektskonstanten ( $K_a$ ) og proteinkonsentrasjonen ( $[P]$ ) se ligning 1.5.10:

$$c = n K_a \times [P] \quad 1.5.10$$

$C$ -verdien bør ifølge Wiseman et al. (1989) ligge mellom 10 og 1000. Turnbull og Daranas (2003) har imidlertid vist at det er mulig å studere lavaffinitetssystemer, men da må visse kriterier være oppfylt; det må være kjent bindingsstøkiometri for reaksjonen og konsentrasjonene til både protein og ligand må være nøyaktige. I tillegg må en tilstrekkelig del av bindingsisotermen brukes under forsøket (proteinet må oppnå en høy metningsgrad), og det må være en tilstrekkelig signal til støy ratio. En lav  $c$ -verdi gjenspeiler svak binding mellom protein og ligand som vist i figur 1.6.2.



Figur 1.6.2. Formen på ITC-isotermen er bestemt av  $c$ -verdien (Turnbull & Daranas 2003).

## 1.7 Mål med oppgaven

Tidligere studier viser at residuer som binder sterkt til  $(\text{GlcNAc})_6$  også er viktige med tanke på prosessivitet (Zakariassen et al. 2009). Det antas derfor at det er en korrelasjon mellom bindingsstyrke og prosessivitet.

I denne oppgaven har bindingsfrienergi for binding av substrat til villtype, samt binding av substrat til utvalgte seterrettede mutanter blitt studert ved hjelp av ITC. Det er valgt ut fem

residuer som er antatt viktige for tilrettelegging den substratbindende kløften og/eller tunneldannelsen ved det aktive setet, samt to katalytiske residuer. De utvalgte bindingsresiduene er D316, E221, F190, W97 og W220, videre er de katalytiske residuene R294 og Y145.



## 2 Materialer:

### 2.1 Laboratorieutstyr

Laboratorieutstyr	Spesifikasjon	Leverandør
<b>Autoklavteip</b>	13 mm	VWR
<b>Automatpipetter</b>	Finnpipetter	Thermo Scientific
<b>Blåkorkflasker</b>	1000 mL 500 mL 250 mL 100 mL	VWR
<b>Cellstar® tubes, Blåkorkrør</b>	15 mL 50 mL	Greiner Bio-One
<b>Bordsentrifuge</b>	Sigma 1-14	LABEX
<b>Cryorør</b>	2 mL	Starsted
<b>Dyrkningskolber</b>	2 L 1 L	Nalgene
<b>Eppendorfrør</b>	1,5 mL	Axygen
<b>Filter</b>	Steritopp 0,22 µm	Millipore
<b>Fryser (-20 °C)</b>		Bosch
<b>Fryser (-80 °C)</b>	Ultra-Low	SANYO
<b>Gelfotoutstyr</b>	Gel Doc EZ Imager	Bio-Rad
<b>Glassutstyr</b>		Schott-Duran
<b>Inkubator</b>		Termaks
<b>Isbitmaskin</b>	KF 145	PORKKA
<b>ITC-kalorimeter</b>	VP-ITC Mikrokalorimeter	MicroCal
<b>Kjøleskap</b>		Gram
<b>Kyvette</b>	1 x 1 cm	VWR
<b>LP-kromatografisystem</b>	BioLogic LP system Kolonne Stempel	Bio-Rad
<b>Magnetrorer</b>		VWR

<b>Mikrobølgeovn</b>	L17MSB13E	Logik
<b>Mikrovekt</b>	Sartorius CP-2P	VWR
<b>Oppkonsentreringsrør</b>	Macrosep-10K Macrosep-30K	Pall Corporation
<b>Parafilm</b>	5 cm	VWR
<b>PCR-maskin</b>	PCR Doppio	VWR
<b>PCR-rør</b>	0,2 mL	VWR
<b>Pertiskåler</b>	9 cm	Heger
<b>pH-meter</b>	SevenEasy	Mettler Toledo
<b>Pipettespisser</b>	«Next Generation Tip Refill»	VWR
<b>Risteinkubator</b>	Multitron Standard Multitron Eco	Infors
<b>Sentrifuge</b>	Avanti™ J-25 Sentrifuge-5430R	Beckman Eppendorf
<b>Sentrifugerotor</b>	JA-10 5430/5430 R	Beckman Eppendorf
<b>Sentrifugerør</b>	500 mL 30 mL	Nalgene
<b>Spektrofotometer</b>	AG Biophotometer	Eppendorf
<b>Sprøytefilter</b>	0,2 µm	Sarstedt
<b>Sprøyter</b>	1 mL 10 mL 50 mL	BD plastipak
<b>Sterilskap</b>	Av-100	TelStar
<b>Vannbad</b>	Eco Temp TW12	Julabo
<b>Vekt</b>	LC621P	Sartorius Basic
<b>Whirlmikser</b>	Vortex-Genie 2	Scientific Industries

## 2.2 Programvare til dataanalyse

Bruksområde	Programvare	Leverandør
ITC	ORIGIN 7.0	MicroCal
LP-kromatografisystem	LP Data View	Bio-Rad
Gel visualisering	ImageLab	Bio-Rad
Sekvensering	CLC DNA Workbenck 6	CLCbio

## 2.3 Kjemikalier

Kjemikalie	Leverandør
<b>3-(N-morfolin) propansvovelsyre (MOPS) SDS buffer (20x)</b>	Invitrogen
<b>Aceton, CH<sub>3</sub>CHCH<sub>3</sub></b>	Sigma-Aldrich
<b>Agar, Bacto-agar</b>	Merck
<b>Ampicillin, C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S</b>	Sigma-Aldrich
<b>Bacto™ Gjærekstrakt</b>	Merck
<b>Bacto™ Trypton</b>	Merck
<b>Bio-Rad Protein Assay Fargereagens</b>	Bio-Rad
<b>Coomassie® Brilliant Blue R-250</b>	Bio-Rad
<b>Destillert vann, dH<sub>2</sub>O (Milli-Q kvalitet)</b>	
<b>Dibasisk kaliumfosfat, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Sigma-Aldrich
<b>Eddiksyre, CH<sub>3</sub>COOH</b>	Sigma-Aldrich
<b>Etanol, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH</b>	VWR
<b>Etylenediaminetetraeddiksyre (EDTA), C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub></b>	Sigma-Aldrich
<b>Fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF), C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>FO<sub>2</sub>S</b>	Sigma-Aldrich
<b>Glyserol, C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O<sub>5</sub></b>	VWR

<b>Hydrogenklorid, HCl</b>	Sigma-Aldrich
<b>Imidazol, C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub></b>	Sigma-Aldrich
<b>Isopropyl-1-tio-β-D-tiogalaktopyrasonid (IPTG)</b>	Sigma-Aldrich
<b>Kaliumdihydrogenfosfat, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Sigma-Aldrich
<b>Magnesiumklorid, MgCl<sub>2</sub></b>	VWR
<b>Natriumhydroksid, NaOH</b>	VWR
<b>Natriumklorid, NaCl</b>	VWR
<b>Ni-NTA Superflow</b>	Qiagen
<b>NuPAGE® 10% Bis-Tris Gel 1,0mm x 10 brønner</b>	Invitrogen
<b>NuPAGE® Prøvebuffer (4x)</b>	Invitrogen
<b>NuPAGE® Reduserende agent (10x)</b>	Invitrogen
<b>Sukrose, C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub></b>	VWR
<b>Trizma base, C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub></b>	Sigma-Aldrich

## 2.4 Proteiner og substrater

<b>Protein/Enzym/Substrat</b>	<b>Spesifikasjoner</b>	<b>Leverandør</b>
<b>BenchMark protein ladder</b>		Invitrogen
<b>Heksaacetylkitohexaose</b>		Megazyme
<b>His-taggede kitinaser</b>	His <sub>10</sub> -ChiB-E144Q	Laget av Anne Line Norberg
	His <sub>10</sub> -ChiB-E144Q-D316A	Laget av Patricia Wildberger
	His <sub>10</sub> -ChiB-E144Q-F190A	Laget av Patricia Wildberger
	His <sub>10</sub> -ChiB-E144Q-R294A	Laget av Anne Grethe Hamre
	His <sub>10</sub> -ChiB-E144Q-W97A	Laget av Patricia Wildberger
	His <sub>10</sub> -ChiB-E144Q-W220A	Laget av Patricia Wildberger
	His <sub>10</sub> -ChiB-E144Q-Y145A	Selvlaget
<b>Lysozym</b>		Sigma-Aldrich

## 2.5 Medier

### 2.5.1 Selvlagde medier

Medium	Innhold
<b>LB-medium med agar</b>	Trypton 10 g Gjærekstrakt 5 g NaCl 10 g Agar 15 g Løses i dH <sub>2</sub> O til et sluttvolum på 1 L Ampicillin tilsettes til en konsentrasjon på 100 µg/mL
<b>LB-medium uten agar</b>	Trypton 10 g Gjærekstrakt 5 g NaCl 10 g Løses i dH <sub>2</sub> O til et sluttvolum på 1 L
<b>TB-medium</b>	Trypton 12g Gjærekstrakt 24 g Glyserol (85 %) 4 mL Løses i dH <sub>2</sub> O til et sluttvolum på 900 mL 100 mL filtrert saltløsning (0,17 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,72 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) tilsettes etter autoklaving.

### 2.5.2 Ferdige medier

Medium	Leverandør
<b>SOC – medium</b>	Life Technologies

## 2.6 Kit

Kit	Innhold	Leverandør
<b>E.N.Z.A.® Plasmid Mini Kit I</b>	Oppsamlingsrør (2 mL) Løsning I/RNase Løsning II (NaOH) Løsning III (Guanidin-HCl, Eddiksyre) HiBind™ DNA minikolonne Ekvibreringsbuffer (NaOH) HB buffer (Guanidin-HCl, isopropanol) DNA vaskebuffer Elueringsbuffer	Omega BIO-TEK
<b>Pellet paint® Co-Precipitant kit</b>	0,3 M natriumacetat pH 5,2 Pellet paint® Co-Precipitant	Novagen
<b>Qubit® BR</b>	Qubit® dsDNA BR buffer Qubit® dsDNA BR reagent	Life Technologies
<b>QuickChange II Site Directed Mutagenesis Kit</b>	10x reaksjonsbuffer DpnI restriksjonsenzym dNTP miks PfuUltra HF DNA polymerase pWhitescript 4.5-kb kontrollplasmid (5 ng/μl) Oligonukleotid kontrollprimer 1 Oligonukleotid kontrollprimer 2	Stratagene

## 2.7 Buffere og løsninger

Buffer/Løsning	Innhold
<b>0,1 M Kaliumfosfatbuffer pH 6,0</b>	13,2 mL 1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 86,8 mL 1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Fortynnes med dH <sub>2</sub> O til et totalvolum på 1L
<b>1 M Tris-HCl pH 8,0</b>	121 g Trizma base pH justeres med 6M HCl til pH 8,0 Fortynnes til et totalvolum på 1 L med dH <sub>2</sub> O
<b>Arbeidsløsning til SDS-PAGE</b>	500 µL Blå buffer 200 µL Reducing agent 300 µL dH <sub>2</sub> O
<b>Avfargingsløsning SDS-PAGE</b>	100 mL Etanol 75 mL 100 % Eddiksyre 825 mL dH <sub>2</sub> O
<b>Bindingsbuffer NI-NTA</b>	20 mM Tris-HCl pH 8,0 5 mM Imidazol 0,5 M NaCl
<b>Elueringsbuffer NI-NTA</b>	20 mM Tris-HCl pH 8,0 250 mM Imidazol 0,5 M NaCl
<b>Fargeløsning SDS-Page</b>	0,50 g Comassie Brilliant Blue R250 200 mL Etanol 50 mL 100 % Eddiksyre 250 mL dH <sub>2</sub> O
<b>Lysis-buffer</b>	1 M Tris-HCl 0,5 M EDTA 1 M MgCl <sub>2</sub> 1 M NaCl 1 mg/mL Lysozym
<b>Spheroplastbuffer</b>	30 mL 1 M Tris-HCl pH 8,0 51,3 g Sukrose 0,3 mL 0,5 M EDTA pH 8,0 0,6 mL PMSF Fortynnes til et totalvolum på 300 mL med dH <sub>2</sub> O
<b>Vaskebuffer NI-NTA</b>	20 mM Tris-HCl pH 8,0 20 mM Imidazol 0,5 M NaCl

## 3 Metoder

### 3.1 Mutant design

På bakgrunn av tidligere forskning er det interessant å utføre bindingsstudier med både aromatiske og polare residuer i det aktive setet hos ChiB. Residuene som ble studert i denne oppgaven var: W97, Y145, F190, W220, E221, R294 og D316 (tabell xx). For å kunne studere binding mellom de aktuelle residuene og Heksa-*N*-acetylglukosamin, (GlcNAc)<sub>6</sub>, må enzymet inaktiveres. Dette kan gjøres ved å mutere den katalytiske syren, E144, til glutamin. Alle mutanter med unntak av His10-E144Q-Y145A var laget tidligere. I tillegg ble His10-R446-E144Q og His10-R446-E144Q-W97A laget. Dette for å kunne studere bidraget av det kitinbindende domenet.

#### 3.1.1 Primer design

For å mutere ønsket mutant, kreves det to primere, en forward og en reverse. Primerene må ha ønsket mutasjonssekvens og i tillegg være komplementære. Design og bestilling av primere ble utført av stipendiat Anne Grethe Hamre ved bruk av QuickChange Primer Design tilgjengelig på Agilent Technologies sine nettsider (AgilentTechnologies 2015). Effektiviteten og sensitiviteten til en polymerase kjedereaksjon (PCR) er avhengig av gode primere. Følgende faktorer er av betydning: 1) assosiasjon- og dissosiasjonskinetikken til primer-templat duplekset ved anealing- og ekstensjonstemperaturene, 2) dupleksets stabilitet med ønsket «mismatch» mutasjon, og 3) polymerasens evne til å gjenkjenne og forlenge området med «mismatch» mutasjonen. (Abd-Elsalam 2003) (He et al. 1994). For å oppnå ønsket sensitivitet og spesifisitet er det noen retningslinjer som bør følges. Lengden på primerene bør være mellom 18 og 30 baser, GC-innholdet mellom 45-60% og smeltetemperaturen (T<sub>m</sub>) omkring 52-58 °C (Abd-Elsalam 2003). Primere benyttet for å lage mutantene i denne oppgaven er vist i tabell 3.1.1.



Tabell 3.1.1 Oversikt over primere brukt for seterettet mutagenese

Mutant	Templat	Primer	Sekvens
<b>His<sub>10</sub>-E144Q-Y145A</b>	His <sub>10</sub> -E144Q	Forward	5'-CCGCCGCTTGCGGGGCTGCCAGTCGATGTCCA-3'
		Reverse	5'-GGCGGCGAACGCCCCGACGGTCAGCTACAGGT-3'
<b>His<sub>10</sub>-G446-E144Q</b>	His <sub>10</sub> -E144Q	Forward	5'-CCGGCGTCGGCCCCGGCTAATAACCTATCATGACCGCGCC-3'
		Reverse	5'-GGCGCGGTCATGATAGGTTATTAGCCGGGGCCGACGCCGG-3'
<b>His<sub>10</sub>-G446-E144Q-W97A</b>	His <sub>10</sub> -G446-E144Q	Forward	5'-GTTCTCCATCGGCGGCGCGTACTACTCCAACGAT-3'
		Reverse	5'-ATCGTTGGAGTAGTACGCGCCGCCGATGGAGAAC-3'

### 3.1.2 Oppdyrking av bakteriestamme

For å utføre seterettet mutagenese er det nødvendig å dyrke opp *E. coli* celler med ønsket plasmid. Plasmidet benyttes videre som templat for muteringen.

Materialer:

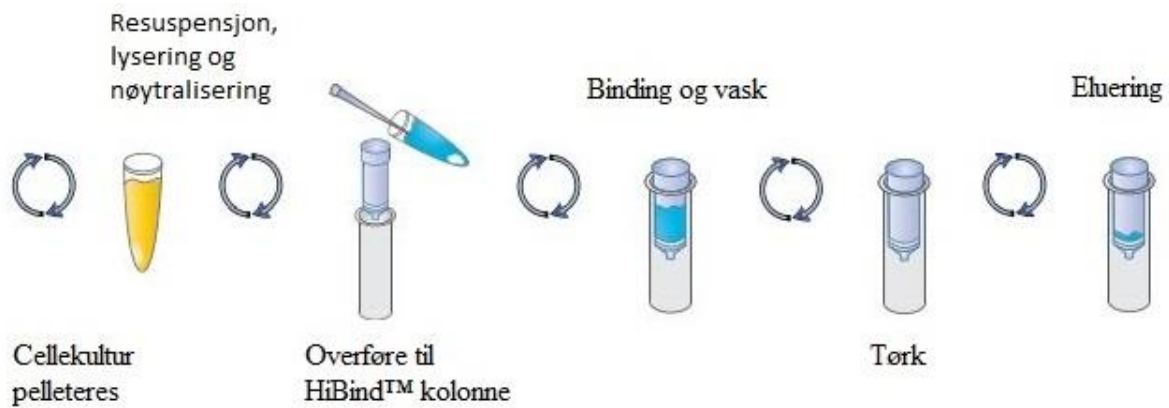
- LB-medium
- Ampicillin (115 mg/ml)
- Frysestock med ønsket bakteriestamme

Metode:

Et dyrkningsrør med 4 mL LB-medie og 2 µL 115 mg/mL ampicillin ble inokulert med celler fra ønsket frysestock. Bakteriekulturen ble videre inkubert ved 37 °C og 225 rpm over natt (12-16 timer).

### 3.1.3 Isolering av plasmid ved bruk av E.N.Z.A. ® Plasmid Miniprep Kit I Spin Protocol.

Plasmid ble videre isolert fra cellekultur ved bruk av E.N.Z.A. ® Plasmid Mini Kit I. Kitet fungerer ved at cellene først blir lysert alkalisk. Deretter bindes DNA til en HiBind® DNA kolonnemembran. Kolonnen blir så vasket og plasmid elueres til slutt med en buffer med lavt saltinnhold (VWR 2015) De ulike trinnene er vist i figur 3.1.1.



Figur 3.1.1 Isolering av plasmid med E.N.Z.A. © Plasmid Mini Kit I (VWR 2015).

#### Materialer:

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

#### Metode:

1 mL cellekultur ble overført til et eppendorfrør og høstet ved sentrifugering i ett minutt ved 10 000 x g i romtemperatur. Mediet ble helt av og pelleten resuspendert i 250 µL Solution I (tilsatt RNAase A). Videre ble det tilsatt 250 µL Solution II, og røret ble vendt forsiktig opp og ned til det ble dannet et klarere lysat. Deretter ble det tilsatt 350 µL Solution III, og løsningen ble umiddelbart blandet ved å snu på røret til det ble dannet en hvit utfelling. Løsningen ble deretter sentrifugert ved 13 000 x g i ti minutter ved romtemperatur. I mellomtiden ble en miniprep-kolonne klargjort ved å tilsette 100 µL ekvibrasjonsbuffer til kolonnen som ble plassert i et 2 mL oppsamlingsrør. Miniprep-kolonnen ble sentrifugert ved 13 000 x g i ett minutt før flow-through ble dekantert. Deretter ble den supernatanten fra den hvite utfellingen overført til den ekvilibrerte kolonnen og sentrifugert ved 13000 x g i et minutt. Flow-through ble dekantert og 500 µL Buffer HBC ble tilsatt kolonnen før en ny runde sentrifugering. Flow-through ble igjen dekantert, før 700 µL DNA vaskebuffer ble tilsatt, etterfulgt av en ny sentrifugering. Flow-through ble helt av og den tomme kolonnen ble videre sentrifugert i ytterlige to minutter ved 13 000 x g. Dette for å tørke kolonnematriksen. Kolonnen ble tilslutt plassert i et rent eppendorfrør. Deretter ble 30 µL elueringsbuffer tilsatt før en siste sentrifugering for å eluere ut DNAet ble gjennomført. Det isolerte plasmidet ble oppbevart ved  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.1.4 Måling av DNA-konsentrasjon med Qubit®

For videre bruk er det nødvendig å vite konsentrasjonen til det rensede plasmidet. Konsentrasjonen ble målt ved bruk av et Qubit® dsDNA BR Assay Kit og et Qubit® Fluorometer. Dette fluorometeret måler DNA konsentrasjoner fra 1-1000 ng/ $\mu$ L (LifeTechnologies 2015c).

Materialer:

- Qubit dsDNA BR Reagent
- Qubit dsDNA BR Buffer
- Renset plasmid
- Qubit® rør

Metode:

Det ble laget en arbeidsløsning bestående av 199  $\mu$ L BR buffer og 1  $\mu$ L BR reagent for hver prøve som skulle måles. Videre ble 2  $\mu$ L plasmid og 198  $\mu$ L arbeidsløsning blandet i et Qubit® rør. Prøvene ble vortexet og inkubert ved romtemperatur i to minutter. Konsentrasjonene ble deretter bestemt med et Qubit® fluorometer og en tidligere laget standardkurve.

### 3.1.5 Seterettet mutagenese

Seterettet mutagenese er en metode hvor det gjøres punktspesifikke mutasjoner i DNA. Ved en slik spesifikk endring i mRNA-sekvensen kan føre til endring i aminosyresekvensen som videre potensielt kan endre proteinstrukturen. For å lage spesifikke punktmutasjoner i DNA kan seterettet mutagenese benyttes. Kitet som ble brukt var QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit. Det ble videre benyttet PCR for amplifisering av ønsket DNA sekvens (se avsnitt 3.1.6)

Materialer:

- QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit
- Primere (tabell 3.1.1)
- dsDNA templat (avsnitt 3.1.3 og tabell 3.1.1)

Metode:

Prøvereaksjonen vist i tabell 3.1.2 og kontrollreaksjonen vist i tabell 3.1.3 ble laget i PCR-rør på kuldeblokk.

Tabell 3.1.2 Prøvereaksjon ved seterettet mutagenese

Komponent	Mengde ( $\mu\text{L}$ )
<b>10x reaksjonsbuffer</b>	5
<b>ChiB dsDNA templat (75-100 ng)</b>	2
<b>Forward primer (100 ng/<math>\mu\text{L}</math>)</b>	1,25
<b>Reverse primer (100 ng/<math>\mu\text{L}</math>)</b>	1,25
<b>dNTP mix</b>	1
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	39,5
<b>PfuUltra HF DNA polymerase</b>	1

Tabell 3.1.3 Kontrollreaksjon for seterettet mutagenese.

Komponent	Mengde ( $\mu\text{L}$ )
10x reaksjonsbuffer	5
<b>pWhitescript 4.5 kb control plasmid</b>	2
<b>Forward primer</b>	1,25
<b>Reverse primer</b>	1,25
<b>dNTP mix</b>	1
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	39,5
<b>PfuUltra HF DNA polymerase</b>	1

### 3.1.6 PCR og DpnI behandling

PCR er en metode som oppamplifiserer en spesifikk DNA sekvens. Prøvene settes i en termosyklus som raskt kan endre temperatur. Det er tre hovedtrinn i en PCR syklus. I det første trinnet denatureres DNA. Prøven varmes opp til ~95 °C og DNA går fra dsDNA til ssDNA. Dette som følge av brudd på hydrogenbindingene mellom heliksene. I trinn to skjer det en hybridisering. Prøven kjøles ned til ~55°C og primererne binder seg til templatene. I det tredje trinnet vil det foregå en polymerisering. Her varmes prøven opp til ~72 °C og mål-DNA vil bli syntetisert av DNA polymerase. Denne syklusen gjentas flere ganger for å oppnå ønsket mengde DNA. Etter endt PCR syklus tilsettes restiksjonenzymet DpnI. DpnI bryter ned metylert foreldre-DNA samt hemimetylert DNA (villtype DNA med fraksjoner av PCR-produkt), men ikke det ønskede PCR-produktet.

#### Materialer

- PCR-reaksjoner fra 3.1.5
- DpnI

#### Metode:

PCR-programmet som ble benyttet er vist i tabell 3.1.4.

Tabell 3.1.4 PCR-programmet som ble brukt ved seterettet mutagenese av ChiB-mutanter.

Reaksjon	Sykluser	Temperatur (°C)	Tid (sekunder)
<b>Oppvarming av lokk</b>	1	110	
<b>Initial denaturering</b>	1	95	30
<b>Denaturering</b>		95	30
<b>Hybridisering</b>	18	55	60
<b>Forlengelse</b>		68	330*
<b>Nedkjøling</b>	1	10	

\*5,5 minutter for å gjøre ekstensjonstiden til rundt 1 minutt per kilobase.

Etter endt PCR-program ble 1  $\mu\text{L}$  DpnI tilsatt PCR reaksjonen for å bryte ned ikke ønsket DNA, og kun sitte igjen med rent PCR-produkt. Reaksjonene ble deretter inkubert ved 37 °C i én time.

### 3.1.7 Utfelling av plasmid

For å øke konsentrasjonen av plasmid før transformering inn i OneShot® BL21 star (DE3) benyttes ofte et kit kalt Pellet Paint® Co-Precipitant. Dette kitet renser og oppkonsentrerer plasmidet gjennom flere rensetrinn. I første trinn farges plasmidet rosa, noe som gjør det lett å følge plasmidet i påfølgende rensesteg hvor primere og annet uønsket materiale fjernes. Pellet Paint interfererer ikke med transformasjonen (Millipore 2015).

Materialer:

- DpnI behandlede reaksjoner fra 3.1.7
- Pellet Paint® Co-Percipitant
- Etanol
- $\text{dH}_2\text{O}$

Metode:

Reaksjonene fra avsnitt 3.1.7 ble videre overført til eppendorfrør. 2  $\mu\text{L}$  Pellet Paint og 0,1 volum 3 M NaAc ble tilsatt DNA løsningen før den ble blandet forsiktig. To volum 96% EtOH ble deretter tilsatt, før løsningen ble inkubert i to minutter ved romtemperatur. For å felle ut DNA ble prøven sentrifugert i fem minutter ved 16 000 x g. Supernatanten ble fjernet og pelleten renses ved å tilsette flere volum 70 % EtOH før en ny sentrifugering ble utført. Supernatanten ble dekantert og pelleten vasket. Dette ble gjort ved å tilsette 96 % EtOH før et siste sentrifugeringstrinn. Etter dekantering av supernatant ble plasmidet inkubert ved romtemperatur til all etanol var fordampet. Den tørre pelleten ble tilslutt resuspendert i 5  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$ .

### 3.1.8 Transformering av plasmid inn i OneShot® BL21 Star™ (DE3) celler

Renset og oppkonsentrert plasmid ble transformert inn i OneShot® BL21 Star™ (DE3) celler. Disse cellene har en høy transformasjonseffektivitet,  $1 \times 10^8$  cfu/ $\mu$ g plasmid DNA, i tillegg til at de er designet for et høyt ekspresjonstrykk av protein (LifeTechnologies 2015b).

Materialer:

- OneShot® BL21 star (DE3) celler
- Plasmid fra 3.1.7
- SOC medium
- LB-agarplater (100  $\mu$ g/mL ampicillin)

Metode:

OneShot® BL21 Star™ (DE3) celler ble tint forsiktig på is før plasmidet fra avsnitt 3.1.8 ble tilsatt og blandet forsiktig. Cellene ble videre inkubert i 30 minutter på is. Deretter ble cellene varmebehandlet på 42 °C i 30 sekunder etterfulgt av to minutter på is. Videre ble det tilsatt 250  $\mu$ L forvarmet SOC-medium. Reaksjonene ble deretter inkubert ved 37 °C og 220 rpm i en time. Etter endt inkubasjon ble cellekulturen platet ut på LB-agarplater. To ulike konsentrasjoner, henholdsvis 25 og 150  $\mu$ L, ble platet ut før platene ble inkubert ved 37 °C over natt.

### 3.1.9 Oppdyrking av transformanter

Transformanter fra LB-agarplatene ble plukket og dyrket etter metoden beskrevet i avsnitt 3.1.2.

### 3.1.10 Tillaging av frysestocker

En frysestock ble laget av cellekulturene fra avsnitt 3.1.9 for oppbevaring ved  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Materialer:

- Cellekultur
- 87 % glyserol

1050  $\mu\text{L}$  cellekultur og 450  $\mu\text{L}$  autoklavert 85% glyserol ble blandet i et cryorør. Røret ble vendt noen ganger for å sikre at blandingen var homogen før det ble plassert i  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  fryseren for videre oppbevaring.

### 3.1.11 Isolering og konsentrasjonsmåling av plasmid til sekvensering

Plasmid med mutert DNA ble isolert som beskrevet i avsnitt 3.1.4. DNA-konsentrasjonen ble målt ved bruk av Qubit® tilsvarende avsnitt 3.1.5.

### 3.1.12 Tillagning av sekvenseringsreaksjoner

For å bekrefte korrekt mutasjon i plasmidet ble muterte plasmid sendt til GATC Biotech, Constance, Tyskland for sekvensering. Ved DNA-sekvensering bestemmes nukleotidsekvensen til DNAet. Dersom den muterte sekvensen sammenliknes med villtype sekvensen er det mulig å bekrefte korrekt mutasjon. Sammenligningen av nukleotidsekvensene ble gjort ved hjelp av CLC DNA Workbench. Primerene benyttet til sekvenseringen av de ulike ChiB-mutantene er presentert i tabell 3.1.5.



Tabell 3.1.5. Primere brukt til sekvensering.

Primer	Sekvens (5' -3')
<b>Sp6</b>	ATTAGGTGACACTATAG
<b>T7</b>	TAATACGACTCACTATAGGG
<b>Fw1568</b>	CCAGACGTAGCCTTGGTAGG
<b>Rev537</b>	TGAAGGATTA CGGCTTCGAC

#### Materialer

- Isolert plasmid
- Sekvenseringsprimere fra tabell 3.1.5 (5 pmol)
- Elueringsbuffer fra E.N.Z.A.® Plasmid Mini Kit I

#### Metode:

5  $\mu$ L plasmid med en konsentrasjon på mellom 80 og 100 ng/ $\mu$ L ble blandet med 5  $\mu$ L primer (tabell 3.1.5), totalt fire sekvenseringsreaksjoner. Prøvene ble videre merket og sendt til GATC Biotech for sekvensering.

### 3.2 Uttrykking av his-taggede kitinaser

Kitinasegenene det ble arbeidet med i denne oppgaven er tidligere klonet inn i en Pet-16b vektor. Denne vektoren inneholder en N-terminal sekvens med 10 histidinresiduer. I tillegg inneholder vektoren en T7 *lac* promoter, samt en promoter og sekvens som koder for en *lac*-repressor. Denne *lac* repressoren binder seg til en *lac* operatorsekvens nedstrøms for promoteren og hindrer T7 RNA polymerase i å binde seg til *lac* UV5 promoteren i OneShot® BL21 Star™ (DE) cellene. OneShot® BL21 Star™ (DE) cellene inneholder et DE3 lysogen som bærer genet for T7 RNA polymerase under kontroll av *lac*UV5 promoter. En aktiv T7 RNA polymerase elongerer omtrent fem ganger raskere enn *E. coli* RNA polymerase. Når T7 polymerasen innføres til en *E. coli* celle vil kun DNA som er under kontroll av en T7

promoter transkriberes. *lacUV5* promoteren induseres av isopropyl-1-tio- $\beta$ -D-tiogalaktopyranosid (IPTG) ved en konformasjonsendring i *lacUV5* repressoren som gjør at den ikke bindes til promotoren. Ved IPTG tilsetning vil T7 RNA polymerase induseres. Polymerasen vil transkribere målgenet under kontroll av T7 promoteren. Før induksjon forhindres transskripsjon av målgenet ved T7 lysozym inhiberer T7 RNA polymerase. Etter induksjon vil et produseres vesentlig mer T7 RNA polymerase enn T7 lysozymet inhiberer (Andersson 1998). IPTG tilsetning bør skje midt i lag-fasen når cellene forbereder seg på eksponentiell vekst. Ved å måle absorbansen til cellekulturen med et spektrofotometer ved 600 nm ( $OD_{600}$ ) kan det undersøkes når cellene er i denne fasen. Den optiske tettheten gir en indikasjon på celletettheten i mediet. En optimal indusering fremkommer når  $OD_{600}$  ligger mellom 0,8 – 1,0.

### 3.2.1 Overekspresjon

De ulike bakteriestammene ble dyrket i LB-medium tilsatt ampicillin for å uttrykke ønsket kitinase. I dette tilfellet ulike mutanter av kitinase B.

Materialer:

- LB-medium
- Ampicillin (115 mg/mL)
- Frysestock med ønsket bakteriestamme
- 1 M IPTG

Metode:

50 mL LB-medium tilsatt 115 mg/mL ampicillin ble inokulert med ønsket his-tagget kitinase fra frysestock. Forkulturen ble deretter inkubert ved 37 °C og 225 rpm over natt (over 16 timer). Forkulturen ble videre inokulert i nye 250 mL LB-medium tilsatt 115 mg/mL ampicillin til en  $OD_{600}$  på 0,1. Den nye voksekulturen ble inkubert ved samme temperatur til en OD på mellom 0,8 og 1,0 var oppnådd. Temperaturen ble så senket til 22 °C og 220 rpm før kulturene ble indusert med 25  $\mu$ L 1 M IPTG. Etter omkring 16 timer ble cellene høstet.

### 3.2.2 Tillaging av periplasmatisk ekstrakt

*E. coli* er gramnegative bakterier som mellom ytre cellevegg og peptidoglykanlaget har et område kalt periplasma. Kitinasen, ChiB, har vist å ikke ha et N-signal peptid for transportering til dette området. Likevel ser det ut til at enzymet, av ukjente grunner, siver ut i periplasma (Brurberg et al. 2001). Ved tilsetning av spheroplastbuffer, en buffer med høy sukkerkonsentrasjon, vil cellene ta opp dette sukkeret, før det periplasmatiske ekstraktet frigjøres ved osmotisk sjokk med iskaldt vann og MgCl<sub>2</sub>. For å hemme proteaser i løsningen kan fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF) tilsettes.

#### Materialer

- Fersk, kald spheroplastbuffer
- Sterilt, iskald H<sub>2</sub>O
- 1 M MgCl<sub>2</sub>

#### Metode:

For å høste cellene ble cellekulturene sentrifugert ved 8000 rpm ved 4 °C i 20 minutter. Cellepelleten ble deretter resuspondert i 25 mL kald spheroplastbuffer og inkubert på is i fem minutter. Den resusponderte cellekulturen ble spunnet ned ved 8000 rpm i 10 minutter ved 4 °C. Supernatanten ble dekantert og pelleten inkubert i romtemperatur i 10 minutter. Videre ble pelleten resuspondert i 15 mL sterilt, iskaldt vann og inkubert på is i 45 sekunder før det ble tilført 1,5 mL 1 M MgCl<sub>2</sub>. Suspensjonen ble deretter sentrifugert ved 8000 rpm og 4 °C i 10 minutter. Supernatanten ble filtrert gjennom et 0,20 µm sterilfilter. Det periplasmatiske ekstraktet ble oppbevart ved 4 °C frem til rensing.

### 3.2.3 Cytoplasmatisk ekstrakt

Cytoplasmatisk ekstrakt ble laget etter periplasmatisk ekstrakt for å øke utbyttet av den ønskede his-taggede kitinasen. Som tidligere nevnt inneholder ikke ChiB signalpeptid og transporteres derfor bare delvis til periplasma. På grunn av dette antas det at mer protein er igjen i cytoplasma. For å ødelegge cellemembranen og dermed ekstrahere proteinet benyttes lysozym.

Materialer:

- Cellepellet fra siste sentrifugeringstrinn i avsnitt 3.2.2
- Lysisbuffer

Metode:

Cellepelletene fra avsnitt 3.2.2 ble resuspendert i 25 mL lysisbuffer. Løsningene ble inkubert på 37 °C ved 225 rpm i 30 minutter. Etter endt inkubasjon ble løsningene sentrifugert ved 8000 rpm i 20 minutter ved 4 °C. Supernatanten ble filtrert gjennom et 0,20 µm sterilfilter. Det cytoplasmiske ekstraktet ble lagret ved 4 °C frem til rensing.

### 3.3 Rensing av his-taggede ChiB-mutanter

Periplasmatisk- og cytoplasmatisk ekstrakt inneholder urenheter som må fjernes før videre karakterisering av proteinet. En måte å rense his-taggede kitinaser på er ved bruk av immobilisert metallaffinitets-kromatografi (IMAC). IMAC baserer seg på interaksjon mellom et immobilisert transisjonsmetallion på kolonnen og en spesifikk aminosyrekjede på proteinet. Histidin, som det forøvrig er mange av i disse his-taggede kitinasene, er aminosyren med sterkest interaksjon med nikkelet i en nikkelkolonne. For å eluere proteinet kan pH endres, eller en kan tilsette en buffer med høy imidazolkonsentrasjon på kolonnen (Bornhorst & Falke 2011).

#### 3.3.1 Rensing av his-taggede kitinaser med nikkelkolonne

Kitinasene ble rensed ved bruk av en kolonne pakket med Ni-NTA Superflow agarose. Ni-NTA består av et nikkellion og nitroleddiksyre (NTA) – en såkalt chelaterende agent. Nikkellionet har seks bindingssteder hvorav fire er okkupert av NTA og de to resterende er ledige for binding til en histidintag.

Når det kommer til eluering av de his-taggede proteinene, så elueres disse ved hjelp av en buffer med høy imidazol konsentrasjon. Dette fordi imidazol har større affinitet til nikkel enn hva histidin har. Forøvrig er vaskebufferen også tilsatt imidazol, dog lavere konsentrasjon. Dette for å forhindre at uønskede proteiner binder seg til kolonnen under rensesprosessen.

Materialer:

- Periplasmatisk og cytoplasmisk ekstrakt med his-taggede kitinaser fra 3.2.2 og 3.2.3.
- Ni-NTA Superflow kolonnemateriale
- Buffer A
- Buffer B
- Buffer C
- 0,5 M NaOH
- 20 % EtOH

Metode:

En kolonne ble pakket med ~5 mL Ni-NTA Superflow kolonnemateriale. Buffer B ble satt på med en flow hastighet lik 2,5 mL/min til baselinjen var stabil. Proteinekstraktet ble påsatt kolonnen med samme hastighet. Deretter ble kolonnen vasket med buffer A til baselinjen var stabil ved grunnlinje. Buffer B ble så tilsatt for å vaske ut urenheter og løst bundet protein. Det his-taggede proteinet ble til slutt eluert ut ved hjelp av Buffer C. Ved stabil baselinje ble kolonnen vasket i 10 minutter, med henholdsvis 0,5 M NaOH og 20 % EtOH.

### 3.3.2 Natriumdodecylsulfat polyakrylamid gel elektroforese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE brukes for å undersøke størrelse og renhet til proteiner. For at proteinene skal kunne undersøkes må de først denatureres. Dette skjer ved behandling med natriumdodecylsulfat (SDS), ditiorteitol (DDT) og varme. SDS bryter opp to- og tredimensjonale strukturer ved å legge til negativ ladning til aminosyrene. DDT er en sterk reduktant som reduserer disulfidbindinger. Varmen øker molekylhastigheten som tillater binding av SDS til hydrofobe områder og fullføre denatureringen (Caprette 2012). Etter denaturering appliseres proteinene på en polyakrylamid gel. Når elektrisk spenning settes på denne gelen separeres proteinene i løsningen etter størrelse. På grunn av proteinenes negative ladning vil de vandre mot den positive polen. Porer i gelen fører til at små proteiner vandrer raskere og lengre enn store proteiner. En proteinmarkør, en såkalt ladder, benyttes for å identifisere proteinene med hensyn på størrelse.

For å visualiserer proteinene på gelen benyttes Coomassie brilliant blue, et intenst koboltblått fargestoff. Fargen binder hovedsakelig til de basiske aminosyrene i proteinet, og mengden fargestoff som binder er omtrentlig proporsjonal med antall positive ladninger i proteinet. (LifeTechnologies 2015a).

#### Materialer:

- NuPAGE® 10% Bis-Tris Gel 1,0 mm x 10 brønner
- MOPS SDS Running buffer (1x)
- Arbeidsløsning
- Proteinmarkør, Bench Mark Protein Ladder
- Proteinfraksjoner
- SDS-fargeløsning
- SDS-avfargningsløsning
- H<sub>2</sub>O

#### Metode:

10 µL arbeidsløsning og 10 µL proteinløsning ble blandet i et eppendorfrør. Prøvene ble deretter denaturert ved 70 °C i ti minutter. En ferdigstøpt gel ble videre plassert i et gelelektroforesekammer fylt med MOPS SDS buffer. 7,5 µL proteinmarkør og 20 µL denaturert proteinfraksjon ble så applisert i hver sin brønn. Gelen ble påført en spenning på 200 V i 50 minutter. Videre ble gelen farget med SDS-fargeløsning. Omtrentlig 1 dl fargeløsning ble tilsatt gelen før gelkaret ble satt ett minutt i mikrobølgeovn på 750 W. Deretter ble gelen overført til et ristebrett i romtemperatur i fem minutter. Fargeløsningen ble så helt av og gelen vasket med H<sub>2</sub>O før avfargningsløsning ble tilsatt. Avfargningsløsningen ble videre varmet i ett minutt i mikrobølgeovn før også den ble inkubert fem minutter på ristebrett i romtemperatur. Denne prosedyren ble gjentatt totalt to ganger. Tilslutt ble gelen visualisert ved hjelp av EZ-imager fra Bio-Rad.

### 3.3.3 Oppkonsentrering og bytting av buffer

For å rense makromolekylære forbindelser, oppkonsentrere og avsalte prøver, samt bytte buffer brukes gjerne sentrifugefilter. Macrosep® Advance sentrifugefilter har Omega™ membran som binder få proteiner og derfor minker tapet av protein (PallCorporation 2015). Filtrene i sentrifugerørene har ulik porestørrelse, og finnes for eksempel med cut-off ved ulike molekylvekter, for eksempel 30 kDa eller 10 kDa. Forbindelser med lavere molekylvekt enn porestørrelsen vil gå gjennom filteret, større forbindelser vil bli værende.

#### Materialer

- Macrosep® Advance 30K sentrifugerør
- Rene proteinfraksjoner
- Lagringsbuffer, 20 mM Kaliumfosfatbuffer pH 6,0

#### Metode:

Rene proteinfraksjoner ble overført til sentrifugefilter med ønsket porestørrelse, fortrinnsvis MWCO 30 kDa, og tilsatt lagringsbuffer. Rørene ble sentrifugert ved 4300 rcf. 4 °C til det var omtrentlig 1,5 mL proteinløsning igjen i filteret. Flow through ble helt av og filteret etterfylt med lagringsbuffer. Denne prosedyren ble gjentatt fire ganger. Dette for å sikre utskiftning av elueringsbuffer fra rensetrinnet i avsnitt 3.3.1. Til slutt ble proteinløsningen overført til et 15 ml blåkorkrør og oppbevart ved 4 °C.

### 3.3.4 Konsentrasjonsmåling med Bradford-metoden

Bradford-metoden går ut på å endre absorpsjonsmaksimum fra 470 nm til 595 nm ved at fargeløsningen binder seg til proteinets basiske, hovedsakelig arginin, og aromatiske residuer (BioRad 2015). Absorbansen måles ved 595 nm med et spektrofotometer. Mengde protein i løsningen bestemmes med utgangspunkt i en standardkurve.

Materialer:

- Lagringsbuffer, 20 mM Kaliumfosfatbuffer pH 6,0
- Proteinløsning
- BioRad Protein Assay Dye Reagent

Metode:

Proteinløsning ble fortynnet ved hjelp av lagringsbuffer til et totalvolum på 800  $\mu\text{L}$  i tre paralleller. Det ble også laget en blankprøve bestående utelukkende av lagringsbuffer. Videre ble hver prøve tilsatt 200  $\mu\text{L}$  fargeløsning før de ble inkubert i etterfulgt av fem minutters inkubering i romtemperatur. Blankprøven ble brukt til å nullstille spektrofotometeret. Deretter ble konsentrasjonen i de tre parallellene målt.

### 3.4 Isoterm titreringskalorimetri (ITC)

ITC ble benyttet for å bestemme termodynamiske parametere for protein-ligand interaksjoner. Forsøkene ble utført med et VP-ITC kalorimeter fra MicroCal. Instrumentet er beskrevet nærmere i Wiseman et al. (1989).

Materialer:

- Ren proteinløsning
- 20 mM kaliumfosfatbuffer, pH 6,0
- Ligand ( $\text{GlcNAc}$ )<sub>6</sub>
- 0,1 M NaOH
- $\text{dH}_2\text{O}$

Metode:

Før hvert forsøk ble prøvecellen vasket med 0,1 M NaOH og skylt med  $\text{dH}_2\text{O}$  og 20 mM kaliumfosfatbuffer pH 6,0. Proteinløsning ble fortynnet til ønsket konsentrasjon med 20 mM kaliumfosfatbuffer pH 6,0 og degasset under vakuum i 20 minutter. Etter degassing ble 1,8 mL proteinløsning injisert i prøvecellen (prøvecellen rommer totalt 1,41 mL). Et overskudd



proteinløsning ble tilsatt for å hindre dannelse av luftbobler i systemet. 5-8  $\mu\text{L}$  injeksjoner ligand ble tilsatt prøvecellen gjennom en roterende injeksjonssprøyte (260 rpm). For å sikre metning av proteinet ble 36-55 injeksjoner tilsatt. Et minimum på fire ulike temperaturer, fra 10 til 37  $^{\circ}\text{C}$ , for hver mutant ble kjørt, to paralleller eller mer. Se tabell 3.4.1 for oversikt over parametere brukt for de forskjellige mutantene. Data fra den første injeksjonen, 2  $\mu\text{L}$ , ble fjernet fra datasettet. Dette skyldes at unøyaktig verdi grunnet blanding mellom protein- og ligandløsning. Feil i  $\Delta H$ ,  $K_d$  og  $\Delta G$  vil være standardfeil/avvik fra minst to eksperimenter. Feil i  $\Delta S$  og  $T\Delta S$  vil være en følge av forplantning/opphopning av feil. Det ble benyttet en standard 1:1 bindingsmodell for å tilpasse dataene. Alle dataene ble behandlet med dataprogrammet ORIGIN 7.0 (MicroCal).

Tabell 3.4.1 Oversikt over parametere brukt ved ITC.

Enzym	Injeksjon ( $\mu\text{L}$ )	[Enzym] ( $\mu\text{M}$ )	[(GlcNAc) <sub>6</sub> ] (mM)
<b>ChiB</b>	5	20	0,5
<b>ChiB-D316A</b>	5	20	0,5
<b>ChiB-W220A</b>	8	20	2
<b>ChiB-W97A</b>	8	80	2
<b>ChiB-F190A</b>	5	60	1,5
<b>ChiB-R294A</b>	5	20	0,5
<b>ChiB-Y145A</b>	5	40	1
<b>ChiB-E144A</b>	5	20	0,5
<b>ChiB-G446*</b>	5	20	0,5

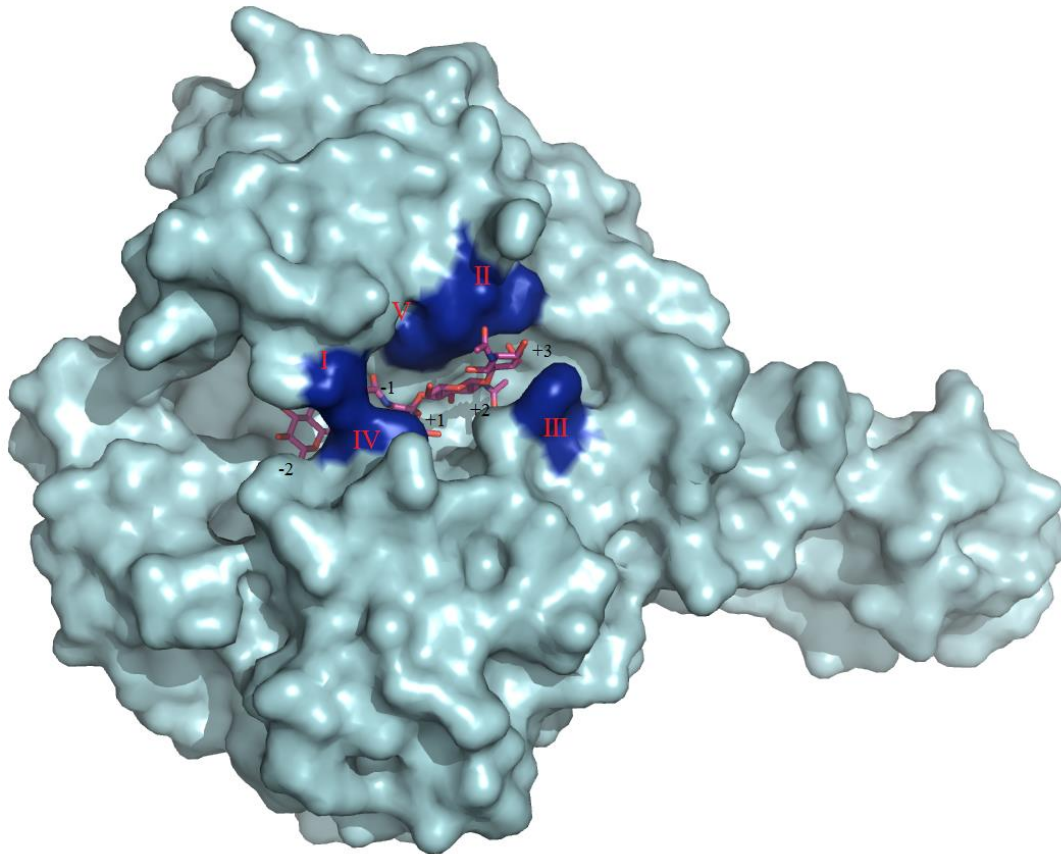
## 4 Resultater

### 4.1 Residuanalyse

#### 4.1.1 Residuer for prosessivitet og tunneldannelse

Et kjennetegn for prosessive kitinaser er aromatiske residuer som strekker seg fra det det kitinbindende domenet til det aktive setet. Disse aromatiske residuene interagerer med substratet når substratet skyves gjennom den substratbindene kløften og produkt frigjøres (Zakariassen et al. 2009). Det er tidligere vist av Sørli et al. (2012) at den prosessive karakteren til ChiB til en viss grad styres av de aromatiske residuene W97 og W220 i henholdsvis subsete +1 og +2. I tillegg til dette er det polare residuer i  $\alpha/\beta$  domenet som er med på å danne den tunnelligende topologien som er interessante å studere om de er bidragsyttere til enzymets prosessivitet.

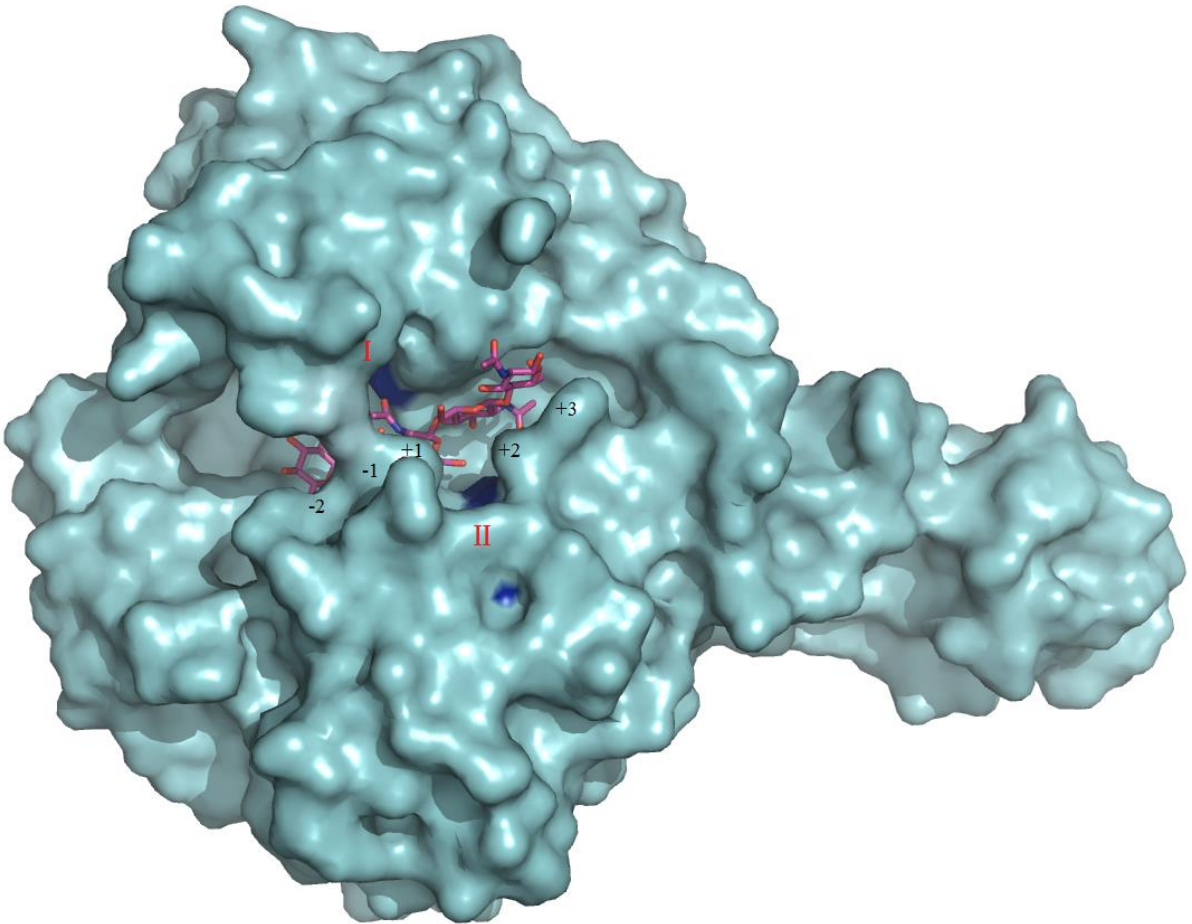
Residuet W97 ligger i subsete +1, ved siden av den enzymatiske hydrolysen. W97 er vist viktig for prosessivitet i nedbrytningen av krystallinsk kitin (Sørli et al. 2012). Residuet danner hydrofobe interaksjoner med substratet og sammen med D316 utgjør de taket til tunnelen over det aktive setet når enzym er bundet til substrat. Residuet W220 er i en loop i  $\alpha/\beta$  domenet, og er med på utgjøre +2 subsetet. I likhet med W97 er W220 viktig for prosessivitet og nedbrytning av krystallinsk kitin, dog i mindre grad (Sørli et al. 2012). Aromaten har stor kontaktflate med sukkeret, hvilket fører til dannelse av mange hydrofobe interaksjoner. W220 danner i tillegg hydrogenbinding med oksygenet til sukkeret i subsete +3. Et annet residuet verdt å nevne er E221. Dette ligger ved siden av W220 og danner en hydrogenbinding med OH-gruppen til sukkeret i subsete +3. E221 danner også hydrogenbinding med oksygenet i sukkerringen til samme enhet i +3 subsete. F190 ligger i subsete +3 på motsatt side av E221. Aromaten F190 danner også hydrogenbindinger med sukkerenheten i +3 subsete. Ved substratbinding vil F190 heves opp mot sukkeret og hjelper til med å danne den substratbindende kløften. Lokasjonen til de forskjellige residuene er vist i figur 4.1.1.



Figur 4.1.1. Krystallstruktur av ChiB hvor de ulike residuenes posisjon er markert med blått. I er D316, II viser til E221, III er F190, IV er W97 og V er W220. Sukkerets posisjon i subsetet er markert med svart. .

#### 4.1.2 Residuer for katalyse

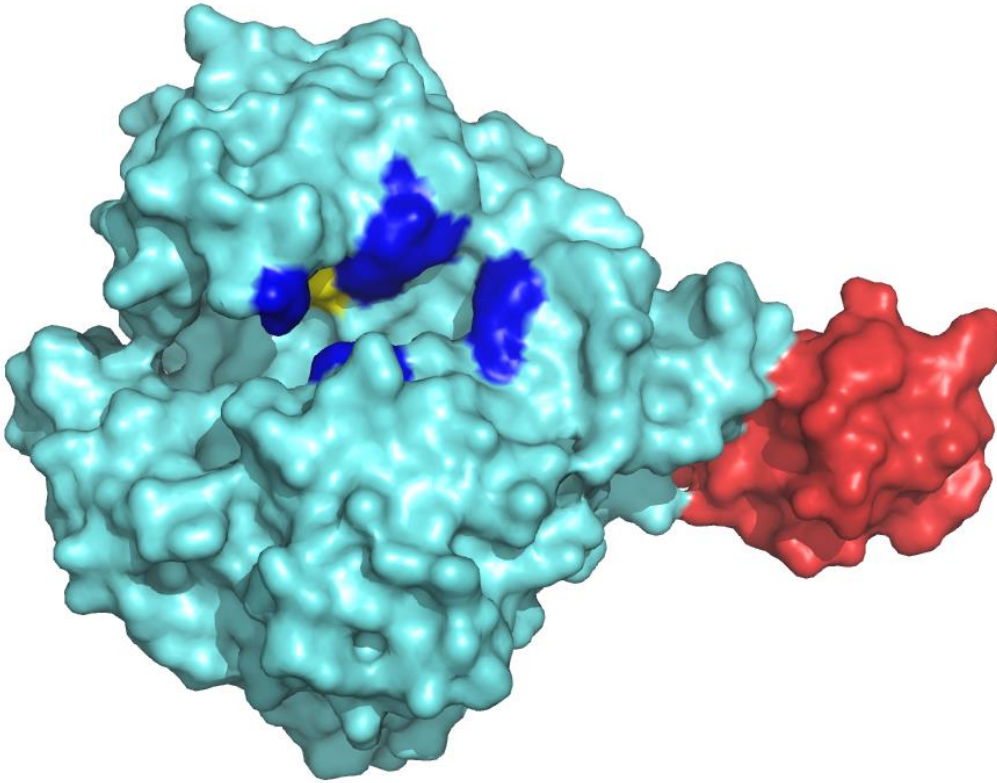
Videre er det polare residuer som har vist seg å være viktig for katalyse i ChiB. Ved subsete +1 ligger R294. Dette residuet danner hydrogenbinding med karbonyloksygenet på N-acetylgruppen i +1 subsete. Madhuprakash et al. (2012) viste i 2012 at R294 er viktig for balansen mellom transglykosylering og hydrolyse. Tilslutt er Y145 verdt å nevne. Dette residuet ligger på motsatt side av R294 ved subsete +1. Y145 er naboresiduet til den katalytiske syren E144. Residuet er vist å danne en hydrogenbinding med OH-gruppen på C6 til sukkeret i subsete +2. Residuenes posisjon er vist i figur 4.1.2



Figur 4.1.2. Krystallstruktur av ChiB hvor de ulike katalytiske residuenes posisjon er markert med blått. I er R294 og II viser til Y145. Sukkerets posisjon i substatet er markert med svarte tall.

Med utgangspunkt i de overnevnte funnene ble følgende mutanter, fortrinnsvis i positive subsetter valgt, D316A, E221A, F190A, W97A, W220A, med tanke på dannelse av tunneltopologi, samt Y145A og R294A med tanke på effekt mot katalyse versus binding.

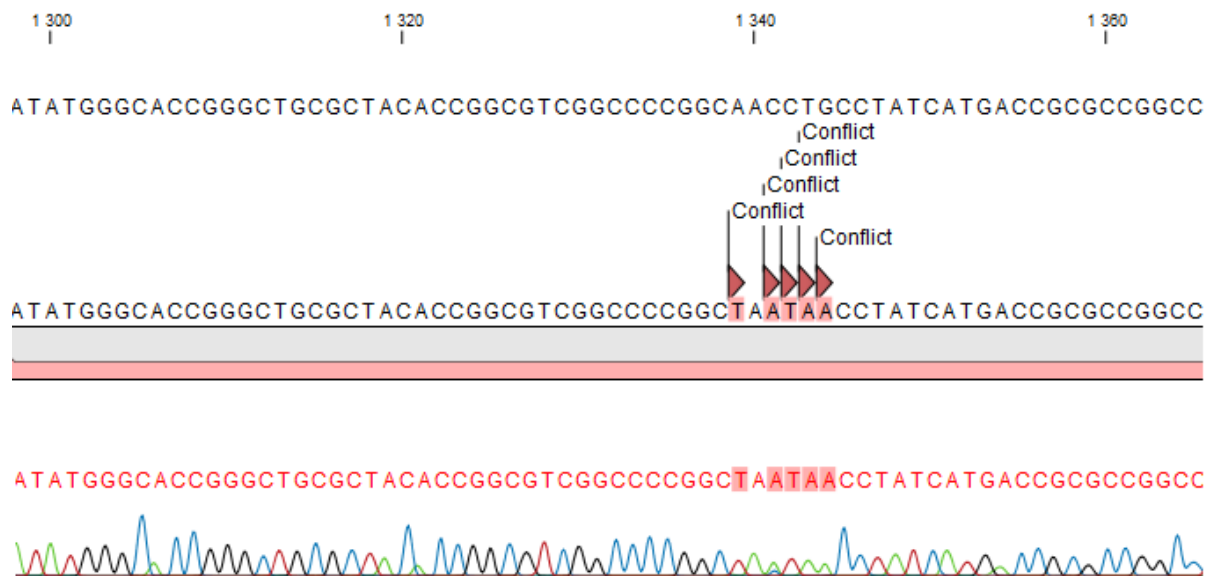
Det ble også laget to mutanter uten det kitinbindende domenet, G446-E144Q og G446-E144Q-W97A med tanke på kunne produsere krystallstrukturer med substrat. Når det skal lages krystallstrukturer av ChiB vil det substratbindende domenet binde seg til et annet enzym og det vil dannes en dimer. Ved å kutte av det kitinbindende domenet vil det kunne lages en krystallstruktur av monomeren. Figur 4.1.3 viser en oversikt over de utvalgte residuene, samt det kitinbindende domenet til ChiB.



Figur 4.1.3. Krystallstruktur av ChiB. Bindingsresiduene er markert i blått, de katalytiske residuene i gult og det kitinbindendedomenet i rødt.

## 4.2 Seterettet mutagenese

For å kunne analysere binding av  $(\text{GlcNAc})_6$  til ChiB og dens mutanter ved hjelp av ITC krever det at enzymene er inaktive. Den katalytiske syren, E144, er derfor mutert til glutamin (Q) i alle mutanter. Som beskrevet i kapittel 3.1.1 ble mutantene, His<sub>10</sub>-E144Q-Y145A, His<sub>10</sub>-G446-E144Q og His<sub>10</sub>-G446-E144Q-W97A, tillaget i denne oppgaven. Samtlige mutanter nevnt i denne oppgaven er his-tagget. For enkelhetens skyld vil mutantene refereres til kun etter deres mutasjon. For å bekrefte at korrekt mutasjon var foretatt ble det muterte plasmidet sendt til GATC Biotech i Constance, Tyskland for sekvensering (beskrevet i kapittel 3.1.12). Resultatet av sekvenseringen ble analysert ved hjelp av programvaren CLC DNA Workbench. I figur 4.2.1 vises en del av aminosyresekvensen til villtype ChiB sammenlignet med G446-E144Q mutasjonen.



Figur 4.2.1. Aminosyresekvensen til ChiB villtype sammenlignet med ChiB-G446-E144Q. Residuen merket med «conflict» viser muteringen. Det er mutert inn to stoppkodon, hvor første mutasjon er alanin (A) er mutert til treonin (T) ved aminosyre 1339. Øverst i figuren vises villtypesekvensen, mens sekvensen under er konsensussekvensen. Konsensussekvensen er sammenstillingen av sekvensene fra se fire ulike primerene.

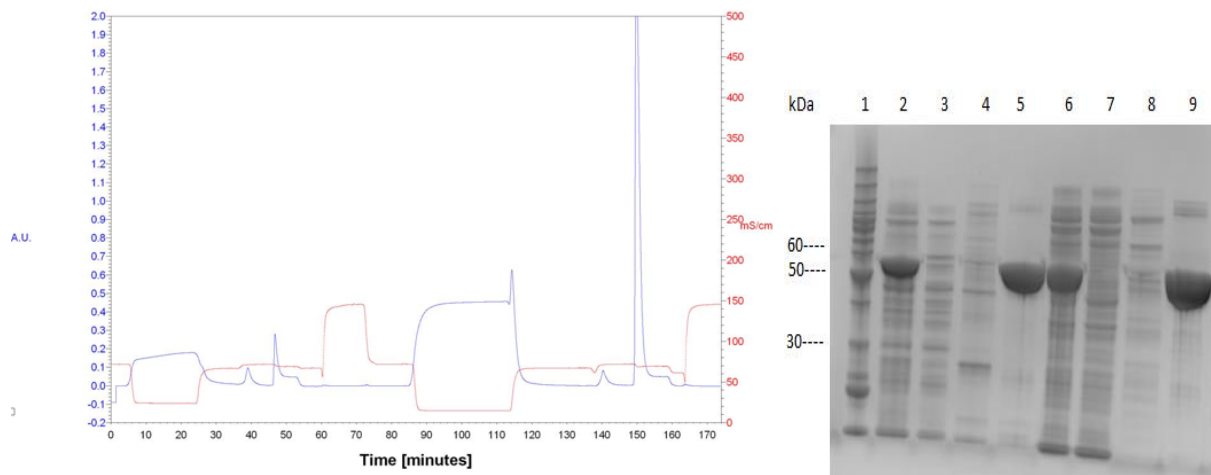
## 4.3 Rensing av his-taggede kitinaser

### 4.3.1 Rensing av his-taggede kitinaser med nikkelkolonne

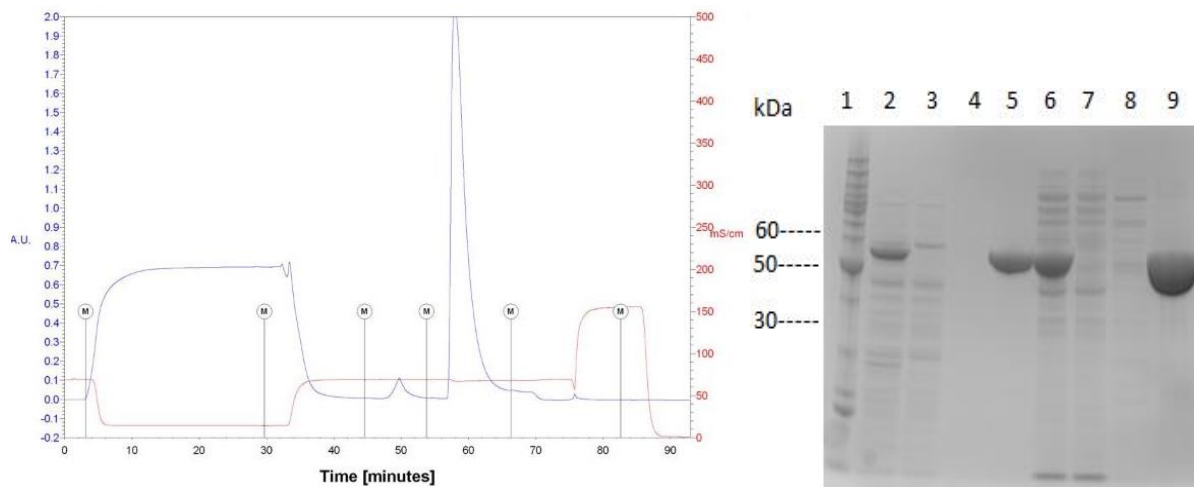
His-taggede mutanter ble isolert ved å rense både periplasmatiske- og cytoplasmatiske ekstrakt ved bruk av en nikkelkolonne (avsnitt 3.3.1). Kromatogrammene for rensingen av de ulike mutantene, samt tilhørende SDS-PAGE geler er vist i figur 4.3.1-4.3.9. Felles for alle kromatogrammene er en såkalt void topp. Denne toppen inneholder proteiner i løsningen som ikke er his-tagget og dermed ikke binder til kolonnematerialet.

Etter påsetting av protein ble kolonnen vasket, dette for å fjerne løst bundet protein, observert i topp nummer to. Til slutt ble aktuelt his-tagget protein eluert, observert i topp tre. Videre ble kolonnen vasket før tilsettelse av det cytoplasmatiske ekstraktet på samme måte som det periplasmatiske ekstraktet. SDS-PAGE ble benyttet for å kontrollere renheten av proteinet. Som tidligere nevnt har ChiB en molekylvekt på 55 kDa.

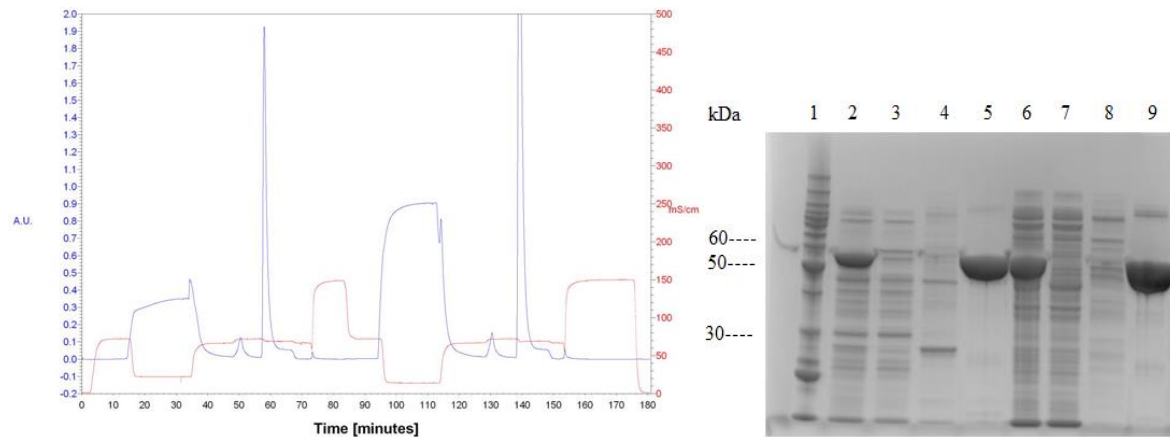




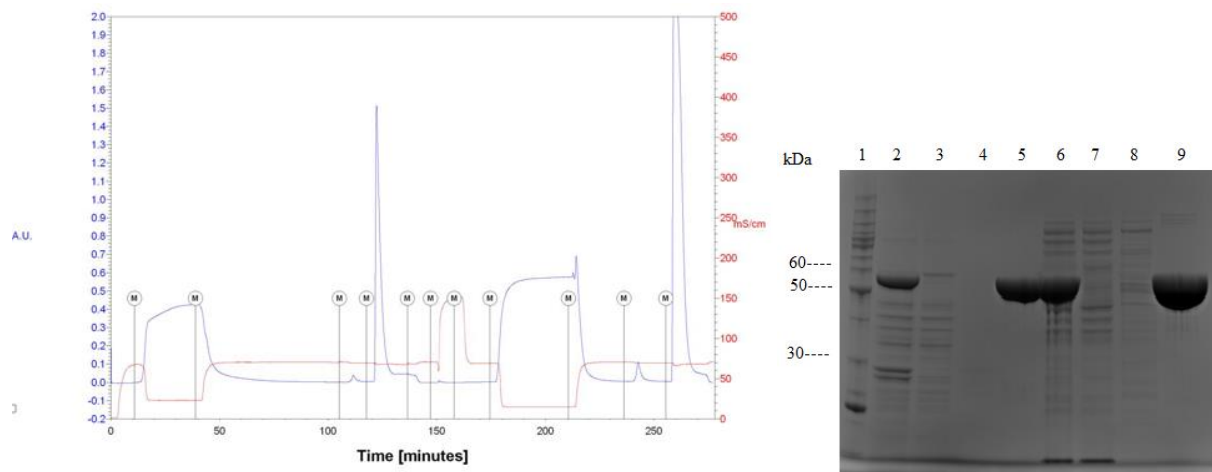
Figur 4.3.1. Kromatogram (til venstre) og SDS-PAGE gel (til høyre) for rensing av his-tagget ChiB-E144Q med nikkelkolonne. I kromatogrammet er den første toppen void-toppen, den andre er vasketoppen, mens den tredje er elueringstoppen for periplasmatisk ekstrakt. De påfølgende tre toppene er tilsvarende toppene for cytoplasmatisk ekstrakt. På SDS-PAGE gelen er brønn 1 påsatt størrelsesmarkør, brønn 2 fraksjon fra periplasmatisk ekstrakt, brønn 3 fraksjon fra void-toppen, brønn 4 fraksjon fra vasketoppen, brønn 5 fraksjon fra elueringstoppen, brønn 6 fraksjon fra cytoplasmatisk ekstrakt, brønn 7 fraksjon fra void-toppen, brønn 8 fraksjon fra vasketoppen og brønn 9 fraksjon fra elueringstoppen. Et bånd ved 55 kDa indikerer ChiB.



Figur 4.3.2. Kromatogram (til venstre) og SDS-PAGE gel (til høyre) for rensing av his-tagget ChiB-E144Q-D316A med nikkelkolonne. I kromatogrammet er den første toppen void-toppen, den andre er vasketoppen, mens den tredje er elueringstoppen. Dette kromatogrammet viser kun CPE. På SDS-PAGE gelen er brønn 1 påsatt størrelsesmarkør, brønn 2 fraksjon av periplasmatisk ekstrakt, brønn 3 fraksjon fra void-toppen, brønn 4 fraksjon fra vasketoppen, brønn 5 fraksjon fra elueringstoppen, brønn 6 fraksjon fra cytoplasmatisk ekstrakt, brønn 7 fraksjon fra void-toppen, brønn 8 fraksjon fra vasketoppen og brønn 9 fraksjon fra elueringstoppen. Et bånd ved 55 kDa indikerer ChiB.

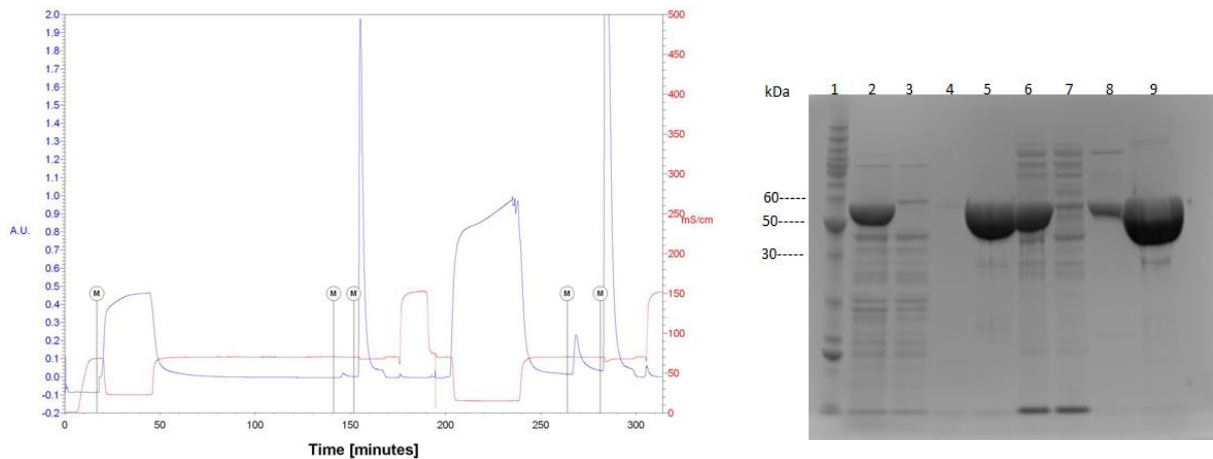


Figur 4.3.3 Figur 4.3.4. Kromatogram (til venstre) og SDS-PAGE gel (til høyre) for rensing av his-tagget ChiB-E144Q-E221A med nikkelkolonne. I kromatogrammet er den første toppen void-toppen, den andre er vasketoppen, mens den tredje er elueringstoppen for periplasmatisk ekstrakt. De påfølgende tre toppene er tilsvarende topper for cytoplasmatisk ekstrakt. På SDS-PAGE gelen er brønn 1 påsatt størrelsesmarkør, brønn 2 fraksjon fra periplasmatisk ekstrakt, brønn 3 fraksjon fra void-toppen, brønn 4 fraksjon fra vasketoppen, brønn 5 fraksjon fra elueringstoppen, brønn 6 fraksjon fra cytoplasmatisk ekstrakt, brønn 7 fraksjon fra void-toppen, brønn 8 fraksjon fra vasketoppen og brønn 9 fraksjon fra elueringstoppen. Et bånd ved 55 kDa indikerer ChiB.

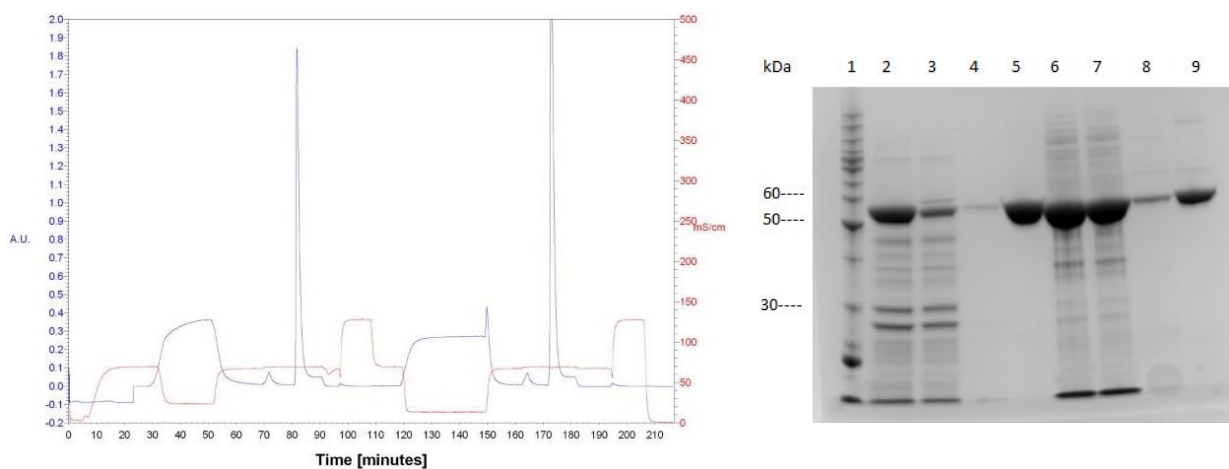


Figur 4.3.5. Kromatogram (til venstre) og SDS-PAGE gel (til høyre) for rensing av his-tagget ChiB-E144Q-F190A med nikkelkolonne. I kromatogrammet er den første toppen void-toppen, den andre er vasketoppen, mens den tredje er elueringstoppen for periplasmatisk ekstrakt. De påfølgende tre toppene er tilsvarende topper for cytoplasmatisk ekstrakt. På SDS-PAGE gelen er brønn 1 påsatt størrelsesmarkør, brønn 2 fraksjon fra periplasmatisk ekstrakt, brønn 3 fraksjon fra void-toppen, brønn 4 fraksjon fra vasketoppen, brønn 5 fraksjon fra elueringstoppen, brønn 6 fraksjon fra cytoplasmatisk ekstrakt, brønn 7 fraksjon fra void-toppen, brønn 8 fraksjon fra vasketoppen og brønn 9 fraksjon fra elueringstoppen. Et bånd ved 55 kDa indikerer ChiB.

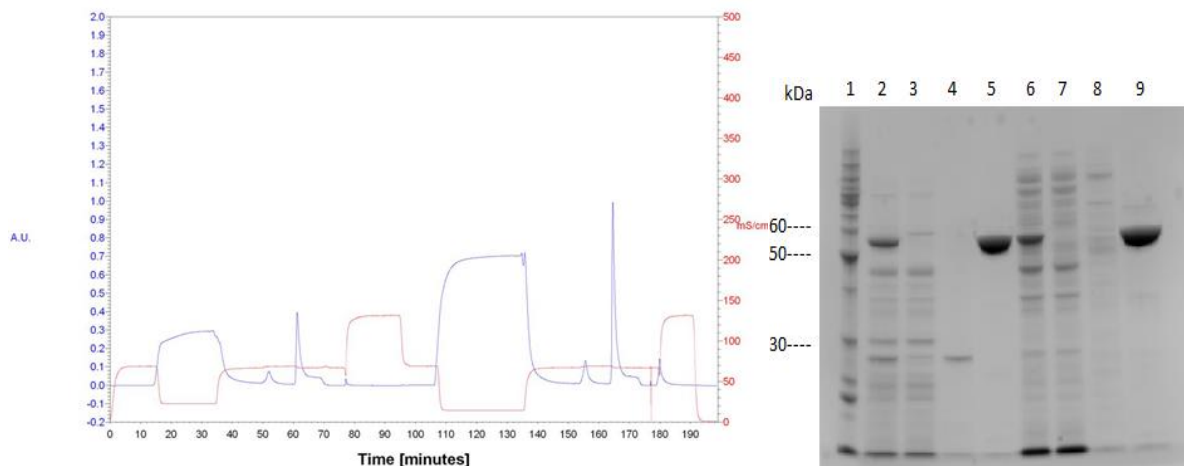




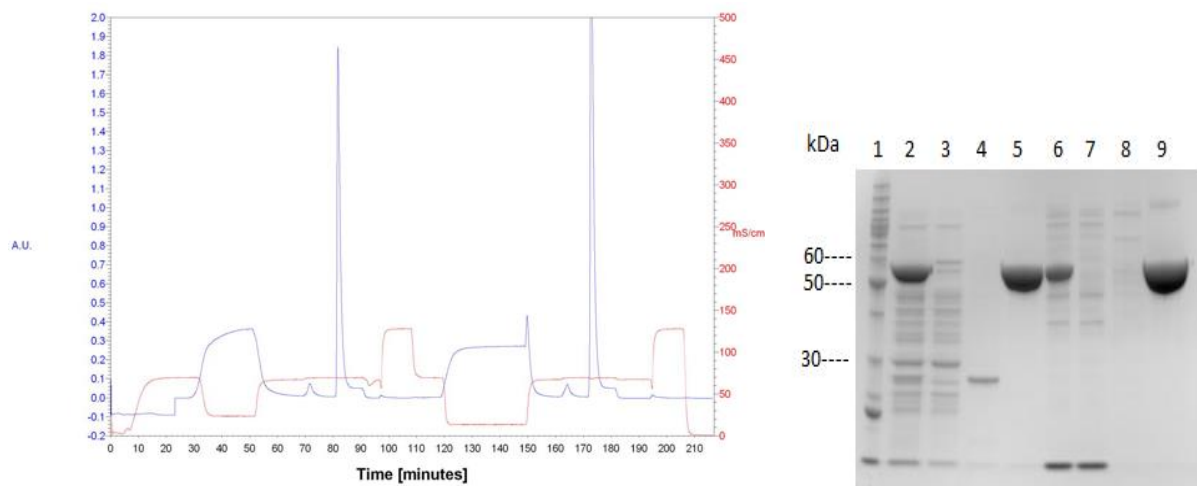
Figur 4.3.6. Kromatogram (til venstre) og SDS-PAGE gel (til høyre) for rensing av his-tagget ChiB-E144Q-W97A med nikkelkolonne. I kromatogrammet er den første toppen void-toppen, den andre er vasketoppen, mens den tredje er elueringstoppen for periplasmatisk ekstrakt. De påfølgende tre toppene er tilsvarende toppe for cytoplasmatisk ekstrakt. På SDS-PAGE gelen er brønn 1 påsatt størrelsesmarkør, brønn 2 fraksjon fra periplasmatisk ekstrakt, brønn 3 fraksjon fra void-toppen, brønn 4 fraksjon fra vasketoppen, brønn 5 fraksjon fra elueringstoppen, brønn 6 fraksjon fra cytoplasmatisk ekstrakt, brønn 7 fraksjon fra void-toppen, brønn 8 fraksjon fra vasketoppen og brønn 9 fraksjon fra elueringstoppen. Et bånd ved 55 kDa indikerer ChiB.



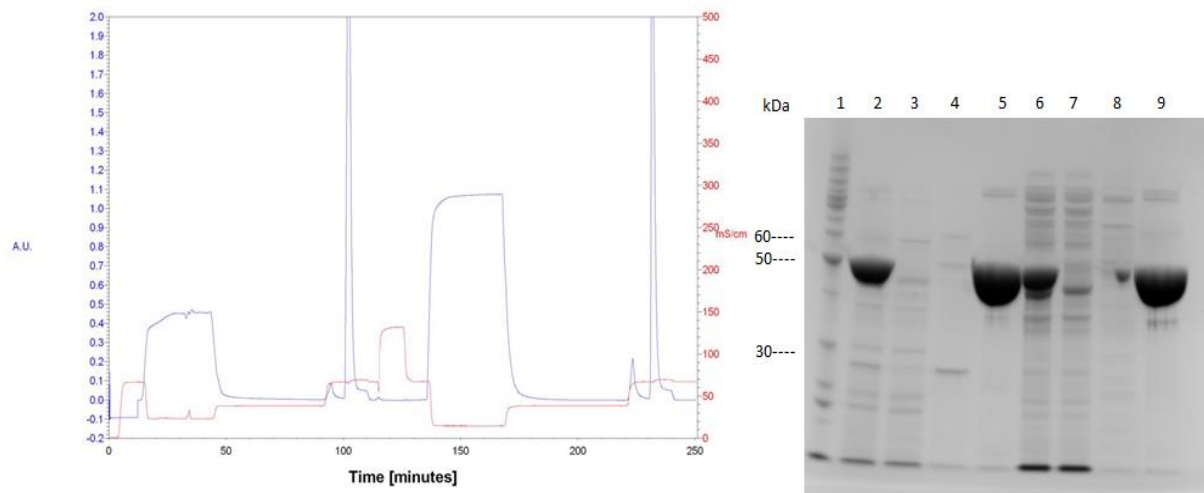
Figur 4.3.7 Kromatogram (til venstre) og SDS-PAGE gel (til høyre) for rensing av his-tagget ChiB-E144Q-W220A med nikkelkolonne. I kromatogrammet er den første toppen void-toppen, den andre er vasketoppen, mens den tredje er elueringstoppen for periplasmatisk ekstrakt. De påfølgende tre toppene er tilsvarende toppe for cytoplasmatisk ekstrakt. På SDS-PAGE gelen er brønn 1 påsatt størrelsesmarkør, brønn 2 fraksjon fra periplasmatisk ekstrakt, brønn 3 fraksjon fra void-toppen, brønn 4 fraksjon fra vasketoppen, brønn 5 fraksjon fra elueringstoppen, brønn 6 fraksjon fra cytoplasmatisk ekstrakt, brønn 7 fraksjon fra void-toppen, brønn 8 fraksjon fra vasketoppen og brønn 9 fraksjon fra elueringstoppen. Et bånd ved 55 kDa indikerer ChiB



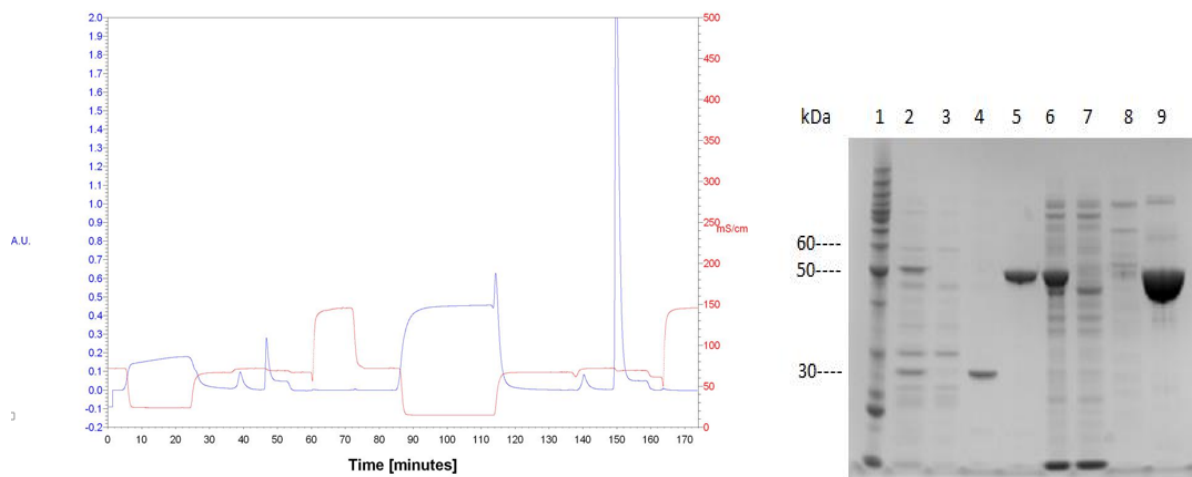
Figur 4.3.8. Kromatogram (til venstre) og SDS-PAGE gel (til høyre) for rensing av his-tagget ChiB-E144Q-R294A med nikkelkolonne. I kromatogrammet er den første toppen void-toppen, den andre er vasketoppen, mens den tredje er elueringstoppen for periplasmatisk ekstrakt. De påfølgende tre toppene er tilsvarende toppene for cytoplasmatisk ekstrakt. På SDS-PAGE gelen er brønn 1 påsatt størrelsesmarkør, brønn 2 fraksjon fra periplasmatisk ekstrakt, brønn 3 fraksjon fra void-toppen, brønn 4 fraksjon fra vasketoppen, brønn 5 fraksjon fra elueringstoppen, brønn 6 fraksjon fra cytoplasmatisk ekstrakt, brønn 7 fraksjon fra void-toppen, brønn 8 fraksjon fra vasketoppen og brønn 9 fraksjon fra elueringstoppen. Et bånd ved 55 kDa indikerer ChiB.



Figur 4.3.9. Kromatogram (til venstre) og SDS-PAGE gel (til høyre) for rensing av his-tagget ChiB-E144Q-Y145A med nikkelkolonne. I kromatogrammet er den første toppen void-toppen, den andre er vasketoppen, mens den tredje er elueringstoppen for periplasmatisk ekstrakt. De påfølgende tre toppene er tilsvarende toppene for cytoplasmatisk ekstrakt. På SDS-PAGE gelen er brønn 1 påsatt størrelsesmarkør, brønn 2 fraksjon fra periplasmatisk ekstrakt, brønn 3 fraksjon fra void-toppen, brønn 4 fraksjon fra vasketoppen, brønn 5 fraksjon fra elueringstoppen, brønn 6 fraksjon fra cytoplasmatisk ekstrakt, brønn 7 fraksjon fra void-toppen, brønn 8 fraksjon fra vasketoppen og brønn 9 fraksjon fra elueringstoppen. Et bånd ved 55 kDa indikerer ChiB protein.



Figur 4.3.10. Kromatogram (til venstre) og SDS-PAGE gel (til høyre) for rensing av his-tagget ChiB-G446-E144Q med nikkelkolonne. I kromatogrammet er den første toppen void-toppen, den andre er vasketoppen, mens den tredje er elueringstoppen for periplasmatisk ekstrakt. De påfølgende tre toppene er tilsvarende topper for cytoplasmatisk ekstrakt. På SDS-PAGE gelen er brønn 1 påsatt størrelsesmarkør, brønn 2 fraksjon fra periplasmatisk ekstrakt, brønn 3 fraksjon fra void-toppen, brønn 4 fraksjon fra vasketoppen, brønn 5 fraksjon fra elueringstoppen, brønn 6 fraksjon fra cytoplasmatisk ekstrakt, brønn 7 fraksjon fra void-toppen, brønn 8 fraksjon fra vasketoppen og brønn 9 fraksjon fra elueringstoppen. Et bånd ved 50 kDa indikerer ChiB uten det kitinbindende domenet.



Figur 4.3.11. Figuren viser kromatogram (til venstre) og SDS-PAGE gel (til høyre) for rensing av his-tagget ChiB-G446-E144Q-W97A med nikkelkolonne. I kromatogrammet er den første toppen void-toppen, den andre er vasketoppen, mens den tredje er elueringstoppen for periplasmatisk ekstrakt. De påfølgende tre toppene er tilsvarende topper for cytoplasmatisk ekstrakt. På SDS-PAGE gelen er brønn 1 påsatt størrelsesmarkør, brønn 2 fraksjon fra periplasmatisk ekstrakt, brønn 3 fraksjon fra void-toppen, brønn 4 fraksjon fra vasketoppen, brønn 5 fraksjon fra elueringstoppen, brønn 6 fraksjon fra cytoplasmatisk ekstrakt, brønn 7 fraksjon fra void-toppen, brønn 8 fraksjon fra vasketoppen og brønn 9 fraksjon fra elueringstoppen. Et bånd ved 50 kDa indikerer ChiB uten kitinbindende domene.

#### 4.3.2 Bestemmelse av proteinkonsentrasjon med Bradford-metoden

Proteinkonsentrasjonen ble bestemt ved hjelp av Bradford-metoden (avsnitt 3.3.6). Tabell 4.3.1 viser en oversikt over målte konsentrasjoner (mg/ml) av de his-taggede ChiB-mutantene. De fleste mutantene ble dyrket i flere omganger. Tallene gjengitt i tabell 4.3.1 viser et representativt utbytte for den aktuelle mutanten.

Tabell 4.3.1. Oversikt over his-tagget kitinase, proteinkonsentrasjon, mengde proteinløsning og mengde vekstmedium brukt.

His-tagget kitinase	Proteinkonsentrasjon (mg/mL)	Mengde proteinløsning (mL)	Mengde vekstmedium (L)
<b>E144Q</b>	4,52	5,3	2,0
<b>E144Q-D316A</b>	3,0	5,2	1,5
<b>E144Q-E221A</b>	2,96	8,5	1,5
<b>E144Q-F190A</b>	5,54	4,1	1,5
<b>E144Q-W97A</b>	5,72	4,2	1,5
<b>E144Q-W220A</b>	5,79	4,8	1,5
<b>E144Q-R294A</b>	1,12	5,2	3,0
<b>E144Q-Y145A</b>	5,37	8,7	1,5
<b>G446-E144Q</b>	6,12	6,7	2,0
<b>G446-E144Q-W97A</b>	6,49	5,0	2,0

Mangel på tid førte til at arbeid gjenstår arbeid med mutantene uten det kitinbindende domenet.

#### 4.4 Binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-mutanter

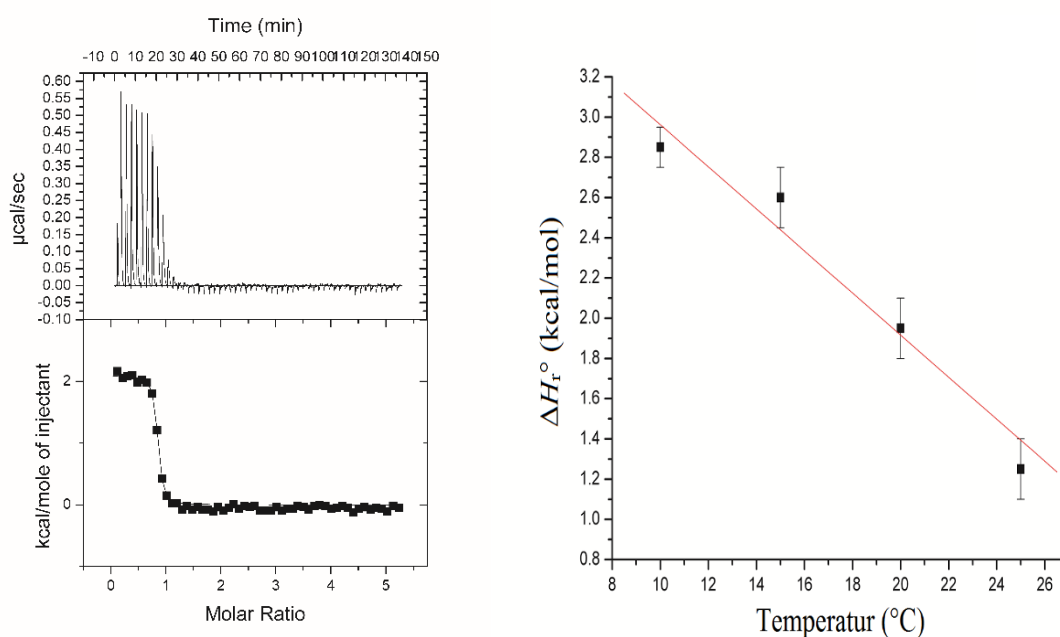
Bindingen til (GlcNAc)<sub>6</sub> mot de forskjellige ChiB-mutantene ble studert ved hjelp av ITC. Forsøkene ble utført ved pH 6,0 i 20 mM kaliumfosfatbuffer over ulike temperaturer i området fra 10 til 37 °C. Normalt sett benyttes temperaturområdet 20 til 37 °C, avvik fra dette vil forekomme som følge av ustabilitet og/eller lite varme fra systemet.  $K_a$  og  $\Delta H_r^\circ$  ble gitt direkte fra ITC forsøkene.  $K_d$ ,  $\Delta G_r^\circ$ ,  $\Delta S_r^\circ$  og  $\Delta C_{p,r}$  ble beregnet ved hjelp av ligningene 1.5.2-1.5.8 fra avsnitt 1.5.1-1.5.4. Som nevnt tidligere må ChiB mutantene være gjort inaktive om det skal gjøres bindingsstudier med (GlcNAc)<sub>6</sub> ved ITC. For enkelhetens skyld vil ikke mutantene nevnes som for eksempel ChiB-E144Q-D316A, men som ChiB-D316A.

##### 4.4.1 Residuer i den substratbindende kløften

For å undersøke effekten av binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til den substratbindende kløften til ChiB ble utvalgte mutanter av ChiB studert; D316A, E221A, F190A, W97A og W220A. De termodynamiske parameterne er oppsummert i tabell 4.4.1

#### 4.4.1.1 Binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-D316A.

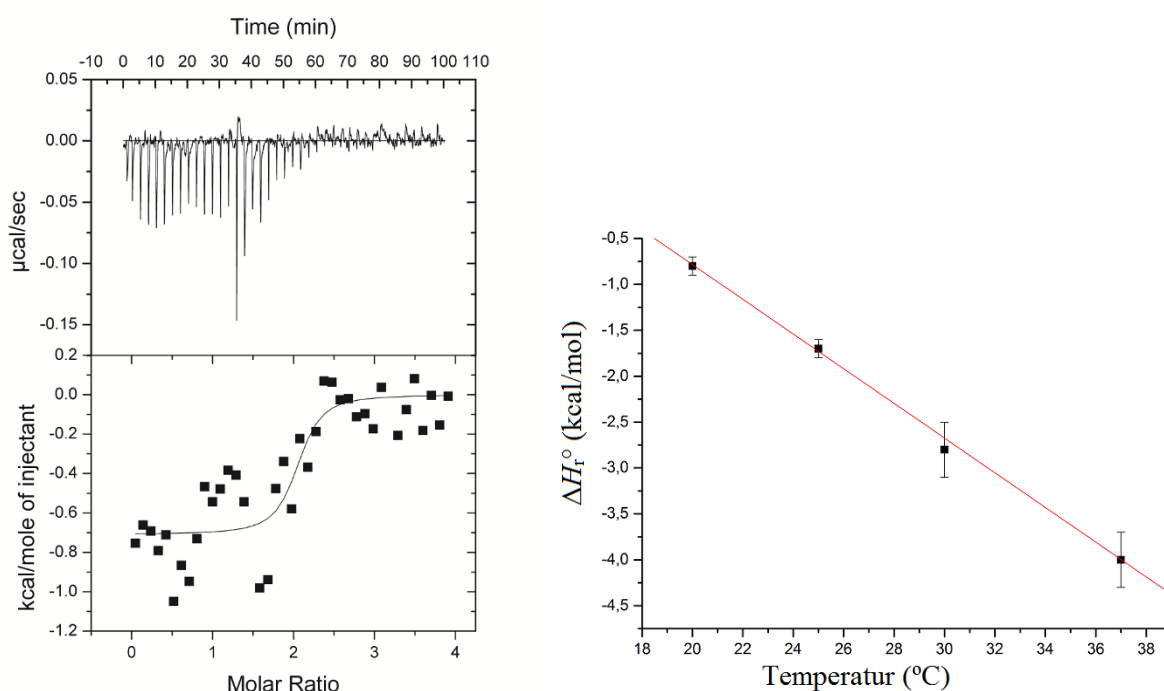
Et ITC termogram, isoterm og temperaturavhengigheten for bindingen av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-D316A er vist i figur 4.4.1. Termodynamiske parametere for bindingen av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-D316A er vist i tabell 4.4.1. Ved 30 °C binder ChiB-D316A til (GlcNAc)<sub>6</sub> med  $K_d = 0,87 \pm 0,05 \mu\text{M}$  og  $\Delta G_r^\circ = -8,4 \pm 0,1 \text{ kcal/mol}$ .  $\Delta H_r^\circ$  for reaksjonen er  $-0,9 \pm 0,2 \text{ kcal/mol}$  og  $\Delta S_r^\circ = 24,8 \pm 0,7 \text{ cal/K mol}$  ( $-T\Delta S_r^\circ = -7,5 \pm 0,2 \text{ kcal/mol}$ ).  $\Delta C_{p,r}$ , beregnet med utgangspunkt i ligning 1.5.8, ble funnet å være  $-105 \pm 11 \text{ cal/K mol}$



Figur 4.4.1. Til venstre: Termogram (øverst) og bindingsisoterm (nederst) for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-D316A ved pH 6,0 og  $t = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Til høyre: Temperaturavhengigheten for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-D316A ved pH 6,0.  $\Delta H_r^\circ$  plottet mot temperatur gir  $\Delta C_{p,r}$  som stigningstall.

#### 4.4.1.2 Binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-E221A

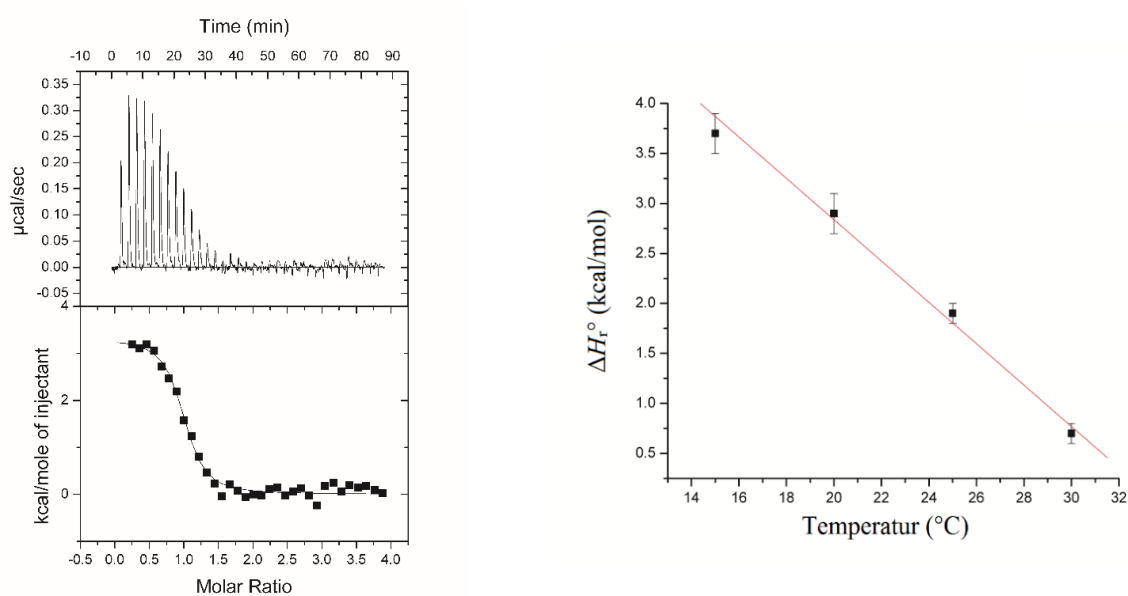
Et ITC termogram, isoterm og temperaturavhengigheten for bindingen av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-E221A er vist i figur 4.4.2. Termodynamiske parametere for bindingen av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-E221A er vist i tabell 4.4.1. Ved 30 °C binder ChiB-E221A til (GlcNAc)<sub>6</sub> med  $K_d = 0,77 \pm 0,05 \mu\text{M}$  og  $\Delta G_r^\circ = -8,5 \pm 0,1 \text{ kcal/mol}$ .  $\Delta H_r^\circ$  for reaksjonen er  $-2,8 \pm 0,3 \text{ kcal/mol}$  og  $\Delta S_r^\circ$  er lik  $18,8 \pm 0,1 \text{ cal/K mol}$  ( $-T\Delta S_r^\circ = -5,7 \pm 0,3 \text{ kcal/mol}$ ).  $\Delta C_{p,r}$ , beregnet med utgangspunkt i ligning 1.5.8, ble funnet å være  $-189 \pm 16 \text{ cal/K mol}$ .



Figur 4.4.2 Til venstre: Termogram (øverst) og bindingsisoterm (nederst) for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-E221A ved pH 6,0 og  $t = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Til høyre: Temperaturavhengigheten for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-E221A ved pH 6,0.  $\Delta H_r^\circ$  plottet mot temperatur gir  $\Delta C_{p,r}$  som stigningstall.

#### 4.4.1.3 Binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-F190A

Et ITC termogram, isoterm og temperaturavhengigheten for bindingen av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-F190A er vist i figur 4.4.3. Termodynamiske parametere for bindingen av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-F190A er vist i tabell 4.4.1. Ved 30 °C binder ChiB-F190A til (GlcNAc)<sub>6</sub> med  $K_d = 0,55 \pm 0,12 \mu\text{M}$  og  $\Delta G_r^\circ = -8,7 \pm 0,2 \text{ kcal/mol}$ .  $\Delta H_r^\circ$  for reaksjonen er  $-0,6 \pm 0,2 \text{ kcal/mol}$  og  $\Delta S_r^\circ$  er lik  $26,7 \pm 1,0 \text{ cal/K mol}$  ( $-T\Delta S_r^\circ = -8,1 \pm 0,3 \text{ kcal/mol}$   $\Delta C_{p,r}$ , beregnet med utgangspunkt i ligning 1.5.8, ble funnet å være  $-207 \pm 13 \text{ cal/K mol}$ ).

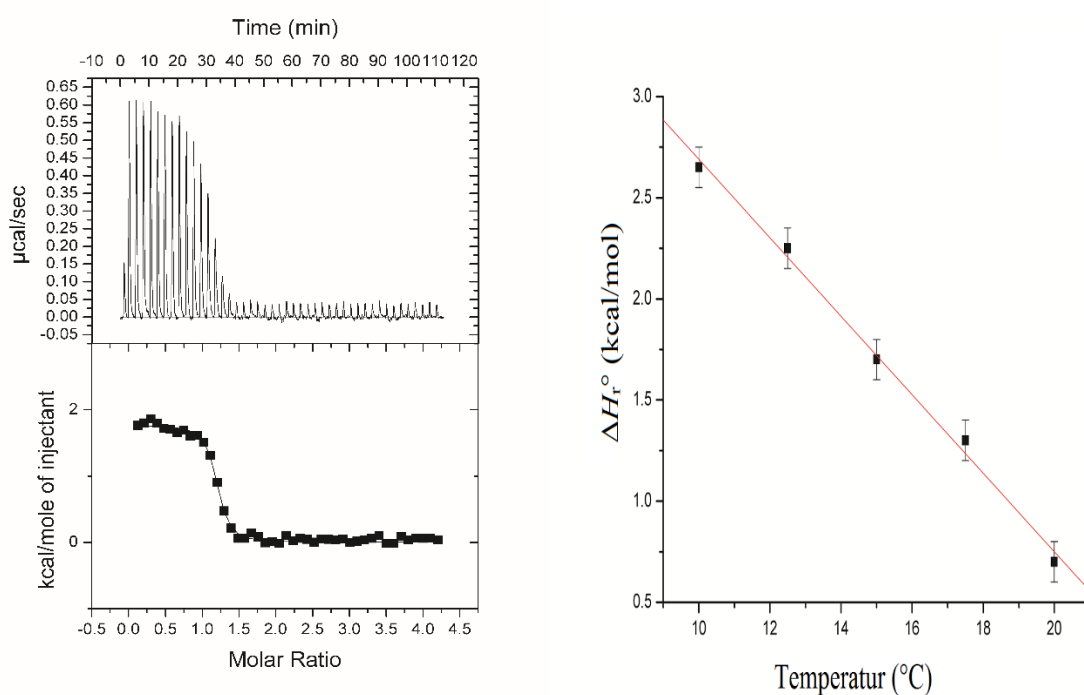


Figur 4.4.3. Til venstre: Termogram (øverst) og bindingsisoterm (nederst) for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-F190A ved pH 6,0 og  $t = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Til høyre: Temperaturavhengigheten for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-F190A ved pH 6,0.  $\Delta H_r^\circ$  plottet mot temperatur gir  $\Delta C_{p,r}$  som stigningstall.



#### 4.4.1.4 Binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-W97A

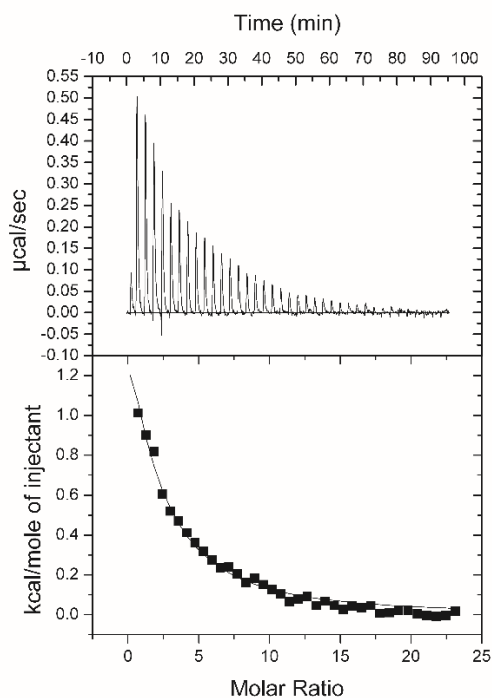
Et ITC termogram, isoterm og temperaturavhengigheten for bindingen av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-W97A er vist i figur 4.4.4. Termodynamiske parametere for bindingen av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-W97A er vist i tabell 4.4.1. Ved 30 °C binder ChiB-W97A til (GlcNAc)<sub>6</sub> med  $K_d = 0,87 \pm 0,14 \mu\text{M}$  og  $\Delta G_r^\circ = -8,4 \pm 0,14 \text{ kcal/mol}$ .  $\Delta H_r^\circ$  for reaksjonen er  $-1,2 \pm 0,1 \text{ kcal/mol}$  og  $\Delta S_r^\circ = 23,76 \pm 0,66 \text{ cal/K mol}$  ( $-T\Delta S_r^\circ = -7,2 \pm 0,2 \text{ kcal/mol}$   $\Delta C_{p,r}$ , beregnet med utgangspunkt i ligning 1.5.8, ble funnet å være  $-194 \pm 13 \text{ cal/K mol}$ ).



Figur 4.4.4 Til venstre: Termogram (øverst) og bindingsisoterm (nederst) for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-W97A ved pH 6,0 og  $t = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Til høyre: Temperaturavhengigheten for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-W97A ved pH 6,0.  $\Delta H_r^\circ$  plottet mot temperatur gir  $\Delta C_{p,r}$  som stigningstall.

#### 4.4.1.5 Binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-W220A

Et ITC termogram og isoterm for bindingen av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-W220A er vist i figur 4.4.5. Termodynamiske parametere for bindingen av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-W220A er vist i tabell 4.4.1. Ved 30 °C binder ChiB-W220A til (GlcNAc)<sub>6</sub> med  $K_d = 57 \pm 0,04 \mu\text{M}$  og  $\Delta G_r^\circ = -5,9 \pm 0,1 \text{ kcal/mol}$ . Det var ikke tilstrekkelig reproduserbarhet i resultatene for å kunne regne ut resten av de termodynamiske parameterene for enzymet.



Figur 4.4.5 Termogram (øverst) og bindingsisoterm (nederst) for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-W220A ved pH 6,0 og  $t = 20$  °C.

#### 4.4.1.6 Parameterisering av den entropiske termen

Entropiendring kan observeres som summen av tre ledd (Baker & Murphy 1997):

$$\Delta S_r^\circ = \Delta S_{\text{solv}}^\circ + \Delta S_{\text{conf}}^\circ + \Delta S_{\text{mix}}^\circ \quad 4.2.1$$

$\Delta S_{\text{solv}}^\circ$  er entropiendringen når et vannmolekyl frigjøres som følge av binding mellom protein og ligand.  $\Delta S_{\text{conf}}^\circ$  gir entropiendringen som følge av endringer i strukturen og i rotasjonsfriheten til protein og ligand ved binding.  $\Delta S_{\text{mix}}^\circ$  viser tap av translasjons- og rotasjonsfrihet når det dannes et kompleks fra to molekyler som er frie i løsning.

Solvatiseringsentropien er dokumentert tilnærmet lik null for proteiner ved  $T = 385 \text{ K}$  (Baldwin 1986).  $\Delta C_{p,r}^\circ$  for bindingsreaksjonen ved  $t = 30 \text{ }^\circ\text{C}$  kan da gis ved  $\Delta S_{\text{solv}}^\circ$  gjennom ligning 4.2.2:

$$\Delta S_{\text{solv}}^\circ = \Delta C_{p,r}^\circ \ln \left( \frac{303 \text{ K}}{385 \text{ K}} \right) \quad 4.2.2$$

$\Delta S_{\text{mix}}^\circ$  er estimert til  $-8 \text{ cal/K mol}$  ved bruk av ligning 4.2.3 (Baker & Murphy 1997):

$$\Delta S_{\text{mix}}^\circ = R \ln \left( \frac{1}{55} \right) \quad 4.2.3$$

Dette gjør det mulig å beregne  $\Delta S_{\text{conf}}^\circ$  ved bruk av ligning 4.2.1. Ved bruk av ligning 4.2.2 ble  $\Delta S_{\text{solv}}^\circ$  for ChiB-D316A beregnet til å være  $25,1 \pm 2,6 \text{ cal/K mol}$  ( $-T\Delta S_{\text{solv}}^\circ = -7,6 \pm 0,8 \text{ kcal/mol}$ ), mens  $\Delta S_{\text{conf}}^\circ$  ble beregnet til å være  $7,6 \pm 2,6 \text{ cal/K mol}$  ( $-T\Delta S_{\text{conf}}^\circ = -2,3 \pm 0,8 \text{ kcal/mol}$ ). For ChiB-E221A ble  $\Delta S_{\text{solv}}^\circ$  beregnet til å være  $45,2 \pm 3,3 \text{ cal/K mol}$  ( $-T\Delta S_{\text{solv}}^\circ = -13,7 \pm 1,0 \text{ kcal/mol}$ ), og  $\Delta S_{\text{conf}}^\circ$  ble beregnet til å være  $-18,5 \pm 3,3 \text{ cal/K mol}$  ( $-T\Delta S_{\text{conf}}^\circ = 5,6 \pm 1,0 \text{ kcal/mol}$ ). For ChiB-F190A ble  $\Delta S_{\text{solv}}^\circ$  beregnet til å være  $49,5 \pm 3,0 \text{ cal/K mol}$  ( $-T\Delta S_{\text{solv}}^\circ = -15,0 \pm 0,9 \text{ kcal/mol}$ ), og  $\Delta S_{\text{conf}}^\circ$  ble beregnet til å være  $-14,9 \pm 3,0 \text{ cal/K mol}$  ( $-T\Delta S_{\text{conf}}^\circ = 4,5 \pm 0,9 \text{ kcal/mol}$ ). For ChiB-W97A ble  $\Delta S_{\text{solv}}^\circ$  beregnet til å være  $46,5 \pm 3,0 \text{ cal/K mol}$  ( $-T\Delta S_{\text{solv}}^\circ = -14,1 \pm 0,9 \text{ kcal/mol}$ ), og  $\Delta S_{\text{conf}}^\circ$  ble beregnet til å være  $-14,9 \pm 3,0 \text{ cal/K mol}$  ( $-T\Delta S_{\text{conf}}^\circ = 4,5 \pm 0,9 \text{ kcal/mol}$ ). Se tabell 4.4.1 for oversikt over alle termodynamiske parameterene.

Tabell 4.4.1 Termodynamiske parametere for (GlcNAc)<sub>6</sub> binding til ChiB-WT og utvalgte mutanter ved  $t=30\text{ }^{\circ}\text{C}$  og  $\text{pH} = 6,0$

Enzym	$K_d^a$	$\Delta G_r^{ob}$	$\Delta H_r^{ob}$	$-T\Delta S_r^{ob}$	$-T\Delta S_{solv}^{ob,c}$	$-T\Delta S_{conf}^{ob,d}$	$-T\Delta S_{mix}^{ob,d}$	$\Delta C_{p,r}^{o,e,f}$
<b>ChiB<sup>e</sup></b>	$0,20 \pm 0,03$	$-9,3 \pm 0,1$	$-0,1 \pm 0,3$	$-9,2 \pm 0,3$	$-11,5 \pm 0,3$	$-0,1 \pm 0,4$	2,4	$-158 \pm 5$
<b>D316A<sup>b</sup></b>	$0,87 \pm 0,05$	$-8,4 \pm 0,1$	$-0,9 \pm 0,2$	$-7,5 \pm 0,2$	$-7,6 \pm 0,8$	$-2,3 \pm 0,8$	2,4	$-105 \pm 11$
<b>E221A</b>	$0,77 \pm 0,05$	$-8,5 \pm 0,1$	$-2,8 \pm 0,3$	$-5,7 \pm 0,3$	$-13,7 \pm 1,0$	$5,6 \pm 1,0$	2,4	$-189 \pm 16$
<b>F190A</b>	$0,55 \pm 0,12$	$-8,7 \pm 0,2$	$-0,6 \pm 0,2$	$-8,1 \pm 0,3$	$-15,0 \pm 0,9$	$4,5 \pm 0,9$	2,4	$-207 \pm 13$
<b>W97A<sup>b</sup></b>	$0,87 \pm 0,14$	$-8,4 \pm 0,1$	$-1,2 \pm 0,1$	$-7,2 \pm 0,2$	$-14,1 \pm 0,9$	$4,5 \pm 0,9$	2,4	$-194 \pm 13$
<b>W220A<sup>i</sup></b>	$57 \pm 0,04$	$-5,9 \pm 0,1$						

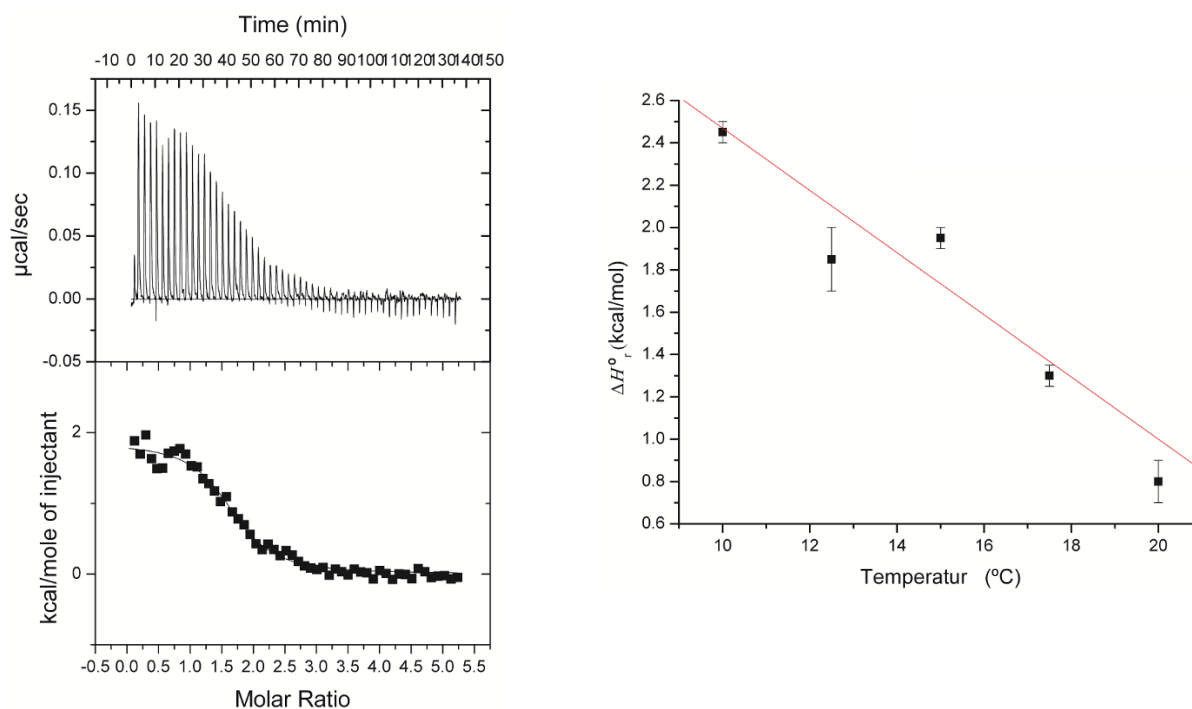
<sup>a</sup>  $\mu\text{M}$ , <sup>b</sup> kcal/mol, <sup>c</sup>  $\Delta S_{solv}^{\circ} = \Delta C_p \ln(T_{303\text{ K}}/T_{385\text{ K}})$ , <sup>d</sup> utledet ved hjelp av ligningen  $\Delta S_r^{\circ} = \Delta S_{solv}^{\circ} + \Delta S_{mix}^{\circ} + \Delta S_{conf}^{\circ}$  hvor  $\Delta S_{mix}^{\circ} = R \ln(1/55.5) = -8\text{ cal/K mol}$  ("cratic" term), <sup>e</sup> cal/K mol, <sup>f</sup> utledet fra temperaturuavhengigheten til  $\Delta H_r^{\circ}$  ved minimum fire uavhengige temperaturer <sup>g</sup> avledet fra interpolering av verdier over og under  $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , <sup>h</sup> avledet fra ekstrapolering av verdier under  $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , <sup>i</sup> Lav reproduserbarhet for  $\Delta H_r^{\circ}$  i temperaturområdet studert i denne oppgaven. Dette kan være felles for bindingsinteraksjoner med en  $c$ -verdi under 10 (Turnbull & Daranas 2003).

#### 4.4.2 Katalytiske residuer

For å undersøke effekten noen katalytiske residuer har på binding av  $(\text{GlcNAc})_6$  til ChiB ble mutantene ChiB-R294 og ChiB-Y145A studert med ITC.

##### 4.4.2.1 Binding av $(\text{GlcNAc})_6$ til ChiB-R294A

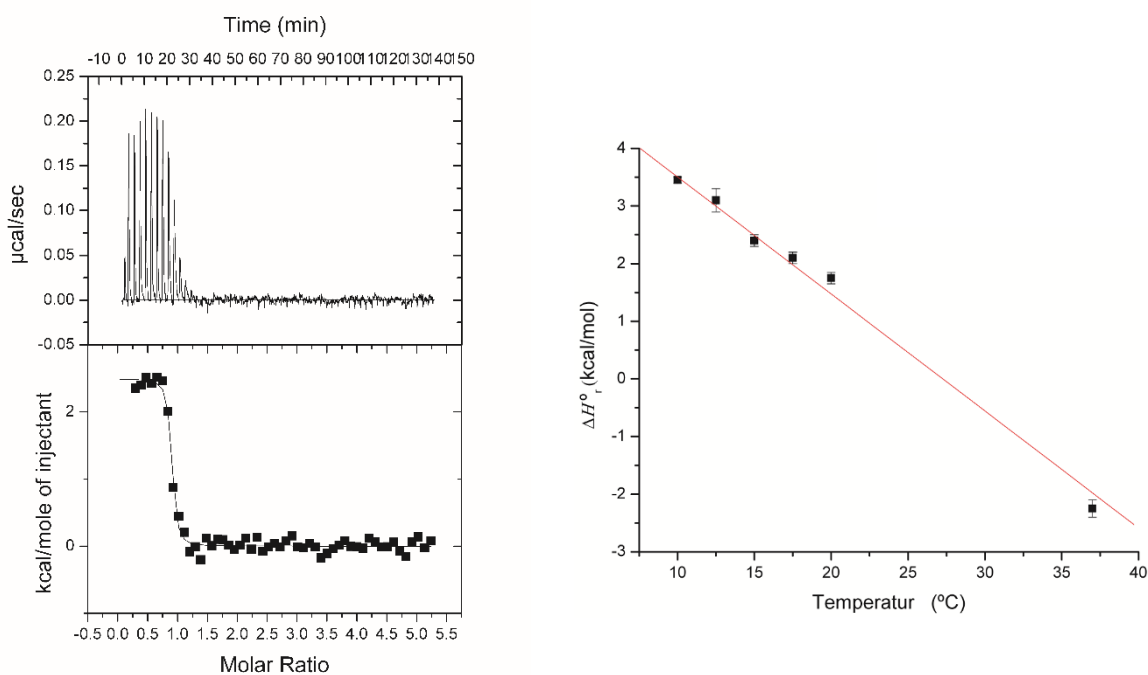
Et ITC termogram, isoterm og temperaturavhengigheten for bindingen av  $(\text{GlcNAc})_6$  til ChiB-R294A er vist i figur 4.4.6. Termodynamiske parametere for bindingen av  $(\text{GlcNAc})_6$  til ChiB-R294A er vist i tabell 4.4.2. Ved 30 °C binder ChiB-R294A til  $(\text{GlcNAc})_6$  med  $K_d = 0,90 \pm 0,11 \mu\text{M}$  og  $\Delta G_r^\circ = -8,4 \pm 0,2 \text{ kcal/mol}$ .  $\Delta H_r^\circ$  for reaksjonen er  $-0,5 \pm 0,4 \text{ kcal/mol}$  og  $\Delta S_r^\circ = 26,07 \pm 1,32 \text{ cal/K mol}$  ( $-T\Delta S_r^\circ = -7,9 \pm 0,4 \text{ kcal/mol}$   $\Delta C_{p,r}$ , beregnet med utgangspunkt i ligning 1.5.8, ble funnet å være  $-147 \pm 8 \text{ cal/K mol}$ ).



Figur 4.4.6 Til venstre: Termogram (øverst) og bindingsisoterm (nederst) for binding av  $(\text{GlcNAc})_6$  til ChiB-R294A ved pH 6,0 og  $t = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Til høyre: Temperaturavhengigheten for binding av  $(\text{GlcNAc})_6$  til ChiB-R294A ved pH 6,0.  $\Delta H_r^\circ$  plottet mot temperatur gir  $\Delta C_{p,r}$  som stigningstall.

#### 4.4.2.2 Binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-Y145A

Et ITC termogram, isoterm og temperaturavhengigheten for bindingen av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-Y145A er vist i figur 4.4.7. Termodynamiske parametere for bindingen av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-Y145A er vist i tabell 4.4.2. Ved 30 °C binder ChiB-Y145A til (GlcNAc)<sub>6</sub> med  $K_d = 1,10 \pm 0,17 \mu\text{M}$  og  $\Delta G_r^\circ = -8,3 \pm 0,2 \text{ kcal/mol}$ .  $\Delta H_r^\circ$  for reaksjonen er  $-0,6 \pm 0,1 \text{ kcal/mol}$  og  $\Delta S_r^\circ = 25,41 \pm 0,66 \text{ cal/K mol}$  ( $-T\Delta S_r^\circ = -7,2 \pm 0,2 \text{ kcal/mol}$   $\Delta C_{p,r}$ , beregnet med utgangspunkt i ligning 1.5.8, ble funnet å være  $-203 \pm 5 \text{ cal/K mol}$ ).



Figur 4.4.7. Til venstre: Termogram (øverst) og bindingsisoterm (nederst) for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-Y145A ved pH 6,0 og  $t = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Til høyre: Temperaturavhengigheten for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> til ChiB-Y145A ved pH 6,0.  $\Delta H_r^\circ$  plottet mot temperatur gir  $\Delta C_{p,r}$  som stigningstall.

#### 4.4.2.3 Parameterisering av den entropiske termen

Parameterisering av den entropiske termen ble gjort på tilsvarende måte som vist tidligere i avsnitt 4.4.1.6. For ChiB-R294A ble  $\Delta S_{\text{solv}}^\circ$  beregnet til å være  $35,3 \pm 3,3 \text{ cal/K mol}$  ( $-T\Delta S_{\text{solv}}^\circ = -10,7 \pm 1,0 \text{ kcal/mol}$ ), og  $\Delta S_{\text{conf}}^\circ$  ble beregnet til  $-1,3 \pm 3,3 \text{ cal/K mol}$  ( $-T\Delta S_{\text{conf}}^\circ =$

0,4 ± 1,0 kcal/mol). For ChiB-Y145A ble  $\Delta S_{\text{solv}}^{\circ}$  beregnet til å være 48,5 ± 3,0 cal/K mol ( $-T\Delta S_{\text{solv}}^{\circ} = -14,7 \pm 0,9$  kcal/mol), og  $\Delta S_{\text{conf}}^{\circ}$  ble beregnet til  $-15,2 \pm 3,0$  cal/K mol ( $-T\Delta S_{\text{conf}}^{\circ} = 4,6 \pm 0,9$  kcal/mol). Se tabell 4.4.2 for oversikt over de termodynamiske parameterne.

Tabell 4.4.2 Termodynamiske parametere for (GlcNAc)6 binding til ChiB-WT og utvalgte mutanter ved  $t=30$  °C og  $pH = 6,0$

Enzym	$K_d^a$	$\Delta G_r^{\text{ob}}$	$\Delta H_r^{\text{ob}}$	$-T\Delta S_r^{\text{ob}}$	$-T\Delta S_{\text{solv}}^{\text{ob,c}}$	$-T\Delta S_{\text{conf}}^{\text{ob,d}}$	$-T\Delta S_{\text{mix}}^{\text{ob,d}}$	$\Delta C_{p,r}^{\text{e,f}}$
<b>ChiB<sup>g</sup></b>	0,20 ± 0,03	-9,3 ± 0,1	-0,1 ± 0,3	-9,2 ± 0,3	-11,5 ± 0,3	-0,1 ± 0,4	2,4	-158 ± 5
<b>R294A</b>	0,90 ± 0,11	-8,4 ± 0,2	-0,5 ± 0,4	-7,9 ± 0,4	-10,7 ± 1,0	0,4 ± 1,0	2,4	-147 ± 8
<b>Y145A</b>	1,10 ± 0,17	-8,3 ± 0,2	-0,6 ± 0,1	-7,7 ± 0,2	-14,7 ± 0,9	4,6 ± 0,9	2,4	-203 ± 5

<sup>a</sup> μM, <sup>b</sup> kcal/mol, <sup>c</sup>  $\Delta S_{\text{solv}}^{\circ} = \Delta C_p \ln(T_{303\text{ K}}/T_{385\text{ K}})$ , <sup>d</sup> utledet ved hjelp av  $\Delta S_r^{\circ} = \Delta S_{\text{solv}}^{\circ} + \Delta S_{\text{mix}}^{\circ} + \Delta S_{\text{conf}}^{\circ}$  hvor  $\Delta S_{\text{mix}}^{\circ} = R \ln(1/55.5) = -8$  cal/K mol (“cratic” term), <sup>e</sup> cal/K mol, <sup>f</sup> utledet fra temperaturuavhengigheten til  $\Delta H_r^{\circ}$  ved minimum fire uavhengige temperaturer <sup>g</sup> avledet fra interpolering av verdier over og under  $t = 30$  °C

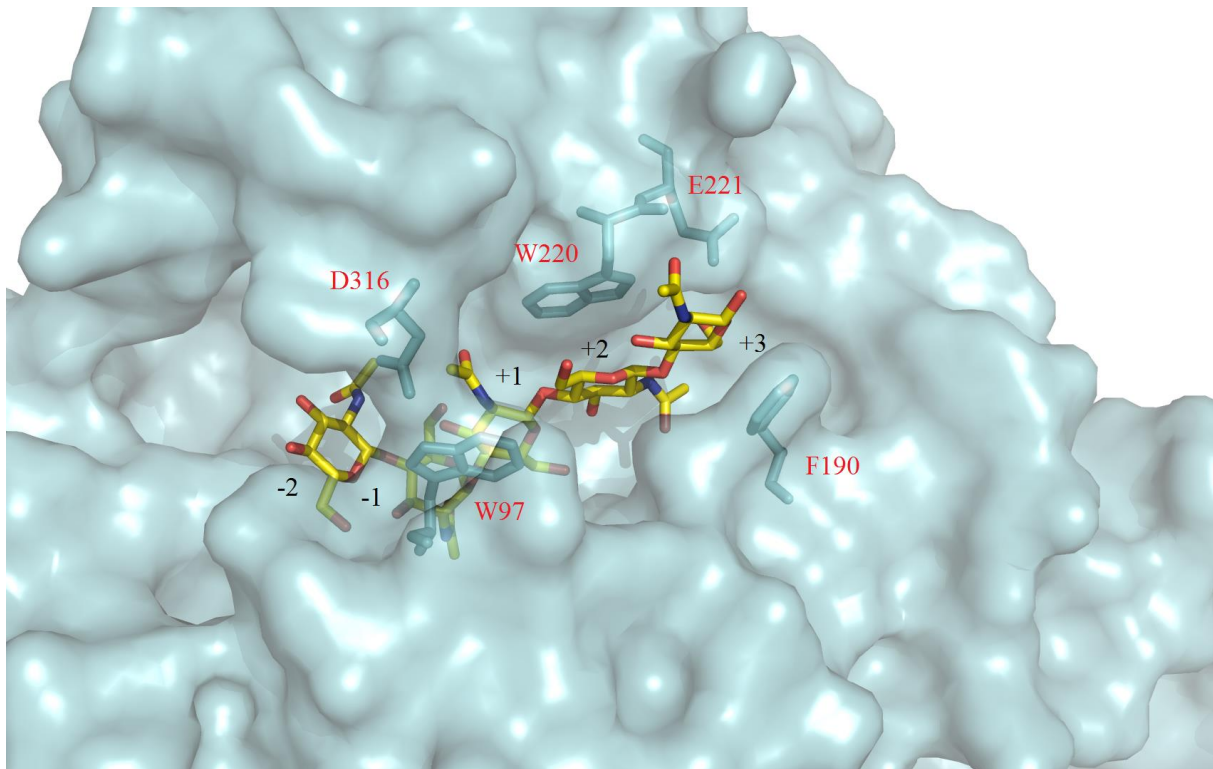
## 5 Diskusjon

I denne oppgaven ble det utført bindingsstudier med (GlcNAc)<sub>6</sub> til familie 18 kitinaser ChiB i *Serratia marcescens*. Målet ved disse bindingsstudiene er å se om termodynamiske signaturer ved substratbinding kan relateres til deres egenskaper. Residuene D316, E221, F190, W97, samt W220, alle lokalisert i det katalytiske domenet i ChiB, er tatt i nærmere øyensyn. I tillegg ble effekten av residuene, R294 og Y145, kartlagt. Disse residuene er lokalisert på hver sin side i +1 subsete. Med utgangspunkt i de bestemte  $\Delta C_p$  verdiene for protein-ligand interaksjoner korresponderer disse godt med graden av hydrofobiske interaksjoner ved ligandbinding.  $\Delta C_p$ -verdiene gjør parameteriseringen av  $\Delta S_r$  mulig. Fra parameteriseringen kan  $\Delta S_{conf}$  kalkuleres, og kalkuleringen viser å samsvare godt med hva som er observert i annet strukturelt arbeide for samme protein system (Zakariassen & Sørli 2007).

### 5.1 Termodynamiske signaturer for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> mot mutanter –antatte bindingsresiduer

Tidligere studier gjort av Baker og Murphy (1997) har vellykket vist at det er mulig å gjennomføre strukturbaserte termodynamiske kalkulasjoner på et system uten proton linkede effekter hvor sammenligningen baseres på den eksperimentelle energetikken. Systemet som brukes i denne oppgaven er ikke så ulikt Baker og Murphys system. Med utgangspunkt i den termodynamiske signaturen for ChiB, samt de termodynamiske signaturene til D316, E221, F190, W97 og W220 er det mulig å foreta en sammenligning for å finne ut hvilken effekt de ulike residuene har. De ulike parameterene for dobbeltmutantene er presentert i tabell 4.4.1. Verdiene i oppgaven må ikke ses på som absolutte, men de kan allikevel tyde på stor effekt hos de valgte residuene. Figur 5.1.1 viser krystallstruktur for ChiB med (GlcNAc)<sub>5</sub> bundet og residuene vist i «stick»-formasjon.





Figur 5.1.1. Krystallstruktur av det aktive setet til ChiB i kompleks med  $(\text{GlcNAc})_5$  molekyl. Residuene studert er vist ved «stick» formasjon, og markert med navn i rødt. I svart er det markert hvilket subsete  $(\text{GlcNAc})_5$  er bundet.

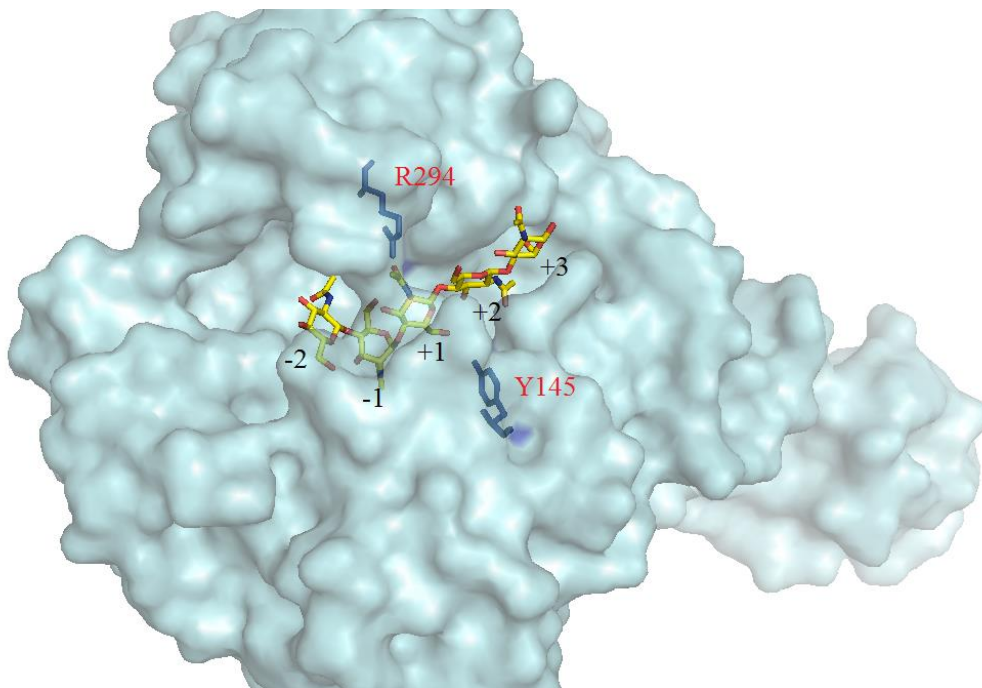
Alle dobbelmutantene binder svakere enn villtypen, samlet sett 0,8 kcal/mol mindre. Det er en relativ lik entalpiendring for mutantene med unntak av E221, men ikke så mye med tanke på at entalpien endrer seg ved temperatur. De tre mutantene E221, F190A og W97A har alle en signifikant mer gunstig endring i solvatiseringsentropi sammenliknet med villtype. Her er det sett en endring på  $-2,8$  kcal/mol. De tre mutantene viser en større endring i solvatiseringsentropi mot D316A, her er det  $-7,0$  kcal/mol. Videre viser de samme tre mutantene signifikant mer ugunstig konformasjonsentropiendring enn villtype med 4,8 kcal/mol, mot D316A viste verdiene for de tre mutantene en enda mer ugunstig konformasjonsentropiendring på hele 7,2 kcal/mol. Den kraftige økningen i konformasjonsentropiendring vist for E221, F190 og W97 antyder at disse residuene er viktig for å «preordne» bindingskløften/tunnelen før binding av substrat. Verdiene tyder videre at D316 har stor konformasjonsfrihet før binding av substrat. Ved substratbinding låses residuet. Dette er i overenstemmelse med en såkalt «umbrella sampling», en energibarriere som skiller systemet. Det er gjennomført molekylærdynamisk simulering (MD) hvor det ble beregnet at D316 kan bevege seg fra å danne hydrogenbindinger med W97 til å være i en avstand opp til 7 Å uten en energisk straff (upubliserede data, C. M. Payne *et al.*, personlig kommunikasjon).

Den sterkt reduserte bindingsstyrken for W220A sett mot villtype, 2,5 kcal/mol, viser at W220 er et sentralt residu for å gjenkjenne og binde substrat. Residuet er viktig for at  $\alpha/\beta$  domenet skal være med i dannelsen av bindingskløften/tunnelen. I figur 5.1.1 vises de ulike residuene bundet med (GlcNAc)<sub>5</sub>.

En del av endringen i konformasjonsentropien kan komme av konformasjonsendringen til sukkerenheten i subsete -1 ved hydrolyse. Hvor stort dette bidraget er for binding av (GlcNAc)<sub>n</sub> til KOS er ikke kjent. Det har imidlertid blitt gjort studier på andre sukkerenheter og enzymer. Det er tidligere vist av Haverkamp et al. (2007) at bidraget av entropi og Gibbs frienergi til konformasjonsendringen fra stol- til båtformasjon for dextran er mindre enn 3 cal K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>.

## 5.2 Termodynamiske signaturer for binding av (GlcNAc)<sub>6</sub> mot mutanter –antatte katalytiske residuer

Med utgangspunkt i den termodynamiske signaturen for ChiB, samt de termodynamiske signaturene til R294A og Y145A, er det mulig å sammenligne de termodynamiske parameterene og se bindingeffekten til de katalytiske residuene. De ulike parameterene til kitinasene er presentert i tabell 4.4.2. I figur 5.2.1 vises krystallstrukturen til ChiB bundet til (GlcNAc)<sub>5</sub>, med residuene vist i «stick»-formasjon.



Figur 5.2.1. Krystallstruktur av det aktive setet til ChiB i kompleks med (GlcNAc)<sub>5</sub>. Her er de katalytiske residuene R294 og Y145 vist i «stick» formasjon. Sukkerets plassering i subsetet er vist i svarte tall.

Ved 30 °C og pH 6,0 øker dissosiasjonskonstanten til nesten fem ganger verdien for R294A ( $K_d = 0,9 \pm 0,11 \mu\text{M}$ ) sammenliknet med ChiB villtype. Videre øker dissosiasjonskonstanten over fem ganger for Y145A ( $K_d = 1,1 \pm 0,17 \mu\text{M}$ ) sammenliknet med villtype ( $K_d = 0,2 \pm 0,03 \mu\text{M}$ ). Det er nesten like stor endring i  $\Delta G$  for begge mutantene kontra villtype, en endring på  $\sim 1$  kcal/mol. Bindingsentalpien viser også tilsvarende tendens og blir redusert med  $\sim 0,5$  kcal/mol. Endringen i  $\Delta S$  er  $\sim 1,4$  kcal/mol for både R294A og Y145A. Solvatiseringsentropien for R294A er nesten lik som for villtype. Y145A derimot, har en gunstig endring på 3 kcal/mol. Konformasjonsentropien er tilnærmet nøytral for R294A, men ugunstig for Y145A.

R294A viser liten endring i termodynamiske verdier sammenliknet med villtype. Det antas derfor at R294 ikke har en like stor effekt på binding av substrat som for eksempel W97. Synstad et al. (2004) har vist at det dannes en sterk saltbro mellom R294 og D215. Denne saltbroen antas å være viktig for stabilisering under hydrolyse. En tidligere studie gjort av Madhuprakash et al. (2012) har vist at en tilsvarende mutasjon i en annen kitinase (R284A i ChiD fra *Serratia proteamaculans*) har ført til en tilnærmet dobling i den spesifikke aktiviteten og høy grad av transglykosylering. R294 kan være et residu som er viktig for prosessiviteten, men ikke i så stor grad for bindingen av ligand.

Bindingsstudiene for (GlcNAc)<sub>6</sub> til Y145A viser den nest høyeste dissosiasjonskonstantene av alle mutantene ( $K_d = 1,10 \pm 0,17 \mu\text{M}$ ,  $\Delta G_r^\circ = -8,3 \pm 0,2$  kcal/mol). Endring i solvatiseringsentropien er signifikant mer gunstig for Y145A en villtype. Dette antyder en høyere grad av solvatisering i dette området enn villtype før binding. I tillegg indikerer det at bindingen frigjør mer vann enn villtype. Endring i konformasjonsentropi viser seg også å være ugunstig ( $-T\Delta S_{\text{conf}}^\circ = 4,6 \pm 0,9$  kcal/mol). Dette kan tyde på Y145 også er viktig for å tilrettelegge tunnelen og/eller bindingskløften før binding.

### 5.3 Oppsummering og videre arbeid

Bruk av ITC og bestemmelse av de termodynamiske parametere er et nyttig verktøy for enzymatiske studier. Det gir god informasjon om hvordan et enzym interagerer med substrat. Det er vist at de utvalgte residuene har en viktig rolle med tanke på å tilrettelegge tunnelen og/eller bindingkløften før binding av substrat.

Når det kommer til videre arbeid ville det vært aktuelt å dyrke opp mutantene His<sub>10</sub>-G446-E144Q og His<sub>10</sub>-G446-E144Q-W97A for krystallstrukturer med binding til (GlcNAc)<sub>6</sub>. Det ville også vært interessant og se på tilsvarende residuer i andre familie 18 kitinaser for å se om de gir tilsvarende resultater.



## 6 Referanser

- Aam, B. B., Heggset, E. B., Norberg, A. L., Sorlie, M., Varum, K. M. & Eijsink, V. G. (2010). Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine. *Mar Drugs*, 8 (5): 1482-517.
- Abd-Elsalam, K. A. (2003). Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *african Journal of biotechnology*, 2 (5): 91-95.
- AgilentTechnologies. (2015). Primer.
- Andersson, K. B. (1998). Beregning av proteinkonsentrasjon.
- Baker, B. M. & Murphy, K. P. (1997). Dissecting the energetics of a protein-protein interaction: the binding of ovomucoid third domain to elastase. *Journal of Molecular Biology*, 268 (2): 557-569.
- Baldwin, R. L. (1986). TEMPERATURE-DEPENDENCE OF THE HYDROPHOBIC INTERACTION IN PROTEIN FOLDING. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83 (21): 8069-8072.
- Biarnés, X., Ardèvol, A., Planas, A., Rovira, C., Laio, A. & Parrinello, M. (2007). The Conformational Free Energy Landscape of  $\beta$ -d-Glucopyranose. Implications for Substrate Preactivation in  $\beta$ -Glucoside Hydrolases. *Journal of the American Chemical Society*, 129 (35): 10686-10693.
- BioRad. (2015). Quick Start Bradford Protein Assay.
- Blackwell, J. (1969). Structure of  $\beta$ -chitin or parallel chain systems of poly- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetyl-D-glucosamine. *Biopolymers*, 7 (3): 281-298.
- Bornhorst, B. J. & Falke, J. J. (2011). Reprint of: Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Protein Expr Purif*.
- Brameld, K. A. & Goddard, W. A. (1998). Substrate Distortion to a Boat Conformation at Subsite -1 Is Critical in the Mechanism of Family 18 Chitinases. *Journal of the American Chemical Society*, 120 (15): 3571-3580.
- Brurberg, M. B., Synstad, B., Klemsdal, S. S., van Aalten, D. M., Sundheim, L. & Eijsink, V. G. (2001). Chitinases from *Serratia marcescens*. *Recent Res Dev Microbiol*, 5: 187-204.
- Bueter, C. L., Specht, C. A. & Levitz, S. M. (2013). Innate Sensing of Chitin and Chitosan. *PLoS Pathog*, 9 (1): e1003080.
- Caprette, D. R. (2012). Preparing Protein Samples for Electrophoresis.
- Chodera, J. D. & Mobley, D. L. (2013). Entropy-enthalpy compensation: role and ramifications in biomolecular ligand recognition and design. *Annu Rev Biophys*, 42: 121-42.

- Connelly, P. R. & Thomson, J. A. (1992). Heat capacity changes and hydrophobic interactions in the binding of FK506 and rapamycin to the FK506 binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (11): 4781-5.
- Davies, G. & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3 (9): 853-859.
- Davies, G. J., Wilson, K. S. & Henrissat, B. (1997). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem. J.*, 321 (2): 557-559.
- Freiburger, L. A., Mittermaier, A. K. & Auclair, K. (2011). Collecting variable-concentration isothermal titration calorimetry datasets in order to determine binding mechanisms. *J Vis Exp* (50).
- Freire, E. (2004). Isothermal titration calorimetry: controlling binding forces in lead optimization. *Drug Discovery Today: Technologies*, 1 (3): 295-299.
- Fuchs, R. L., McPherson, S. A. & Drahos, D. J. (1986). Cloning of A *Serratia-Marcescens* Gene Encoding Chitinase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51 (3): 504-509.
- Fukamizo, T. (2000). Chitinolytic enzymes: catalysis, substrate binding, and their application. *Curr Protein Pept Sci*, 1 (1): 105-24.
- Hamid, R., Khan, M. A., Ahmad, M., Ahmad, M. M., Abdin, M. Z., Musarrat, J. & Javed, S. (2013). Chitinases: An update. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 5 (1): 21-29.
- Harish Prashanth, K. V. & Tharanathan, R. N. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview. *Trends in Food Science & Technology*, 18 (3): 117-131.
- Hart, H., Craine, L. E., Hart, D. J. & Hadad, C. M. (1994). *Organic Chemistry*. 12th utg.: Houghton Mifflin Company.
- Haverkamp, R. G., Marshall, A. T. & Williams, M. A. (2007). Entropic and enthalpic contributions to the chair-boat conformational transformation in dextran under single molecule stretching. *J Phys Chem B*, 111 (48): 13653-7.
- He, Q. S., Marjamaki, M., Soini, H., Mertsola, J. & Viljanen, M. K. (1994). PRIMERS ARE DECISIVE FOR SENSITIVITY OF PCR. *Biotechniques*, 17 (1): 82-&.
- Henrissat, B. (1991). A Classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino-Acid-Sequence Similarities. *Biochem. J.*, 280: 309-316.
- Henrissat, B. & Bairoch, A. (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, 293 (Pt 3): 781-788.
- Horn, S. J., Sikorski, P., Cederkvist, J. B., Vaaje-Kolstad, G., Sørli, M., Synstad, B., Vriend, G., Vårum, K. M. & Eijsink, V. G. H. (2006). Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (48): 18089-18094.

- Horn, S. J., Sørbotten, A., Synstad, B., Sikorski, P., Sørli, M., Vårum, K. M. & Eijsink, V. G. H. (2006). Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. *FEBS Journal*, 273 (3): 491-503.
- Kauzmann, W. (1959). OF PROTEIN DENATURATION1. *Advances in protein chemistry*, 14: 1-63.
- Kless, H., Sitrit, Y., Chet, I. & Oppenheim, A. B. (1989). Cloning of the Gene Coding for Chitinase of *Serratia-Marcescens*. *Molecular & General Genetics*, 217 (2-3): 471-473.
- Koshland, D. E. (1953). STEREOCHEMISTRY AND THE MECHANISM OF ENZYMATIC REACTIONS. *Biological Reviews*, 28 (4): 416-436.
- Laidler, K. J., Meiser, J. H. & Sanctuary, B. C. (2003). *Physical Chemistry*, b. 4th. Boston: Houghton Mifflin Company.
- Laine, R. A. (1994). A calculation of all possible oligosaccharide isomers both branched and linear yields  $1.05 \times 10^{12}$  structures for a reducing hexasaccharide: the Isomer Barrier to development of single-method saccharide sequencing or synthesis systems. *Glycobiology*, 4 (6): 759-67.
- Lesk, A. (2010). *Introduction to protein science*. 2nd utg. New York: Oxford University Press Inc.
- LifeTechnologies. (2015a). Coomassie Brilliant Blue R-250 Dye.
- LifeTechnologies. (2015b). One Shot® BL21 Star™ (DE3) Chemically Competent E. coli.
- LifeTechnologies. (2015c). Qubit Fluorometer vs. Competitors.
- Madhuprakash, J., Tanneeru, K., Purushotham, P., Guruprasad, L. & Podile, A. R. (2012). Transglycosylation by Chitinase D from *Serratia proteamaculans* Improved through Altered Substrate Interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, 287 (53): 44619-44627.
- McCarter, J. D. & Withers, S. G. (1994). Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr Opin Struct Biol*, 4 (6): 885-92.
- Millipore, M. (2015). Pellet Paint Co-Precipitant.
- Minke, R. & Blackwell, J. (1978). The structure of  $\alpha$ -chitin. *Journal of Molecular Biology*, 120 (2): 167-181.
- Monreal, J. & Reese, E. T. (1969). The chitinase of *Serratia marcescens*. *Canadian Journal of Microbiology*, 15 (7): 689-696.
- Murphy, K. P., Privalov, P. L. & Gill, S. J. (1990). Common features of protein unfolding and dissolution of hydrophobic compounds. *Science*, 247 (4942): 559-561.
- Murphy, K. P. (1994). Hydration and convergence temperatures - on the use and interpretation of correlation plots. *Biophys.Chem.*, 51 (2-3): 311-326.



- Pall Corporation. (2015). Macrosep® Advance Centrifugal Devices.
- Payne, C. M., Baban, J., Horn, S. J., Backe, P. H., Arvai, A. S., Dalhus, B., Bjørås, M., Eijsink, V. G. H., Sørli, M., Beckham, G. T., et al. (2012). Hallmarks of Processivity in Glycoside Hydrolases from Crystallographic and Computational Studies of the *Serratia marcescens* Chitinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 287 (43): 36322-36330.
- Perozzo, R., Folkers, G. & Scapozza, L. (2004). Thermodynamics of protein-ligand interactions: History, presence, and future aspects. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 24 (1-2): 1-52.
- Pierce, M. M., Raman, C. S. & Nall, B. T. (1999). Isothermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions. *Methods*, 19 (2): 213-221.
- Prabhu, N. V. & Sharp, K. A. (2005). Heat capacity in proteins. *Annu Rev Phys Chem*, 56: 521-48.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in polymer science*, 31 (7): 603-632.
- Rye, C. S. & Withers, S. G. (2000). Glycosidase mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4 (5): 573-580.
- Syme, N. R., Dennis, C., Phillips, S. E. V. & Homans, S. W. (2007). Origin of Heat Capacity Changes in a “Nonclassical” Hydrophobic Interaction. *ChemBiochem*, 8 (13): 1509-1511.
- 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., Gåseidnes, S., van Aalten, D. M. F., Vriend, G., Nielsen, J. E. & Eijsink, V. G. H. (2004). Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase. *Eur.J.Biochem.*, 271 (2): 253-262.
- Sørli, M., Zakariassen, H., Norberg, A. L. & Eijsink, V. G. (2012). Processivity and substrate-binding in family 18 chitinases. *Biocatalysis and Biotransformation*, 30 (3): 353-365.
- Terwisscha van Scheltinga, A. C., Armand, S., Kalk, K. H., Isogai, A., Henrissat, B. & Dijkstra, B. W. (1995). Stereochemistry of chitin hydrolysis by a plant chitinase/lysozyme and X-ray structure of a complex with allosamidin: evidence for substrate assisted catalysis. *Biochemistry*, 34 (48): 15619-23.
- Turnbull, W. B. & Daranas, A. H. (2003). On the value of  $c$ : Can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? *Journal of the American Chemical Society*, 125 (48): 14859-14866.
- Vaaje-Kolstad, G., Houston, D. R., Rao, F. V., Peter, M. G., Synstad, B., van Aalten, D. M. & Eijsink, V. G. (2004). Structure of the D142N mutant of the family 18 chitinase ChiB from *Serratia marcescens* and its complex with allosamidin. *Biochim Biophys Acta*, 1696 (1): 103-11.

- Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., Sørli, M. & Eijsink, V. G. H. (2013). The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens* – a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *FEBS J.*, 280 (13): 3028-3049.
- van Aalten, D. M. F., Synstad, B., Brurberg, M. B., Hough, E., Riise, B. W., Eijsink, V. G. H. & Wierenga, R. K. (2000). Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1.9-angstrom resolution. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 97 (11): 5842-5847.
- van Aalten, D. M. F., Komander, D., Synstad, B., Gåseidnes, S., Peter, M. G. & Eijsink, V. G. H. (2001). Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 98 (16): 8979-8984.
- VWR. (2015). E.N.Z.A. Plasmid DNA Mini Kit I.
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F. & Lin, L. N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem*, 179 (1): 131-7.
- Zakariassen, H. & Sørli, M. (2007). Heat capacity changes in heme protein–ligand interactions. *Thermochimica Acta*, 464 (1–2): 24-28.
- 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.



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

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