



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2016 60 stp
Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Termodynamiske signaturer for substratbinding til cellulaser fra *Thermobifida fusca*

Thermodynamic Signatures of Substrate Binding to
Cellulases from *Thermobifida fusca*

Anita Kaupang
Master i Bioteknologi

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM), ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU), i perioden mars 2015-mai 2016. Oppgaven har vært del av et større prosjekt i Bioorganisk forskningsgruppe.

Først og fremst vil jeg rette en stor takk til hovedveileder Morten Sørli for at jeg fikk mulighet til å skrive masteroppgave i hans forskningsgruppe, og for all hjelp, støtte og oppmuntring underveis. I tillegg vil jeg takke mine medveiledere Anne Grethe Hamre og Åsmund Kjendseth Røhr for all praktisk hjelp på labben og alle nyttige tips og råd. Takk også til resten av bioorganisk forskningsgruppe for hyggelige lunsjer og et positivt og sosialt miljø på labben. Det har vært et utfordrende år, men samtidig utrolig spennende og lærerikt!

Takk til mine medstudenter Karianne Moe og Anne-Grethe Strømnes for alle hyggelige tepauser, og all støtte gjennom uendelig mange oppturer og nedturer på labben i løpet av året. Dette året hadde ikke vært så morsomt uten dere!

Til slutt vil jeg takke venner, familie og kjæreste for at de alltid har vært like positive og hatt troa på meg gjennom et langt studieløp.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Ås, mai 2016

Anita Kaupang

Sammendrag

Denne oppgaven er skrevet som en del av et større forskningsprosjekt der det overordnede målet er å tilegne seg kunnskap om enzymer som katalyserer hydrolyse av de krystallinske substratene cellulose og kitin. Cellulose er den vanligste biopolymeren i naturen og består av β (1 \rightarrow 4) linkede D-glukoseenheter. *Thermobifida fusca* er en filamentøs jordbakterie og en viktig nedbryter av organisk materiale. *T. fusca* syntetiserer en rekke ekstracellulære cellulaser som katalyserer nedbrytning av cellulose, hvorav tre er undersøkt nærmere i denne oppgaven. *TfCel5A* er en ikke-prosessiv endoaktiv cellulase, *TfCel9A* er prosessiv og endoaktiv og *TfCel48A* er prosessiv og eksoaktiv fra den reduserende enden.

De termodynamiske signaturene for binding av (Glc)₆ til inaktive mutanter av *TfCel5A*, *TfCel9A* og *TfCel48A* har blitt bestemt ved hjelp av isoterm titreringskalorimetri (ITC). Ved 30 °C og pH 6,0 er endringen i bindingsfrienergi lik for de prosessive cellulasete *TfCel9A* og *TfCel48A* (hhv. $\Delta G_r^\circ = -8,7 \text{ kcal/mol} \pm 0,2 / -8,6 \pm 0,2 \text{ kcal/mol}$). For *TfCel5A* er endringen i bindingsfrienergi mindre gunstig ($\Delta G_r^\circ = -6,4 \pm 0,1 \text{ kcal/mol}$). I *TfCel9A* og *TfCel48A* er bindingen drevet av gunstig endring i både entalpi ($\Delta H_r^\circ = -1,1 \pm 0,1 \text{ kcal/mol}$ for *TfCel9A* og $\Delta H_r^\circ = -2,7 \pm 0,3 \text{ kcal/mol}$ for *TfCel48A*) og entropi ($-T\Delta S_r^\circ = -7,6 \pm 0,2 \text{ kcal/mol}$ for *TfCel9A* og $-T\Delta S_r^\circ = -5,9 \pm 0,4 \text{ kcal/mol}$ for *TfCel48A*). Binding av (Glc)₆ til *TfCel5A* er kun entalpisk drevet ved 30 °C ($\Delta H_r^\circ = -6,4 \pm 0,2 \text{ kcal/mol}$, $-T\Delta S_r^\circ = 0,0 \pm 0,2 \text{ kcal/mol}$). Endringen i varmekapasitet, $\Delta C_{p,r}^\circ$, er $209 \pm 17 \text{ cal/K}\cdot\text{mol}$, $239 \pm 21 \text{ cal/K}\cdot\text{mol}$ og $176 \pm 25 \text{ cal/K}\cdot\text{mol}$ for henholdsvis *TfCel5A*, *TfCel9A* og *TfCel48A*.

Det foreligger en hypotese som direkte kobler bindingsfrienergi (ΔG_r°) og iboende prosessivitet (P^{intr}). De eksperimentelt bestemte ΔG_r° fra denne oppgaven har derfor blitt sammenlignet med tidligere publiserte prosessivitetsverdier for *TfCel5A*, *TfCel9A* og *TfCel48A*. Resultatene indikerer at det er en kvalitativ sammenheng mellom bindingsfrienergi og prosessivitet.

I tillegg til ITC-forsøk har det blitt utført hydrolyse av cello-oligosakkarider ((Glc)_x) i H₂¹⁸O med aktive enzymer, for å undersøke posisjoneringen av substratet i det aktive setet. Resultatene fra hydrolyse av (Glc)₅ i H₂¹⁸O viser at binding i subsete -3 \rightarrow +2 dominerer i *TfCel48A*, med en dimer i de to produktbindende subsetene +1 og +2. Den endoaktive *TfCel5A* hadde samme posisjonering av substratet. I *TfCel9A* dominerer binding -4 \rightarrow +1 ved hydrolyse av (Glc)₅, der de negative subsetene (-4 til -1) antas å være produktbindende.

Abstract

This thesis was written as part of a larger research project where the objective is to acquire knowledge about enzymes involved in the breakdown of recalcitrant polysaccharides such as cellulose and chitin. Cellulose is the most abundant biopolymer in nature and is composed of β (1 \rightarrow 4) linked D- glucose units. The smallest structural unit is a dimer, cellobiose.

Thermobifida fusca is a filamentous soil bacterium and a major degrader of organic material. It produces several extracellular cellulases and three of them have been studied in this thesis. *TfCel5A* is a non-processive and endo-acting cellulase, *TfCel9A* is processive and endo-acting and *TfCel48A* is a reducing end-specific processive exo-acting cellulase.

The thermodynamic signatures for binding of (Glc)₆ to inactive mutants of *TfCel5A*, *TfCel9A* and *TfCel48A* was determined by isotherm titration calorimetry (ITC). The processive cellulases *TfCel9A* and *TfCel48A* bind the substrate with similar affinity at 30 °C and pH 6,0 ($\Delta G_r^\circ = -8,7 \text{ kcal/mol} \pm 0,2$ and $-8,6 \pm 0,2 \text{ kcal/mol}$, respectively). *TfCel5A* has a slightly lower binding affinity ($\Delta G_r^\circ = -6,4 \pm 0,1 \text{ kcal/mol}$). The binding in *TfCel9A* and *TfCel48A* is accompanied by a favorable change in both enthalpy ($\Delta H_r^\circ = -1,1 \pm 0,1 \text{ kcal/mol}$ for *TfCel9A* and $\Delta H_r^\circ = -2,7 \pm 0,3 \text{ kcal/mol}$ for *TfCel48A*) and entropy ($-T\Delta S_r^\circ = -7,6 \pm 0,2 \text{ kcal/mol}$ for *TfCel9A* og $-T\Delta S_r^\circ = -5,9 \pm 0,4 \text{ kcal/mol}$ for *TfCel48A*). The binding of (Glc)₆ in *TfCel5A* is driven only by the favorable change in enthalpy ($\Delta H_r^\circ = -6,4 \pm 0,2 \text{ kcal/mol}$, $-T\Delta S_r^\circ = 0,0 \pm 0,2 \text{ kcal/mol}$). The change in heat capacity, $\Delta C_{p,r}^\circ$, is $209 \pm 17 \text{ cal/K}\cdot\text{mol}$, $239 \pm 21 \text{ cal/K}\cdot\text{mol}$ og $176 \pm 25 \text{ cal/K}\cdot\text{mol}$ for *TfCel5A*, *TfCel9A* og *TfCel48A* respectively.

A mathematical relationship that directly links binding free energy (ΔG_r°) with intrinsic processivity (P^{Intr}) has been proposed. On this basis, the experimental ΔG_r° from this thesis was compared to previously published processivity values for *TfCel5A*, *TfCel9A* and *TfCel48A*. The results indicate a qualitative relationship between binding free energy and intrinsic processivity.

In addition to the ITC experiments, hydrolysis of cello-oligosaccharides was performed to study positioning of the substrate in the active site. The results from hydrolysis of (Glc)₅ in H₂¹⁸O show binding in subsite -3 \rightarrow +2 dominating in *TfCel48A*, with a dimer in the two product binding subsites +1 and +2. The same positioning of the substrate is observed with the endo-acting *TfCel5A*. The preferred binding of (Glc)₅ in *TfCel9A* is in subsites -4 \rightarrow +1. These negative subsites (-4 to -1) are probably product binding.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	III
Innholdsfortegnelse	IV
Forkortelser	VIII
1 Introduksjon	1
1.1 Karbohydrater	1
1.2 Cellulose	2
1.2.1 Struktur	2
1.2.2 Anvendelser	4
1.3 Glykosidhydrolaser	4
1.3.1 Klassifisering	5
1.3.2 Mekanismer	6
1.3.3 Struktur	7
1.3.4 Prosessivitet	8
1.4 Cellulaser	10
1.4.1 Cellulaser fra <i>Thermobifida fusca</i>	10
1.4.2 <i>TfCel5A</i>	10
1.4.3 <i>TfCel9A</i>	11
1.4.4 <i>TfCel48A</i>	13
1.5 Termodynamikk ved protein-ligand interaksjoner	14
1.5.1 Likevektskonstanten (K_a) og Gibbs frienergi (ΔG°)	14
1.5.2 Bindingsentalpi (ΔH)	15
1.5.3 Bindingsentropi (ΔS)	16
1.5.4 Endring i varmekapasitet (ΔC_p)	16
1.6 Isoterm titreringskalorimetri (ITC)	17
1.7 Mål med oppgaven	20
2 Materialer	21
2.1 Laboratorieutstyr	21
2.2 Programvare til analyse	24

2.3	Kjemikalier	24
2.4	Enzymer/proteiner, substrater og bakteriestammer	25
2.4.1	Enzymer/proteiner	25
2.4.2	Substrater.....	26
2.4.3	Bakteriestammer.....	26
2.5	Medier og løsninger	26
2.5.1	Ferdige medier.....	26
2.5.2	Selvlagde medier	26
2.5.3	Selvlagde løsninger og buffere.....	27
2.6	Kit.....	28
2.7	Plasmid og primere	29
2.7.1	Plasmid	29
2.7.2	Primere til seterettet mutagenese.....	29
2.7.3	Primere til sekvenseringsreaksjoner	30
3	Metode.....	31
3.1	Kloning	31
3.1.1	Transformering av cellulasekonstrukter	31
3.1.2	Oppdyrking av transformanter	32
3.1.3	Tillaging av frysestocker	33
3.2	Seterettet mutagenese	33
3.2.1	Primerdesign.....	33
3.2.2	Polymerasekjedereaksjon (PCR) og DpnI behandling.....	34
3.2.3	Utfelling av plasmid	35
3.2.4	Transformering av mutert plasmid	36
3.2.5	Oppdyrking av transformanter og tillaging av frysestocker.....	37
3.2.6	Isolering av plasmid til sekvensering	37
3.2.7	Bestemmelse av DNA-konsentrasjon med Qubit.....	38
3.2.8	Sekvensering	38
3.3	Uttrykking av cellulaser.....	39
3.3.1	Induksjonstest.....	39
3.3.2	Natriumdodecylsulfat polyakrylamide gelelektroforese (SDS-PAGE) av cellepellet	40
3.3.3	Overekspresjon av cellulaser.....	41
3.4	Rensing av cellulaser	42

3.4.1	Tillaging av prøve til proteinrensing	42
3.4.2	Ionebytterkromatografi med en sterk anionbytter	43
3.4.3	SDS-PAGE.....	45
3.4.4	Hydrofob interaksjonskromatografi (HIC).....	45
3.4.5	Oppkonsentrering	47
3.4.6	Gelfiltrering - size exclusion chromatography (SEC).....	47
3.4.7	Bufferbytte ved dialyse	49
3.4.8	Bestemmelse av proteinkonsentrasjon - A ₂₈₀	49
3.5	Isoterm titreringskalorimetri- ITC	50
3.6	Initiell hydrolyse av (Glc) _x i H ₂ ¹⁸ O	51
4	Resultater.....	54
4.1	Seterettet mutagenese	54
4.2	Uttrykking og rensing av cellulaser	55
4.2.1	Induksjonstest.....	55
4.2.2	Rensing av cellulaser med ionebytterkromatografi.....	55
4.2.3	Rensing av cellulaser med hydrofob interaksjonskromatografi.....	58
4.2.4	Rensing av cellulaser med gelfiltrering (SEC).....	60
4.2.5	Rensing av cellulaser- samlede resultater	62
4.2.6	Bestemmelse av proteinkonsentrasjon- A ₂₈₀	64
4.3	Binding av (Glc) ₆ til inaktive cellulaser	64
4.3.1	Binding av (Glc) ₆ til <i>Tf</i> Cel5A-E356A	64
4.3.2	Binding av (Glc) ₆ til <i>Tf</i> Cel9A-E425A	65
4.3.3	Binding av (Glc) ₆ til <i>Tf</i> Cel48A-E359A	66
4.3.4	Parameterisering av den entropiske termen.....	67
4.4	Initiell hydrolyse av (Glc) _x i H ₂ ¹⁸ O	68
4.4.1	Initiell hydrolyse av (Glc) _x med <i>Tf</i> Cel5A-WT	69
4.4.2	Initiell hydrolyse av (Glc) _x med <i>Tf</i> Cel9A-WT	69
4.4.3	Initiell hydrolyse av (Glc) _x med <i>Tf</i> Cel48A-WT	70
4.4.4	Initiell hydrolyse av (Glc) _x i H ₂ ¹⁸ O – samlede resultater	71
5	Diskusjon.....	72
5.1	Initiell hydrolyse av (Glc) _x i H ₂ ¹⁸ O	72
5.2	Termodynamiske signaturer for binding av (Glc) ₆ til <i>Tf</i> Cel5A, <i>Tf</i> Cel9A og <i>Tf</i> Cel48A	74
5.2.1	Kobling mellom prosessivitet og bindingsfrienergi	76

5.3	Oppsummering og videre arbeid	78
6	Referanser.....	79

Forkortelser

µg	mikrogram
µL	mikroliter
µM	mikromolar
µm	mikrometer
Ala (A)	alanin
Asn (N)	asparagin
Asp (D)	aspartat
bp	basepar
CAZy	Carbohydrate-Active EnZYmes- karbohydrataktive enzymer
CBM	karbohydratbindendemodul
cm	centimeter
CMC	karboksymetylcellulose
Da	Dalton
DTT	dithiothreitol
dH₂O	sterilt vann av milli-q kvalitet
DHB	dihydroksybenzosyre
DNA	deoksyribonukleinsyre
EtOH	etanol
g	gram
GH	glykosidhydrolase
(Glc)_x	cello-oligosakkarider
(Glc)₂	cellobiose
(Glc)₃	cellotriose
(Glc)₄	cellotetraose
(Glc)₅	cellopentaose
(Glc)₆	celloheksaose
Glu (E)	glutamat
HCHT	human kitotriosidase

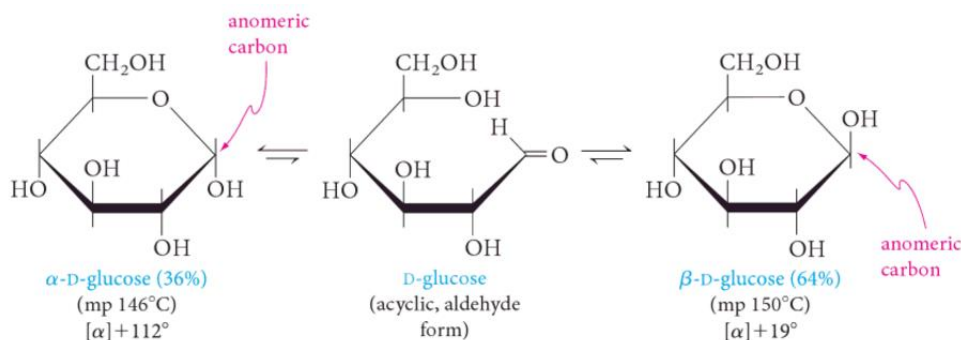
HIC	hydrofobinteraksjonskromatografi
His (H)	histidin
Ile (I)	isoleucine
ITC	isoterm titreringskalorimetri
IPTG	isopropyl β -D-1-tiogalaktopyranosid
K	Kelvin
k	kilo
K_a	assosiasjonskonstanten
k_a	hastighetskonstant for assosiasjon
k_{cat}	hastighetskonstant for katalyse
K_d	dissosiasjonskonstanten
k_d	hastighetskonstant for dissosiasjon
k_{off}	hastighetskonstant for dissosiasjon
k_{on}	hastighetskonstant for assosiasjon
L	liter
LB	lysogeny broth
LPMO	lytisk polysakkarid monooksygenase
M	molar
MALDI	matriks assistert laser desorpsjons/ionisering
mg	milligram
mL	milliliter
mM	millimolar
mm	millimeter
MOPS	3 – (<i>N</i> -morfolin) propansvovelsyre
MS	massespektrometri
MW	molekylvekt
MWCO	molekylvekt cut-off
ng	nanogram
nM	nanomolar

nm	nanometer
OD	optisk tetthet
PASC	phosphoric acid swollen cellulose
PCR	polymerasekjedereaksjon
Phe (F)	fenylalanine
Pi	uorganisk fosfat
pI	isoelektrisk punkt
R	den universelle gasskonstanten ($1,987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)
RNA	ribonukleinsyre
rpm	antall omdreiningar per minutt
SDS-PAGE	natriumdodecylsulfat polyakrylamid gelelektroforese
SEC	size exclusion chromatography – gelfiltrering
TB	terrific broth
TOF	time-of-flight
Trp (W)	tryptofan
Tyr (Y)	tyrosin
WT	villtype
Å	Ångstrøm
ΔC_p	endring i varmekapasitet
ΔH	endring i entalpi
ΔG	endring i Gibbs frienergi
ΔS	endring i entropi

1 Introduksjon

1.1 Karbohydrater

Karbohydrater er organiske forbindelser med generell formel $C_n(H_2O)_n$, men kan også inneholde fosfor, svovel eller nitrogen. Den minste strukturelle enheten i karbohydrater er monosakkarider med tre til ni karbonatomer. Monosakkarider med fem eller seks karbonatomer kan danne stabile ringer med et internt hemiacetal. I en fysiologisk løsning vil typisk mer enn 99 % av disse monosakkaridene ha ulike ringstrukturer (Mathews et al. 2013). Ringstrukturene gir opphav til et stereogent senter ved hemiacetalkarbonet C-1, også kalt det anomere karbonatomet. Ved dette karbonatomet er det en likevekt mellom to anomerer, en α - og en β -form, med den åpenkjededede strukturen som intermediat. Dette kalles mutarotasjon og er illustrert i Figur 1.1.1.



Figur 1.1.1 Ved det anomere karbonatomet er det en likevekt mellom α - og β - formen av et monosakkarid med den åpenkjededede strukturen som intermediat. I α - anomeren peker hydroksylgruppen «ned», i β - anomeren peker hydroksylgruppa «opp» (Hart et al. 2012).

Monosakkarider kan kobles sammen med glykosidbindinger til di-, oligo- (fra gresk *oligos*, få) og polysakkarider. Det vanligste er O-glykosidbindinger, men bindingen kan også involvere svovel eller nitrogenatomer og gi S- eller N- glykosidbindinger.

Di-, oligo- og polysakkarider har ulike strukturer, egenskaper og funksjoner avhengig av hvordan de er bygget opp og hvilke monosakkarider de består av. For polysakkarider skilles det mellom homopolysakkarider og heteropolysakkarider. Homopolysakkarider består av kun en type monomerer mens heteropolysakkarider er bygget opp av ulike typer monomerer. Strukturen til et polysakkarid påvirkes også av hvilke karbonatomer som er involvert i glykosidbindingen. Like bindinger mellom alle monomerene gir et rettkjedet polysakkarid, mens en kombinasjon av ulike bindinger kan gi et forgreinet molekyl. I tillegg har konfigurasjonen ved det anomere karbonatomet i monosakkaridene innvirkning på struktur og

egenskaper. Eksempelvis er cellulose og amylose begge rettkjedede homopolymerer av (1→4) linkede D-glukoseenheter. Allikevel kan ikke animalske enzymer som hydrolyserer α (1→4) bindingene i amylose hydrolysere β (1→4) bindingene i cellulose (Hart et al. 2012; Mathews et al. 2013).

I naturen har karbohydrater flere ulike og viktige biologiske funksjoner. Cellulose og kitin er eksempler på strukturelle karbohydrater som er viktige bestanddeler i celleveggen til henholdsvis planter og fungi. Kitin finnes også i eksoskjelettet til leddyr som insekter og skalldyr. Karbohydrater er også viktige forbindelser for energilagring, og amylose og amylopektin utgjør stivelse i planter. Glykogen brukes til lagring av energi i dyr og mikrobielle celler. Oligo- og polysakkarider festet til cellemembraner har en viktige funksjon som cellemarkører i flercellede organismer. Et eksempel på en viktig gruppe av slike cellemarkører er blodgruppe-antigener (Mathews et al. 2013).

1.2 Cellulose

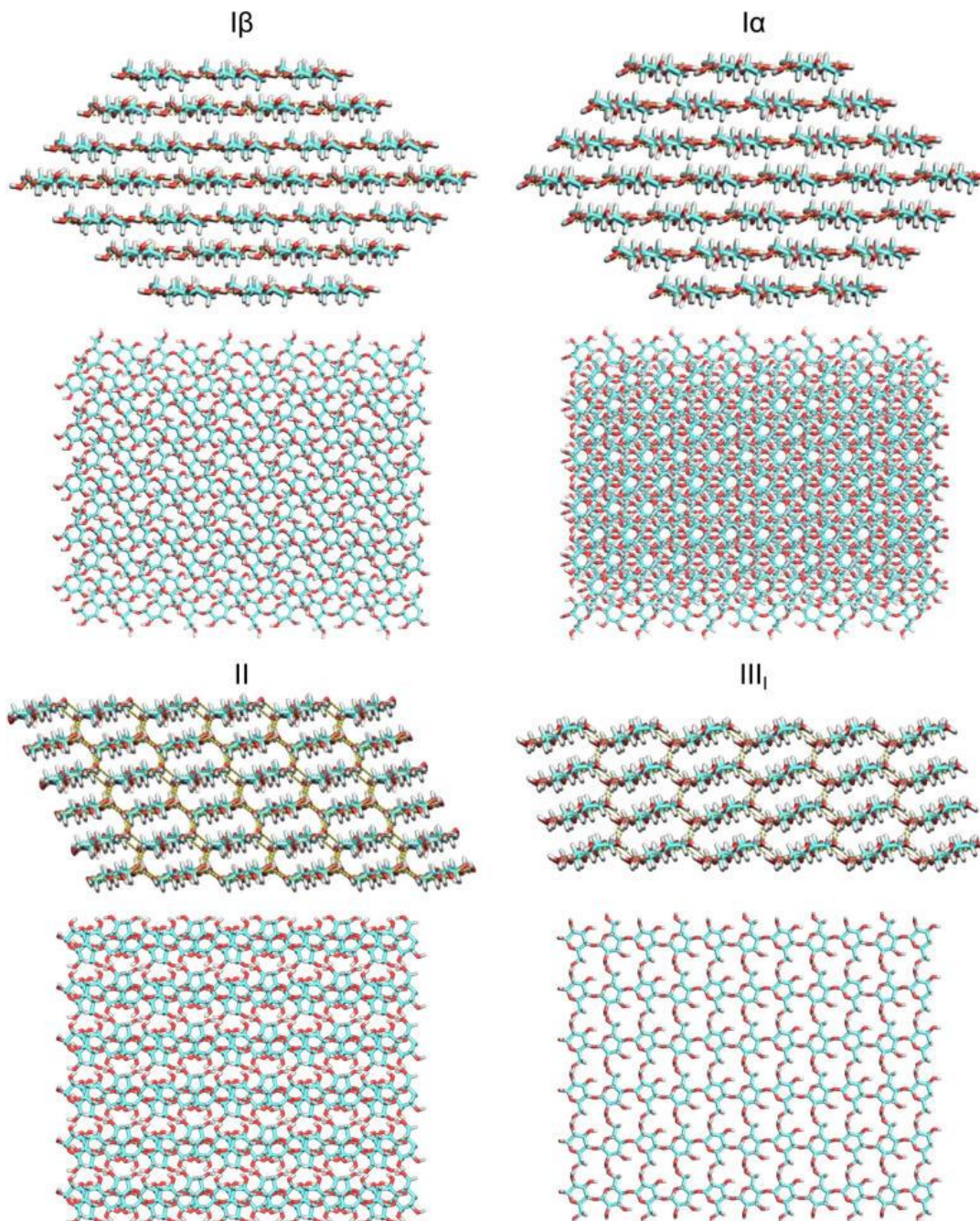
Cellulose er biopolymeren med høyest forekomst i biosfæren. Det er en lineær polymer av β (1→4) linkede D-glukoseenheter. Hver monomer er rotert 180 ° i forhold til den forrige og den minste strukturelle enheten er derfor en dimer- cellobiose. Lange cellulosekjeder har en ende der det foregår mutarotasjon ved det anomere karbonatomet på den ytterste glukoseenheten. Dette kalles den reducerende enden (Hart et al. 2012; Payne et al. 2015).

1.2.1 Struktur

Cellulose har en krystallinsk struktur og er uløselig. Glukoseoligomerer (glykankjeder) bestående av mer enn åtte enheter har større affinitet for hverandre enn et vandig løsningsmiddel (Brown 2004). Naturlig forekommende cellulose betegnes som cellulose I og består av to ulike former kalt I α - og I β -cellulose. Begge disse formene holdes sammen av et 2-dimensjonalt nettverk av hydrogenbindinger og hydrofobe interaksjoner mellom cellulosekjedene. Cellulosekjedene er videre organisert parallelt i mikrofibriller (Beckham et al. 2011; Nishiyama et al. 2002; Nishiyama et al. 2003).

Ulike behandlinger av cellulose I gir opphav til flere cellulosepolymorfer. Cellulose I er løselig i elektrolyttløsninger, og ved utfelling av cellulose fra en slik løsning dannes cellulose II. Cellulose II har anti-parallele «sheets». Behandling av cellulose I eller II med ammoniakk

gir henholdsvis cellulose III_I eller cellulose III_{II} (Payne et al. 2015). Cellulose III_I/ III_{II} har parallelle kjeder. I motsetning til det 2-dimensjonale nettverket i cellulose I har både cellulose II og III et 3-dimensjonalt nettverk med både inter- og intralags hydrogenbindinger (Beckham et al. 2011). En illustrasjon av forskjellen mellom de ulike cellulosepolymorfene er gitt i Figur 1.2.1. Varmebehandling av cellulose III_I eller III_{II} gir henholdsvis cellulose IV_I eller IV_{II} (O'Sullivan 1997).



Figur 1.2.1 En oversikt over ulike cellulosepolymorfer. For alle polymorfene er strukturen vist fra «enden» (øverst) og «ovenfra og ned» (nederst). Cellulose I_β og I_α har kun intralags hydrogenbindinger, og forskjellen i hydrogenbindingsmønsteret er mest åpenbar «ovenfra og ned». Cellulose II og III_I har et 3-dimensjonalt nettverk med inter- og intralags hydrogenbindinger (Payne et al. 2015).

I plantemateriale er cellulose også assosiert med hemicellulose og den aromatiske polymeren lignin. Denne komplekse strukturen bidrar til at cellulose fra celleveggen i planter er svært motstandsdyktig mot nedbrytning.

1.2.2 Anvendelser

Tradisjonelt har cellulose blitt anvendt i papirindustrien, men cellulose har også utallige andre bruksområder. De mange hydroksylgruppene på hver glukoseenhet gir mulighet for dannelse av ulike derivater. Noen av disse, for eksempel karboksymetyl- cellulose (CMC), brukes som tilsetningsstoff i mat (Mattilsynet 2013). Cellulose triacetat er et annet cellulosederivat og brukes blant annet til dannelse av tynne filmer.

Et annet bruksområde for cellulose er produksjon av bioetanol til biodrivstoff. Nedbrytning av cellulose til fermenterbare monosakkarider er derfor et forskningsområde med stor global interesse. I dag produseres bioetanol hovedsakelig fra råstoff som mais, soya og sukkerrør. Dette kalles første generasjons bioetanol. Et viktig mål for en mer bærekraftig produksjon av biodrivstoff er å i stedet utnytte celluloseråstoff dyrket på arealer som ikke konkurrerer med matproduksjon, såkalt andre generasjons bioetanol (Williams 2008).

1.3 Glykosidhydrolaser

Glykosidhydrolaser er nøkkelenzymer i karbohydratmetabolismen. De bidrar i nedbrytningen av komplekse polysakkarider til enkle di- og monosakkarider. Glykosidhydrolaser har en rekke viktige biologiske funksjoner knyttet til energioptak, turnover av signalmolekyler og nedbrytning av celleveggen i bakterier og planter (Davies & Henrissat 1995).

Forskning på glykosidhydrolaser, spesielt cellulaser, er viktig for å oppnå en mer kostnadseffektiv produksjon av andre generasjons bioetanol. Selve bioetanolproduksjonen involverer ofte en forbehandling av råstoffet, etterfulgt av enzymatisk hydrolyse av den krystallinske cellulosepolymeren, og til slutt fermentering av løselige sukker (Wilson 2009). Design av nye mer effektive enzymer til denne prosessen krever en forståelse av mekanismen bak cellulosenedbrytning på et molekylært nivå (Himmel et al. 2007). Et eksempel er mekanismen bak substratbinding til cellulaser hvor en del av en cellulosekjede i en mikrofibril binder til det aktive setet i en cellulase. Dette er antageligvis det hastighetsbegrensende trinnet

i nedbrytning av cellulose. For å utvikle cellulaser med høyere aktivitet på naturlige substrater er det derfor viktig å forstå mekanismen bak dette trinnet (Wilson 2009).

Cellulose fra plantemateriale har en kompleks struktur og er svært resistent mot nedbrytning. I naturen har mikrober utviklet ulike strategier for å takle denne utfordringen. En strategi er å syntetisere et helt sett av ekstracellulære glykosidhydrolaser. Dette gjøres av mange aerobe organismer og de ulike enzymene fungerer synergistisk i nedbrytningen av krystallinsk cellulose. Andre mikrober syntetiserer store multienzym-komplekser kalt cellulosomer. Disse kompleksene har enkelte enzymer med en karbohydratbindende modul (CBM), som sørger for binding mellom kompleks og substrat (Wilson 2011). Forskning på designer cellulosomer, der ulike ekstracellulære glykosidhydrolaser settes sammen, kan bidra til mer effektive enzymer til industrien (Moraïs et al. 2012).

I tillegg til glykosidhydrolaser er det de senere årene blitt oppdaget en klasse med oksidative enzymer kalt lytisk polysakkarid monooxygenaser (LPMO). Disse enzymene er kobberavhengige og bruker molekylært oksygen, og en ekstern elektrondonor, for å øke nedbrytningshastigheten til hydrolytiske enzymer på krystallinske substrater (Vaaje-Kolstad et al. 2010).

1.3.1 Klassifisering

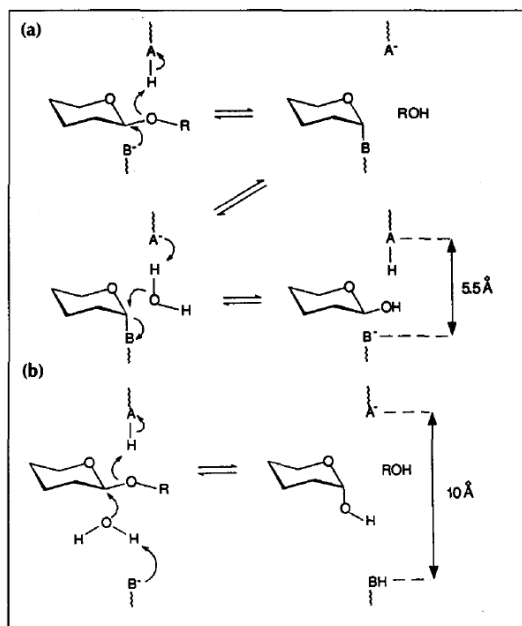
Glykosidhydrolaser klassifiseres i CAZy- databasen sammen med andre karbohydrataktive enzymer. De har i tillegg til det katalytiske domene ofte andre assosierte moduler som klassifiseres hver for seg. CAZy-databasen deler de karbohydrataktive enzymene i fem ulike klasser: glykosidhydrolaser, glykosyltransferaser, polysakkaridlyaser, karbohydratesteraser og hjelpeenzymer (AA- Auxillary Activities). I tillegg har databasen en klasse med ikke-katalytiske karbohydratbindende moduler (CBM). Klassen glykosidhydrolaser er videre delt inn i 135 familier (www.cazy.org) (Lombard et al. 2014). Klassifiseringen i ulike familier i CAZy- databasen skjer basert på aminosyresekvensen til enzymene. Dette gir blant annet mulighet for homologimodellering hvis strukturen til ett av enzymene i familien er kjent. Slike analyser kan gi informasjon om viktige konserverte residuer og katalytiske residuer i et enzym (Henrissat 1991).

Glykosidhydrolaser har ulike virkningsmåter. Endoaktive enzymer, endoglukanaser, katalyserer hydrolyse av bindinger midt i substratkjeden. På denne måten dannes nye kjedeender. Eksoaktive enzymer, eller cellobiohydrolaser, angriper enden av en substratkjede.

For eksoaktive glykosidhydrolaser skilles det også mellom enzymer som angriper den reduserende enden og enzymer som angriper den ikke-reduserende enden av substratkjeden (Davies & Henrissat 1995).

1.3.2 Mekanismer

Enzymatisk hydrolyse av glykosidbindinger skjer via to hovedmekanismer. De to ulike mekanismene resulterer i enten bevaring eller invertering av stereokjemien ved det anomere karbonatomet i ringstrukturen. Hydrolysen skjer ved generell syrekatalyse og krever to kritiske residuer: en proton donor og en nukleofil/base. De to ulike mekanismene er illustrert i Figur 1.3.1 (Davies & Henrissat 1995). Denne oppfatningen har derimot vist seg å være en forenkling ettersom flere ulike mekanismer har blitt identifisert, inkludert substratassisterte mekanismer og mekanismer der et nettverk av residuer erstatter en nukleofil/base (Vuong & Wilson 2010).



Figur 1.3.1 De to ulike hovedmekanismene for enzymatisk hydrolyse av glykosidbindinger. a) bevarende mekanisme b) inverterende mekanisme (Davies & Henrissat 1995).

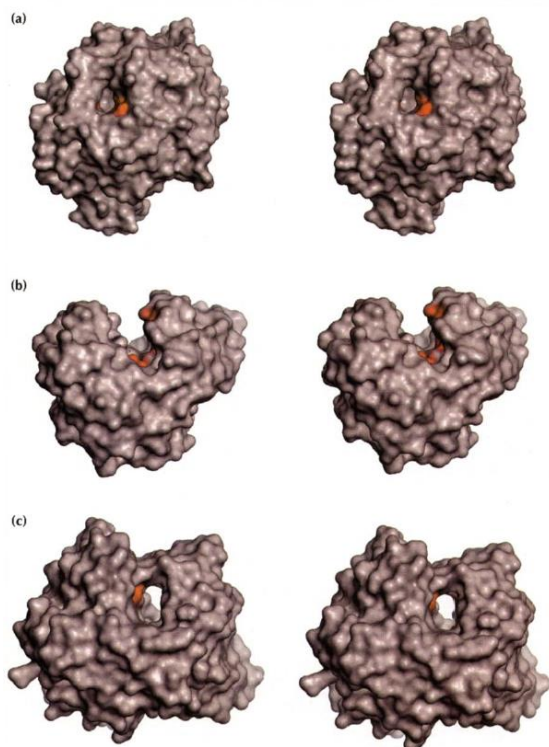
Den bevarende mekanismen er en dobbel forskyvningsmekanisme (Rye & Withers 2000). I bevarende glykosidhydrolaser er de to katalytiske residuene plassert med en gjennomsnittlig avstand på 5,5 Å. Hydrolysen begynner med at den katalytiske syra (AH) protonerer glykosidbindingen. Samtidig skjer et nukleofilt angrep og gir et kovalent intermedat. I det neste steget fungerer den deprotonerte syra som en base ved å ta opp et proton og dette

aktiverer et vannmolekyl. Vannmolekylet utfører så et nukleofilt angrep på det anomere karbonet og dette resulterer i bevaring av stereokjemien (Davies & Henrissat 1995; Vuong & Wilson 2010).

Den inverterende mekanismen er en enkel forskyvningsmekanisme (Rye & Withers 2000). I inverterende glykosidhydrolaser er de katalytiske residuene plassert med en gjennomsnittlig avstand på 10 Å. Hydrolysen begynner med at den katalytiske syra protonerer glykosidbindingen. Samtidig aktiverer den katalytiske basen et vannmolekyl og det skjer et nukleofilt angrep på det anomere karbonet. Resultatet er inversjon av stereokjemien (Davies & Henrissat 1995; Vuong & Wilson 2010).

1.3.3 Struktur

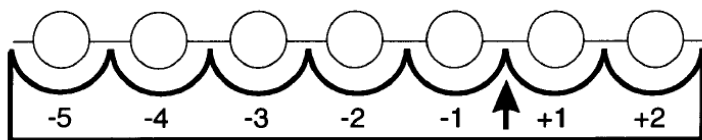
Glykosidhydrolaser består ofte av et katalytiske domene og en eller flere ikke-katalytiske karbohydratbindende moduler (CBM). Topologien i det aktive setet til glykosidhydrolasen er knyttet til virkningsmekanismen. Mange proteinfolder er representert i CAZy databasen, men topologien i det aktive setet faller stort sett inn i en av tre kategorier: Lomme, kløft eller tunnel, se Figur 1.3.2 (Davies & Henrissat 1995).



Figur 1.3.2 Topologien i det aktive setet til glykosidhydrolaser faller generelt inn i en av tre kategorier: a) lomme b) kløft eller c) tunnel (Davies & Henrissat 1995).

De tre ulike topologiene er typiske for forskjellige virkningsmekanismer og substrater. Lomme/krater-topologien binder ikke-reduserende kjedeender. Eksoaktive enzymer med denne topologien er tilpasset substrater med mange tilgjengelige kjedeender, for eksempel naturlig stivelse. Enzymer med denne topologien i det aktive setet er derimot lite effektive på krystallinske substrater som cellulose. Kløft-topologien er vanlig for endoaktive enzymer og den åpne strukturen gir mulighet for tilfeldig binding til polymeren. Tunnel-topologien har likheter med kløft-topologien, men en loop dekker deler av kløfta. Denne topologien er assosiert med prosessive eksoaktive enzymer (Davies & Henrissat 1995).

Subsetene i det aktive setet til glykosidhydrolaser nummereres etter en nomenklatur foreslått av Davies et al. (1997) med $-n$ og $+n$ subsetter. Negative subsetter binder den ikke-reduserende enden av substratet, og positive subsetter binder den reduserende enden. Selve kløyvingen foregår mellom subsete -1 og $+1$, dette prinsippet er illustrert i Figur 1.3.3.



Figur 1.3.3 Nummererte subsetter etter $-n$, $+n$ systemet i et enzym som kløyver av disakkarider fra den reduserende enden av et substrat (Davies et al. 1997).

1.3.4 Prosessivitet

En prosessiv glykosidhydrolase binder til substratet og utfører flere hydrolyser før dissosiasjon. De fleste prosessive glykosidhydrolaser er eksoenzymer, men det er også oppdaget prosessive enzymer med endoaktivitet, eksempelvis Cel9A fra *Thermobifida fusca* (Sakon et al. 1997; Wilson & Kostylev 2012). Den substratbindende kløften i prosessive enzymer har aromatiske residuer, ofte tryptofan (Trp), som er involvert i binding av substrat (Sørli et al. 2012). Disse residuene er også ansvarlig for den glidende bevegelsen av substratkjeden gjennom det aktive setet (Horn et al. 2006).

Binding av enkle substratkjeder til det aktive setet i cellulaser er antageligvis det hastighetsbegrensende trinnet ved nedbrytning av krystallinsk cellulose (Wilson 2009). Depolymerisering av krystallinske substrater krever en ugunstig endring i Gibbs frienergi, beregnet til å være 5,4 kcal/mol for en kantkjede i cellulose I β (Beckham et al. 2011). Dette medfører at en prosessiv virkningsmåte er en fordel. Dette hindrer også at substratkjeden

reassosierer med den krystallinske strukturen. Lav hastighetskonstant for dissosiasjon (k_{off}) og dermed sterk binding av produkt er nødvendig for prosessivitet ved nedbrytning av krystallinsk kitin av kitinaser i GH-familie 18 (Kurašin et al. 2015).

Det er derimot vist at en lav dissosiasjonskonstant kan føre til at enzymet blir sittende fast på substratet hvis det møter en hindring (Kurašin & Väljamäe 2011). En studie av Horn et al. (2006) viste at mutasjon av Trp⁹⁷ i kitinase B fra *Serratia marcescens* (*SmChiB*) fører til tap av prosessivitet og reduksjon i nedbrytning av krystallinsk kitin. Samtidig øker nedbrytningshastigheten på løselig kitosan 29 ganger.

Ved måling av prosessivitet skilles det mellom apparent og intrinsic (iboende) prosessivitet. Apparent prosessivitet kan defineres som antall hydrolytiske kløyvinger delt på antall ganger det prosessive enzymet binder til en kjedeende. I praksis kan dette sees som den faktiske prosessiviteten til et enzym på et gitt substrat under gitte forhold. Iboende prosessivitet er antall kløyvinger før dissosiasjon på et ideelt substrat, og representerer dermed den øvre grensen for apparent prosessivitet (Beckham et al. 2014).

Bestemmelse av prosessivitetsverdier er en stor utfordring, men ulike metoder blir benyttet til formålet. Disse kan gi en indikasjon på prosessivitet. En metode går ut på å undersøke ratioen av løselig over ikke-løselige reduserende ender ved inkubasjon av enzym på filterpapir eller et annet uløselig substrat. Dette er en nyttig teknikk for å skille mellom ikke-prosessive og prosessive cellulaser. Eksocellulaser produserer mer enn 93 % løselige reduserende ender, for endocellulaser er den tilsvarende verdien 60-70 % (Irwin et al. 1993; Wilson & Kostylev 2012). En bedre metode for å bestemme prosessiviteten til eksocellulaser er ratioen av cellobiose over cellotriose ved hydrolyse. Denne metoden baserer seg på antagelsen om at den første hydrolysen etter binding produserer cellotriose og cellobiose med lik sannsynlighet, mens de alle senere hydrolyser produserer cellobiose (Wilson & Kostylev 2012). Begge disse metodene gir en indikasjon på apparent prosessivitet (P^{app}). Iboende prosessivitet avhenger av de to hastighetskonstantene k_{cat} og k_{off} og for prosessive enzymer antas det at $k_{\text{cat}} \gg k_{\text{off}}$. Iboende prosessivitet (P^{intr}) kan estimeres fra eksperimentelt bestemte k_{cat} og beregnede k_{off} , der $P^{\text{intr}} \approx k_{\text{cat}}/k_{\text{off}}$ (Kurašin & Väljamäe 2011).

1.4 Cellulaser

Cellulaser er glykosidhydrolaser som bryter ned β (1 \rightarrow 4) bindingene i cellulose og de er klassifisert i GH-familie 5, 6, 7, 8, 9 og 48 (www.cazy.org) (Lombard et al. 2014; Parsiegla et al. 2008). Eksocellulaser tilhører GH- familie 6, 7 og 48, der familie 6 angriper den ikke-reduserende enden, og familie 7 og 48 angriper den reduserende enden (Barr et al. 1996).

1.4.1 Cellulaser fra *Thermobifida fusca*

T. fusca er en aerob, filamentøs jordbakterie og en viktig nedbryter av organisk materiale, for eksempel kompost. De ekstracellulære glykosidhydrolasene fra *T. fusca* er termostabile og aktive innenfor et bredt pH spekter. Disse gunstige egenskapene gjør at disse enzymene er nøye studert (Lykidis et al. 2007).

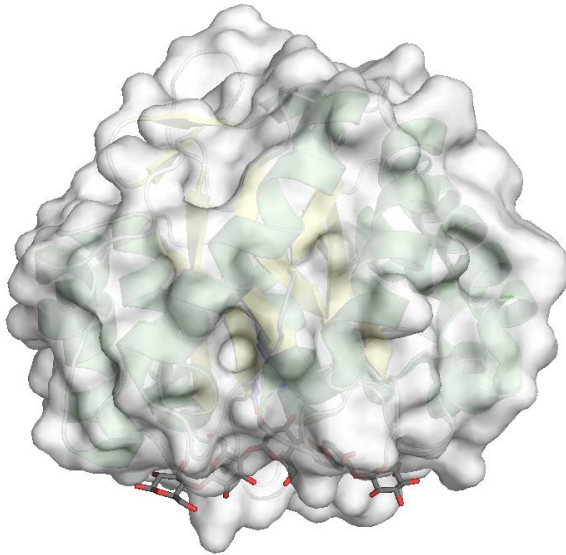
Det cellulolytiske maskineriet til *T. fusca* består av fire endoaktive cellulaser, *TfCel5A*, *TfCel5B*, *TfCel6A* og *TfCel9B*, to prosessive eksoaktive cellulaser, *TfCel48A* og *TfCel6B*, og en prosessiv endoaktiv cellulase, *TfCel9A* (Irwin et al. 1993; Posta et al. 2004). De prosessive eksocellulasene *TfCel48A* og *TfCel6B* angriper fra henholdsvis den reduserende og den ikke-reduserende enden. Alle cellulasetene har en karbohydratbindende modul, CBM2. Denne er lokalisert N-terminalt for *TfCel5A*, *TfCel6B* og *TfCel48A* og C-terminalt for *TfCel6A*, *TfCel9A* og *TfCel9B* (Wilson 2004). Unntaket er *TfCel5B* som kun har et C-terminalt CBM3 (Posta et al. 2004). *TfCel5A*, *TfCel9A* og *TfCel48A* har blitt studert nærmere i denne oppgaven og er beskrevet under.

I tillegg til de syv ekstracellulære cellulasetene er det vist at *T. fusca* produserer to lytisk polysakkarid monooksygenaser (LPMOer), E7 og E8, ved vekst på enkelte substrater (Moser et al. 2008). E7 oksiderer ved C1 og C4, mens E8 er en C1-oksiderende LPMO. Dette gir opphav til synergi når disse enzymene er involvert i nedbrytning av cellulose (Forsberg et al. 2014).

1.4.2 *TfCel5A*

TfCel5A er en ikke-prosessiv endocellulase med en total molekylvekt på 46,6 kDa, tidligere kalt E5. Den består av et GH-familie 5 katalytisk domene og en N-terminal karbohydratbindende modul, CBM2 (Lao et al. 1991; Wilson 2004). I likhet med andre cellulaser i familie 5 kløyver den substratet med en bevarende mekanisme. Det katalytiske

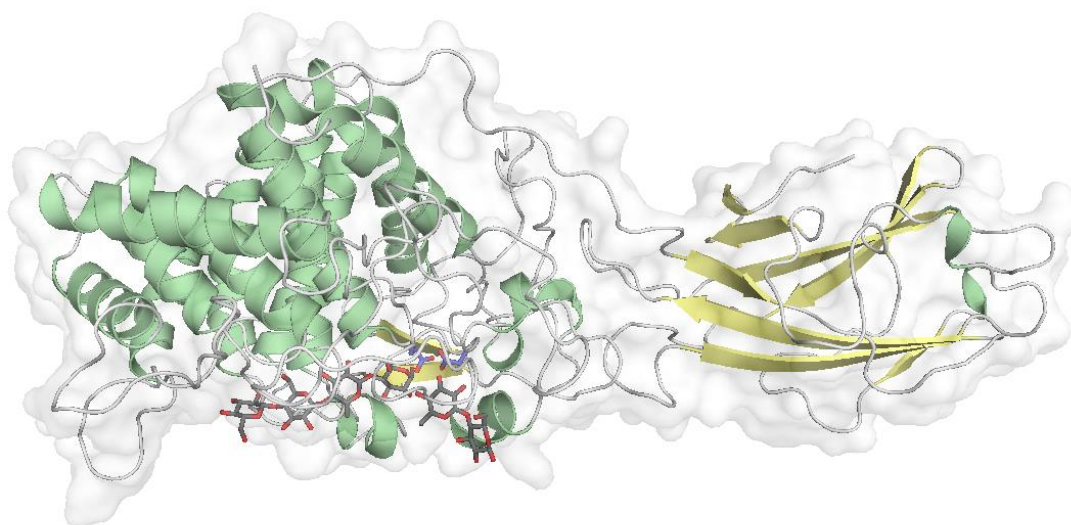
domenet har en $(\beta/\alpha)_8$ fold og krystallstrukturen til dette domenet er vist i Figur 1.4.1 (www.cazy.org) (Lombard et al. 2014). Den karbohydratbindende modulen, CBM2, er avgjørende for binding til det krystallinske substratet Avicel (McGinnis & Wilson 1993). På det løselige substratet CMC beholder det katalytiske domenet derimot 94 % av aktiviteten sammenlignet med full-lengde enzym (Irwin et al. 1993).



Figur 1.4.1 Krystallstruktur av det katalytiske domenet i *TjCel5A-E355Q*. Det aktive setet sitter i en åpen kløft, i overenstemmelse med endoaktiviteten (PDB-ID: 2CKR).

1.4.3 *TjCel9A*

TjCel9A er en prosessiv endocellulase med en molekylvekt på 90,5 kDa, tidligere kalt E4. Den består av et GH-familie 9 katalytisk domene, et FNIII-lignende domene og to karbohydratbindende moduler. Den ene, CBM3, er rigid bundet til det katalytiske domenet, mens den andre, CBM2, er bundet til det katalytiske domenet og CBM3 via en fleksibel linker (Irwin et al. 1998; Sakon et al. 1997). Det katalytiske domenet i *TjCel9A* har en $(\alpha/\alpha)_6$ tønne fold og CBM3 har en antiparallell β -sandwich fold (Sakon et al. 1997). Figur 1.4.2 viser krystallstrukturen til disse to domene. Den substratbindende kløfta fortsetter ut i den karbohydratbindende modulen. I den andre enden er av det aktive setet er det en loop som forhindrer binding forbi subseite -4. Sakon et al. (1997) fant også en rekke aromatiske residuer involvert i substratbinding det aktive setet til *TjCel9A*: Trp²⁵⁶(-4), Trp²⁰⁹(-3), Trp³¹³(-2), Tyr²⁰⁶(-1), His¹²⁵/Tyr⁴²⁰(+1), Trp¹²⁸/Ile³⁸⁸(+2/+3).

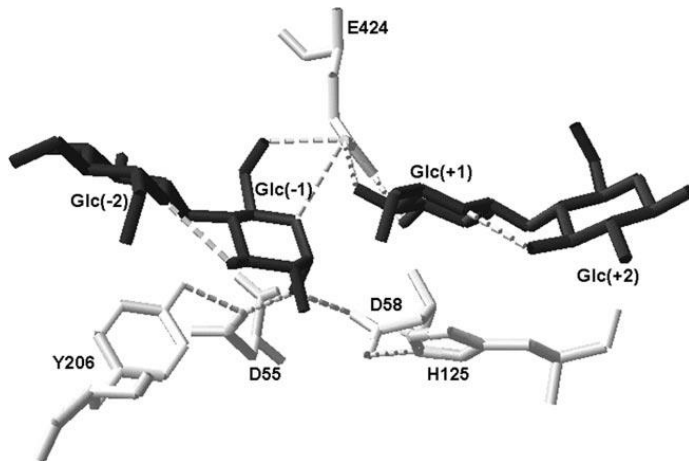


Figur 1.4.2 Krystallstruktur av *TjCel9A*. Det katalytiske domenet til venstre og CBM3 til høyre. (PDB-ID: 4TF4)

TjCel9A er endoaktiv med en åpen substratbindende kløft, men har en prosessiv virkningsmåte der enzymet forblir assosiert med substratet etter den initielle hydrolysen. Basert på krystallstrukturen er det blitt foreslått at *TjCel9A* beveger seg fra den nye ikke-reducerende enden, mot den reducerende enden, som en prosessiv cellulase. For hver hydrolyse kløyves det av en cellotetraose enhet (Sakon et al. 1997).

TjCel9A gir opphav til synergisme med både endoaktive og begge klassene av eksoaktive enzymer og viser også den høyeste enkeltenzym aktiviteten av alle cellulaser fra *T.fusca* (Irwin et al. 1993). Den karbohydrat bindende modulen, CBM3, har vist seg å være avgjørende for prosessivitet i *TjCel9A* og eliminasjon av denne fører til reduksjon i ratio av løselige/uløselige reducerende ender (Irwin et al. 1998).

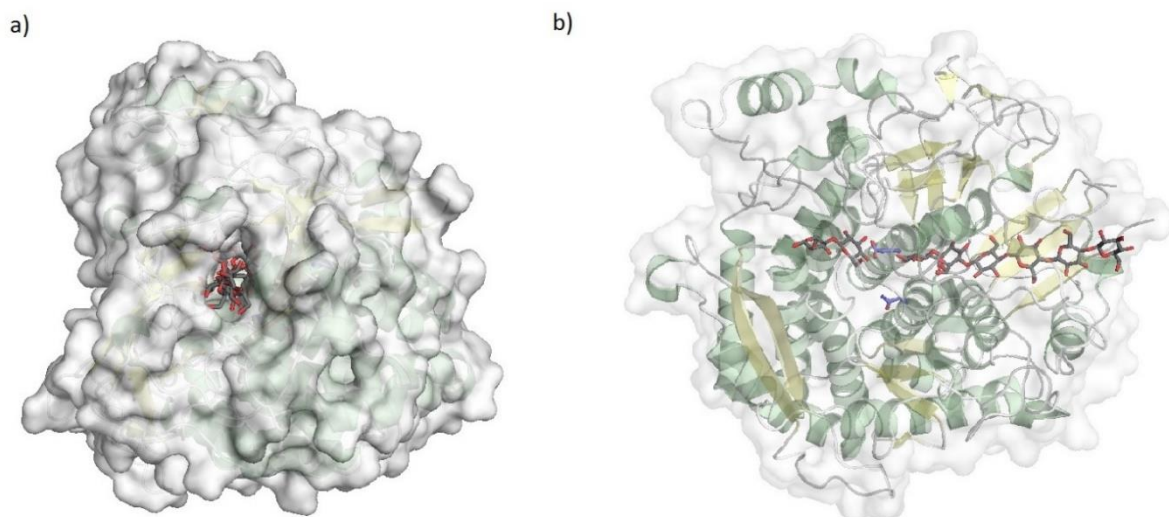
En studie utført av Zhou et al. (2004) identifiserte flere residuer i *TjCel9A* med viktige funksjoner. Glu⁴²⁵ er den katalytiske syra og mye tyder på at Asp⁵⁵ og Asp⁵⁸ sammen fungerer som den katalytiske basen. Mutasjon av Tyr²⁰⁶ og Tyr³¹⁸ gir begge tap av prosessivitet. Dette er antageligvis knyttet til svakere binding av cellulose kjeden i subsete -1 (Tyr²⁰⁶) og -2 (Tyr³¹⁸) (Zhou et al. 2004). Mutasjon av His¹²⁵ i subsete +1 gir også tap av prosessivitet (Li et al. 2007). Mutasjon av Tyr²⁰⁶ til Ser²⁰⁶ og Phe²⁰⁶ viser dessuten at hydroksylgruppen i Tyr²⁰⁶ har en viktig hydrogenbinding til den ene katalytiske residuen (Asp⁵⁵) (Zhou et al. 2004). Tilsvarende har His¹²⁵ en hydrogenbinding til Asp⁵⁸. Dette nettverket med Tyr²⁰⁶, His¹²⁵, Asp⁵⁵ og Asp⁵⁸ er essensielt for katalyse, se Figur 1.4.3. (Li et al. 2007).



Figur 1.4.3 Nettverket med Tyr²⁰⁶, Asp⁵⁵, Asp⁵⁸, His¹²⁵ og sukkerenheten i subsete -1 er essensielt for katalyse i *TjCel9A* (Li et al. 2007).

1.4.4 *TjCel48A*

Den 104 kDa store eksocellulasen *TjCel48A*, opprinnelig E6, består av et GH-familie 48 katalytisk domene, en N-terminal karbohydratbindende modul, CBM2, og i tillegg et FNIII-lignende domene (Irwin et al. 2000). *TjCel48A* har en prosessiv virkningsmåte og angriper substratet fra den reduserende enden (Barr et al. 1996). Det katalytiske domenet har en $(\alpha/\alpha)_6$ tønne-fold og topologien i det aktive setet ligner en tunnel. Figur 1.4.4 viser krystallstrukturen av det katalytiske domenet. Sammenligning av det aktive setet i *TjCel48A* med strukturer fra andre enzymer i GH-familie 48 viser høy grad av konservering (Kostylev et al. 2014).



Figur 1.4.4 Krystallstruktur av det katalytiske GH-familie 48 domenet i *TjCel48A*-D224N. De 2 strukturene er rotet 90° i forhold til hverandre. a) Det aktive setet i *TjCel48A* har en tunneltopologi. b) GH-familie 48-domenet har en $(\alpha/\alpha)_6$ tønne fold, de katalytiske residuene Asp²²⁴ (mutert til Asn²²⁴) og Glu⁵¹ er markert i blått. (PDB-ID: 4JJJ)

Enzymene i GH-familie 48 har ni subseter (-7, -6, -5, -4, -3, -2, -1, +1, og +2), der de positive subsetene interagerer med cellobiose produktet ved hydrolyse (Guimarães et al. 2002; Parsiegla et al. 2008). De kløyver substratet med en inverterende mekanisme. Kostylev og Wilson (2011) har undersøkt katalytiske baser i GH-familie 48 og fant at Asp²²⁵ i det katalytiske domenet fungerer som base i *Tf*Cel48A (den katalytiske syra er i tilsvarende tilfelle Glu⁵²).

*Tf*Cel48A har liten aktivitet på både krystallinske substrater og CMC, men virker å være spesielt viktig i synergistiske blandinger med andre cellulaser (Irwin et al. 1993; Irwin et al. 2000). Punktmutasjoner av aromatiske og ikke aromatiske residuer i og ved tunnelåpningen i *Tf*Cel48A fant at to residuer, Trp³¹³ og Trp³¹⁵, er viktige for prosessivitet på krystallinsk bakteriell cellulose(BC) og phosphoric acid swollen cellulose (PASC). I tillegg ble det identifisert to residuer, Tyr⁹⁷ og Phe¹⁹⁵, som virker å være viktige for binding av enzym til tilgjengelige kjedeender (Kostylev et al. 2014).

1.5 Termodynamikk ved protein-ligand interaksjoner

Bestemmelse av termodynamiske parameter er viktig for å karakterisere kreftene som driver biomolekylære assosiasjoner. Termodynamiske parameter inkluderer likevektskonstanten (K_a), endring i Gibbs frienergi (ΔG°), endring i entalpi (ΔH°), endring i entropi (ΔS°) og endring i varmekapasitet (ΔC_p).

1.5.1 Likevektskonstanten (K_a) og Gibbs frienergi (ΔG°)

En typisk bindingsreaksjon mellom protein (P) og ligand (L) kan beskrives med en enkel likning:



Hvor k_a og k_d er hastighetskonstantene for henholdsvis assosiasjon og dissosiasjon. Ved likevekt kan assosiasjonskonstanten K_a relateres til konsentrasjonen av protein, ligand og protein-ligand komplekset, samt hastighetskonstantene k_a og k_d . Denne sammenhengen er vist i likning 1.5.2.

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

Tilsvarende er dissosiasjonskonstanten bestemt av likning 1.5.3.

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} = \frac{k_d}{k_a} = \frac{1}{K_a} \quad (1.5.3)$$

Endring i Gibbs frienergi (ΔG°) er knyttet til assosiasjonskonstanten (K_a) og dissosiasjonskonstanten (K_d) gjennom likning 1.5.4,

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_a = RT \ln K_d \quad (1.5.4)$$

der R er den universelle gasskonstanten ($1,987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) og T er temperaturen i Kelvin (K). Endringen i Gibbs frienergi forteller om en reaksjon er termodynamisk gunstig ved standardbetingelser (Mathews et al. 2013). En negativ ΔG° viser at reaksjonen er spontan i retning reaktanter mot produkter. En positiv ΔG° betyr at reaksjonen er ikke-spontan i retning reaktanter mot produkter, men derimot spontan i retning produkter mot reaktanter. For en bindingsreaksjon gir ΔG° informasjon om bindingsaffiniteten, det vil si hvor termodynamisk gunstig bindingen mellom ligand og protein er. Endringen i Gibbs frienergi eller bindingsfrienergi (ΔG°) kan videre deles opp og relateres til endringen i entalpi (ΔH°) og endringen i entropi (ΔS°) ved likning 1.5.5.

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (1.5.5)$$

Likning 1.5.5 viser at mange ulike ΔH° og ΔS° kan gi samme ΔG° og at dette også er avhengig av temperatur. Bindingen mellom protein og ligand kan altså være drevet av gunstig endring i entalpi, gunstig endring i entropi, eller begge deler. I biologiske systemer kan det ofte observeres at ugunstig endring i ΔH kompenseres av en gunstig endring i ΔS , eller motsatt, slik at ΔG for reaksjonen forblir forholdsvis konstant. Dette kalles entalpi-entropi kompensasjon. Effekten er spesielt tydelig for systemer i vann der endringer i ikke-kovalente bindinger dominerer (Cooper et al. 2001; Dunitz 1995).

1.5.2 Bindingsentalpi (ΔH)

Den observerte endringen i entalpi er summen av endringene i ikke-kovalente bindinger mellom protein, ligand og løsningsmiddel (vann) i protein-ligand interaksjonen. ΔH_r reflekterer endringene i hydrogenbindinger, elektrostatiske interaksjoner og dipol

interaksjoner i en bindingsreaksjon der to fullt hydrerte molekyler går sammen til et kompleks (Perozzo et al. 2004).

1.5.3 Bindingsentropi (ΔS)

Endringen i entropi i protein-ligand interaksjoner kan sees på som summen av tre ulike bidrag gitt i likning 1.5.6 (Baker & Murphy 1997).

$$\Delta S_r^\circ = \Delta S_{\text{solv}}^\circ + \Delta S_{\text{mix}}^\circ + \Delta S_{\text{conf}}^\circ \quad (1.5.6)$$

Endring i solvatiseringsentropien $\Delta S_{\text{solv}}^\circ$ er det viktigste bidraget i ΔS_r° . $\Delta S_{\text{solv}}^\circ$ kommer fra frigjøring av vannmolekyler ettersom den totale hydratiserte overflaten til protein og ligand blir mindre i bindingsreaksjonen (Freire 2004; Perozzo et al. 2004). Ved temperaturer nær 385 K er endring i solvatiseringsentropien beregnet å være nær 0 og $\Delta S_{\text{solv}}^\circ$ kan relateres til endringen i varmekapasitet ($\Delta C_{p,r}$) (j.f.r avsnitt 1.5.4) gjennom likning 1.5.7 (Baldwin 1986).

$$\Delta S_{\text{solv}}^\circ = \Delta C_{p,r}^\circ \ln(303\text{K}/385\text{K}) \quad (1.5.7)$$

ΔS_{mix} korrigerer for endringene i translasjonsfrihet og rotasjonsfrihet ved miksing av ligand og protein med løsningsmiddel. Den er konstant og kan beregnes fra likning 1.5.8 (Baker & Murphy 1997).

$$\Delta S_{\text{mix}}^\circ = R \ln(1/55,5\text{K}) \quad (1.5.8)$$

Endringen i konformasjonsentropi $\Delta S_{\text{conf}}^\circ$ kan bestemmes fra likning 1.5.6 basert på en eksperimentelt bestemt ΔS_r° og beregnede $\Delta S_{\text{solv}}^\circ$ og $\Delta S_{\text{mix}}^\circ$ fra henholdsvis likning 1.5.7 og 1.5.8. $\Delta S_{\text{conf}}^\circ$ er vanligvis et stort bidrag i ΔS_r° , oftest i negativ retning. Denne verdien reflekterer reduksjonen i konformasjonsfrihet for protein og ligand ved binding.

1.5.4 Endring i varmekapasitet (ΔC_p)

Varmekapasitet er energien som kreves for å øke temperaturen til et system med en grad Kelvin. Endring i varmekapasitet $\Delta C_{p,r}^\circ$ er definert i likning 1.5.9.

$$\Delta C_{p,r}^\circ = \left(\frac{\delta \Delta H_r^\circ}{\delta T} \right) \quad (1.5.9)$$

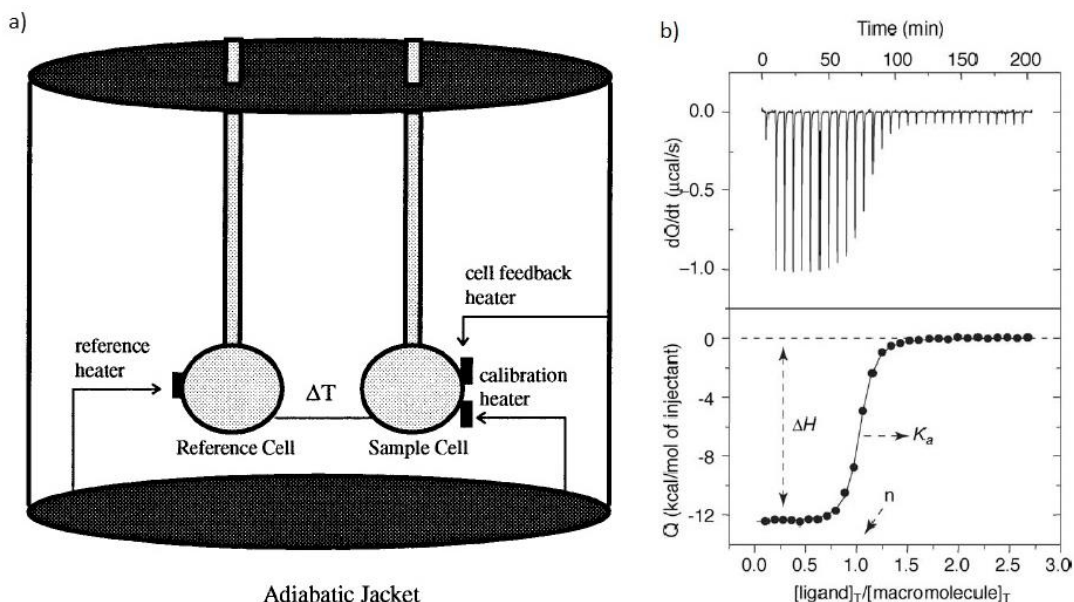
ΔH_r° er endring i entalpi og T er temperaturen i Kelvin (K). $\Delta C_{p,r}^\circ$ er dermed temperaturavhengigheten til entalpiendringen. Det er en sterk korrelasjon mellom ΔC_p og overflaten som begraves når et kompleks dannes. Det har blitt vist at fjerning av interaksjoner

mellom løsningsmiddelet (vann) og overflaten på proteinet gir en stor negativ ΔC_p . Endring i varmekapasitet gir en link mellom termodynamisk data og strukturell informasjon (Perozzo et al. 2004).

1.6 Isoterm titreringskalorimetri (ITC)

Isoterm titreringskalorimetri kan benyttes for å studere mange ulike biomolekylære interaksjoner inkludert protein-ligand, protein-protein og protein-nukleinsyre interaksjoner. Et enkelt ITC-forsøk kan gi de termodynamiske parameterne K_a og ΔH_r° i tillegg til støkiometrien n for reaksjonen. Videre kan ΔG_r° og ΔS_r° for bindingsreaksjonen beregnes (Perozzo et al. 2004; Pierce et al. 1999). Ved å utføre forsøkene ved flere temperaturer kan ΔC_p bestemmes. ITC er den eneste teknikken som kan dele opp bindingsenergien i en entalpisk og en entropisk term (Freire 2004) og er derfor en viktig teknikk for bestemmelse av termodynamiske signaturer.

Et-ITC instrument består av to celler, en prøvecelle og en referansecelle. Disse er laget av et varmeledende materiale og er omgitt av en adiabatisk jakke, se Figur 1.6.1. Referansecella er fylt med vann eller buffer. Sensorer aktiverer varmeelementer ved behov slik at alle komponentene holder samme temperatur (Pierce et al. 1999).



Figur 1.6.1 a) Skjematiske diagram av et ITC instrument (Pierce et al. 1999). b) Resultat fra et typisk ITC eksperiment. Avviket fra baselinja integreres og arealet under hver topp (øverst) plottes mot molar ratio for ligand/protein (nederst). Denne bindingsisotermen kan benyttes til å bestemme K_a , ΔH og n for bindingsreaksjonen (Freire 2004).

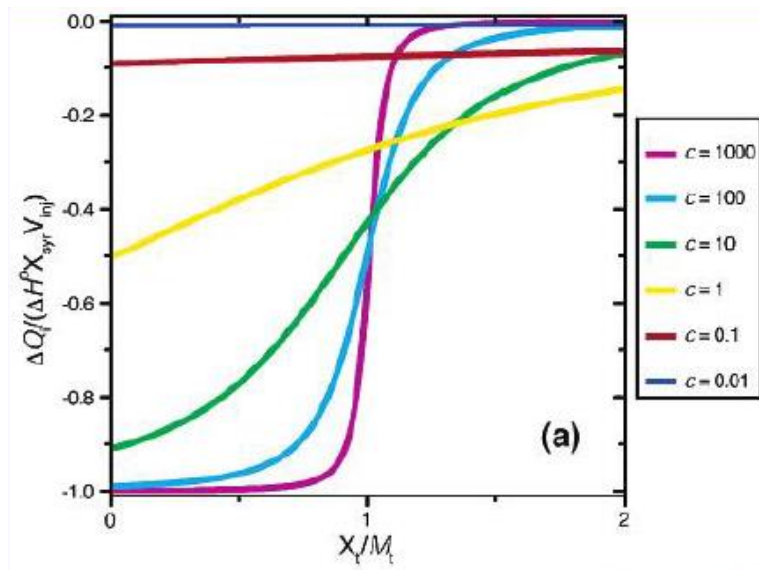
I et typisk ITC-forsøk er proteinet i prøvecella og ligand titreres inn i proteinløsningen under konstant omrøring. En konstant strøm settes på referansecella og dette utgjør baselinja. Denne verdien er strømmen som er nødvendig for å holde temperaturen lik i begge cellene. En eksoterm bindingsreaksjon vil øke temperaturen i prøvecella og det vil gi et fall i strømmen og baselinja. Motsatt vil en endoterm bindingsreaksjon senke temperaturen i prøvecella og dette vil gi en økning i baselinja og i strømmen (Pierce et al. 1999). Reaksjonsentalpien for hver injeksjon beregnes ved integrasjon av avviket fra baselinja (Perozzo et al. 2004). I tillegg til energien fra bindingsreaksjonen vil noe av signalet være et resultat av fortynningen av ligand og protein. Dette kan korrigeres ved å gjøre flere injeksjoner etter at enzymet er mettet og trekke fra bakgrunnsvarmen disse injeksjonene gir (Leavitt & Freire 2001; Pierce et al. 1999).

I starten av et ITC-forsøk er alle bindingssetene på proteinet i prøvecella ledige. Avhengig av bindingsaffiniteten vil all tilsatt ligand i hver injeksjon, eller en stor andel, binde til proteinet. Etterhvert mettes enzymet, og andel ligand som binder til protein etter hver injeksjon vil minke utover i forsøket. Konsekvensen er gradvis lavere varme gjennom titreringen og dette gir opphav til en bindingsisoterm (Pierce et al. 1999). Denne bindingsisotermen kan benyttes til å bestemme K_a , ΔH og støkiometrien n for bindingsreaksjonen, se Figur 1.6.1.

Formen på bindingsisotermen er relatert til c -verdien for systemet, se Figur 1.6.2. c - verdien er definert i likning 1.6.1.

$$c = K_a \times [P] \quad (1.6.1)$$

Generelt anbefales det at ITC-forsøk gjennomføres slik at c -verdien er mellom 10 og 1000. Dette sikrer nok punkter rundt ekvivalenspunktet, se Figur 1.6.2. Turnbull og Daranas (2003) har derimot argumentert for at ITC også kan benyttes til å studere lavaffinitetssystemer med lav c -verdi, forutsatt at det tas noen forbehold. Det er viktig at konsentrasjonen til ligand og enzym er nøyaktige. Overtitrering av proteinet der flere ekvivalenter med ligand tilsettes i hver injeksjon sikrer at graden av metning øker for hver injeksjon. Dette øker signal til støy ratioen. Det er også nødvendig å fiksere støkiometrien n før tilpasning av resultatene. Det er verdt å bemerke at arbeid med systemer der $c < 10$ gir større usikkerhet i ΔH .



Figur 1.6.2 Formen til en bindingsisoterm varierer med c -verdien (Turnbull & Daranas 2003).

1.7 Mål med oppgaven

TfCel5A, *TfCel9A* og *TfCel48A* er tre av de ekstracellulære cellulaserne fra jordbakterien *T.fusca*. *TfCel5A* og *TfCel9A* er endoaktive, mens *TfCel48A* er eksoaktiv. De tre cellulaserne har også ulik grad av prosessivitet, direksjonalitet og topologi i det aktive setet. I denne oppgaven har termodynamiske signaturer for substratbinding til inaktive mutanter av disse enzymene blitt bestemt. Dette ble gjort for å se om disse signaturene kan knyttes opp mot enzymenes ulike egenskaper og funksjon.

I tillegg ble det utført hydrolyse av cello-oligosakkarider med aktive villtyper av enzymene. Dette ble gjort for å undersøke hvordan substratet er posisjonert i det aktive setet før hydrolyse. Hydrolyse av (Glc)₅ og (Glc)₆ ble utført i H₂¹⁸O for å skille mellom binding i positive og negative sub seter.

Payne et al. (2013) har foreslått en sammenheng mellom prosessivitet og bindingsfrienergi. En eventuell kvalitativ sammenheng kan undersøkes ved å sammenligne de eksperimentelt bestemte verdiene for endring i bindingsfrienergi fra denne oppgaven med tidligere publiserte prosessivitetsverdier for de tre cellulaserne.

2 Materialer

2.1 Laboratorieutstyr

Laboratorieutstyr	Spesifikasjon	Leverandør
Autoklavteip	12 mm	VWR
	18 mm	
Automatpipetter	Finnpipetter	Thermo Scientific
Avtrekkskap	Mc6	Waldner
Blåkorkflasker	1000 mL	VWR
	500 mL	
	250mL	
	100 mL	
Blåkorkrør	Cellstar® tubes	Greiner Bio-One
	15 mL	
	50 mL	
Bordsentrifuge	Sigma 1-14	LABEX
Cryorør	2 mL	Sarstedt
Dialysepølser	SnakeSkin® Pleated Dialysis	Thermo-Scientific
	10000 MWCO	
Dyrkningskolber	0,25 L	Nalgene
	1 L	
	2 L	
Elektroforeseutstyr	Gelkjøringskammer	VWR
	Gelspenningskilde	
Eppendorfrør	1,5 mL – Axygen	VWR
	5 mL	Sigma Aldrich
Filter	Steritopp 0,22 µm	Millipore
Fryser (-20 °C)		Bosch
		Whirlpool
Fryser (-80 °C)	Ultra-Low	SANYO
Gelfoto	Gel Doc EZ Imager	Bio-Rad
Glassutstyr		Schott-Duran/VWR
Harbingersystem	LEX 48 bioreactor	Harbinger
HiTrap Phenyl HP, 5 mL		GE Healthcare

HiTrap Q HP, 5mL		GE Healthcare
HiLoad™16/60		GE Healthcare
Superdex™ 75 Pregrade		
Inkubator		Termaks
Inoculation loops	1 µL	Sarstedt
Isbitmaskin	KF 145	PORKKA
ITC-kalorimeter	VP-ITC Microcalorimeter	MicroCal
Kjøleskap (4 °C)		Whirlpool
Kyvette	1 x 1 cm	VWR
LP-kromatografisystem	BioLogic LP system BioFrac Fraction Collector	Bio-Rad
Magnetrorer		VWR
MALDI target	MTP 384 Ground Steel	Bruker
Mikrobølgeovn		Logik
Mikrovekt	Sartorius CP-2P	VWR
Oppkonsentreringsrør	Amicon Ultra 0,5 10K Macrosep 10 K Macrosep 30 K	Merck Millipore PALL corporation PALL corporation
Parafilm	5 cm	VWR
Pasteurpipetter	Plast, 5 mL	VWR
PCR-maskin	PCR Doppio SimpliAmp	VWR ThermoFischer Scientific
PCR- rør	0,2 mL	VWR
Petriskåler	9 cm	Heger
pH-meter	FiveEasy Plus	Mettler Toledo Sentron
Pipettespisser	«Next Generation Tip Refill»	VWR
Risteinkubator	Multitron HT	Infors
Sentrifuger	Avanti™ J-25 Sentrifuge- 5430R	Beckman Eppendorf
Sentrifugerotorer	JA10 JA14 5430- R	Beckman Beckman Eppendorf

Sentrifugerør	500 mL	Nalgene
	250 mL	
	50 mL	
Sonikator	Vibracell	Sonics
Spektrofotometer	AG Biophotometer	Eppendorf
	WPA	Biochrom
Sprøytefilter	0,20 µM	Sarsted
Sprøyter	1 mL	BD-plastipak
	2 mL	
	10 mL	
	20mL	
	30mL	
	50mL	
Sterilskap	Av-100	TelStar
Termomiksere	Comfort	Eppendorf
	C	Eppendorf
Ultralydbad	Transsonic 460/H	Elma
Uvetter		Eppendorf
Vannbad	Eco Temp TW12	Julabo
Veieskip		VWR
Vekter	Sartorius basic	Sartorius
Vortex	Vortex-2 Genie	Scientific Industries
	MS 3 basic	IKA
Qubit fluorometer		Life Technologies

2.2 Programvare til analyse

Programvare	Bruksområde	Leverandør
CLC DNA Workbench	Sekvensering	CLCbio
ExPASy ProtParam tool	Beregninger av pI, MW, ϵ	ExPASy
Flex Analysis	MALDI	Bruker
Flex Control	MALDI	Bruker
ImageLab	Gelvisualisering	BioRad
LP Data View	LP-kromatografisystem	BioRad
ORIGIN 7.0	ITC	MicroCal
QuickChange Primer Design Tool	Primerdesign	AgilentTechnologies

2.3 Kjemikalier

Kjemikalie		Leverandør
^{18}O -merket vann	H_2^{18}O	Larodan fine chemicals
2,5- dihydroksybenzoyre (DHB)	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$	Bruker Daltonics
3 – (N-morfolin) propansvovelsyre (MOPS) SDS buffer (20x)		Life Technologies
Acetonitrile	CH_3CN	Sigma Aldrich
Agar - agar		MerckMillipore
Agarose		Lonza
Ammoniakk 25% løsning	NH_3	FERAK
Ammoniumacetat	$(\text{NH}_4)\text{CH}_3\text{COO}$	VWR
Ammoniumsulfat	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sigma-Aldrich
Ampicillin- Natriumsalt	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{NaO}_4\text{S}$	Sigma-Aldrich
Antifoam		Sigma-Aldrich
Coomassie® Brilliant Blue R-250		Bio-Rad
Protease inhibitor cocktail tablets		Sigma-Aldrich
Destillert vann, dH ₂ O (Milli-Q kvalitet)		
Dibasisk kaliumfosfat	K_2HPO_4	Sigma-Aldrich
Eddiksyre	CH_3COOH	Sigma-Aldrich
Etanol	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	VWR

Etylenediamintetraeddiksyre (EDTA)	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	Sigma-Aldrich
Gjærekstrakt		MerckMillipore
Glyserol	$C_3H_5O_3$	VWR
Hydrogenklorid	HCl	Sigma-Aldrich
Isopropanol	C_3H_8O	VWR
Isopropyl β-D-1-tiogalaktopyranosid (IPTG)		Sigma-Aldrich
Kaliumdihydrogenfosfat	KH_2PO_4	Sigma-Aldrich
Metanol	CH_3OH	Sigma-Aldrich
Natriumhydroksid	NaOH	VWR
Natriumklorid	NaCl	Sigma-Aldrich
NuPAGE® 10 % Bis-Tris Gel 1,0mmx 10 brønner		Life Technologies
NuPAGE® Prøvebuffer (4x)		Life Technologies
NuPAGE® Reduserende agent (10x)		Life Technologies
Streptomycinsulfat	$C_{21}H_{39}N_7O_{12} \cdot 1.5 H_2SO_4$	Sigma-Aldrich
Trizma base	$C_4H_{11}NO_3$	Sigma-Aldrich
Trypton		MerckMillipore

2.4 Enzymer/proteiner, substrater og bakteriestammer

2.4.1 Enzymer/proteiner

Enzym/protein	Spesifikasjon	Leverandør
Cellulaser	<i>Tf</i> Cel5A-WT	Selvlaget
	<i>Tf</i> Cel5A-E356A	
	<i>Tf</i> Cel9A-WT	
	<i>Tf</i> Cel9A-E425A	
	<i>Tf</i> Cel48A-WT	
	<i>Tf</i> Cel48A-E359A	
Lysozym		Sigma-Aldrich
BenchMark™ Protein Ladder		Life Technologies

2.4.2 Substrater

Substrat	Spesifikasjon	Leverandør
1,4-β-D-gluko-oligosakkarider	(Glc) ₄ -Cellotetraose	Megazyme
	(Glc) ₅ -Cellopentaose	
	(Glc) ₆ -Celloheksaose	

2.4.3 Bakteriestammer

Bakteriestamme	Spesifikasjon	Leverandør
<i>Escherichia coli</i>	Kjemisk kompetente	Life Technologies
One Shot® BL21 Star™ (DE3)	celler til proteinekspresjon	

2.5 Medier og løsninger

2.5.1 Ferdige medier

Medium	Innhold	Leverandør
SOC medium	2 % tryptone	Life Technologies
	0,5 % gjærekstrakt	
	10 mM NaCl	
	2,5 mM KCl	
	10 mM MgCl ₂	
	10 mM MgSO ₄	
	20 mM glukose	

2.5.2 Selvlagde medier

Medium:	Innhold
LB medium	10 g trypton
	5 g gjærekstrakt
	10 g NaCl
	Løses i dH ₂ O til et sluttvolum på 1 L.
	pH justeres til 7-7,5 med 6M NaOH.
	Autoklaveres.

LB medium med agaragar

10 g trypton
 5 g gjærekstrakt
 10 g NaCl
 15 g agaragar

Løses i dH₂O til et sluttvolum på 1 L.
 pH justeres til 7-7,5 med 6M NaOH.
 Autoklaveres.
 Fordeles i petriskåler etter autoklaving.

TB medium

12 g trypton
 24 g gjærekstrakt
 5 g glycerol

Løses i dH₂O til et totalvolum på 900 mL.
 Autoklaveres
 Før bruk tilsettes 100 mL saltløsning, pH 7,6.

2.5.3 Selvlagde løsninger og buffere

Buffer/løsning	Innhold
Saltløsning pH 7,6	23,13 g KH ₂ PO ₄ (0,17 M) 125,41 g K ₂ HPO ₄ (0,72 M) dH ₂ O til et totalvolum på 1 L Autoklaveres
1 M Tris-HCl pH 8,0	121,14 g Trizma Base løses i ca 800 mL dH ₂ O pH justeres til 8,0 dH ₂ O til et totalvolum på 1 L Autoklaveres
Lysisbuffer	50 mM Tris-HCl pH 8,0 0,3 mg/mL lysozym 1 mM EDTA 1 protease inhibitor cocktail tablet (/60mL)
Ammoniakk 2,5 %	25 % NH ₃ fortynnes i dH ₂ O
10 % Streptomycinsulfat (w/v)	1 g streptomycinsulfat løses i 10 mL dH ₂ O pH justeres til 7,0 med 2,5 % NH ₃
Buffer A Q HP/Buffer B Phenyl HP	50 mM Tris-HCl pH 8,0

Buffer B Q HP	50 mM Tris-HCl pH 8,0 1 M NaCl
Buffer A Phenyl HP	50 mM Tris-HCl pH 8,0 1 M (NH ₄) ₂ SO ₄
Buffer HiLoad Superdex	20 mM Tris-HCl pH 8,0 0,2 M NaCl
Arbeidsløsning SDS-PAGE	5 mL NuPAGE® Prøvebuffer (4X) 2 mL NuPAGE® Reduserende agent (10x) 3 mL dH ₂ O
Fargeløsning SDS-PAGE	0,5 g Comassie blue 200 mL Etanol 50 mL Eddiksyre Fortynnes til 0,5 L i dH ₂ O
Avfargingsløsning SDS-PAGE	100 mL Etanol 75 mL Eddiksyre Fortynnes til 1 L i dH ₂ O
Running buffer SDS-PAGE (1x MOPS)	20x MOPS fortynnes i dH ₂ O
0,1 M Kaliumfosfatbuffer (KPi) pH 6,0	90 mL 1 M KH ₂ PO ₄ Justerer til pH 6,0 med 1 M K ₂ HPO ₄ Fortynnes til 1 L i dH ₂ O.
ITC-buffer	20 mM Kaliumfosfatbuffer pH 6,0
3 M (NH₄)₂SO₄	99,11 g NH ₄ SO ₄ løses i 250 mL dH ₂ O
2 M Ammoniumacetat pH 6,1	154 mg NH ₄ Ac løses i 1 mL H ₂ O pH justeres til 6,1 med ammoniak eller eddiksyre
Buffer initiell hydrolyse av (Glc)_x	20 mM ammoniumacetat pH 6,1 i H ₂ O eller H ₂ ¹⁸ O

2.6 Kit

Navn	Innhold	Leverandør
E.Z.N.A.® Plasmid	Løsning I	OMEGA bio-tek
Mini Kit I, V(capped)	RNase A	
Spin		

	Løsning II	
	Løsning III	
	Ekvilibreringsbuffer	
	HBC buffer	
	DNA vaskebuffer	
	Elueringsbuffer	
	HiBind® DNA Minikolonner	
	2 mL oppsamlingsrør	
Pellet Paint® Co-Precipitant	Pellet Paint® Co-Precipitant 3 M Natriumacetat, pH 5.2	Novagen
Qubit® dsDNA BR Assay Kits	Qubit® dsDNA BR Reagent (Komponent A) Qubit® dsDNA BR Buffer (Komponent B)	Life Technologies
QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	<i>PfuUltra</i> High-Fidelity DNA polymerase (2.5 U/ µl) 10× reaksjonsbuffer <i>DpnI</i> restriksjonsenzym (10 U/µl) dNTP mix	Agilent Technologies

2.7 Plasmid og primere

2.7.1 Plasmid

Bestilt plasmid/konstrukt	Leverandør
Cel5A/Tfu_0901-wt_pET-22b(+)	GenScript
Cel9A/Tfu_2176-wt_pET-22b(+)	GenScript
Cel48A E359A_pET-22b(+)	GenScript

2.7.2 Primere til seterettet mutagenese

Protein	Primer	Sekvens	Leverandør
Cel5A	Cel5A-E356A-FP ^a	5'-CCG GTG TTT GTG ACC GCA TTT GGC ACC GAA ACC-3'	Life Technologies

Cel5A	Cel5A-E356A-BP ^a	5'-GGT TTC GGT GCC AAA TGC GGT CAC AAA CAC CGG-3'	Life Technologies
Cel9A	Cel9A-E425A-FP ^a	5'- GGA TTA TGT GGC GAA CGC AGT GGC GAC CGA TTA TA-3'	Life Technologies
Cel9A	Cel9A-E425A-BP ^a	5'- TAT AAT CGG TCG CCA CTG CGT TCG CCA CAT AAT CC-3'	Life Technologies
Cel48A	Cel48A_A359E_fw ^b	5'-GAT AAT AGC TAA ACG CTT CGC TGG TGG TCT GAT GG-3'	Life Technologies
Cel48A	Cel48A_A359E_rev ^b	5'-CCA TCA GAC CAC CAG CGA AGC GTT TAG CTA TTA TC-3'	Life Technologies

^a Designet selv ^b Designet av Postdoc Anne Grethe Hamre

2.7.3 Primere til sekvenseringsreaksjoner

Protein	Primer	Sekvens	Leverandør
<i>Tf</i>Cel5A-E356A	T7	5' -GCT AGT TAT TGC TCA GCG G- 3'	Life
<i>Tf</i>Cel9A-E425A	promotor		Technologies
<i>Tf</i>Cel48A-WT			
<i>Tf</i>Cel5A-E356A	T7	5' -TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG- 3'	Life
<i>Tf</i>Cel9A-E425A	terminator		Technologies
<i>Tf</i>Cel48A-WT			
<i>Tf</i>Cel9A-E425A	rev1741 ^a	5' -GAA AGC TCC AAT CGT TGC TC- 3'	Life Technologies
<i>Tf</i>Cel9A-E425A	fw 633 ^a	5' -GAG CGC CTA TCA GGA TGA AC-3'	Life Technologies
<i>Tf</i>Cel48A-WT	rev1411 ^a	5'-AAA AGC CAA AGC CAT ACA CG- 3'	Life Technologies
<i>Tf</i>Cel48A-WT	fw775 ^a	5' - CTG CAG TTT ACC AGC AGC AA- 3'	Life Technologies

^a Designet av Postdoc Anne Grethe Hamre

3 Metode

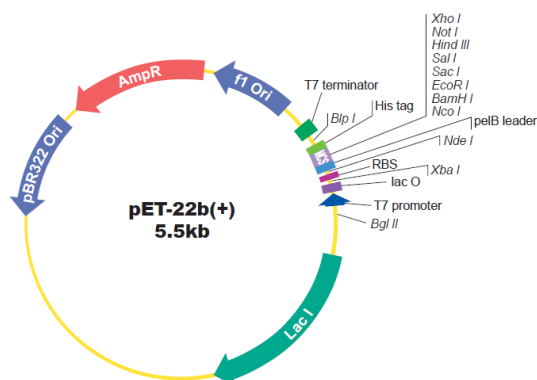
3.1 Kloning

Cellulasene *TfCel5A*, *TfCel9A* og *TfCel48A* hadde ikke tidligere blitt uttrykt og rensset ved Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM), NMBU. Første steg i denne oppgaven var derfor å transformere konstrukter med gener som koder for disse enzymene inn i en bakteriestamme egnet for overekspresjon av proteiner.

3.1.1 Transformering av cellulasekonstrukter

Gensekvensene til *TfCel5A*, *TfCel9A* og *TfCel48A* ble hentet fra åpne databaser på internett, og ett konstrukt for hver cellulase ble bestilt fra GenScript (<http://www.genscript.com/>). I konstruktene var genene til de ulike cellulasete satt inn i det multiple kloningsetet, mellom *NdeI* og *HindIII*, i pET-22b(+) vektoren. Gensekvensene for *TfCel5A*, *TfCel9A* og *TfCel48A* ble først kodonoptimalisert for *E. coli* samt at signalpeptidene ble fjernet. Dette ble gjort for å øke sannsynligheten for cytoplasmatisk uttrykk av cellulasete. Genene i konstruktene med *TfCel5A* og *TfCel9A* kodet for villtypen av enzymet (*TfCel5A*-WT og *TfCel9A*-WT), mens genet i konstruktet med *TfCel48A* kodet for en inaktiv mutant der den katalytiske syra Glu³⁵⁹ var endret til Ala³⁵⁹. Dette ga mutanten *TfCel48A*-E359A.

Figur 3.1.1 viser vektorkartet til pET-22b(+) vektoren. Denne vektoren har en lac operator (lac O) sekvens rett nedstrøms for T7 promotoren (T7 lac promotor), samt genet for lac repressoren *lacI*. Disse genene er viktige for egenskaper knyttet til kontroll av proteinekspresjon, se videre beskrivelse i delkapittel 3.3. AmpR gir ampicillinresistens og brukes som seleksjonsmarkør (EMDBiosciences 2005).



Figur 3.1.1 Vektorkart for pET-22b(+) (GenScript 2016).

Konstruktene ble mottatt som tørrstoff og ble løst i dH₂O før de ble transformert inn i celler egnet for proteinekspressjon. Det ble brukt One Shot® BL21 Star™ (DE3) kjemisk kompetente *E. coli* celler fra Life Technologies. Disse cellene mangler 2 proteaser, *Lon* og *OmpT* som reduserer nedbrytningen av heterogene proteiner i cella. I tillegg har de en mutasjon i RNaseE genet me131 som gir redusert nedbrytning av mRNA (LifeTechnologies 2010).

Materialer:

- One Shot® BL21 Star™ (DE3) kjemisk kompetente *E. coli* celler
- Plasmid fra Genscript:
 - Cel5A/Tfu_0901-wt_pET-22b(+)
 - Cel9A/Tfu_2176-wt_pET-22b(+)
 - Cel48A E359A_pET-22b(+)
- LB-medium
- LB-agarplater med ampicillin (100µg/mL)

Metode:

Plasmidene ble løst i 50 µL sterilfiltrert dH₂O til en konsentrasjon på 80 ng/µL. One Shot® BL21 Star™ (DE3) kompetente celler ble tint på is. Til 12,5 µL celler ble det tilsatt 1 µL plasmid. Cellene ble inkubert på is i 30 minutter. Deretter ble reaksjonene varmebehandlet ved 42 °C i 30 sekunder, før de ble satt tilbake på is i 2 minutter. Videre ble det tilsatt 300 µL forvarmet LB-medium (42 °C) til hver reaksjon, og rørene ble inkubert i 1 time ved 37 °C og 200 rpm. Etter endt inkubasjon ble 150 µL cellekultur platet ut på LB-agarplater med 100 µg/mL ampicillin. Platene ble inkubert ved 37 °C over natt.

3.1.2 Oppdyrking av transformanter

Materialer:

- LB- agarplater med transformanter
- LB-medium
- Ampicillin (10 mg/mL)

Metode:

I sterile kulturrør ble 2 mL LB-medie tilsatt 20 μ L 10 mg/mL ampicillin. Enkeltkolonier ble plukket fra platene og inokulert i mediet. Cellekulturene ble inkubert over natt ved 37 °C og 200 rpm.

3.1.3 Tillaging av frysestocker

Det ble laget frysestocker av bakteriekulturene (j.f.r avsnitt 3.1.2) for lagring ved -80 °C.

Materialer:

- Cellekultur
- Glyserol (60 %)

Metode:

750 μ L cellekultur og 750 μ L 60 % glyserol ble blandet godt sammen i et cryorør.

Frysestockene ble oppbevart ved -80 °C.

3.2 Seterettet mutagenese

Målet med seterettet mutagenese er å innføre en eller flere punktmutasjoner i DNA slik at aminosyresekvensen til proteinet endres. Dermed kan rollen til ulike residuer i et enzym studeres. I denne oppgaven ble seterettet mutagenese benyttet for å endre nukleofilen Glu³⁵⁶ i *TfCel5A* til Ala³⁵⁶ (*TfCel5A-E356A*) og den katalytiske syra Glu⁴²⁵ i *TfCel9A* til Ala⁴²⁵ (*TfCel9A-E425A*). Dette gir inaktive enzymer som kan benyttes i bindingsstudier mot (Glc)₆ ved hjelp av ITC. I tillegg ble Ala³⁵⁹ i *TfCel48A-E359A* endret tilbake til den katalytiske syra Glu³⁵⁹. Dette tilsvarer villtype og enzymet ble benyttet til initiell hydrolyse av cello-oligosakkarider ((Glc)_x).

3.2.1 Primerdesign

Seterettet mutagenese krever to primere, en forward primer og en revers primer, for å innføre mutasjoner i plasmid DNAet. Primerene må være komplementære til den samme sekvensen på hver sin tråd av templat DNAet med unntak av der mutasjonen skal innføres. Ved design av primere til mutagenese er det flere faktorer det er viktig å ta hensyn til. Lengden på

primerene bør være 25-45 bp og nukleotiden(e) som skal endres bør sitte så sentrert i primeren som mulig. I tillegg er det viktig at GC-innholdet er mer enn 40 %, og primerene bør også ende med en eller flere G eller C nukleotider. Smeltepunktet for primeren kan beregnes utfra en egen formel og bør være ≥ 78 °C (AgilentTechnologies 2015).

Primerne som ble benyttet i denne oppgaven ble designet med QuickChange Primer Design Tool på Agilent Technologies sin nettside (AgilentTechnologies 2016). En oversikt over disse er vist i avsnitt 2.7.2.

3.2.2 Polymerasekjedereaksjon (PCR) og DpnI behandling

Ved seterettet mutagenese kan PCR benyttes for å syntetisere plasmid med en ønsket mutasjon. PCR er en nyttig teknikk for amplifisering av DNA in vitro og en PCR-reaksjon har tre trinn: Denaturering, hybridisering og forlengelse. I første trinn varmes reaksjonsblandingen opp til 95 °C. Ved denne temperaturen denatureres DNAet, og de to trådene skiller seg fra hverandre. Neste trinn er hybridisering der temperaturen senkes til 55 °C og primerne fester seg til den komplementære sekvensen på DNAet. I siste trinn, forlengelse, økes temperaturen til 68 °C. Dette er optimumstemperaturen for *PfuUltra* DNA polymerase og nytt DNA med den aktuelle mutasjonen syntetiseres. Syklusen gjentas for å oppnå ønsket mengde DNA (AgilentTechnologies 2015; Mathews et al. 2013). Etter PCR-reaksjonen tilsettes *DpnI*, en endonuklease som gjenkjenner og bryter ned hemimetylert og metylert templat plasmid (AgilentTechnologies 2015).

Materialer:

- QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit
- Templat: Plasmid fra GenScript
 - Cel5A/Tfu_0901-wt_pET-22b(+)
 - Cel9A/Tfu_2176-wt_pET-22b(+)
 - Cel48A E359A_pET-22b(+)
- Primere (jfr. avsnitt 2.7.2)

Metode:

Prøvereaksjonen vist i Tabell 3.2.1 ble laget i PCR-rør på is. *PfuUltra* DNA polymerase ble tilsatt rett før PCR-kjøringen ble startet.

Tabell 3.2.1 Prøvereaksjon ved seterettet mutagenese av *TfCel5A-E356A*, *TfCel9A-E425A* og *TfCel48A WT*.

Reagens	Mengde
10x reaksjonsbuffer	5 µL
Templat	1 µL (80 ng)
Forward primer	1,25 µL (125 ng)
Backward primer	1,25 µL (125 ng)
dNTP mix	1 µL
dH ₂ O	40,5 µL
<i>PfuUltra</i> DNA polymerase	1 µL

PCR-programmet som ble brukt er vist i Tabell 3.2.2. Lengden på forlengelsestrinnet bestemmes av størrelsen på templatplasmidet. *Cel5A/Tfu_0901-wt_pET-22b(+)* er totalt 6,8 kb og forlengelsestrinnet ble satt til 7 minutter. For *Cel9A/Tfu_2176-wt_pET-22b(+)* og *Cel48A E359A_pET-22b(+)* ble forlengelsestrinnet satt til henholdsvis 8 minutter (8,0 kb) og 8,5 minutter (8,3 kb).

Tabell 3.2.2 Oversikt over PCR-program brukt i seterettet mutagenese av *TfCel5A-E356A*, *TfCel9A-E425A* og *TfCel48A-WT*.

Handling	Antall repetisjoner	Temperatur	Lengde
Oppvarming	x 1	110 °C	
Initiell denaturering	x 1	95 °C	0,5 min
Denaturering		95 °C	0,5 min
Hybridisering	x 18	55 °C	1 min
Forlengelse		68 °C	7/8/8,5 min
Nedkjøling	x 1	10 °C	

Etter endt PCR-reaksjon ble det tilsatt 1 µL *DpnI* til PCR-produktet. Reaksjonen ble inkubert i 1 time ved 37 °C.

3.2.3 Utfelling av plasmid

Før transformering ble plasmidet felt ut ved hjelp av Pellet Paint® Co-Precipitant Kit fra Novagen. Dette bidrar til å fjerne primere og eventuelle andre urenheter i prøven

(MerckMillipore 2016). I tillegg oppkonsentreres plasmidet ved at det løses i et mindre volum.

Materialer:

- Dpn I behandlet reaksjon (jfr. avsnitt 3.2.2)
- Pellet Paint® Co-Precipitant
- NaAc (3M)
- Etanol (70 %)
- Etanol (96 %)
- Milli-q H₂O

Metode:

DpnI behandlet reaksjon ble overført til et eppendorfrør. Det ble tilsatt 2 µL Pellet Paint® Co-Precipitant og 0,1 volum 3M NaAc. Deretter ble det tilsatt 2 volum 96 % etanol. Løsningen ble vortexet lett og inkubert i romtemperatur i 2 minutter før sentrifugering ved 16100 x g i 5 minutter. Supernatanten ble fjernet, og videre ble det tilsatt 5 volum 70 % etanol. Løsningen ble vortexet lett og igjen sentrifugert i 5 minutter. Supernatanten ble fjernet og det ble tilsatt 5 volum 96 % etanol før ny sentrifugering i 5 minutter. Supernatanten ble fjernet, og røret ble inkubert med åpent lokk i romtemperatur til all etanol var fordampet. Deretter ble pelleten løst i 5 µL dH₂O.

3.2.4 Transformering av mutert plasmid

Det rensede og oppkonsentrerte plasmidet ble transformert inn i One Shot® BL21 StarTM (DE3) kjemisk kompetente *E.coli* celler som er egnet for proteinekspresjon.

Materialer:

- One Shot® BL21 StarTM (DE3) kjemisk kompetente *E.coli* celler
- Plasmid (jfr. avsnitt 3.2.3)
- SOC-medium
- LB-agarplater med ampisillin (100 µg/mL)

Metode:

Et rør med One Shot® BL21 Star™ (DE3) kompetente celler ble tint på is før det ble tilsatt 5 µL plasmid. Videre ble transformasjonen utført som beskrevet i avsnitt 3.1.1 med unntak av at det ble tilsatt 250 µL SOC-medium i stedet for 300 µl LB-medium, og at det ble platet ut 25 µL og 150 µL cellekultur.

3.2.5 Oppdyrking av transformanter og tillaging av frysestocker

Oppdyrking av transformanter og tillaging av frysestocker ble utført som beskrevet i henholdsvis avsnitt 3.1.2 og 3.1.3.

3.2.6 Isolering av plasmid til sekvensering

Isolering av plasmid fra cellekultur ble utført med E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit I. Med dette kitet brukes modifisert alkalisk lysing til å lysere cellene samt separere genomisk DNA fra plasmid DNA. Videre benyttes en HiBind® DNA Mini kolonne for å rense plasmidet i 3 enkle steg: Binding, vasking og eluering (OMEGA bio-tek 2016).

Materialer:

- Cellekultur
- E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit I, V(capped) Spin

1,5 - 4,5 mL cellekultur ble spunnet ned i et eppendorfrør ved 10 000 x g i 1 minutt. Cellepelletten ble resuspendert i 250 µL løsning I/RNase A. Det ble deretter tilsatt 250 µL løsning II, og røret ble vendt opp ned et par ganger. Reaksjonen ble inkubert i 2- 4 minutter for å få et klarere lysat. 350 µL løsning III ble tilsatt, og røret ble umiddelbart vendt opp ned til det ble dannet en hvit utfelling. Løsningen ble sentrifugert i 10 minutter på 13 000 x g. Samtidig ble en HiBind® DNA Mini kolonne ekvilibrert ved å sentrifugere 100 µL ekvilibreringsbuffer i 1 minutt ved 12 300 x g. Den klare supernatanten ble overført til den ekvilibrerte kolonnen og sentrifugert i 1 minutt ved 13 000 x g. Det ble videre tilsatt 500 µL HBC buffer, og kolonnen ble sentrifugert i 1 minutt ved 13 000 x g. I neste steg ble det tilsatt 700 µL DNA vaskebuffer før en ny sentrifugering i 1 minutt ved 13 000 x g. Deretter ble den tomme kolonnen sentrifugert i 2 minutter ved 13 000 x g for å fjerne rester av etanol. Plasmidet ble til slutt eluert i et rent eppendorfrør med 30 µL elueringsbuffer tilsatt kolonnen

og sentrifugering ved 13 000 x g i 1 minutt. For *TfCel9A-E425A* og *TfCel48A-WT* ble elueringsbufferen først varmet til 70 grader. Isolert plasmid ble oppbevart ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.7 Bestemmelse av DNA-konsentrasjon med Qubit

DNA-konsentrasjonen etter plasmidisolering ble målt med Qubit® dsDNA BR Assay Kit og et Qubit® Fluorometer. Denne metoden kan brukes til å bestemme DNA konsentrasjoner fra 100 pg/ μL -1000 ng/ μL (ThermoFisherScientific 2016b).

Materialer:

- Qubit® dsDNA BR Assay Kit
- Isolert plasmid (jfr. avsnitt 3.2.6)

Metode:

Det ble laget en arbeidsløsning med $n \times 1\text{ }\mu\text{L}$ BR-reagent og $n \times 199\text{ }\mu\text{L}$ BR-buffer, der n er antall prøver. I Qubit® assay tubes ble 198 μL bufferløsning blandet med 2 μL isolert plasmid. Prøvene ble vortexet og inkubert i romtemperatur i 2 minutter. DNA-konsentrasjonen ble avlest i et Qubit® fluorometer utfra en tidligere laget standardkurve. Hver prøve ble analysert i 3 paralleller.

3.2.8 Sekvensering

Det isolerte plasmidet ble sendt til sekvensering ved GATC Biotech (Konstanz, Tyskland) for å kontrollere at den ønskede mutasjonen hadde blitt innført i genet og at det ikke hadde oppstått uønskede mutasjoner. Under sekvenseringen blir nukleotidsekvensen funnet. Den ble sammenlignet med kjent villtypesekvens ved hjelp av *CLC DNA Workbench*.

Materialer:

- Isolert plasmid (80-100 ng/ μL) (jfr. avsnitt 3.2.6)
- Sekvenseringsprimere (5 pmol/ μL) (jfr. avsnitt 2.7.3)

Metode:

5 μL av det isolerte plasmidet ble tilsatt 5 μL sekvenseringsprimer i et eppendorfrør. For *TfCel5A-E356A* ble det laget 2 ulike sekvenseringsreaksjoner, mens det for *TfCel9A-E425A*

og TjCel48A-WT ble laget 4 ulike sekvenseringsreaksjoner. Prøvene ble merket og sendt til GATC Biotech for sekvensering.

3.3 Uttrykking av cellulaser

pET-22b(+)-vektoren med gener som kodet for både de aktive og inaktive cellulasete var blitt transformert inn i One Shot® BL21 Star™ (DE3) kjemisk kompetente *E.coli* celler (jfr. avsnitt 3.1.1 og 3.2.4). pET-22b(+) har et T7 basert ekspresjonsystem med en T7 *lac* promotor. Hvis laktose ikke er tilstede er *lac* repressoren *lacI* bundet til *lac* operator sekvensen i T7 *lac* promotoren. Dette hindrer binding av T7 RNA polymerase og dermed transkripsjon av det ønskede genet. One Shot® BL21 Star™ (DE3) kjemisk kompetente *E.coli* celler har et DE3 lysogen der genet for T7 RNA polymerase er under kontroll av en *lacUV5* promotor, og uten laktose hindrer *lacI* også transkripsjon av dette genet. Ved induksjon med IPTG løsner *lacI* fra begge operatorsekvensene og transkripsjon av T7 RNA polymerase begynner. Deretter starter T7 RNA polymerase transkripsjon av det ønskede genet i pET-22b(+)-vektoren (EMDBiosciences 2005; LifeTechnologies 2010; ThermoFisherScientific 2016a).

3.3.1 Induksjonstest

Induksjonstesten utføres for å sjekke om bakteriekulturene gir overuttrykk av det ønskede proteinet ved induksjon med IPTG.

Materialer:

- Frysestock
- LB-medium
- Ampicillin (10 mg/mL)
- IPTG (0,1 M)

Metode:

I sterile kulturrør ble 1 mL LB-medie tilsatt 10 µL 10 mg/mL ampicillin. Celler fra ønsket frysestock ble inokulert i mediet. Cellekulturene ble inkubert over natt ved 37 °C og 200 rpm.

50 µL cellekultur ble inokulert i 1 mL LB-medie med ampicillin (100 µg/mL). Kulturene ble inkubert i 2 timer ved 37 °C og 200 rpm. Deretter ble det tilsatt IPTG til sluttkonsentrasjon 1

mM, før videre inkubering i 4- 5 timer. 200 µL cellekultur ble overført til eppendorfrør og spunnet ned ved 16 100 x g i 1 minutt.

3.3.2 Natriumdodecylsulfat polyakrylamide gelelektroforese (SDS-PAGE) av cellepellet

SDS-PAGE brukes for å separere proteinene i en løsning etter størrelse. Slik kan størrelsen på de tilstedeværende proteinene samt renheten til løsningen undersøkes. Proteinløsningen som skal undersøkes tilsettes natriumdodecylsulfat (SDS) og dithiothreitol (DTT). SDS er en kraftig og negativt ladet detergent som binder til hydrofobe områder i proteinet. Varmebehandling øker hastigheten til denatureringen. DTT er en sterk reduktant og tilsettes for å redusere disulfidbindinger. Etter denne behandlingen er proteinet utfoldet, og proteiner av lik størrelse har lik form og lik ladning fordi de har bundet samme mengde SDS. De negativt ladede molekylene vil vandre mot den positive polen i et elektrisk felt. Nettverket av porer i polyakrylamidgelen gjør at store molekyler vandrer saktere enn små molekyler, og dermed blir proteinene i løsningen separert i klare bånd etter størrelse (Alberts et al. 2015). En størrelsesmarkør gjør det mulig å identifisere proteinene ved hjelp av størrelse. Fargestoffet Comassie brilliant blue binder til proteiner og brukes for å visualisere proteinene på gelen. I dette tilfellet ble resuspendert cellepellet fra induksjonstesten undersøkt for å se om det var overekspresjon av ønsket cellulase.

Materialer:

- SDS-PAGE arbeidsløsning
- Cellepellet (jfr. avsnitt 3.3.1)
- NuPAGE® 10 % Bis-Tris Gel 1,0mm x 10 brønner
- Størrelsesmarkør: BenchMark™ Protein Ladder
- 1 x MOPS buffer
- Fargeløsning SDS-PAGE gelelektroforese
- Avfargingsløsning SDS-PAGE gelelektroforese

Metode:

Hver cellepellet ble resuspendert i 50 µL arbeidsløsning. Prøvene ble inkubert ved 70 °C i 10 minutter for å denaturere proteinene. De ble deretter vortexet og spunnet ned i 10 minutter ved 16 100 x g. En ferdigstøpt NuPAGE® 10 % Bis-Tris Gel ble montert i et

gelelektroforesekammer, og kammeret ble fylt med 1 x MOPS buffer. Det ble applisert 7,5 µL størrelsesmarkør og 20 µL denatureert og sentrifugert prøve. Gelelektroforesekaret ble koblet til strøm, og gelen ble påført 200 V i 50 minutter. Deretter ble gelen farget med SDS-PAGE fargeløsning i mikrobølgeovn i 1 minutt før inkubasjon på ristebrett i 5 minutter. Gelen ble videre avfarget ved å varme gel og avfargingsløsning i mikrobølgeovn i 1 minutt før inkubasjon på ristebrett i 5-10 minutter. Avfargingssteget ble gjentatt til gelen viste klare proteinbånd.

3.3.3 Overekspresjon av cellulaser

De transformantene som viste overuttrykk av det ønskede proteinet i induksjonstesten ble brukt til overekspresjon. Dyrking ble gjort i dyrkningskolber i ristekubator, med unntak av *TjCel5A-WT*, som ble dyrket i et harbingersystem (LEX 48 bioreactor). I harbingersystemet blir cellekulturene inkubert i flasker i vannbad og de tilføres luft gjennom et slangesystem.

Materialer:

- Frysestock
- LB-medium
- TB-medium
- Saltløsning pH 7,6
- Ampicillin (100 mg/mL)
- IPTG (1M)

Metode:

40 mL LB-medium ble tilsatt ampicillin til sluttkonsentrasjon 100 µg/mL i en 250 mL dyrkningskolbe. Løsningene ble inokulert med celler fra ønsket frysetstock. Forkulturene ble inkubert ved 37 °C og 200 rpm over natt.

450 mL TB-medium tilsatt ampicillin til 100 µg/mL og 40 mL saltløsning pH 7,6 ble videre blandet i en 2 L dyrkningskolbe som deretter ble inkubert ved 37 °C i 30 minutter for å oppnå samme temperatur som forkulturen. Etter inkubering ble forkulturen inokulert. Eventuelt ble forkulturen inokulert til en OD₆₀₀ på 0,1. Disse cellekulturene ble inkubert ved 37 °C til OD₆₀₀ var 0,6 - 0,8, før de ble induert med IPTG til en sluttkonsentrasjon på 0,5 mM. Kolbene ble deretter inkubert ved 20 °C og 200 rpm i 16-20 timer.

For *TfCel5A*-WT ble 40 mL forkultur inokulert i 600 mL TB-medium med 40 mL saltløsning pH 7,6 og 100 µg/mL ampicillin i en 1 L flaske. Denne ble inkubert i et Harbingerbad ved 30 °C, og cellekulturen ble induisert med IPTG til en sluttkonsentrasjon lik 0,5 mM ved OD₆₀₀ = 0,73 før videre inkubering ved 30 °C over natt.

I alle tilfeller ble cellene høstet ved 20 minutter sentrifugering ved 8000 rpm og 4 °C.

Cellepelletene ble oppbevart i plastposer ved -20 °C frem til videre opparbeiding.

3.4 Rensing av cellulaser

Ettersom cellulasetene som ble studert i denne oppgaven ikke har blitt uttrykt ved IKBM tidligere, var det nødvendig å utvikle en renseprotokoll for hver enkelt cellulase. Det ble brukt samme protokoll for rensing av villtype og inaktiv mutant.

3.4.1 Tillaging av prøve til proteinrensing

Enzymene i denne oppgaven hadde ikke signalpeptid (se avsnitt 3.1.1) og ble som følge av dette uttrykt i cytoplasma i cellene. Cellene måtte derfor lyses for å frigjøre proteinene, før isolering og rensing av det ønskede enzymet. Lysozym ble tilsatt for å bidra til nedbrytning av peptidoglycan i celleveggen til *E.coli*. Sonikering ble brukt for å senke viskositeten i løsningen, mens DNAet i supernatanten ble felt ut ved tilsetning av streptomycinsulfatløsning.

T.fusca er en filamentøs jordbakterie som vokser ved 55 °C, og *TfCel5A*, *TfCel9A* og *TfCel48A* er som følge av dette relativt termostabile enzymer (Wilson 2004).

Varmebehandling av proteinløsningen ble derfor brukt for å felle ut *E. coli* proteiner og redusere kompleksiteten av løsningen før videre rensing.

Materialer:

- Cellepellett (jfr. avsnitt 3.3.3)
- 50 mM Tris-HCl pH 8,0
- EDTA (0,5 M)
- Proteasehemmer
- Lysozym
- Streptomycinsulfat

Metode:

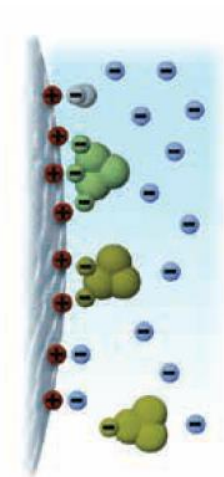
60 mL Tris-HCl pH 8,0 ble tilsatt 20 mg lysozyme, 1 tablett proteasehemmer og 120 μ L 0,5 M EDTA. Frossen cellepellet fra dyrking ble resuspendert i bufferen ved hjelp av magnetrøring. 60- 120 mL buffer ble brukt til å løse pellet fra 0,5 L vekstmedium.

Cellesuspensjonen ble overført til 50 mL sentrifugerør som ble inkubert ved 30 °C i 1 time. Videre ble løsningene satt på is og sonikert i 4 minutter hver (5 sekunder på/av) med en amplitude lik 33 %. Etter sonikering ble løsningene sentrifugert i 30 minutter ved 7197 x g og 4 °C. Supernatanten ble videre overført til en målesylinder. Volumet (= x) ble avlest og det ble laget en x/10 10 % (w/v) streptomycinsulfatløsning. pH i denne løsningen ble justert til 7 med 2,5 % NH₃. Streptomycinsulfatløsningen ble tilsatt dråpevis til supernatanten over en periode på 5 minutter. Prøven ble ytterligere inkubert i 10 minutter under konstant omrøring. Prøvene ble deretter sentrifugert i 20 minutter ved 7197 x g og 4 °C. Supernatanten ble inkubert ved 50 °C i 1 time før sentrifugering ved 7197 x g og 4 °C i 10 minutter. Supernatanten ble oppbevart ved 4 °C før kromatografi.

Det ble gjort SDS-PAGE (se avsnitt 3.4.3) av prøver før og etter varmebehandling for alle enzymer, inkludert mutanter, for å kontrollere at ikke det ønskede enzymet felte ut ved varmebehandlingen.

3.4.2 Ionebytterkromatografi med en sterk anionbytter

I første rensessteg ble det benyttet en high performance sepharose kolonne fra GE Healthcare (HiTrap Q HP) med kolonnevolum 5 mL. Dette er en sterk anionbytter med kvartære ammoniumgrupper. En sterk anionbytter forblir positivt ladet over et stort pH-område. Negativt ladde proteiner vil binde til de positive gruppene på kolonnematerialet, og kan elueres ved å øke konsentrasjonen av salt eller eventuelt ved å endre pH i bufferen (GEHealthcare 2016). I dette tilfellet ble det brukt en gradient med NaCl. Prinsippet for separasjon er vist i Figur 3.4.1.



Figur 3.4.1 Separasjon av proteiner med ulik nettoladning ved hjelp av en anionbytter (GEHealthcare 2006).

Ved bruk av anionbytter er det viktig at pH i bufferen er over proteinets isoelektriske punkt (pI) slik at proteinets nettoladning er negativ. pI for de ulike cellulasetype ble beregnet med ExPASy ProtParam Tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger et al. 2005). Oversikt over beregnede pI for de ulike enzymene er vist i Tabell 3.4.1.

Tabell 3.4.1 Teoretisk pI for *TfCel5A-WT*, *TfCel5A-E356A*, *TfCel9A-WT*, *TfCel9A-E425A*, *TfCel48A-WT* og *TfCel48A-E359A*.

Cellulase	pI
<i>TfCel5A-WT</i>	5,00
<i>TfCel5A-E356A</i>	5,05
<i>TfCel9A-WT</i>	4,44
<i>TfCel9A-E425A</i>	4,45
<i>TfCel48A-WT</i>	4,31
<i>TfCel48A-E359A</i>	4,31

Materialer:

- HiTrap Q HP, kolonnevolum 5 ml
- Buffer A: 50 mM Tris-HCl pH 8,0
- Buffer B: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1M NaCl
- 20 % EtOH

Metode:

Kolonnen ble påsatt bufferne med en hastighet lik 4 mL/min gjennom hele rensingen. Kolonnen ble først vasket med 20 % EtOH før buffer A ble påsatt til baselinja var stabil. Deretter ble kolonnen vasket med 100 % buffer B for å fjerne eventuelle urenheter. Når baselinja igjen var stabil ble kolonnen ekvibrert med buffer A.

Sterilfiltrert proteinløsning fra prøveopparbeidelsen (jfr. avsnitt 3.4.1) ble deretter applisert. Det ble påsatt 15-20 mL pr kjøring for å unngå overbelastning av kolonnen. Deretter ble kolonnen vasket med buffer A til baselinja var stabil. Videre ble proteinet eluert med en lineær gradient fra 0-60 % buffer B over 20 kolonnevolum (100 mL). Fra starten av gradienten ble det samlet fraksjoner på 4 mL.

For *TfCel5A*-WT og *TfCel5A*-E356A ble det benyttet en gradient med 0-40 % B over 20 kolonnevolum. For *TfCel5A*-WT ble 2 kolonner satt sammen. Gradienten ble kjørt over 20 kolonnevolum (200 mL), og det ble samlet 6 mL/fraksjon.

Etter at gradienten var fullført ble kolonnen vasket med 100 % buffer B til baselinja igjen var stabil og deretter med 20 % EtOH.

3.4.3 SDS-PAGE

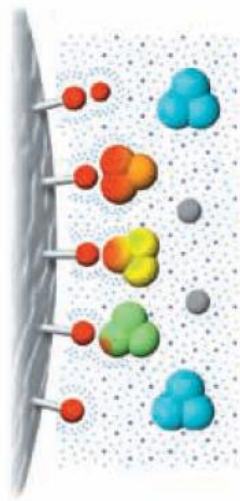
SDS-PAGE ble benyttet for å kontrollere hvilke fraksjoner fra ionebytterkromatografi som inneholdt ønsket enzym, samt grad av renhet. Den ble utført som beskrevet i avsnitt 3.3.2 med unntak av hvordan prøvene ble tillaget. 10 µL proteinløsning ble tilsatt 10 µL arbeidsløsning. Prøvene ble varmebehandlet 10 minutter ved 70 °C. 20 µL prøve ble applisert i gelbrønnen.

De fraksjonene som ga et sterkt bånd på gelen ved riktig størrelse ble slått sammen for videre rensing.

3.4.4 Hydrofob interaksjonskromatografi (HIC)

Fraksjonen som inneholdt protein med riktig størrelse ble videre rensert med en annen high performance sepharose kolonne fra GE healthcare (HiTrap Phenyl HP). Denne har også et kolonnevolum lik 5 ml. Dette er en hydrofob interaksjonskolonne med fenylgrupper bundet til kolonnematerialet. Startbufferen har en høy saltkonsentrasjon noe som øker interaksjonene mellom hydrofobe grupper på enzymet og kolonnematerialet. Ved å gradvis senke

saltkonsentrasjonen i systemet skilles proteiner med ulik hydrofobisitet fra hverandre, og de mest hydrofobe proteinene eluerer til slutt, se illustrasjon i Figur 3.4.2 (GEHealthcare 2006).



Figur 3.4.2 Separasjon av proteiner med ulik hydrofobisitet (illustrert med rød farge) i en hydrofob interaksjonskolonne (GEHealthcare 2006).

Materialer:

- HiTrap Phenyl HP, kolonnevolum 5 ml
- Buffer A: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Buffer B: 50 mM Tris-HCl pH 8,0
- 20 % EtOH
- dH_2O
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3M)
- Fraksjoner fra ionebytterkromatografi (jfr. avsnitt 3.4.2)

Metode:

Kolonnen ble påsatt bufferne med en hastighet lik 4 mL/min gjennom hele rensingen.

Kolonnen ble først vasket med 20 % EtOH og deretter dH_2O til baselinja var stabil. Buffer A ble påsatt til baselinja var stabil, og kolonnen ble så vasket med 100 % buffer B for å fjerne eventuelle urenheter. Når baselinja igjen var stabil ble kolonnen ekvilibrert med buffer A.

Fraksjonene fra ionebytterkromatografi ble tilsatt 3M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dråpevis til en sluttkonsentrasjon på 1 M under konstant omrøring. Omrøring fortsatte i 20 minutter etter at

all $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ var tilsatt. Deretter ble prøven sterilfiltrert før applisering på HiTrap Phenyl HP. For å oppnå best mulig separasjon ble ulike gradienter benyttet for de 3 enzymene.

TfCel48A enzymene ble eluert med 0-70 % buffer B over 10 kolonnevolum (50 mL), 70-100 % buffer B over 15 kolonnevolum og til slutt 100 % buffer B over 5 kolonnevolum. *TfCel5A* enzymene ble eluert med 0-75 % B over 10 kolonnevolum, 75- 100 % B over 15 kolonnevolum og til slutt 100 % buffer B over 5 kolonnevolum. *TfCel9A* enzymene ble eluert med 0-85 % B over 4 kolonnevolum, 85-100 % B over 20 kolonnevolum og deretter 100 % buffer B over 4 kolonnevolum. Det ble i alle tilfeller samlet fraksjoner på 4 mL fra starten av gradienten.

Renheten til aktuelle fraksjoner ble sjekket med SDS-PAGE (jfr. avsnitt 3.4.3). Dersom renheten til proteinet ikke var høy nok ble løsningen oppkonsentrert, og gelfiltrering ble benyttet som et tredje rensetrinn (jfr. avsnitt 3.4.5 og 3.4.6). Rene fraksjoner ble oppkonsentrert og det ble utført bufferbytte ved dialyse på inaktive mutanter til ITC (jfr. avsnitt 3.4.5 og 3.4.7).

3.4.5 Oppkonsentrering

Macrosep® Advance Centrifugal Devices fra PALL Corporation ble benyttet for å oppkonsentrere proteinløsningen etter rensing. Dette øker konsentrasjonen av det ønskede proteinet og bidrar til å fjerne salter og andre urenheter med lav molekylvekt.

Sentrifugerørene har et filter som kan variere i porestørrelse.

Materialer:

- Macrosep® Advance Centrifugal Devices 30K/10K
- Proteinløsning (jfr. 3.4.4)

Metode:

Proteinløsning fra rensing ble overført til et sentrifugefilter med ønsket porestørrelse. Rørene ble sentrifugert ved 4300 x g og 4 °C til ønsket volum (1-5 mL) var oppnådd.

3.4.6 Gelfiltrering - size exclusion chromatography (SEC)

Dersom proteinet ikke var rent etter HIC og oppkonsentrering ble gelfiltrering benyttet som et tredje rensetrinn. Gelfiltrering separerer proteinene i en løsning etter størrelse. Små proteiner

og molekyler vil diffundere lenger inn i porene i kolonnematerialet enn de store. Dette fører til at det skjer en separasjon der proteinene med størst molekylvekt eluerer først (GEHealthcare 2014). Prinsippet for separasjonen er vist i Figur 3.4.3.



Figur 3.4.3 Separasjon av molekyler med ulik størrelse i en SEC-kolonne (GEHealthcare 2006).

Materialer:

- HiLoad 16/600 Superdex 75 pg
- Buffer: 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,2 M NaCl
- Oppkonsentrert og sterilfiltrert proteinløsning (maks 2 mL)
- 20 % EtOH

Metode:

Kolonnen ble ekvilibrert med minimum 1 kolonnevolum (120 mL) buffer med en hastighet lik 1 mL/min. Når baselinja var stabil ble oppkonsentrert proteinløsning applisert med en hastighet tilnærmet lik 1 ml/min ved hjelp av en sprøyte. Proteinet ble eluert med 1 kolonnevolum buffer. Det ble samlet fraksjoner på 2 eller 3 mL fra tidspunktet prøven ble applisert på kolonnen.

Renheten til aktuelle fraksjoner ble sjekket med SDS-PAGE (jfr. avsnitt 3.4.3).

3.4.7 Bufferbytte ved dialyse

I ITC-forsøk (se delkapittel 3.5) er det viktig at protein og ligand er løst i nøyaktig samme buffer. Det ble derfor byttet buffer på de inaktive enzymene. Dialyse er en skånsom metode for å bytte buffer i en proteinløsning. «Dialysepølsa» har porer som kan være av ulik størrelse og som holder makromolekyler inne i «pølsa» mens salter og andre små molekyler slipper igjennom. Over tid oppstår det en likevekt mellom bufferen inne i «dialysepølsa» og bufferen utenfor.

Materialer:

- Oppkonsentrert enzymløsning fra rensing
- «Dialysepølse»
- ITC buffer: 20 mM KPi pH 6,0

Metode:

«Dialysepølsa» ble først klargjort ved å væte den i ITC-buffer før enzymløsningen ble overført. «Dialysepølsa» ble lukket med klemmer og lagt i 500 ml buffer (2- 5 ml enzymløsning) som ble inkubert ved 4 °C i 20- 24 timer under omrøring. Enzymløsningen ble deretter overført til et eppendorfrør som ble lagret ved 4 °C frem til bruk.

3.4.8 Bestemmelse av proteinkonsentrasjon - A₂₈₀

De aromatiske aminosyrene fenyylalanin, tyrosin og tryptofan absorberer UV-stråling og har absorpsjonsmaksimum ved henholdsvis 257 nm, 274 nm og 280 nm (Lesk 2010). Absorbans ved 280 nm (A₂₈₀) kan måles i et spektrofotometer og benyttes for å bestemme proteinkonsentrasjonen i en løsning ved hjelp av Beer-Lamberts lov (Pace et al. 1995):

$$A = c\epsilon l \quad (3.4.1)$$

der A er absorbansen, c er konsentrasjonen i M, ϵ er ekstinksjonskoeffisienten og l er lengden av cella. Ekstinksjonskoeffisienten (ϵ) til hvert protein ble beregnet ved hjelp av ExPASy ProtParam Tool på bakgrunn av aminosyresekvensen (<http://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger et al. 2005). En oversikt over ekstinksjonskoeffisientene for enzymene er vist i Tabell 3.4.2.

Tabell 3.4.2 Beregnet ekstinksjonskoeffisient for *TjCel5A-WT*, *TjCel5A-E356A*, *TjCel9A-WT*, *TjCel9A-E425A*, *TjCel48A-WT* og *TjCel48A-E359A*.

Protein	Ekstinksjonskoeffisient (ϵ)
Cel5A-WT	94 225
Cel5A-E356A	94 225
Cel9A-WT	214 435
Cel9A-E425A	214 435
Cel48A-WT	259 925
Cel48A-E359A	259 925

Materialer:

- Proteinløsning
- Buffer til blank prøve (50 mM Tris-HCl pH 8,0/ 20 mM KPi pH 6,0)
- UVetter

Metode:

Buffer tilsvarende den enzymet ble lagret i ble benyttet som blank prøve. A_{280} ble målt slik at $0 < A_{280} < 1$, og konsentrasjonen til enzymet ble beregnet ved bruk av ligning 3.4.1.

3.5 Isoterm titreringskalorimetri- ITC

ITC ble brukt for å bestemme termodynamiske parametere for binding mellom enzym og ligand. Forsøkene ble utført med et VP-ITC kalorimeter fra MicroCal. Dette instrumentet er tidligere beskrevet av Wiseman et al. (1989).

Materialer:

- Enzymløsning
- 20 mM KPi pH 6,0
- (Glc)₆
- 0,1 M NaOH
- dH₂O

Metode:

Før hvert forsøk ble prøvecella vasket med 0,1 M NaOH og deretter skylt med dH₂O og 20 mM KPi pH 6,0. Til hvert forsøk ble det forberedt 2 mL enzymløsning med ønsket konsentrasjon i et cryorør. Prøven ble degasset i 20 minutter for å unngå dannelse av luftbobler i prøvecella. 1,5 mL enzymløsning ble deretter injisert i prøvecella. (Glc)₆ ble tilsatt i 5 eller 8 µL injeksjoner gjennom en roterende injeksjonsprøyte (260 rpm). For å sikre metting av proteinet ble 36-50 injeksjoner tilsatt. Tre eller fire temperaturer ble benyttet for hvert enzym. Det ble kjørt minimum to paralleller ved hver temperatur. Forsøksbetingelsene for de ulike enzymene er vist i Tabell 3.5.1.

Bindingsforsøkene med *TfCel5A-E356A* og (Glc)₆ ga en lav c-verdi. Derfor ble dette enzymet overtitrert med en høy konsentrasjon av ligand (se beskrivelse i avsnitt 1.6). For både *TfCel5A-E356A* og *TfCel9A-E425A* ble det gjort tilpasninger i forsøksoppsettet på grunn av ustabilitet i enzymløsningen. I forsøkene med *TfCel5A-E356A* ble enzymkonsentrasjonen senket fra 15 µM til 8 µM. I forsøkene med *TfCel9A-E425A* ble avstanden mellom injeksjonene økt fra 150 s til 240 s.

Tabell 3.5.1 Oversikt over forsøksbetingelsene brukt i ITC forsøk for *TfCel5A-E356A*, *TfCel9A-E425A* og *TfCel48A-E359A*.

Enzym	[Enzym]	[Glc ₆]	Injeksjoner	Avstand	Temperatur
<i>TfCel5A-E356A</i>	8 µM	1 mM	36 x 8 µL	150 s	20, 25, 30 og 37 °C
<i>TfCel9A-E425A</i>	15 µM	500 µM	50 x 5 µL	240 s	20, 30 og 37 °C
<i>TfCel48A-E359A</i>	15 µM	500 µM	50 x 5 µL	150 s	20, 25, 30 og 37 °C

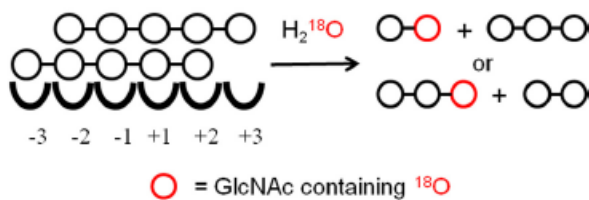
Dataene ble behandlet med Origin 7.0 (MicroCal) og tilpasset en standard 1:1 bindingsmodell. Data fra den første injeksjonen (2 µL) ble fjernet fra datasettet. Denne verdien er ofte unøyaktig grunnet blanding mellom protein- og ligandløsningen.

3.6 Initiell hydrolyse av (Glc)_x i H₂¹⁸O

Initiell hydrolyse av (Glc)_x i H₂¹⁸O ble utført for å undersøke eventuelle subsetepreferanser i det aktive setet til de tre cellulasetene. *TfCel5A-WT*, *TfCel9A-WT* og *TfCel48A-WT* ble brukt til å hydrolysere (Glc)₄, (Glc)₅ og (Glc)₆. Analyse av produktene fra hydrolysen gir

informasjon om hvilke sub seter i det aktive setet som har de sterkeste interaksjonene med substratet.

Hydrolyse av (Glc)₅ og (Glc)₆ ble gjort i H₂¹⁸O for å skille mellom binding i positive og negative sub seter (jfr. avsnitt 1.3.3). Ved hydrolyse i H₂¹⁸O vil ¹⁸O inkorporeres i den nye reduserende enden som produseres (Hekmat et al. 2010). Fordelingen av (Glc)₃ med ¹⁸O og ¹⁶O indikerer om (Glc)₅ har vært posisjonert i sub setene -3 → +2 eller -2 → +3 før hydrolysen. Figur 3.6.1 illustrerer dette prinsippet med (GlcNAc)₅ (Eide et al. 2013a).



Figur 3.6.1 Fordelingen av trimer med ¹⁸O og ¹⁶O indikerer om pentameren har vært posisjonert i sub setene -3 → +2 eller -2 → +3 før hydrolysen (Eide et al. 2013a).

Materialer:

- 20 mM ammoniumacetatbuffer pH 6.1/20 mM ammoniumacetatbuffer pH 6.1 i H₂¹⁸O
- Substrat: 5 mM (Glc)₄/(Glc)₅/(Glc)₆ i H₂O/H₂¹⁸O
- Enzym: *Tf*Cel48A-WT, *Tf*Cel5A-WT og *Tf*Cel9A-WT
- Matrix: 10 mg/ml DHB i 50 % EtOH/ 10 mg/ml DHB i 50 % EtOH, H₂¹⁸O

Metode:

En prøveløsning på totalt 100 µL ble laget av buffer, 2 µL substrat og enzym (maks 2 µL) og inkubert ved 37 °C og 600 rpm i en termomikser. Enzymkonsentrasjonene som ble brukt i de ulike forsøkene er vist i Tabell 3.6.1. Det ble tatt ut en nullprøve samt prøver hvert 30. sekund i 5 minutter for *Tf*Cel5A and *Tf*Cel9A, mens det for *Tf*Cel48A ble tatt ut prøver hvert minutt i 10 minutter. Prøvene ble spottet direkte på en MTP384 ground steel MALDI-plate. 1 µL prøve ble satt i 1 µL matrix, og reaksjonen ble stoppet ved å pipettere forsiktig opp og ned. Prøvene ble tørket i romtemperatur. For hver hydrolysereaksjon ble det gjort 2 paralleller.

Tabell 3.6.1 Enzymkonsentrasjoner benyttet ved hydrolyse av (Glc)₄, (Glc)₅ og (Glc)₆ med *TfCel5A*-WT, *TfCel9A*-WT og *TfCel48A*-WT.

Enzym	[(Glc)₄]^a	[(Glc)₅]	[(Glc)₆]
<i>TfCel5A</i>-WT	50 nM	25 nM	30 nM
<i>TfCel9A</i>-WT	5 μM	25 nM	25 nM
<i>TfCel48A</i>-WT	2 μM	2 μM	2 μM

^a Hydrolyse av (Glc)₄ ble gjort i H₂¹⁶O

Prøvene ble analysert med et UltraflexTM TOF massespektrometer (Bruker Daltonik) under kontroll av programmet FlexControl 3.4. En løsning med ulike (GlcNAc)_x ble analysert for å kalibrere instrumentet. Spektrum ble tatt opp fra m/z = 200 til m/z = 2000. Dataene ble samlet med 800 laserskudd.

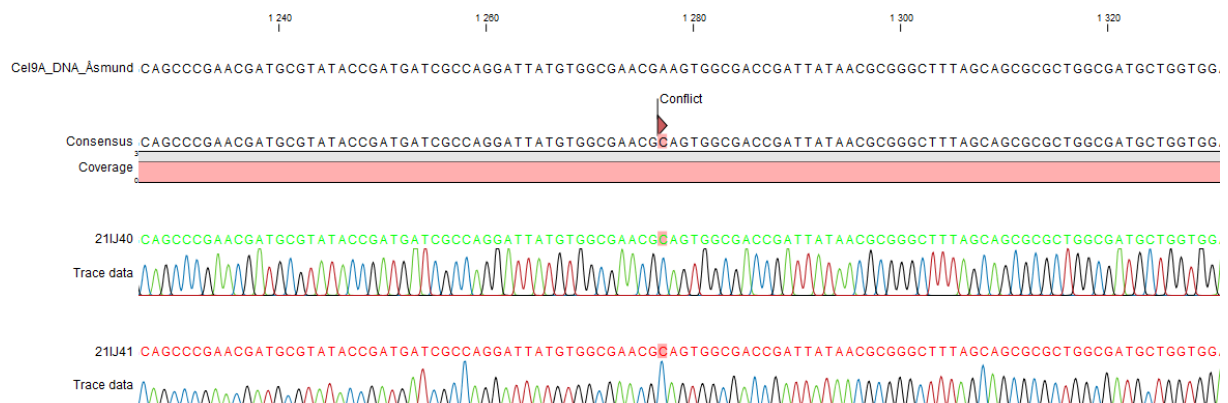
Analyse av spektrene ble gjort med FLEX Analysis 3.4. Dette ga lister med blant annet intensitet og m/z for de observerte toppene. m/z verdiene ble sammenlignet med en liste over beregnede m/z verdier for ulike (Glc)_x.

4 Resultater

4.1 Seterettet mutagenese

For å kunne studere binding av $(\text{Glc})_6$ til *Tf*Cel5A og *Tf*Cel9A måtte det lages inaktive varianter av disse enzymene. Med seterettet mutagenese ble katalytiske residuer i de aktive setene endret til alanin som beskrevet i delkapittel 3.2. *Tf*Cel48A var blitt bestilt som den inaktive mutanten *Tf*Cel48A-E359A, nærmere beskrevet i delkapittel 3.1. En aktiv villtype til initiell hydrolyse av $(\text{Glc})_x$ ble laget ved å mutere Ala³⁵⁹ til Glu³⁵⁹. Samlet ble *Tf*Cel5A-E356A, *Tf*Cel9A-E425A og *Tf*Cel48A-WT tillaget vha seterettet mutagenese.

For å sjekke at riktig mutasjon var blitt innført samt at ingen uønskede mutasjoner hadde oppstått ble det muterte plasmidet sekvensert ved GATC Biotech, Konstanz, Tyskland. Beskrevet i avsnitt 3.2.8. Resultatene fra sekvenseringen ble analysert med *CLC DNA Workbench*. Med denne programvaren kan den opprinnelige DNA-sekvensen sammenlignes med DNA-sekvensen fra sekvenseringen. Figur 4.1.1 viser et utsnitt av sekvensen til *Tf*Cel9A-WT sammenstilt med 2 sekvenser fra sekvenseringen av *Tf*Cel9A-E425A.



Figur 4.1.1 DNA-sekvensen til *Tf*Cel9A-WT sammenstilt med sekvensen til *Tf*Cel9A-E425A. Nukleotiden merket «Conflict» indikerer at A i villtypesekvensen er endret til C etter seterettet mutagenese. Kodonet GAA, som gir glutamin, er endret til kodonet GCA som gir alanin.

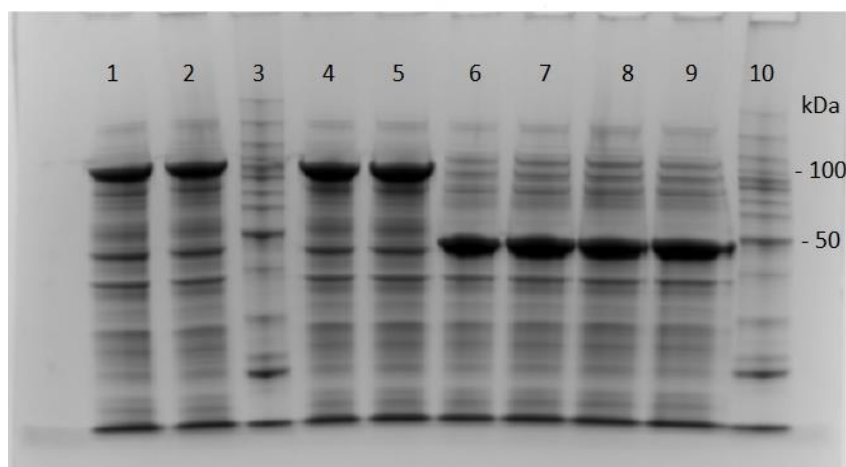
Tilsvarende sammenligninger ble gjort for *Tf*Cel5A-E356A og *Tf*Cel48A WT (resultater ikke vist). Det ble verifisert at mutagenesen hadde vært vellykket og at det ikke var oppstått noen uønskede mutasjoner.

4.2 Uttrykking og rensing av cellulaser

Aktive og inaktive varianter av *TfCel5A*, *TfCel9A* og *TfCel48A* ble isolert over to eller tre rensetrinn etter protokoller beskrevet i delkapittel 3.4. Etter lysering av cellene og varmebehandling av lysatet ble proteinløsningen renset med ionebytterkromatografi. Fraksjonene som viste bånd med størrelse tilsvarende den ønskede cellulase ved SDS-PAGE ble deretter renset videre med en hydrofob interaksjonskromatografi. I de tilfellene der analyse med SDS-PAGE viste urenheter i proteinløsningene etter to rensetrinn ble gelfiltrering benyttet som et tredje trinn.

4.2.1 Induksjonstest

En induksjonstest ble utført både etter transformering av cellulasekonstrukt og etter seterettet mutagenese, for å undersøke om det var overuttrykk av ønsket cellulase (jfr. avsnitt 3.3.1). Figur 4.2.1 viser SDS-PAGE gel fra induksjonstest etter transformering av de bestilte cellulasekonstruktene for *TfCel5A*-WT og *TfCel9A*-WT.

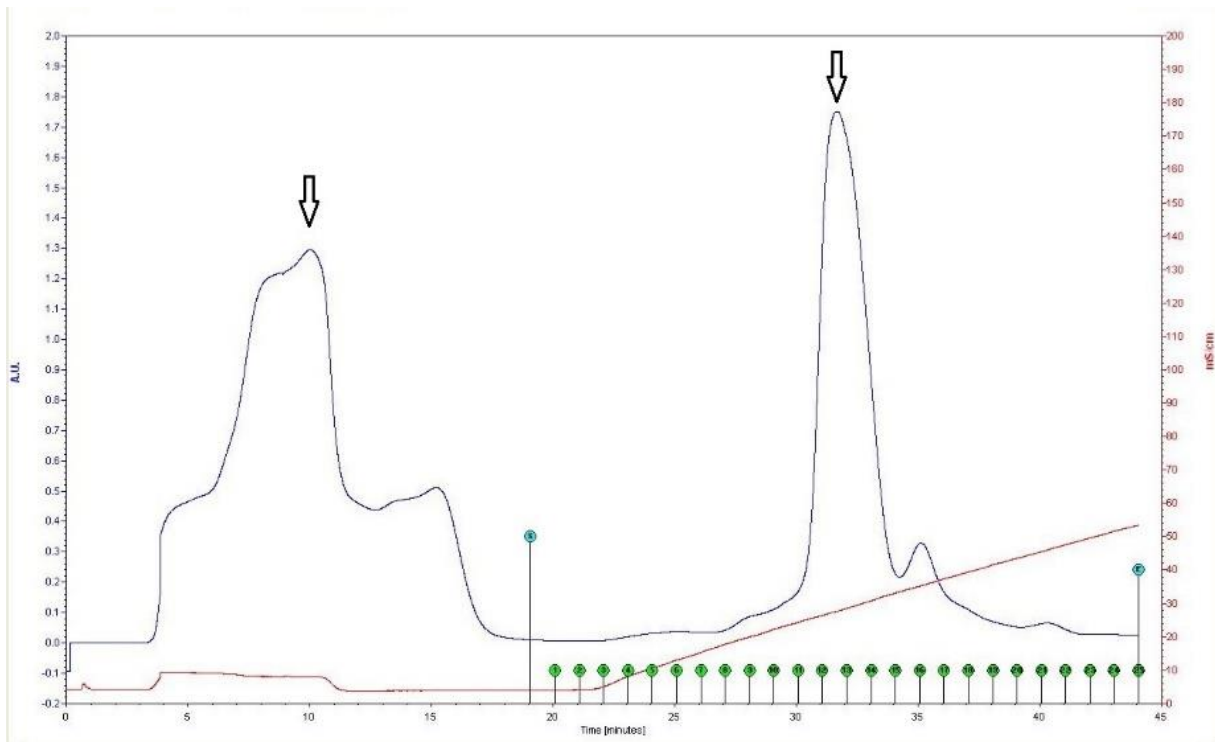


Figur 4.2.1 SDS-PAGE gel fra induksjonstest av *TfCel5A*-WT og *TfCel9A*-WT. I brønn 3 og 10 er det påsatt størrelsesmarkør. Til høyre er molekylvekten til noen utvalgte bånd vist i kDa. I brønn 1+2 og 4+5 er det påsatt resuspendert cellepellet fra induksjonstest av *TfCel9A*-WT(90,5 kDa), og i brønn 6-9 resuspendert cellepellet fra induksjonstest av *TfCel5A*-WT(46,6 kDa).

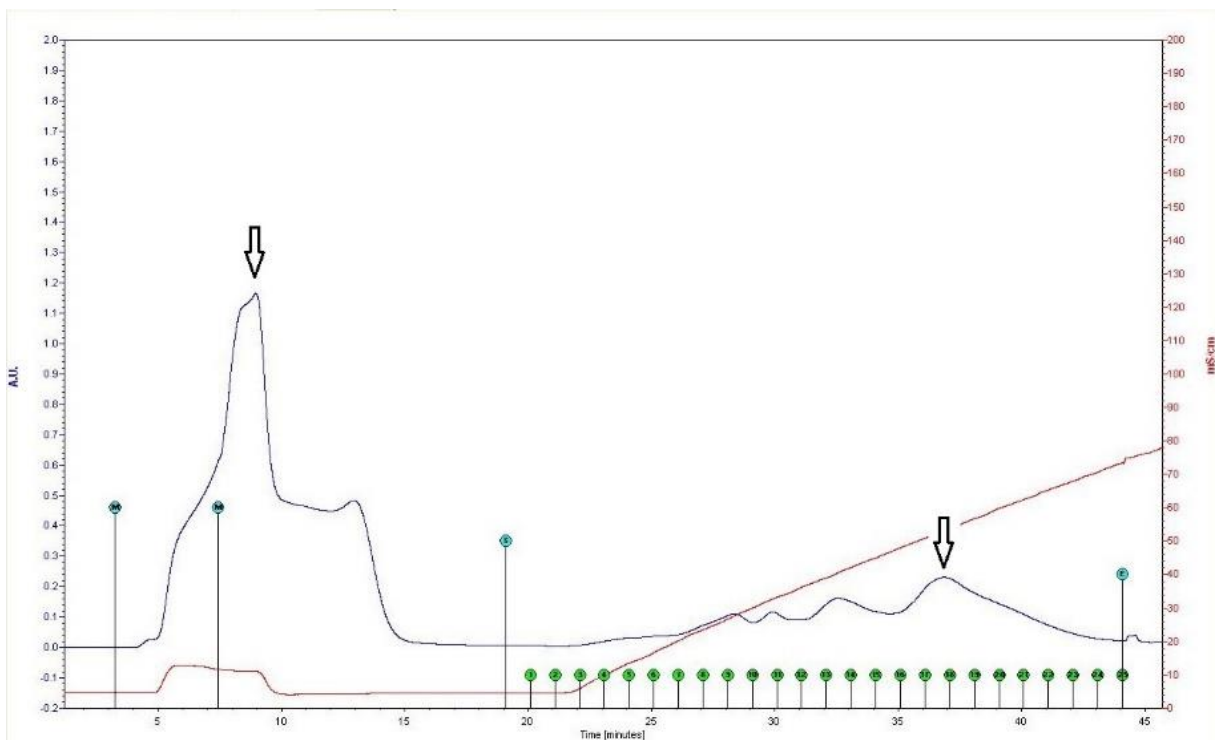
4.2.2 Rensing av cellulaser med ionebytterkromatografi

Figur 4.2.2-4.2.4 viser kromatogrammene fra rensing av de 3 inaktive cellulase med sterk anionbytter. Disse kromatogrammene er også representative for rensing av den aktive varianten. Den første toppen i kromatogrammet er void-toppen med alle proteinene som ikke

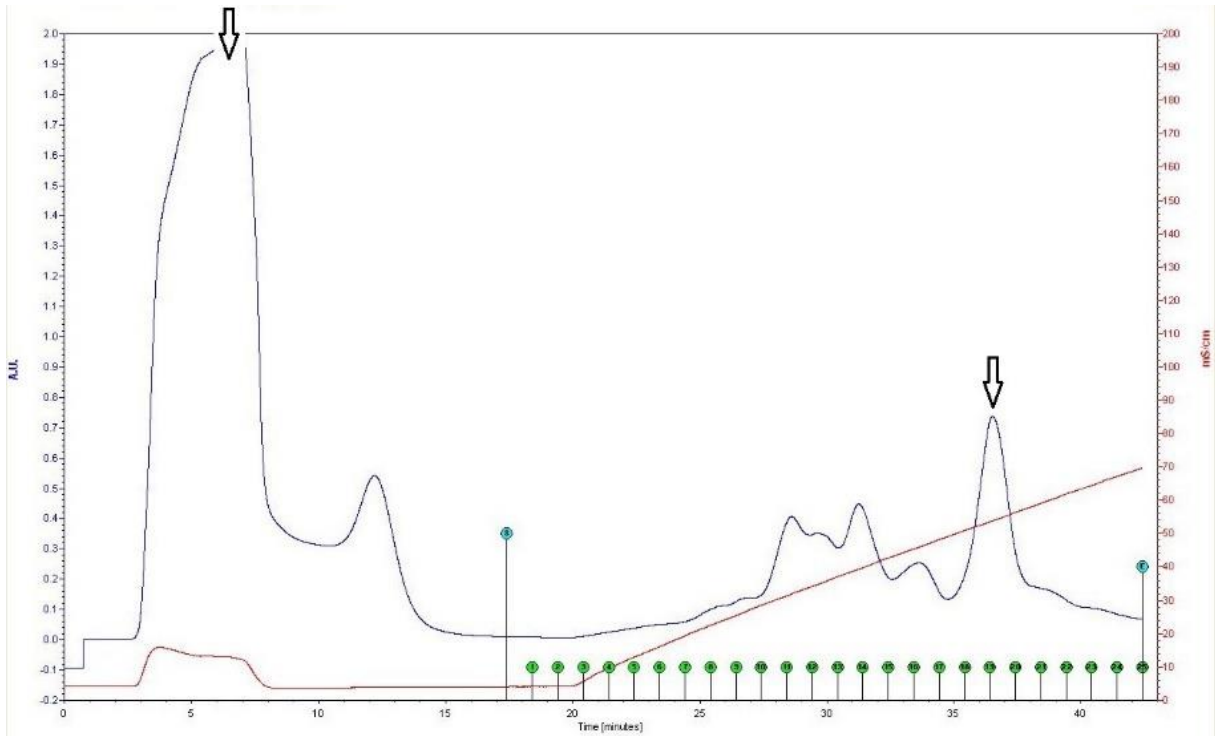
har bundet til kolonnematerialet. Det aktuelle proteinet ble deretter eluert med en gradient av NaCl og det ble samlet fraksjoner som beskrevet i avsnitt 3.4.2.



Figur 4.2.2 Kromatogram for rengjøring av *TjCel5A-E356A* med sterk anionbytter. Pilene indikerer void-toppen og toppen som inneholder det ønskede proteinet, verifisert med SDS-PAGE analyse av fraksjonene i toppen.

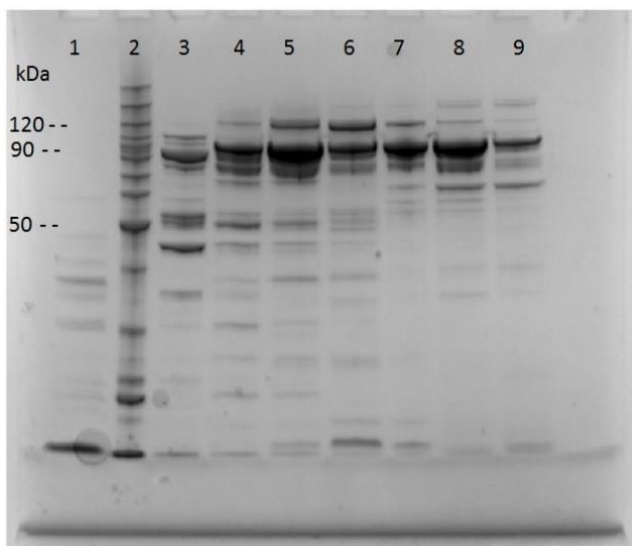


Figur 4.2.3 Kromatogram for rengjøring av *TjCel9A-E425A* med sterk anionbytter. Pilene indikerer void-toppen og toppen som inneholder det ønskede proteinet, verifisert med SDS-PAGE analyse av fraksjonene i toppen.



Figur 4.2.4 Kromatogram for rensing av *TfCel48A-E359A* med sterk anionbytter. Pilene indikerer void-toppen og toppen som inneholder det ønskede proteinet, verifisert med SDS-PAGE analyse av fraksjonene i toppen.

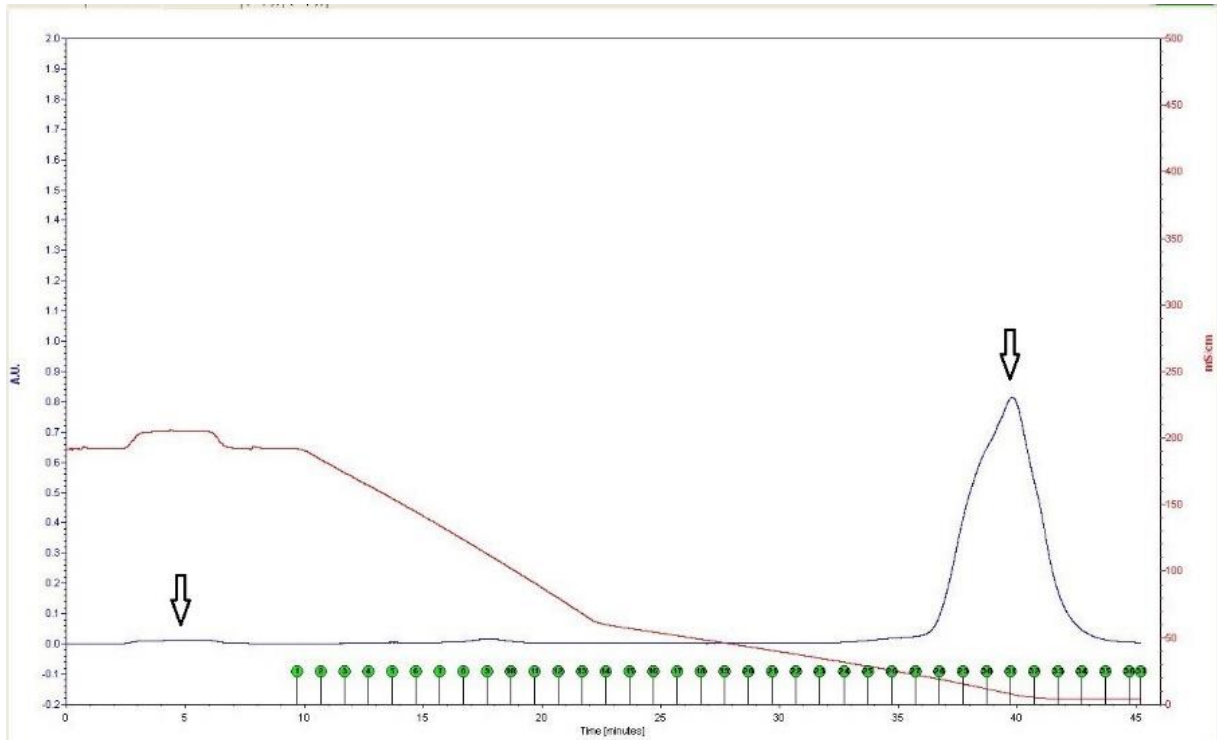
Figur 4.2.5 viser et eksempel på en SDS-PAGE gel etter ionebytterkromatografi for *TfCel9A-E425A* der et bånd ved 90 kDa indikerer at den aktuelle fraksjonen inneholder det ønskede proteinet.



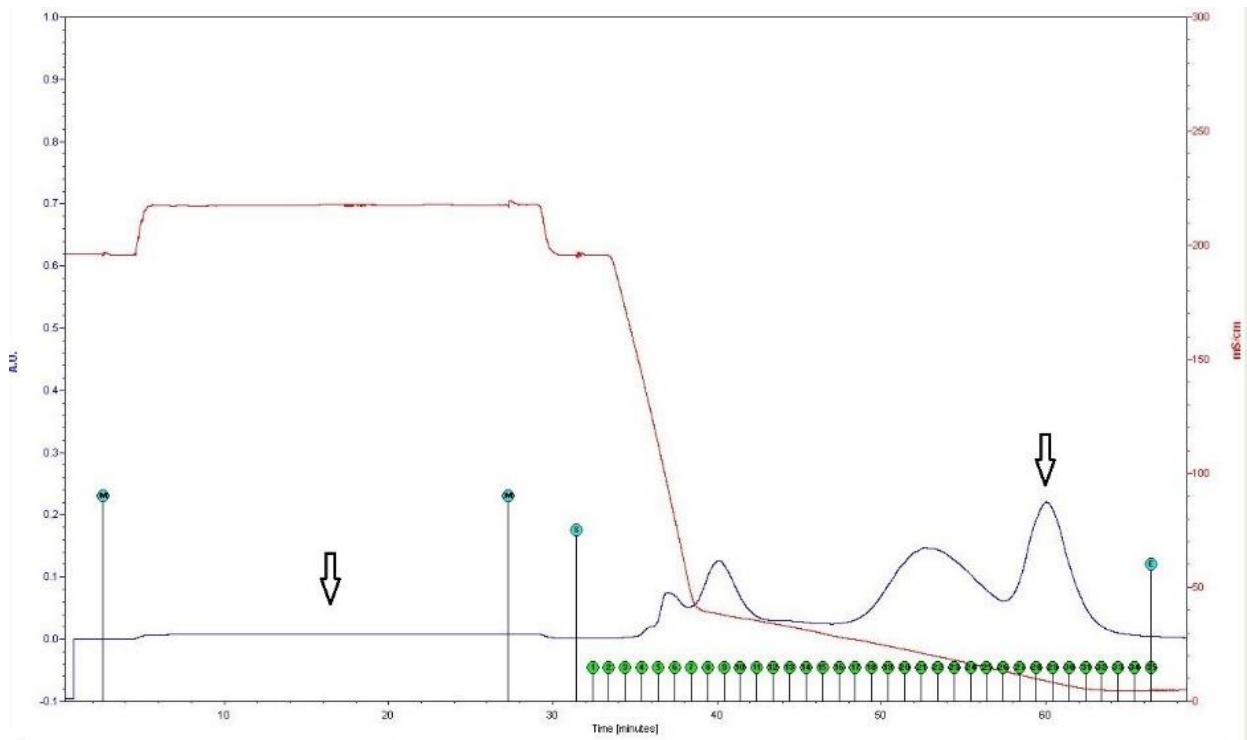
Figur 4.2.5 SDS-PAGE gel etter rensing av *TfCel9A-E425A* med sterk anionbytter. Brønn 1 er påsatt voiden, brønn 2 en størrelsesmarkør og brønn 3-9 fraksjoner fra eluringstoppen. Et bånd ved 90 kDa indikerer *TfCel9A-E425A*.

4.2.3 Rensing av cellulaser med hydrofob interaksjonskromatografi

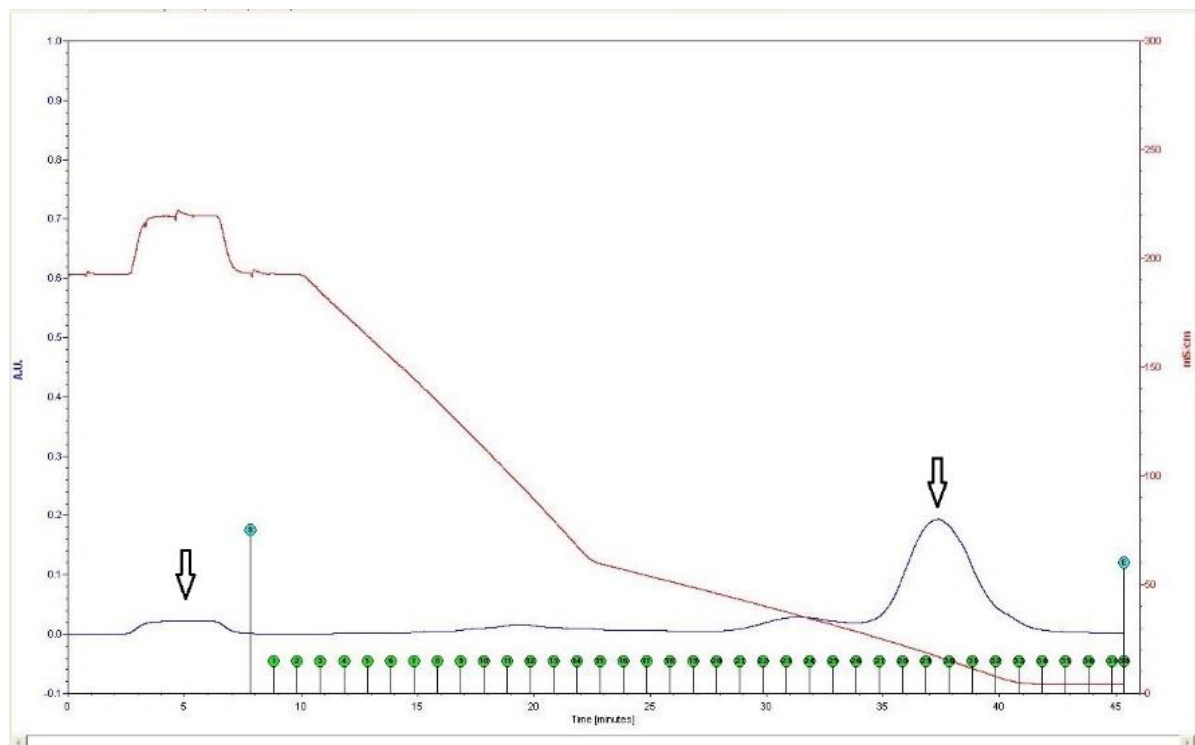
Fraksjonene fra ionebytterkromatografi som indikerte aktuelt protein ble slått sammen og rensset med hydrofob interaksjonskromatografi. *TfCel15A*, *TfCel19A* og *TfCel48A* ble eluert med ulike gradienter som beskrevet i avsnitt 3.4.4. Figur 4.2.6- 4.2.8 viser eksempler på kromatogrammer fra rensing av de 3 inaktive cellulasete. Disse er også representative for rensing av den aktive varianten. Den første toppen i kromatogrammet er void-toppen med alle proteinene som ikke har bundet til kolonnematerialet.



Figur 4.2.6 Kromatogram for rensing av *TfCel5A-E356A* med hydrofob interaksjonskromatografi. Pilene indikerer void-toppen og toppen som inneholder det ønskede proteinet, verifisert med SDS PAGE.

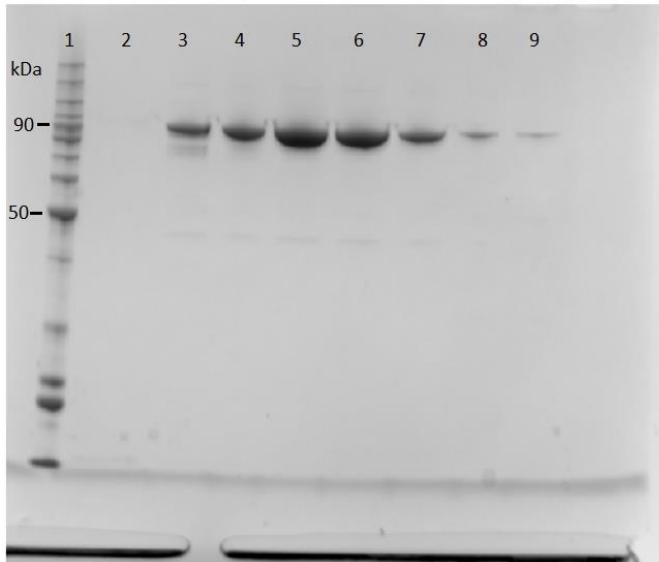


Figur 4.2.7 Kromatogram for rensing av *TjCel9A-E425A* med hydrofobinteraksjonskromatografi. Pilene indikerer voidtoppen og toppen som inneholder det ønskede proteinet, verifisert med SDS-PAGE.



Figur 4.2.8 Kromatogram for rensing av *TjCel48A-E359A* med hydrofobinteraksjonskromatografi. Pilene indikerer voidtoppen og toppen som inneholder det ønskede proteinet, verifisert med SDS-PAGE.

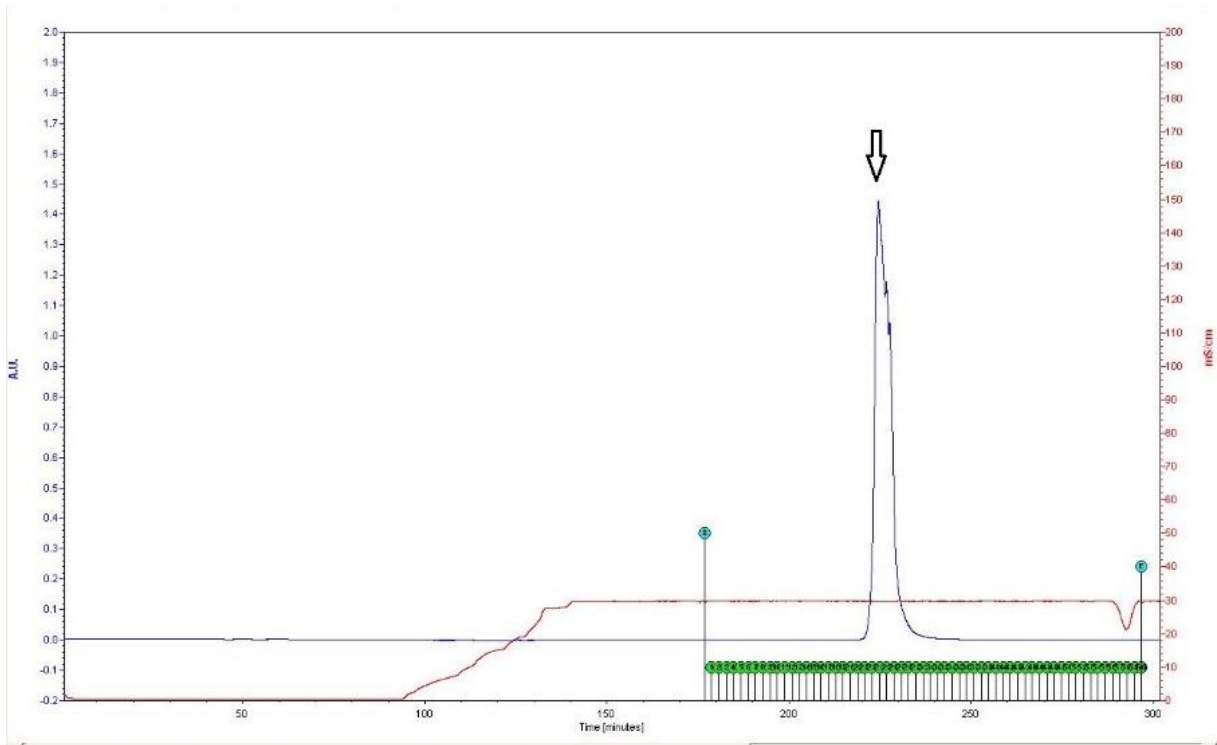
Figur 4.2.9 viser et eksempel på en SDS-PAGE gel etter hydrofob interaksjonskromatografi for *TfCel9A-E425A* der et bånd ved 90 kDa indikerer at den aktuelle fraksjonen inneholder det ønskede proteinet.



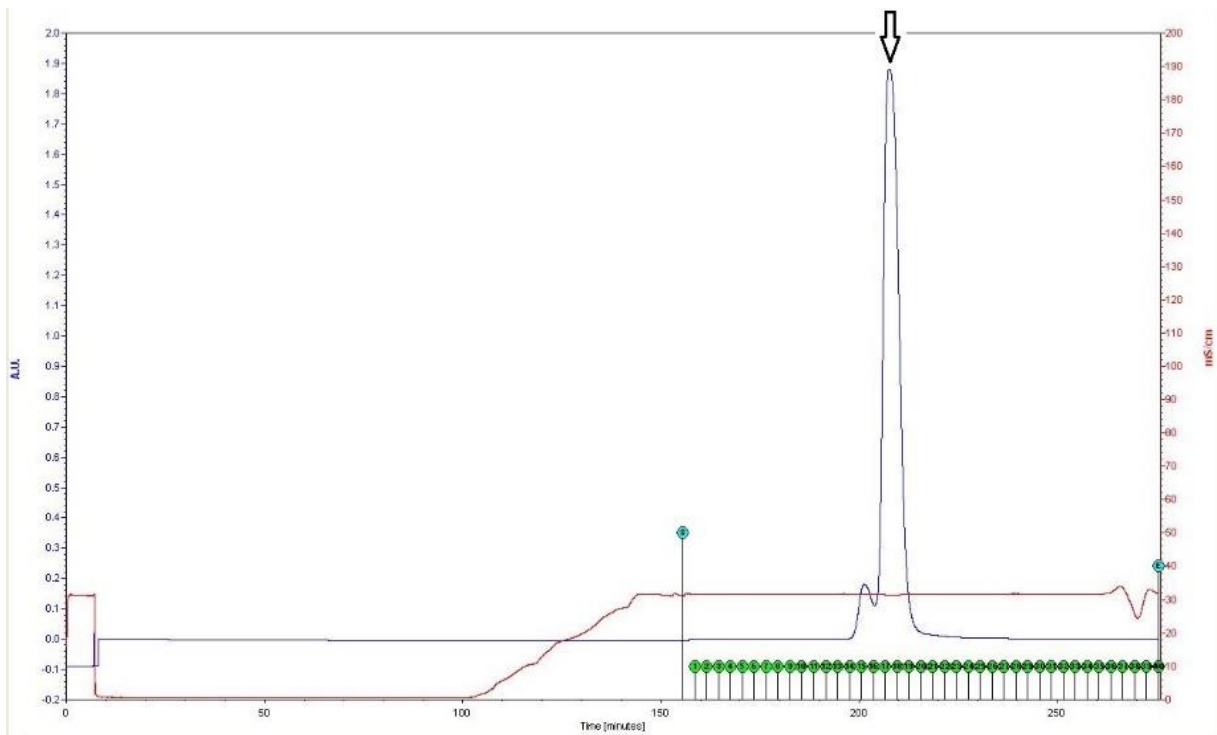
Figur 4.2.9 SDS-PAGE gel etter hydrofob interaksjonskromatografi av *TfCel9A-E425A*. I brønn 1 er det påsatt en størrelsesmarkør, brønn 2 voiden og brønn 3-9 fraksjoner fra elueringstoppen. Et bånd ved 90,5 kDa indikerer *TfCel9A-E425A*.

4.2.4 Rensing av cellulaser med gelfiltrering (SEC)

I de tilfellene der SDS-PAGE viste urenheter i proteinløsningen etter hydrofob interaksjonskromatografi og oppkonsentrering ble gelfiltrering (jfr. avsnitt 3.4.6) benyttet som et tredje rensetrinn. Kolonnen har et voidvolum på 40 mL, og ettersom *TfCel48A* og *TfCel9A* er store proteiner eluerte de rett etter dette voidvolumet. Figur 4.2.10 og Figur 4.2.11 viser kromatogrammer for rensing av *TfCel9A-E425A* og *TfCel48A-E359A*.

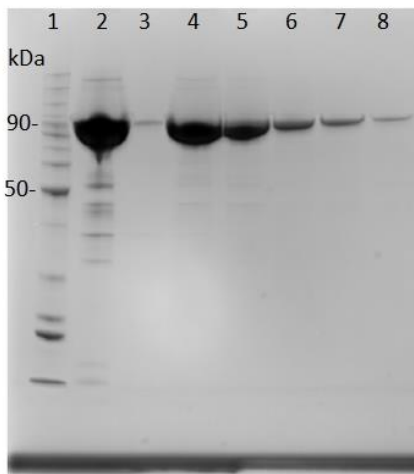


Figur 4.2.10 Kromatogram for rensing av *TjCel9A-E425A* med gelfiltrering. Renheten til fraksjonene i toppen ble undersøkt med SDS-PAGE.



Figur 4.2.11 Kromatogram for rensing av *TjCel48A-E359A* med gelfiltrering. Renheten til fraksjonene i toppen ble undersøkt med SDS-PAGE.

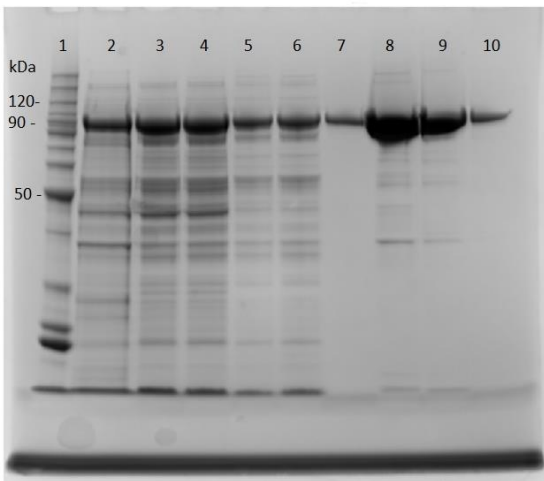
Figur 4.2.12 viser et eksempel på en SDS-PAGE gel av fraksjoner fra gelfiltrering av *TfCel9A-E425A*.



Figur 4.2.12 SDS-PAGE gel etter gelfiltrering av *TfCel9A-E425A*. I brønn 1 er det påsatt en størrelsesmarkør, brønn 2 prøven før gelfiltrering og brønn 3-8 fraksjoner fra elueringstoppen. Et bånd ved 90,5 kDa indikerer *TfCel9A-E425A*.

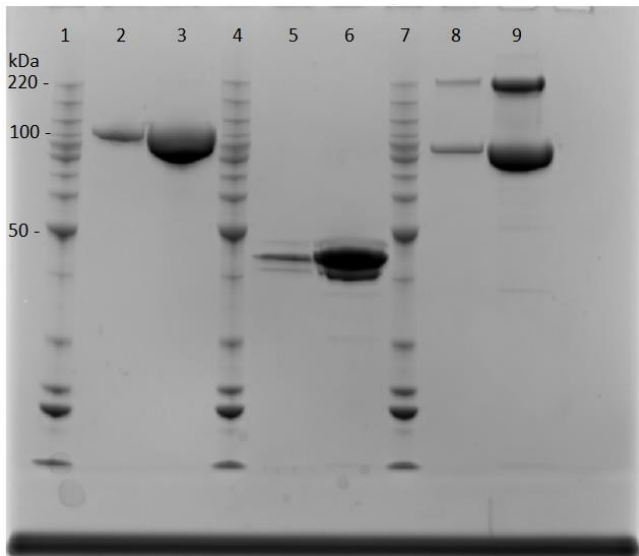
4.2.5 Rensing av cellulaser- samlede resultater

Cellulasene i denne oppgaven ble isolert og renset over 2 eller 3 rensetrinn etter varmebehandling av lysatet fra opparbeidelsen (jfr. delkapittel 3.4). Figur 4.2.13 illustrerer renhet i proteinløsningen på ulike stadier i rensingen av *TfCel9A-E425A*.

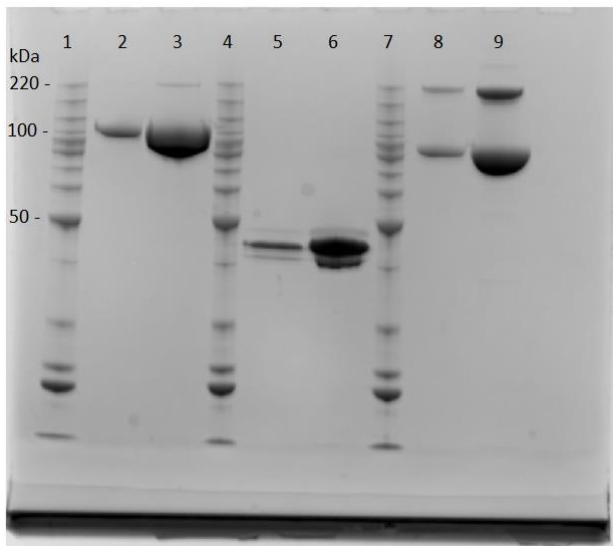


Figur 4.2.13 Oversikt over de ulike rensetrinnene benyttet i denne oppgaven. I brønn 1 er det påsatt en størrelsesmarkør. I brønn 2 er det påsatt resuspendert cellepellet, brønn 3 supernatant etter sentrifugering, brønn 4 supernatant etter utfelling av DNA med streptomycinsulfat, brønn 5 proteinløsning etter varmebehandling, brønn 6 løsning etter anionbytter, brønn 7 løsning etter hydrofobinteraksjonskromatografi, brønn 8 oppkonsentrert protein før gelfiltrering mens brønn 9 og 10 er renset protein etter gelfiltrering.

Figur 4.2.14 og 4.2.15 viser SDS-PAGE geler med alle cellulasete som er renset i denne oppgaven. De doble båndene for *TjCel9A* og *TjCel9A-E425A* kan indikere at det er dannet dimere i proteinløsningen under lagring. Det er også antydning til ekstra bånd for *TjCel5A* og *TjCel5A-E356A*. Dette kan være proteolyse som har skjedd ved lagring over lengre tid. Disse båndene ble ikke observert umiddelbart etter rensing.



Figur 4.2.14 I brønn 1,4 og 7 er det påsatt størrelsesmarkør. Til venstre er molekylvekten til noen utvalgte bånd vist i kDa. I brønn 2 og 3 er det påsatt henholdsvis 2,5 og 25 μg *TjCel48A-E359A*(104kDa), i brønn 5 og 6 henholdsvis 2,5 og 25 μg *TjCel5A-E356A* (46,6 kDa) og i brønn 8 og 9 henholdsvis 2,5 og 25 μg *TjCel9A-E425A*(90,5 kDa).



Figur 4.2.15 I brønn 1,4 og 7 er det påsatt størrelsesmarkør. Til venstre er molekylvekten til noen utvalgte bånd vist i kDa. I brønn 2 og 3 er det påsatt henholdsvis 2,5 og 25 μg *TjCel48A-WT* (104 kDa), i brønn 5 og 6 henholdsvis 2,5 og 25 μg *TjCel5A-WT* (46,6 kDa) og brønn 8 og 9 henholdsvis 2,5 og 25 μg *TjCel9A-WT* (90,5 kDa).

4.2.6 Bestemmelse av proteinkonsentrasjon- A₂₈₀

Etter rensing og oppkonsentrering ble proteinkonsentrasjonen i løøsningene bestemt ved å måle A₂₈₀ i et spektrofotometer (jfr. avsnitt 3.4.8). De fleste enzymene ble dyrket og rensset flere ganger. Tabell 4.2.1 viser en oversikt over høyest oppnådde utbytte i mg/ L vekstmedie.

Tabell 4.2.1 Oversikt over høyest oppnådde utbytte i mg/ L vekstmedie for *TfCel5A*-WT, *TfCel5A*-E356A, *TfCel9A*-WT, *TfCel9A*-E425A, *TfCel48A*-WT og *TfCel48A*-E359A.

Enzym	mengde	vekstmedium	mg/ L vekstmedium
<i>TfCel5A</i> -WT	51 mg	0,6 L	86
<i>TfCel5A</i> -E356A	71 mg	0,45 L	158
<i>TfCel9A</i> -WT	15 mg	0,125 L	120
<i>TfCel9A</i> -E425A	18 mg	1 L	18
<i>TfCel48A</i> -WT	9 mg	0,5 L	18
<i>TfCel48A</i> -E359A	11,4 mg	1 L	11,4

4.3 Binding av (Glc)₆ til inaktive cellulaser

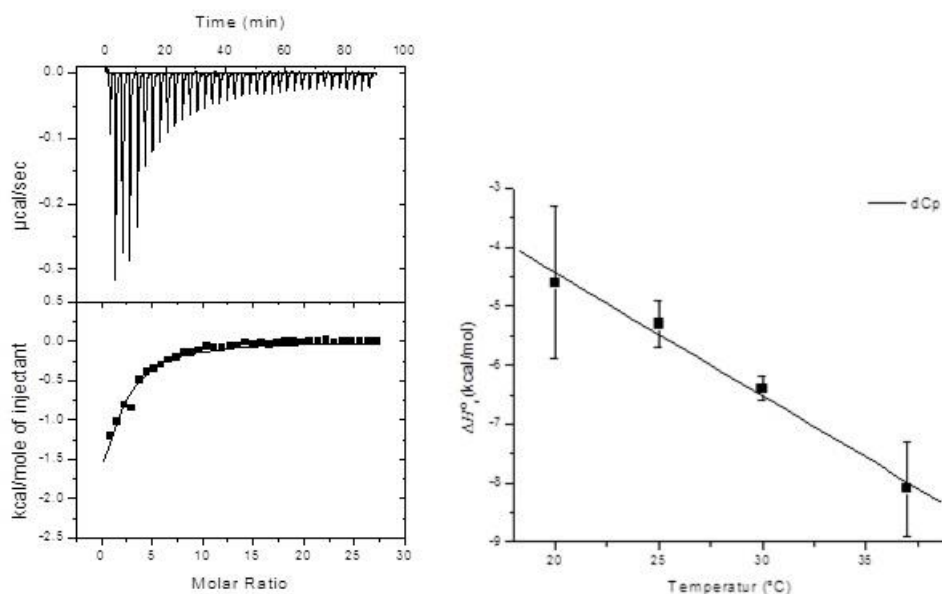
Binding av (Glc)₆ til *TfCel5A*-E356A, *TfCel9A*-E425A og *TfCel48A*-E359A ble studert med ITC. Forsøkene ble utført i 20 mM kaliumfosfatbuffer, pH 6,0 og temperaturer fra 20-37 °C. Tilpasning av resultatene fra ITC ble gjort med programvaren Origin 7.0 som følger med VP-ITC kalorimeteret. Dette ga verdiene for K_a og ΔH_r° i tillegg til støkiometrien n for reaksjonen. K_d , ΔG_r° og $-T\Delta S_r^\circ$ ble bestemt fra likningene 1.5.3, 1.5.4 og 1.5.5 (jfr. delkapittel 1.5). Endring i varmekapasitet, $\Delta C_{p,r}^\circ$, for de ulike bindingsreaksjonene ble beregnet med likning 1.5.9.

4.3.1 Binding av (Glc)₆ til *TfCel5A*-E356A

8 μ M *TfCel5A*-E356A ble overtitrert med en høy ligandkonsentrasjon (1mM, 8 μ L injeksjoner). Dette gjorde det mulig å bestemme K_a , ΔH_r° og støkiometrien n til tross for lav c -verdi for bindingsreaksjonen, og ustabilitet i enzymløsningen ved høyere konsentrasjon (jfr. delkapittel 1.6 og 3.5)

Et ITC termogram, en isoterm og temperaturavhengigheten for bindingen av (Glc)₆ til *TfCel5A*-E356A er vist i figur Figur 4.3.1. En full oversikt over de termodynamiske

parameterne for binding av $(\text{Glc})_6$ til $Tf\text{Cel5A-E356A}$ er vist i Tabell 4.3.1. Ved $30\text{ }^\circ\text{C}$ binder $(\text{Glc})_6$ til $Tf\text{Cel5A-E356A}$ med $K_d = 26 \pm 2\text{ }\mu\text{M}$ som gir $\Delta G_r^\circ = -6,4 \pm 0,1\text{ kcal/mol}$ for reaksjonen. Endring i entalpi (ΔH_r°) er lik $-6,4 \pm 0,2\text{ kcal/mol}$ og dermed er endringen i entropi (ΔS_r°) lik $0,0 \pm 0,6\text{ cal/K}\cdot\text{mol}$ ($-T\Delta S_r^\circ = 0,0 \pm 0,2\text{ kcal/mol}$). $\Delta C_{p,r}^\circ$ ble bestemt til å være $-209 \pm 17\text{ cal/K}\cdot\text{mol}$.



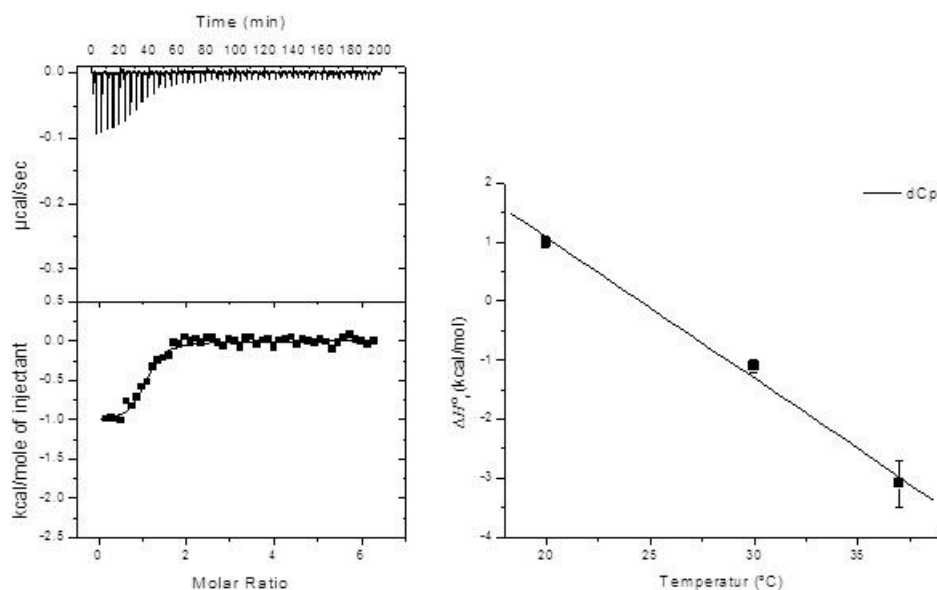
Figur 4.3.1 Til venstre: Termogram (øverst) og bindingsisoterm (nederst) for binding av $(\text{Glc})_6$ til $Tf\text{Cel5A-E356A}$ ved pH 6,0 og $t = 30\text{ }^\circ\text{C}$. Til høyre: Temperaturavhengigheten for binding av $(\text{Glc})_6$ til $Tf\text{Cel5A-E356A}$ ved pH 6,0. Grafen med ΔH_r° mot temperatur gir endring i varmekapasitet ($\Delta C_{p,r}^\circ$) som stigningstall.

4.3.2 Binding av $(\text{Glc})_6$ til $Tf\text{Cel9A-E425A}$

Et ITC termogram, en isoterm og temperaturavhengigheten for bindingen av $(\text{Glc})_6$ til $Tf\text{Cel9A-E425A}$ er vist i Figur 4.3.2. En full oversikt over de termodynamiske parameterne for denne bindingen er vist i Tabell 4.3.1. Det ble utført to paralleller ved 20, 30 og $37\text{ }^\circ\text{C}$. På grunn av lavt utbytte av enzym ble det kun utført en parallell ved $25\text{ }^\circ\text{C}$. Ved $25\text{ }^\circ\text{C}$ er i tillegg $\Delta H_r^\circ \sim 0$ og dette gjør det vanskelig å bestemme K_a ved denne temperaturen. Observert proteinustabilitet under forsøksbetingelser førte til at avstanden mellom injeksjonene ble økt fra 150 til 240 s. Ustabiliteten gjorde også at punkter etter metning av enzymet ble fjernet før tilpasning av resultatene for en av parallellene ved 20 og $37\text{ }^\circ\text{C}$.

Ved $30\text{ }^\circ\text{C}$ binder $(\text{Glc})_6$ til $Tf\text{Cel9A-E425A}$ med $K_d = 0,56 \pm 0,16\text{ }\mu\text{M}$, som gir en $\Delta G_r^\circ = -8,7 \pm 0,2\text{ kcal/mol}$ for reaksjonen. ΔH_r° er lik $-1,1 \pm 0,1\text{ kcal/mol}$, og dermed er $\Delta S_r^\circ = 25,1 \pm$

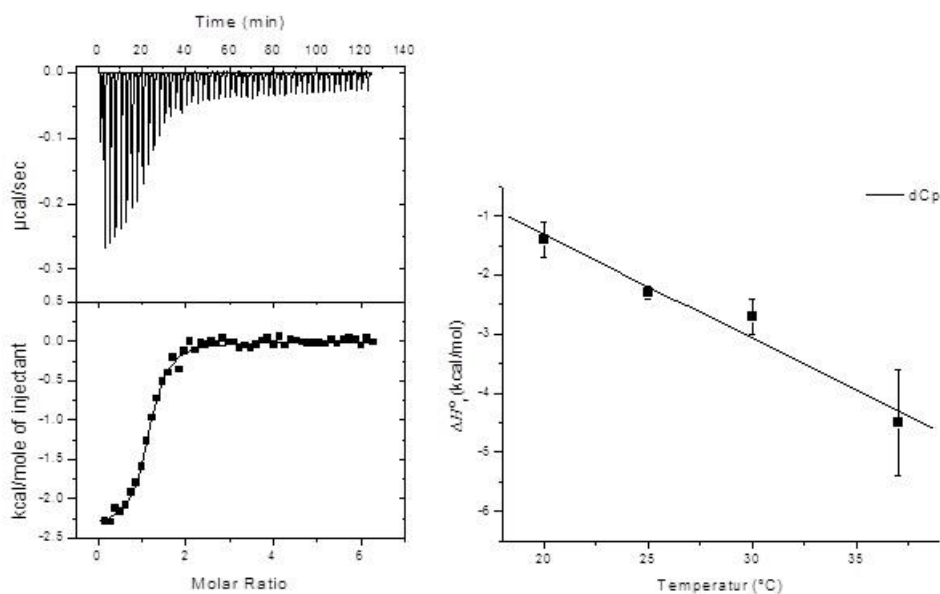
0,7 cal/K·mol ($-T\Delta S_r^\circ = -7,6 \pm 0,2$ kcal/mol). $\Delta C_{p,r}^\circ$ ble bestemt til å være -239 ± 21 cal/K·mol.



Figur 4.3.2 Til venstre: Termogram (øverst) og bindingsisoterm (nederst) for binding av (Glc)₆ til TfCel9A-E425A ved pH 6,0 og $t = 30$ °C. Til høyre: Temperaturavhengigheten for binding av (Glc)₆ til TfCel9A-E425A ved pH 6,0. Grafen med ΔH_r° mot temperatur gir endring i varmekapasitet ($\Delta C_{p,r}^\circ$) som stigningstall.

4.3.3 Binding av (Glc)₆ til TfCel48A-E359A

Et ITC termogram, en isoterm og temperaturavhengigheten for bindingen av (Glc)₆ til TfCel48A-E359A er vist i Figur 4.3.3. En full oversikt over de termodynamiske parameterne for bindingen er vist i Tabell 4.3.1. Ved 30 °C binder (Glc)₆ til TfCel48A-E359A med en $K_d = 0,67 \pm 0,20$ μ M, som gir en $\Delta G_r^\circ = -8,6 \pm 0,2$ kcal/mol for reaksjonen. ΔH_r° er lik $-2,7 \pm 0,3$ kcal/mol, og dermed er ΔS_r° lik $19,5 \pm 1,3$ cal/K·mol ($-T\Delta S_r^\circ = -5,9 \pm 0,4$ kcal/mol). $\Delta C_{p,r}^\circ$ ble bestemt til å være -176 ± 25 cal/K·mol.



Figur 4.3.3 Til venstre: Termogram (øverst) og bindingsisoterm (nederst) for binding av $(\text{Glc})_6$ til $Tf\text{Cel}48\text{A-E}359\text{A}$ ved pH 6,0 og $t = 30^\circ\text{C}$. Til høyre: Temperaturavhengigheten for binding av $(\text{Glc})_6$ til $Tf\text{Cel}48\text{A-E}359\text{A}$ ved pH 6,0. Grafen med ΔH_r° mot temperatur gir endring i varmekapasitet ($\Delta C_{p,r}^\circ$) som stigningstall.

4.3.4 Parameterisering av den entropiske termen

Avsnitt 1.5.3 beskriver hvordan endringen i entropi (ΔS_r°) kan deles i tre ulike parametre; $\Delta S_{\text{solv}}^\circ$, $\Delta S_{\text{conf}}^\circ$, og ΔS_{mix} (Baker & Murphy 1997).

Fra likning 1.5.7 ble $\Delta S_{\text{solv}}^\circ$ for binding av $(\text{Glc})_6$ til $Tf\text{Cel}5\text{A-E}356\text{A}$, $Tf\text{Cel}9\text{A-E}425\text{A}$ og $Tf\text{Cel}48\text{A-E}359\text{A}$ beregnet til å være henholdsvis $50,6 \pm 4,3$, $57,1 \pm 5,3$ og $42,2 \pm 5,9$ $\text{cal/K}\cdot\text{mol}$ ($-T\Delta S_{\text{solv}}^\circ = -15,2 \pm 1,3$, $-17,3 \pm 1,6$ og $-12,8 \pm 1,8$ kcal/mol). Fra likning 1.5.6 ble $\Delta S_{\text{conf}}^\circ$ bestemt å være $-42,2 \pm 4,3$ for $Tf\text{Cel}5\text{A-E}356\text{A}$, $-24,1 \pm 5,3$ for $Tf\text{Cel}9\text{A-E}425\text{A}$ og $-14,9 \pm 5,9$ $\text{cal/K}\cdot\text{mol}$ for $Tf\text{Cel}48\text{A-E}359\text{A}$ ($-T\Delta S_{\text{conf}}^\circ = 12,8 \pm 1,3$, $7,3 \pm 1,6$ og $4,5 \pm 1,8$ kcal/mol). Fullstendig oversikt over de ulike termodynamiske parametrene er gitt i Tabell 4.3.1.

Tabell 4.3.1 Termodynamiske parametere for binding av (Glc)₆ til *Tf*Cel5A-E356A, *Tf*Cel9A-E425A og *Tf*Cel48A-E359A ved *t* = 30 °C og pH 6,0 bestemt med isoterm titreringskalorimetri.

	K_d^a	ΔG_r^{ob}	ΔH_r^{ob}	$-T\Delta S_r^{ob}$	$-T\Delta S_{solv}^{ob,d}$	$-T\Delta S_{conf}^{ob}$	$-T\Delta S_{mix}^{ob}$	$\Delta C_{p,r}^{oc,e}$
<i>Tf</i>Cel5A -E356A	26 ± 2	-6,4 ± 0,1	-6,4 ± 0,2	0,0 ± 0,2	-15,2 ± 1,3	12,8 ± 1,3	2,4	-209 ± 17
<i>Tf</i>Cel9A -E425A	0,56 ± 0,16	-8,7 ± 0,2	-1,1 ± 0,1	-7,6 ± 0,2	-17,3 ± 1,6	7,3 ± 1,6	2,4	-239 ± 21
<i>Tf</i>Cel48A -E359A	0,67 ± 0,20	-8,6 ± 0,2	-2,7 ± 0,3	-5,9 ± 0,4	-12,8 ± 1,8	4,5 ± 1,8	2,4	-176 ± 25

^a μM, ^b kcal/mol, ^c cal/K·mol, ^d $\Delta S_{solv}^\circ = \Delta C_p \ln(303K/385K)$, utifra likningen $\Delta S_r^\circ = \Delta S_{solv}^\circ + \Delta S_{conf}^\circ + \Delta S_{mix}^\circ$ hvor $\Delta S_{mix}^\circ = R \ln(1/55,5) = -8$ cal/K·mol, ^e fra temperaturavhengigheten til ΔH_r° .

4.4 Initiell hydrolyse av (Glc)_x i H₂¹⁸O

Hydrolyse av (Glc)_x med *Tf*Cel5A-WT, *Tf*Cel9A-WT og *Tf*Cel48A-WT ble utført i H₂¹⁸O. Forsøkene ble gjort i 20 mM ammoniumacetatbuffer (pH 6,1) ved 37 °C og 600 rpm i en termomikser. Prøver ble tatt ut med jevne mellomrom i løpet av 5 min for *Tf*Cel5A-WT og *Tf*Cel9A-WT og 10 min for *Tf*Cel48A-WT. Disse prøvene ble analysert med MALDI-TOF-MS. Toppene i spektrene ble sammenlignet med en liste over beregnede m/z- verdier for ulike (Glc)_x. Det ble i hovedsak observert natriumaddukter av (Glc)_x og en oversikt over disse er vist i Tabell 4.4.1.

Tabell 4.4.1 Oversikt over molekylmassen til natriumaddukter av ulike (Glc)_x.

(Glc) _x	Molekylformel	Natriumaddukt ¹⁶ O	Natriumaddukt ¹⁸ O
(Glc) ₂	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	m/z 365	m/z 367
(Glc) ₃	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	m/z 527	m/z 529
(Glc) ₄	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	m/z 689	m/z 691
(Glc) ₅	C ₃₀ H ₅₂ O ₂₆	m/z 851	m/z 853
(Glc) ₆	C ₃₆ H ₆₂ O ₃₁	m/z 1013	m/z 1015

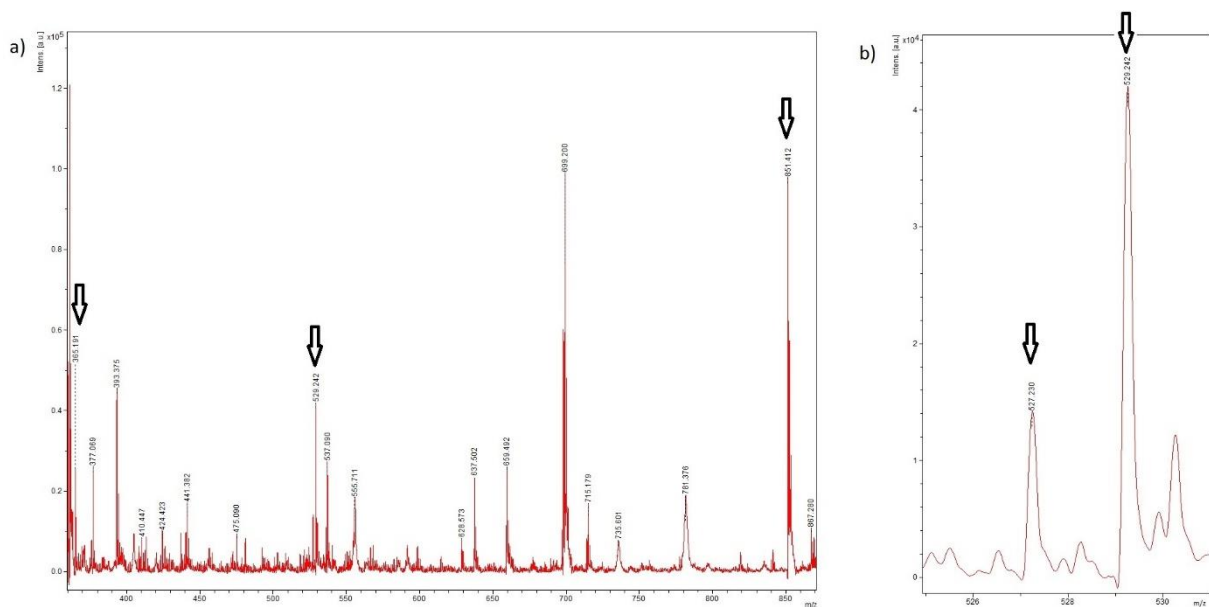
I et tidligere kontrollforsøk med hydrolyse av (GlcNAc)₅ i H₂¹⁸O ble det ikke observert ikke-enzymatisk inkorporering av ¹⁸O ved den reduserende enden (Eide et al. 2013a). Som beskrevet i delkapittel 3.6 ble hydrolyse i H₂¹⁸O brukt for å skille mellom binding i positive og negative subsepter. For *Tf*Cel5A-WT og *Tf*Cel9A-WT ble den relative prosentvise fordelingen mellom subsepte -3 → +2 og -2 → +3 før hydrolyse bestemt. Dette ble gjort ved å sammenligne intensiteten til m/z = 527 og m/z = 529 i alle spektrene der begge disse toppene

ble detektert. For *TfCel9A*-WT ble også både $m/z=527$ og $m/z=529$ observert, men $m/z=691$ var den dominerende toppen og det ble ikke gjort noen tilsvarende beregning. Det ble heller ikke bestemt noen fordeling i subsete $-4 \rightarrow +1$ versus $-3 \rightarrow +2$ for *TfCel9A*. Dette fordi de aktuelle toppene $m/z=529$ og $m/z=691$ ikke har kvantitativt sammenlignbare intensiteter.

4.4.1 Initiell hydrolyse av $(\text{Glc})_x$ med *TfCel5A*-WT

Et MALDI-TOF-MS spekter fra hydrolyse av $(\text{Glc})_5$ i H_2^{18}O med *TfCel5A*-WT er vist i Figur 4.4.1. Analysene viser binding i subsete $-3 \rightarrow +2$ i $75 \pm 2\%$ av tilfellene.

Hydrolyse av $(\text{Glc})_4$ (i H_2O) viser binding $-2 \rightarrow +2$, men det dannes også noe trimer. Ved hydrolyse av $(\text{Glc})_6$ er det binding $-3 \rightarrow +3$, som dominerer, med noe binding $-4 \rightarrow +2$. Det er også tegn til $(\text{Glc})_4$ med ^{16}O fra binding $-2 \rightarrow +4$.

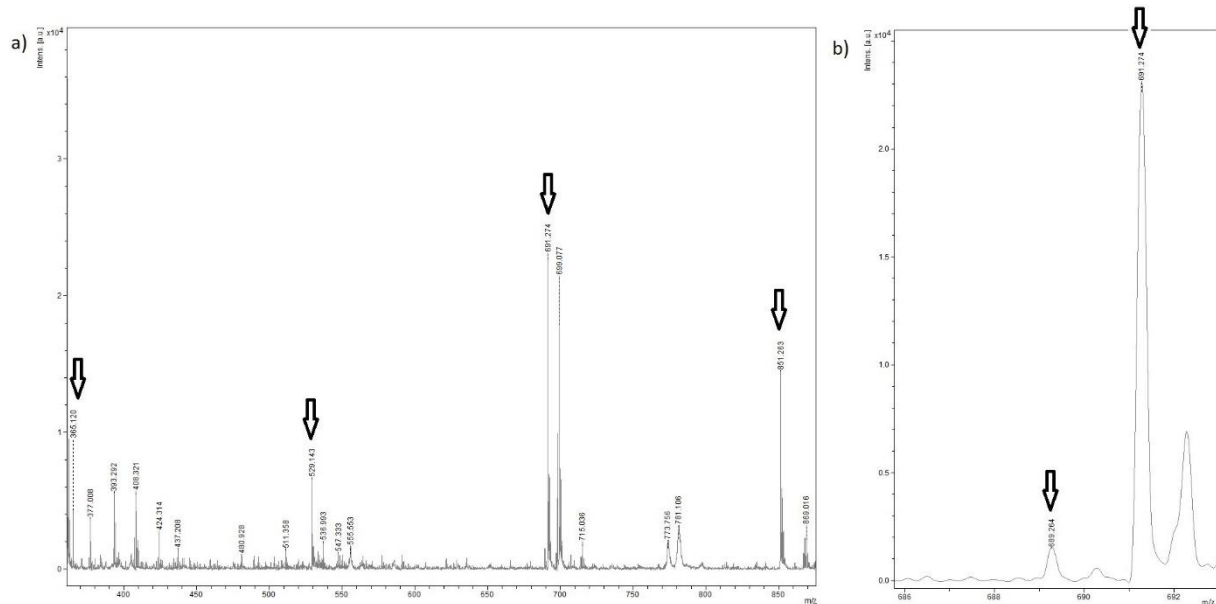


Figur 4.4.1 Spekter fra MALDI-TOF-MS analyse etter hydrolyse av $(\text{Glc})_5$ med *TfCel5A*-WT. a) Utsnitt av spekteret. Pilene indikerer fra venstre hhv $(\text{Glc})_2$, $(\text{Glc})_3$ og $(\text{Glc})_5$. b) Viser produktet $(\text{Glc})_3$ med og uten ^{18}O , toppene $m/z=527$ og $m/z=529$.

4.4.2 Initiell hydrolyse av $(\text{Glc})_x$ med *TfCel9A*-WT

Hydrolyse av $(\text{Glc})_5$ og $(\text{Glc})_6$ med *TfCel9A*-WT ga en annen produktfordeling enn de 2 andre cellulasetype. *TfCel9A*-WT hadde også lav aktivitet på $(\text{Glc})_4$ sammenlignet med $(\text{Glc})_5$ og $(\text{Glc})_6$. Et MALDI-TOF-MS spekter fra hydrolyse av $(\text{Glc})_5$ i H_2^{18}O med *TfCel9A*-WT er vist i Figur 4.4.2. Toppen ved $m/z=691$ viser at binding $-4 \rightarrow +1$ dominerer. Spekteret viser

også noe binding $-3 \rightarrow +2$. Hydrolyse av $(\text{Glc})_4$ viser binding $-2 \rightarrow +2$, men det dannes også noe trimer. Spektre etter hydrolyse av $(\text{Glc})_6$ viser binding $-4 \rightarrow +2$. Det dannes også trimer og spor av pentamer ($-5 \rightarrow +1$).

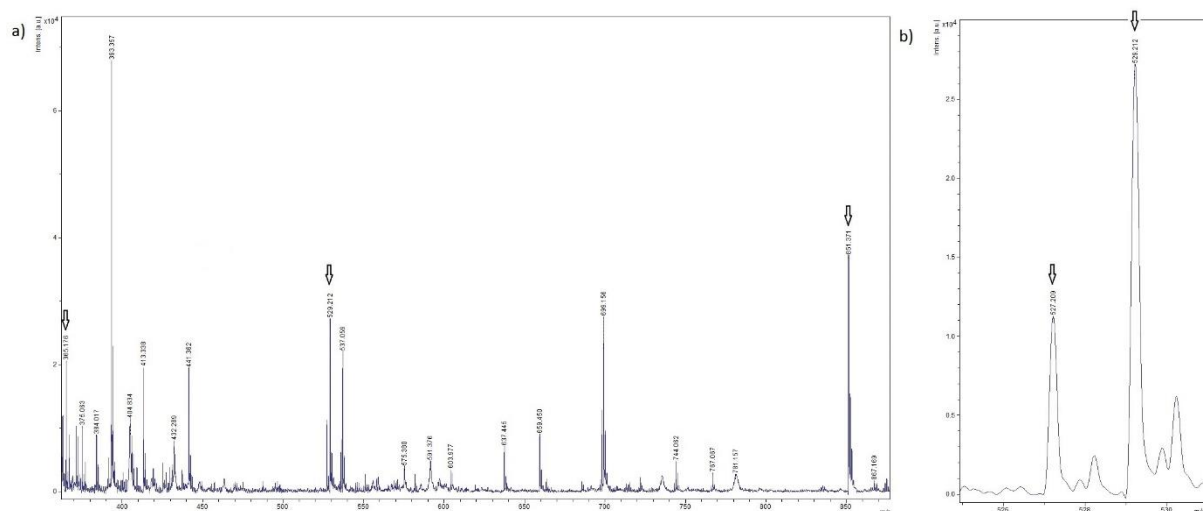


Figur 4.4.2 Spektre fra MALDI-TOF-MS analyse etter hydrolyse av $(\text{Glc})_5$ med *TfCel9A*- WT. a) Utsnitt av spekteret. Pilene indikerer fra venstre hhv $(\text{Glc})_2$, $(\text{Glc})_3$, $(\text{Glc})_4$ og $(\text{Glc})_5$. b) Viser det dominerende produktet $(\text{Glc})_4$ med og uten ^{18}O , toppene $m/z = 689$ og $m/z = 691$.

4.4.3 Initiell hydrolyse av $(\text{Glc})_x$ med *TfCel48A*-WT

Hydrolyse av $(\text{Glc})_5$ i H_2^{18}O med *TfCel48A*-WT viser binding $-3 \rightarrow +2$ i $69 \pm 1\%$ av tilfellene. Et MALDI-TOF-MS spekter fra hydrolysen er vist i Figur 4.4.3.

Hydrolyse av $(\text{Glc})_4$ viser kun binding $-2 \rightarrow +2$. Ved hydrolyse av $(\text{Glc})_6$ er det binding $-3 \rightarrow +3$ som dominerer. Det dannes i tillegg tetramer og dimer, fra binding $-4 \rightarrow +2$. Spektrene viser også en topp med $m/z = 367$, det er derimot ikke noen synlig topp ved $m/z = 689$ som ville vært forventet ved binding i subsete $-2 \rightarrow +4$. Dette tyder på at $(\text{Glc})_4$ med ^{18}O er blitt spaltet videre til to $(\text{Glc})_2$. Begge disse dimerene har ^{18}O inkorporert ved den reduserende enden.



Figur 4.4.3 Spekter fra MALDI-TOF-MS analyse etter hydrolyse av $(\text{Glc})_5$ med *TfCel48A*- WT. a) Utsnitt av spekteret. Pilene indikerer fra venstre hhv $(\text{Glc})_2$, $(\text{Glc})_3$ og $(\text{Glc})_5$. b) Viser produktet $(\text{Glc})_3$ med og uten ^{18}O , toppene $m/z=527$ og $m/z=529$.

4.4.4 Initiell hydrolyse av $(\text{Glc})_x$ i H_2^{18}O – samlede resultater

Tabell 4.4.2 viser en oversikt over de observerte bindingsmåtene ved hydrolyse av $(\text{Glc})_4$, $(\text{Glc})_5$ og $(\text{Glc})_6$ med *TfCel5A*-WT, *TfCel9A*-WT og *TfCel48A*-WT.

Tabell 4.4.2 Oversikt over observerte bindingsmåter ved initiell hydrolyse av $(\text{Glc})_x$ med *TfCel5A*-WT, *TfCel9A*-WT og *TfCel48A*-WT.

Enzym	$(\text{Glc})_4^b$	$(\text{Glc})_5$	$(\text{Glc})_6$
<i>TfCel5A</i>	$-2 \rightarrow +2$	$-3 \rightarrow +2^a$ ($75 \pm 2\%$)	$-3 \rightarrow +3^a$
	$-3 \rightarrow +1/ -1 \rightarrow +3$	$-2 \rightarrow +3$	$-4 \rightarrow +2$
			$-2 \rightarrow +4$
<i>TfCel9A</i>	$-2 \rightarrow +2$	$-4 \rightarrow +1^a$	$-4 \rightarrow +2^a$
	$-3 \rightarrow +1/ -1 \rightarrow +3$	$-3 \rightarrow +2$	$-3 \rightarrow +3$
			$-5 \rightarrow 1$
<i>TfCel48A</i>	$-2 \rightarrow +2$	$-3 \rightarrow +2^a$ ($69 \pm 2\%$)	$-3 \rightarrow +3^a$
		$-2 \rightarrow +3$	$-4 \rightarrow +2$

^a Dominerende bindingsmåte ^b Hydrolyse ble gjort i H_2^{16}O .

5 Diskusjon

I denne oppgaven ble det utført forsøk med binding av $(\text{Glc})_x$ til tre ulike cellulaser fra *T.fusca*. Målet var å undersøke om de termodynamiske signaturene til disse bindingsreaksjonene og initiell hydrolyse kan relateres til enzymenes ulike egenskaper og funksjonalitet, herunder grad av prosessivitet, direksjonalitet, endo- eller eksoaktiv virkningsmåte, og topologi i det aktive setet.

TfCel5A, *TfCel9A* og *TfCel48A* er karakterisert som henholdsvis ikke-prosessiv endoaktiv, prosessiv endoaktiv og prosessiv eksoaktiv. I en studie av Payne et al. (2013) ble det foreslått en matematisk modell som direkte kobler iboende prosessivitet (P^{Intr}) og bindingsfrienergi ΔG° . Den foreslåtte modellen er vist i likning. 5.1.

$$\frac{\Delta G_b^\circ}{RT} = \ln\left(\frac{P^{\text{Intr}} \cdot k_{\text{on}}}{k_{\text{cat}}}\right) \quad (5.1)$$

R er den universelle gasskonstanten ($1,987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T er temperaturen i Kelvin (K), k_{on} er hastighetskonstanten for assosiasjon og k_{cat} er den katalytiske hastighetskonstanten. I studien ble hypotesen testet ved å beregne endringen i Gibbs frienergi med FEP/ λ -REMD molecular dynamics for binding av en cello-oligomer med ni glukoseenheter i det aktive setet til fem cellulaser fra GH-familie 7. Bidraget fra de substratbindende subsetene (-7 til -1) ble estimert ved å beregne endringen i Gibbs frienergi for binding av en celloheptamer til *Cel7A* fra *Tricoderma reesei* (Payne et al. 2013).

Med bakgrunn i denne hypotesen er det interessant å sammenligne de eksperimentelt bestemte ΔG_r° - verdiene fra ITC-forsøk med tidligere publiserte prosessivitetsverdier for *TfCel5A*, *TfCel9A* og *TfCel48A*.

5.1 Initiell hydrolyse av $(\text{Glc})_x$ i H_2^{18}O

Resultatene fra initiell hydrolyse av $(\text{Glc})_x$ i H_2^{18}O gir informasjon om substratposisjonering før hydrolyse i det aktive setet til *TfCel5A*, *TfCel9A* og *TfCel48A*. Dette kan gi informasjon om hvilke subseter i det aktive setet som har de sterkeste interaksjonene med substratet. I tillegg gir det et innblikk i forholdet mellom substratbindende og produktbindende subseter.

For *TfCel9A* dominerer binding i subsete $-4 \rightarrow +1$ og $-4 \rightarrow +2$ ved hydrolyse av henholdsvis $(\text{Glc})_5$ og $(\text{Glc})_6$. Resultatene er i overensstemmelse med observert krystallstruktur der mulighet for binding til et -5 subsete blokkeres av en loop i den substratbindende kløfta. De

støtter også den foreslåtte mekanismen der *TfCel9A* beveger seg prosessivt fra den ikke-reduserende enden, mot den reduserende enden, med hovedproduktet (Glc)₄ (Sakon et al. 1997). Ifølge denne mekanismen er de negative subsetene (-4 til -1) produktbindende subseter. Det er også i andre studier observert at *TfCel9A* kløyver (Glc)₅ i (Glc) + (Glc)₄ og i tillegg (Glc)₂ + (Glc)₃, der (Glc) og (Glc)₂ kommer fra den reduserende enden (Barr et al. 1996). Videre tyder resultatene fra denne oppgaven på at *TfCel9A* har veldig lav aktivitet på (Glc)₄. Det ble ved hydrolyse av (Glc)₄ benyttet 200 ganger høyere konsentrasjon enn ved hydrolyse av (Glc)₅ og (Glc)₆ (5 μM versus 25 nM).

Krystallstrukturer av cellulaser fra GH- familie 48 viser ni subseter nummerert fra -7 til +2 (Guimarães et al. 2002; Parsiegla et al. 2008). *TfCel48A* angriper substratet fra den reduserende enden, og subsete +1 og +2 er dermed produktbindende subseter. Resultatene i denne oppgaven tyder på at binding i subsete -3 → +2 dominerer ved hydrolyse av (Glc)₅. Dette er i overensstemmelse med at substratbinding gir to sukkerenheter i produktbindende subseter, hvilket vil være optimalt for prosessiv hydrolyse.

Ved hydrolyse av (Glc)₆ med *TfCel48A* dominerer binding i subseter -3 → +3. Affinitet i subsete +3 har også blitt observert for den prosessive glykoksidhydrolasen kitinase A fra *S. marcescens* (*SmChiA*). Dette enzymet er aktivt på kitin og har samme direksjonalitet som *TfCel48A*. Denne affiniteten i subsete +3 har blitt relatert til en økt evne til å "dra" produktet, dimeren, ut av det aktive setet (Norberg et al. 2011). Tendensen ved hydrolyse av (Glc)₆ er allikevel posisjonering mot de substratbindende subsetene. Spekterne fra MALDI-TOF-MS viser binding -4 → +2, uten tegn til binding i subsete -2 → +4. I tillegg spaltes tetrameren fra binding -4 → +2 videre til to dimerer. Det er vanskelig å avgjøre om dette er på grunn av prosessive kløyvinger. Det er også mulig at (Glc)₄ først dissosierer fra de substratbindende subsetene, for så å binde til et nytt enzym for en ny hydrolyse.

TfCel48A og den endoaktive *TfCel5A* har relativt lik substratposisjonering. Unntaket er ved hydrolyse av (Glc)₄ (i H₂¹⁶O) der MALDI-TOF-MS spektrene viste både dimer og trimer for begge de endoaktive enzymene *TfCel5A* og *TfCel9A*. Hydrolyse av (Glc)₄ med *TfCel48A* ga kun dimer.

5.2 Termodynamiske signaturer for binding av (Glc)₆ til *TfCel5A*, *TfCel9A* og *TfCel48A*

I denne oppgaven ble termodynamiske signaturer for binding av (Glc)₆ til tre ulike cellulaser fra *T.fusca* bestemt ved hjelp av ITC. *TfCel5A*, *TfCel9A* og *TfCel48A* er alle tilpasset hydrolyse av β (1 \rightarrow 4) bindingene i cellulose og det er i alle forsøkene benyttet samme substrat. Forskjellene i de termodynamiske signaturene kan derfor knyttes til ulike egenskaper for de tre enzymene. Til ITC-forsøkene har det blitt benyttet inaktive mutanter: *TfCel5A*-E356A, *TfCel9A*-E425A og *TfCel48A*-E359A. Disse vil for enkelhetens skyld bli referert til som henholdsvis *TfCel5A*, *TfCel9A* og *TfCel48A* heretter.

Tabell 4.3.1 viser at ved 30 °C og pH 6,0 har de prosessive cellulaserne *TfCel9A* og *TfCel48A* en relativt lik dissosiasjonskonstant ($K_d = 0,56 \pm 0,16 \mu\text{M}$ / $0,67 \pm 0,20 \mu\text{M}$) og dermed også lik endring bindingsfrienergi ($\Delta G_r^\circ = -8,7 \pm 0,2 \text{ kcal/mol}$ / $-8,6 \pm 0,2 \text{ kcal/mol}$). For den ikke-prosessive cellulasen *TfCel5A* er den eksperimentelt bestemte dissosiasjonskonstanten, K_d , 35-45 ganger høyere ($26 \pm 2 \mu\text{M}$). Dette gir også en mindre gunstig endring i bindingsfrienergi ($\Delta G_r^\circ = -6,4 \pm 0,1 \text{ kcal/mol}$). I *TfCel9A* og *TfCel48A* er binding av (Glc)₆ drevet av en gunstig endring i både entalpi og entropi, og i begge tilfellene kommer det største bidraget fra endringen i entropi. For *TfCel5A* er bindingen av (Glc)₆ i det aktive setet kun entalpisk drevet ved 30 °C. Endringen i entropi er $\sim 0 \text{ kcal/mol}$, der det positive bidraget fra endring i solvatiseringsentropi utlignes av den negative endringen i konformasjonsentropi.

I en studie av Hamre et al. (2015a) ble termodynamiske signaturer for binding av (GlcNAc)₆ til kitinase A, B og C (*SmChiA*, *SmChiB* og *SmChiC*) fra *S. marcescens* undersøkt eksperimentelt med ITC. I tillegg ble endringen i bindingsfrienergi beregnet med FEP/ λ -REMD molecular dynamics. Resultatene viste at det i noen tilfeller var store forskjeller på de eksperimentelle og de beregnede verdiene. En foreslått forklaring var at ITC-verdiene reflekterer et gjennomsnitt av ulike bindingsmåter. Det er sannsynlig at dette også er tilfellet for de eksperimentelt bestemte verdiene i denne oppgaven. Resultatene fra initiell hydrolyse av (Glc)₆ tyder på minst to ulike alternativer for posisjonering av (Glc)₆ i det aktive setet hos *TfCel5A*-WT, *TfCel9A*-WT og *TfCel48A*-WT. Dette kan også være tilfellet for de inaktive mutantene som ble benyttet i ITC-forsøkene. Det er derimot viktig å understreke at substratposisjoneringen kan være noe ulik i de inaktive mutantene og villtype på grunn av mutasjonen fra glutamin til alanin. Glutamin har en større sidekjede enn alanin, i tillegg mangler alanin mulighet for hydrogenbindinger med andre residuer og substratet.

Vann spiller en viktig rolle i alle biologiske reaksjoner, også bindingsreaksjoner.

Vannmolekyler frigjøres fra overflaten til protein og ligand ved binding, og det dannes direkte interaksjoner. Om bindingsreaksjonen er gunstig, nøytral eller ugunstig avgjøres av balansen mellom de direkte interaksjonene som dannes og løsningsinteraksjonene som tapes. Det har blitt vist at selv om entropien øker når et vannmolekyl frigjøres, kan gunstig endring i entalpi favorisere et bundet vannmolekyl, fordi dette stabiliserer binding mellom protein og ligand (Li & Lazaridis 2005). Den prosessive og endoaktive *TfCel9A* har den mest gunstige solvatiseringsentropien av de tre cellulasete med $\Delta S_{\text{solv}}^{\circ} = 57,1 \pm 5,3$ (beregnet fra likning 1.5.7), etterfulgt av endoaktive *TfCel5A* ($\Delta S_{\text{solv}}^{\circ} = 50,6 \pm 4,3$ cal/mol). Den eksoaktive *TfCel48A* har minst gunstig solvatiseringsentropi ($\Delta S_{\text{solv}}^{\circ} = 42,2 \pm 5,9$ cal/mol).

Bindingsenergier for vannmolekyler bundet til proteiner har blitt kartlagt av Amadasi et al. (2006). Resultatene fra denne studien viser en bindingsenergi på $-0,38$ kcal/mol og $-0,04$ kcal/mol for vannmolekyler i henholdsvis første og andre hydreringslag rundt proteinet. I det aktive setet er tilsvarende energi $-0,45$ kcal/mol, i et hulrom (cavity) $-0,55$ kcal/mol og for «begravede» vannmolekyler er bindingsenergien $-0,56$ kcal/mol. Bindingsenergien for vannmolekyler som er i samtidig kontakt med protein og ligand er $-1,13$ kcal/mol. Endringen i solvatiseringsentropi er derfor ikke kun avhengig av antall vannmolekyler som frigjøres i bindingsreaksjonen, men også den opprinnelige plasseringen til dette vannmolekylet.

Gunstig endring i solvatiseringsentropi har tidligere blitt koblet til endoaktivitet i *SmChiC*. Det ble foreslått at åpen substratbindende kløft frigjør flere vannmolekyler ved binding av inhibatoren allosamidin enn de substratbindende kløftene i eksoenzymene *SmChiA* og *SmChiB* (Baban et al. 2010). Human kitotriosidase (HCHT) har også en relativt åpen substratbindende kløft, og sammenlignbar endring i solvatiseringsentropi med *SmChiC* ved binding av allosamidin (Eide et al. 2013b). Resultatene i denne oppgaven viser, i tråd med observasjonene til Baban et al. (2010), mest gunstig endring i solvatiseringsentropi for de endoaktive cellulasete *TfCel5A* og *TfCel9A*. Disse cellulasete har åpne og grunne substratbindende kløfter. *TfCel48A* har det aktive setet i en tunnel og lavere endring i solvatiseringsentropi. Beregningene gjort av Hamre et al. (2015a) viste derimot at binding av $(\text{GlcNAc})_6$ i de eksoprosessive kitinasene *SmChiA* og *SmChiB* frigjorde flere vannmolekyler enn tilsvarende binding i *SmChiC*. Dette ble satt i sammenheng med dypere substratbindende kløfter med større overflate. Studien viste også at solvatiseringsentropien for binding av $(\text{GlcNAc})_6$ er mer gunstig i *SmChiA*, enn i *SmChiB* og *SmChiC*. Det er verdt å nevne at selv om *SmChiA* er karakterisert som eksoprosessiv, har den vist endoaktivitet både på kitin og det

vannløselige substratet kitosan (Brurberg et al. 1996; Sikorski et al. 2006). Dermed kan ikke bastante konklusjoner trekkes.

Bidraget fra endring i konformasjonsentropi er negativt for alle tre cellulasetype i denne oppgaven. Dette tyder på lavere fleksibilitet i proteinet etter binding av ligand. Den største straffen er ved binding av (Glc)₆ til *TfCel5A*, fulgt av *TfCel9A* og til slutt *TfCel48A*.

5.2.1 Kobling mellom prosessivitet og bindingsfrienergi

Den foreslåtte koblingen mellom prosessivitet og bindingsfrienergi (likning 5.1) tilsier at en mer gunstig ΔG_r° har en sammenheng med høyere grad av prosessivitet. Verdier for iboende prosessivitet er ikke tilgjengelig for *TfCel5A*, *TfCel9A* og *TfCel48A*. Det er derfor ikke mulig å gjøre en kvantitativ undersøkelse av forholdet mellom prosessivitet og endring i bindingsfrienergi. Det er imidlertid mulig å undersøke om resultatene fra denne oppgaven indikerer en kvalitativ sammenheng.

En tidligere studie av Irwin et al. (1993) har undersøkt grad av prosessivitet for en rekke cellulaser fra *T.fusca* inkludert *TfCel5A*, *TfCel9A* og *TfCel48A*. I studien ble ratioen av løselige over uløselige reduserende ender ved inkubasjon på filterpapir bestemt, se Tabell 5.2.1. Verdiene viser at *TfCel48A* er en prosessiv eksocellulase med en ratio av løselig over uløselige ender på 23,4. Tilsvarende er *TfCel5A* ikke-prosessiv med en ratio på 2,2. For *TfCel9A* er ratioen 7,0 og denne er blitt karakterisert som en prosessiv endocellulase. Verdiene i Tabell 5.2.1 kan ikke sees som absolutte prosessivitetsverdier, og særlig er det vanskelig å sammenligne verdien for den endoprosessive *TfCel9A* med den eksoprosessive *TfCel48A*.

Tabell 5.2.1 Dissosiasjonskonstant (K_d), endring i bindingsfrienergi (ΔG_r°) og ratio av løselige/uløselige reduserende ender for *TfCel5A*, *TfCel9A*, *TfCel48A* og *Cel7A* fra *T.reesei*.

Enzym	K_d^a	$\Delta G_r^{\circ b}$	Ratio løselig/uløselig reduserende ender ^c
<i>TfCel5A</i>	26 ± 2	-6,4 ± 0,0	2,2
<i>TfCel9A</i>	0,56 ± 0,16	-8,7 ± 0,2	7,0
<i>TfCel48A</i>	0,67 ± 0,20	-8,6 ± 0,2	23,4
<i>Cel7A (CBHI)</i>	0,87 ^d	-8,4 ^d	22,0

^a μM ^b kcal/mol ^c fra Irwin et al. (1993) ^d fra Colussi et al. (2015)

De eksperimentelt bestemte verdiene fra ITC-forsøkene viser i samsvar med hypotesen at enzymet med lavest prosessivitet, *TfCel5A*, har den høyeste dissosiasjonskonstanten ($K_d = 26 \pm 2 \mu\text{M}$) Denne har dermed også den minst negative endringen i bindingsfrienergi ($\Delta G_r^\circ = -6,4 \text{ kcal/mol}$). *TfCel48A* og *TfCel9A* har lik endring i bindingsfrienergi, der ΔG_r° er henholdsvis $-8,6 / -8,7 \text{ kcal/mol}$, til tross for store ulikheter i ratioen av løselig/uløselige ender. Studien utført av Irwin et al. (1993) inkluderte også *Cel7A* fra *T.reesei*. Dette er i likhet med *TfCel48A* en eksoprosessiv cellulase som angriper substratet fra den reduserende enden. Verdiene i Tabell 5.2.1 viser at ratioen av løselige/uløselige reduserende ender er relativt lik for de to cellulasetype og de har samtidig en relativt lik endring i bindingsfrienergi (Colussi et al. 2015; Irwin et al. 1993).

Studien av Hamre et al. (2015a) undersøkte også sammenhengen mellom bindingsfrienergi og prosessivitet for *SmChiA*, *SmChiB* og *SmChiC*. Det ble vist en sammenheng mellom de teoretisk beregnede ΔG° og tidligere publiserte P^{app} - verdier for de tre kitinasene (Hamre et al. 2014). De eksperimentelt bestemte ΔG° - verdiene viste ikke den samme korrelasjonen (Hamre et al. 2015a). Derimot er det vist både eksperimentelt og ved teoretiske beregninger at det er en klar korrelasjon mellom bindingsfrienergi og grad av prosessivitet når *SmChiA* og *SmChiB* sammenliknes med mutanter med redusert prosessiv evne (Hamre et al. 2015b; Jana et al. 2016). Resultatene fra denne oppgaven indikerer også en kvalitativ korrelasjon mellom bindingsfrienergi og prosessivitet, der den ikke-prosessive cellulasetype *TfCel5A* har mindre gunstig bindingsfrienergi enn de prosessive cellulasetypene *TfCel9A* og *TfCel48A*..

5.3 Oppsummering og videre arbeid

Resultatene fra denne oppgaven viser ulikheter i de termodynamiske signaturene for binding av substrat til tre cellulaser fra *T.fusca*. Den ikke-prosessive cellulase *TfCel5A* har en mindre gunstig endring i bindingsfrienergi enn de prosessive cellulase *TfCel9A* og *TfCel48A*.

Et mål for det videre arbeidet vil være å bestemme iboende prosessivitetsverdier for *TfCel5A*, *TfCel9A* og *TfCel48A*.

Det kan også være interessant å undersøke eventuelle likheter og forskjeller med andre cellulaser fra *T.fusca*. Det er satt i gang arbeid med å bestemme termodynamiske signaturer for binding av (Glc)₆ til endocellulasene *TfCel6A* og *TfCel9B*.

Mutasjoner i det aktive setet til *SmChiA* gjort av Hamre et al. (2015b) viste reduksjon i både bindingsfrienergi og prosessivitet i forhold til villttypen. Tidligere studier har identifisert flere residuer som er viktige for prosessivitet i *TfCel9A* og *TfCel48A* (Kostylev et al. 2014; Li et al. 2007). Det kan derfor være interessant å utføre seterettet mutagenese av utvalgte residuer og bestemme de termodynamiske signaturene for binding av substrat til disse mutantene.

6 Referanser

- AgilentTechnologies. (2015). *QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit*. Tilgjengelig fra: <http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/200523.pdf>.
- AgilentTechnologies. (2016). *QuickChange Primer Design*. Tilgjengelig fra: http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp?&_requestid=1183641 (lest 18-03).
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2015). *Molecular Biology of the Cell* 6th utg. New York Garland Science.
- Amadasi, A., Spyraakis, F., Cozzini, P., Abraham, D. J., Kellogg, G. E. & Mozzarelli, A. (2006). Mapping the energetics of water–protein and water–ligand interactions with the “natural” HINT forcefield: predictive tools for characterizing the roles of water in biomolecules. *J. Mol. Biol.*, 358 (1): 289-309.
- Baban, J., Fjeld, S., Sakuda, S., Eijsink, V. G. H. & Sørli, M. (2010). The roles of three *Serratia marcescens* chitinases in chitin conversion are reflected indifferent thermodynamic signatures of allosamidin binding. *J. Phys. Chem. B*, 114 (18): 6144-6149.
- Baker, B. M. & Murphy, K. P. (1997). Dissecting the energetics of a protein-protein interaction: the binding of ovomucoid third domain to elastase1. *J. Mol. Biol.*, 268 (2): 557-569.
- Baldwin, R. L. (1986). Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 (21): 8069-8072.
- Barr, B. K., Hsieh, Y. L., Ganem, B. & Wilson, D. B. (1996). Identification of two functionally different classes of exocellulases. *Biochemistry*, 35 (2): 586-592.
- Beckham, G. T., Matthews, J. F., Peters, B., Bomble, Y. J., Himmel, M. E. & Crowley, M. F. (2011). Molecular-level origins of biomass recalcitrance: Decrystallization free energies for four common cellulose polymorphs. *J. Phys. Chem. B*, 115 (14): 4118-4127.
- Beckham, G. T., Ståhlberg, J., Knott, B. C., Himmel, M. E., Crowley, M. F., Sandgren, M., Sørli, M. & Payne, C. M. (2014). Towards a molecular-level theory of carbohydrate processivity in glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 27: 96-106.
- Brown, R. M. (2004). Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century? *J. Polym. Sci. A. Polym. Chem.*, 42 (3): 487-495.
- Brurberg, M. B., Nes, I. F. & Eijsink, V. G. H. (1996). Comparative studies of chitinases A and B from *Serratia marcescens*. *Microbiology*, 142 (7): 1581-1589.
- Colussi, F., Sørensen, T. H., Alasepp, K., Kari, J., Cruys-Bagger, N., Windahl, M. S., Olsen, J. P., Borch, K. & Westh, P. (2015). Probing substrate interactions in the active tunnel of a catalytically deficient cellobiohydrolase (Cel7). *J. Biol. Chem.*, 290 (4): 2444-2454.
- Cooper, A., Johnson, C. M., Lakey, J. H. & Nöllmann, M. (2001). Heat does not come in different colours: entropy–enthalpy compensation, free energy windows, quantum confinement,

- pressure perturbation calorimetry, solvation and the multiple causes of heat capacity effects in biomolecular interactions. *Biophys. Chem.*, 93 (2–3): 215-230.
- 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.
- Dunitz, J. D. (1995). Win some, lose some: enthalpy-entropy compensation in weak intermolecular interactions. *Chem. Biol.*, 2 (11): 709-712.
- Eide, K. B., Lindbom, A. R., Eijsink, V. G. H., Norberg, A. L. & Sørli, M. (2013a). Analysis of productive binding modes in the human chitotriosidase. *FEBS Lett.*, 587 (21): 3508-3513.
- Eide, K. B., Lundmark, S. T., Sakuda, S. & Sørli, M. (2013b). Thermodynamic analysis of allosamidin binding to the human chitotriosidase. *Thermochim. Acta*, 565: 146-150.
- EMDBiosciences. (2005). *Novagen pET System Manual* Tilgjengelig fra: http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Novagen_petsystem.pdf (lest 30-03).
- Forsberg, Z., Mackenzie, A. K., Sørli, M., Røhr, Å. K., Helland, R., Arvai, A. S., Vaaje-Kolstad, G. & Eijsink, V. G. H. (2014). Structural and functional characterization of a conserved pair of bacterial cellulose-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111 (23): 8446-8451.
- Freire, E. (2004). Isothermal titration calorimetry: controlling binding forces in lead optimization. *Drug Disc. Today Technol.*, 1 (3): 295-299.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. & Bairoch, A. (2005). *Protein identification and analysis tools on the ExPASy server*: Springer.
- GEHealthcare. (2006). *Hydrophobic interaction and reversed phase chromatography principles and methods*. Tilgjengelig fra: https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1337001365328/litdoc11001269_20140518225749.pdf (lest 22-03).
- GEHealthcare. (2014). *Size exclusion chromatography principles and methods*. Tilgjengelig fra: https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314807262343/litdoc18102218_20141208003707.pdf (lest 23-03).
- GEHealthcare. (2016). *Ion exchange chromatography principles and methods*. Tilgjengelig fra: https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1454593346687/litdoc11000421_20160204144201.pdf (lest 22-03).
- GenScript. (2016). *pET-22b*. Tilgjengelig fra: <http://www.genscript.com/gfiles/vector-map/bacteria/pET-22b.pdf> (lest 25-03).
- Guimarães, B. G., Souchon, H., Lytle, B. L., David Wu, J. H. & Alzari, P. M. (2002). The crystal structure and catalytic mechanism of cellobiohydrolase CelS, the majorenzymatic component of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *J. Mol. Biol.*, 320 (3): 587-596.

- Hamre, A. G., Lorentzen, S. B., Våljamäe, P. & Sørлие, M. (2014). Enzyme processivity changes with the extent of recalcitrant polysaccharide degradation. *FEBS Lett.*, 588 (24): 4620-4624.
- Hamre, A. G., Jana, S., Holen, M. M., Mathiesen, G., Våljamäe, P., Payne, C. M. & Sørлие, M. (2015a). Thermodynamic relationships with processivity in *Serratia marcescens* family 18 chitinases. *J. Phys. Chem. B*, 119 (30): 9601-9613.
- Hamre, A. G., Jana, S., Reppert, N. K., Payne, C. M. & Sørлие, M. (2015b). Processivity, substrate positioning, and binding: The role of polar residues in a family 18 glycoside hydrolase. *Biochemistry*, 54 (49): 7292-7306.
- Hart, D. J., Hadad, C. M., Craine, L. E. & Hart, H. (2012). *Organic chemistry : a brief course*. 13th ed. utg. Belmont, Calif.: Brooks/Cole Cengage Learning.
- Hekmat, O., Lo Leggio, L., Rosengren, A., Kamarauskaite, J., Kolenova, K. & Stålbrand, H. (2010). Rational engineering of mannosyl binding in the distal glycone subsites of *Cellulomonas fimi* endo- β -1,4-mannanase: Mannosyl binding promoted at subsite -2 and demoted at subsite -3. *Biochemistry*, 49 (23): 4884-4896.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, 280 (2): 309-316.
- Himmel, M. E., Ding, S. Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W. & Foust, T. D. (2007). Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 315 (5813): 804-807.
- Horn, S. J., Sikorski, P., Cederkvist, J. B., Vaaje-Kolstad, G., Sørлие, M., Synstad, B., Vriend, G., Vårum, K. M. & Eijsink, V. G. H. (2006). Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103 (48): 18089-18094.
- Irwin, D. C., Spezio, M., Walker, L. P. & Wilson, D. B. (1993). Activity studies of eight purified cellulases: Specificity, synergism, and binding domain effects. *Biotechnol. Bioeng.*, 42 (8): 1002-1013.
- Irwin, D. C., Shin, D. H., Zhang, S., Barr, B. K., Sakon, J., Karplus, P. A. & Wilson, D. B. (1998). Roles of the catalytic domain and two cellulose binding domains of *Thermomonospora fusca* E4 in cellulose hydrolysis. *J. Bacteriol.*, 180 (7): 1709-1714.
- Irwin, D. C., Zhang, S. & Wilson, D. B. (2000). Cloning, expression and characterization of a Family 48 exocellulase, Cel48A, from *Thermobifida fusca*. *FEBS J.*, 267 (16): 4988-4997.
- Jana, S., Hamre, A. G., Wildberger, P., Holen, M. M., Eijsink, V. G. H., Beckham, G. T., Sørлие, M. & Payne, C. M. (2016). Aromatic-mediated carbohydrate recognition in processive *Serratia marcescens* chitinases. *J. Phys. Chem. B*, 120 (7): 1236-1249.
- Kostylev, M. & Wilson, D. B. (2011). Determination of the catalytic base in family 48 glycosyl hydrolases. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77 (17): 6274-6276.

- Kostylev, M., Alahuhta, M., Chen, M., Brunecky, R., Himmel, M. E., Lunin, V. V., Brady, J. & Wilson, D. B. (2014). Cel48A from *Thermobifida fusca*: Structure and site directed mutagenesis of key residues. *Biotechnol. Bioeng.*, 111 (4): 664-673.
- Kurašin, M. & Väljamäe, P. (2011). Processivity of cellobiohydrolases is limited by the substrate. *J. Biol. Chem.*, 286 (1): 169-177.
- Kurašin, M., Kuusk, S., Kuusk, P., Sørli, M. & Väljamäe, P. (2015). Slow off-rates and strong product binding are required for processivity and efficient degradation of recalcitrant chitin by family 18 chitinases. *J. Biol. Chem.*, 290 (48): 29074-29085.
- Lao, G., Ghangas, G. S., Jung, E. D. & Wilson, D. B. (1991). DNA sequences of three beta-1, 4-endoglucanase genes from *Thermomonospora fusca*. *J. Bacteriol.*, 173 (11): 3397-3407.
- Leavitt, S. & Freire, E. (2001). Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 11 (5): 560-566.
- Lesk, A. M. (2010). *Introduction to protein science : architecture, function, and genomics*. 2nd ed. utg. Oxford: Oxford University Press.
- Li, Y., Irwin, D. C. & Wilson, D. B. (2007). Processivity, substrate binding, and mechanism of cellulose hydrolysis by *Thermobifida fusca* Cel9A. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73 (10): 3156.
- Li, Z. & Lazaridis, T. (2005). The effect of water displacement on binding thermodynamics: Concanavalin A. *J. Phys. Chem. B*, 109 (1): 662-670.
- LifeTechnologies. (2010). *BL21 Star™(DE3) One Shot®BL21 Star™(DE3)pLysS OneShot®Chemically Competent Cells* Tilgjengelig fra: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/oneshotbl21star_man.pdf (lest 16-02).
- Lombard, V., Ramulu, H. G., Drula, E., Coutinho, P. M. & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.*, 42 (D1): D490-D495.
- Lykidis, A., Mavromatis, K., Ivanova, N., Anderson, I., Land, M., DiBartolo, G., Martinez, M., Lapidus, A., Lucas, S. & Copeland, A. (2007). Genome sequence and analysis of the soil cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca* YX. *J. Bacteriol.*, 189 (6): 2477-2486.
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E., Appling, D. R. & Anthony-Cahill, S. J. (2013). *Biochemistry*. 4th ed. utg. Toronto, Ont: Pearson.
- Mattilsynet. (2013). *Hva betyr E-numrene?* Tilgjengelig fra: <http://www.matportalen.no/artikler/article1408.ece/BINARY/Hva%20betyr%20e-numrene-> (lest 06-05).
- McGinnis, K. & Wilson, D. B. (1993). Disulfide arrangement and functional domains of .beta.-1,4-endoglucanase E5 from *Thermomonospora fusca*. *Biochemistry*, 32 (32): 8157-8161.
- MerckMillipore. (2016). *69049 | Pellet Paint® Co-Precipitant*. Tilgjengelig fra: https://www.merckmillipore.com/NO/en/product/Pellet-Paint-Co-Precipitant,EMD_BIO-69049-3?bd=1 (lest 16-02).

- Moraïs, S., Morag, E., Barak, Y., Goldman, D., Hadar, Y., Lamed, R., Shoham, Y., Wilson, D. B. & Bayer, E. A. (2012). Deconstruction of lignocellulose into soluble sugars by native and designer cellulosomes. *MBio*, 3 (6): e00508-12.
- Moser, F., Irwin, D., Chen, S. & Wilson, D. B. (2008). Regulation and characterization of *Thermobifida fusca* carbohydrate-binding module proteins E7 and E8. *Biotechnol. Bioeng.*, 100 (6): 1066-1077.
- Nishiyama, Y., Langan, P. & Chanzy, H. (2002). Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose I β from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *J. Am. Chem. Soc.*, 124 (31): 9074-9082.
- Nishiyama, Y., Sugiyama, J., Chanzy, H. & Langan, P. (2003). Crystal structure and hydrogen bonding system in cellulose I α from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (47): 14300-14306.
- Norberg, A. L., Dybvik, A. I., Zakariassen, H., Mormann, M., Peter-Katalinić, J., Eijsink, V. G. H. & Sørli, M. (2011). Substrate positioning in chitinase A, a processive chito-biohydrolase from *Serratia marcescens*. *FEBS Lett.*, 585 (14): 2339-2344.
- O'Sullivan, A. C. (1997). Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*, 4 (3): 173-207.
- OMEGAbio-tek. (2016). *E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit I, Q(capless) Spin*. Tilgjengelig fra: <http://omegabiotek.com/store/product/plasmid-mini-kit-1-q-spin/> (lest 22-03).
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.*, 4 (11): 2411-2423.
- Parsiegla, G., Reverbel, C., Tardif, C., Driguez, H. & Haser, R. (2008). Structures of mutants of cellulase Cel48F of *Clostridium cellulolyticum* in complex with long hemithiocellulooligosaccharides give rise to a new view of the substrate pathway during processive action. *J. Mol. Biol.*, 375 (2): 499-510.
- Payne, C. M., Jiang, W., Shirts, M. R., Himmel, M. E., Crowley, M. F. & Beckham, G. T. (2013). Glycoside hydrolase processivity is directly related to oligosaccharide binding free energy. *J. Am. Chem. Soc.*, 135 (50): 18831-18839.
- Payne, C. M., Knott, B. C., Mayes, H. B., Hansson, H., Himmel, M. E., Sandgren, M., Ståhlberg, J. & Beckham, G. T. (2015). Fungal cellulases. *Chem. Rev.*, 115 (3): 1308-1448.
- Perozzo, R., Folkers, G. & Scapozza, L. (2004). Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. *J. Recept. Signal Transduct Res.*, 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.
- Posta, K., Béki, E., Wilson, D. B., Kukolya, J. & Hornok, L. (2004). Cloning, characterization and phylogenetic relationships of cel5B, a new endoglucanase encoding gene from *Thermobifida fusca*. *J. Basic Microbiol.*, 44 (5): 383-399.

- Rye, C. S. & Withers, S. G. (2000). Glycosidase mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4 (5): 573-580.
- Sakon, J., Irwin, D., Wilson, D. B. & Karplus, P. A. (1997). Structure and mechanism of endo/exocellulase E4 from *Thermomonospora fusca*. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 4 (10): 810-818.
- Sikorski, P., Sørbotten, A., Horn, S. J., Eijsink, V. G. H. & Vårum, K. M. (2006). *Serratia marcescens* chitinases with tunnel-shaped substrate-binding grooves show endo activity and different degrees of processivity during enzymatic hydrolysis of chitosan. *Biochemistry*, 45 (31): 9566-9574.
- Sørli, M., Zakariassen, H., Norberg, A. L. & Eijsink, V. G. H. (2012). Processivity and substrate-binding in family 18 chitinases. *Biocatal. Biotransformation*, 30 (3): 353-365.
- ThermoFisherScientific. (2016a). *One Shot® BL21 Star™ (DE3) Chemically Competent E. coli*. Tilgjengelig fra: <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C601003> (lest 10-04).
- ThermoFisherScientific. (2016b). *Qubit Assay Kits*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q32853> (lest 16-03).
- Turnbull, W. B. & Daranas, A. H. (2003). On the value of c: Can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (48): 14859-14866.
- Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Horn, S. J., Liu, Z., Zhai, H., Sørli, M. & Eijsink, V. G. H. (2010). An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science*, 330 (6001): 219-222.
- Vuong, T. V. & Wilson, D. B. (2010). Glycoside hydrolases: Catalytic base/nucleophile diversity. *Biotechnol. Bioeng.*, 107 (2): 195-205.
- Williams, N. (2008). Biofuel debate deepens. *Curr. Biol.*, 18 (19): R891-R892.
- Wilson, D. B. (2004). Studies of *Thermobifida fusca* plant cell wall degrading enzymes. *Chem. Rec.*, 4: 72-82.
- Wilson, D. B. (2009). Cellulases and biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 20 (3): 295-299.
- Wilson, D. B. (2011). Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Curr. Opin. Microbiol.*, 14 (3): 259-263.
- Wilson, D. B. & Kostylev, M. (2012). Cellulase processivity. *Methods Mol. Biol.*, 908: 93-9.
- 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): 131-137.
- Zhou, W. L., Irwin, D. C., Escovar-Kousen, J. & Wilson, D. B. (2004). Kinetic studies of *Thermobifida fusca* Cel9A active site mutant enzymes. *Biochemistry*, 43 (30): 9655-9663.



Norges miljø- og biovitenskapelig universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway