



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2016 60 stp
Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Rollen til aromatiske residuer i det aktive setet under substratdegradering

The role of aromatic residues in substrate degradation

Anne-Grethe Skaarberg Strømnes
Master Kjemi

Forord

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

Jeg vil takke min hovedveileder Morten Sørli for god oppmuntring underveis, mye kunnskap og god veiledning. Mine medveiledere Kristine Bistrup Eide og Anne Grethe Hamre fortjener også en stor takk for hjelpen og støtten de har gitt meg underveis. Rianne Harmsen fortjener også en takk for bistand med NMR analyser til en hver tid. Jeg vil også takke mine medstudenter og alle i Bioorganisk forskningsgruppe for et fantastisk godt miljø på labben. Til slutt vil jeg takke kjæreste, venner og familie for støtte og oppmuntring underveis.

Innholdsfortegnelse

Forord	ii
Innholdsfortegnelse	iii
Forkortelser	vi
Sammendrag.....	ix
Abstract.....	xi
1 Introduksjon	1
1.1 Karbohydrater	1
1.2 Kitin.....	1
1.2.1 Struktur	2
1.2.2 Anvendelser	2
1.3 Glykosylhydrolaser	3
1.3.1 Klassifisering	3
1.3.2 Struktur	3
1.3.3 Virkemåte	5
1.3.4 Mekanisme.....	5
1.3.5 Transglykosylering.....	7
1.4 Kitinaser.....	8
1.4.1 Substrat-assistert mekanisme	8
1.4.2 Human chitotriosidase (HCHT)	9
1.4.3 Kitinaser fra <i>Serratia marsescens</i>	10
1.4.4 Aromatiske residuer og CBM.....	14
1.5 Enzymkinetikk	14
1.5.1 Michaelis-Menten modell.....	14
1.5.2 «Kostylew og Wilson»-modellen.....	16
1.6 Mål med oppgaven	16
2 Materialer	17
2.1 Laboratorieutstyr	17
2.2 Programvare til dataanalyse	20
2.3 Kjemikalier	20
2.4 Proteiner og substrater	22
2.5 Medier.....	23

2.6	Kit.....	24
2.7	Buffere og løsninger.....	24
3	Metoder.....	28
3.1	Oppdyrking av HCHT.....	28
3.2	Rensing av HCHT.....	28
3.2.1	Rensing med Ni-NTA Superflow agarose.....	28
3.2.2	Natrium dodecyl sulfate-polyakrylamide gel elektroforese (SDS-PAGE).....	29
3.2.3	Oppkonsentrering og bytte av buffer.....	30
3.2.4	Bestemmelse av proteinkonsentrasjon med Bradford-metoden.....	31
3.3	Nedbrytning av kitin.....	32
3.3.1	Nedbrytning av kitin for bestemmelse av enzymprosessivitet.....	32
3.3.2	Nedbrytning av kitin for bestemmelse av «apparent» k_{cat}	33
3.3.3	High performance liquid chromatography (HPLC).....	33
3.4	Nedbrytning av kitosan.....	34
3.4.1	Oppløsning av kitosan.....	35
3.4.2	Nedbrytning av kitosan.....	35
3.4.3	Prøveopparbeidelse til analyse ved hjelp av kjernemagnetisk resonans (NMR).....	36
3.4.4	Kjernemagnetisk resonans (NMR).....	36
3.4.5	Tolking av spektre fra NMR-analyse.....	37
3.4.6	Størrelsesekslusjonskromatografi (SEC).....	38
3.4.7	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS).....	38
3.5	Uttrykking av det kitinolytiske maskineriet til <i>S. marcescens</i>	39
3.5.1	Oppdyrking av bakteriestamme.....	40
3.5.2	Isolering av plasmid.....	40
3.5.3	Konsentrasjonsbestemmelse av DNA med Qubit®.....	41
3.5.4	Transformerer av plasmid inn i OneShot® TOP10 celler.....	42
3.5.5	Oppdyrking av transformanter.....	42
3.5.6	Transformerer av plasmid inn i OneShot® BL21 Star™ (DE3) celler.....	43
3.5.7	Oppdyrking av transformanter.....	43
3.5.8	Tillaging av frysestocker.....	43
3.5.9	Overekspresjon.....	44
3.5.10	Tillaging av periplasmatisk ekstrakt.....	44
3.6	Rensing av enzymer fra det kitinolytiske maskineriet til <i>S. marcescens</i>	45
3.6.1	Rensing av periplasmatisk ekstrakt på kitinkuler.....	45

3.6.2	SDS-PAGE	46
3.6.3	Oppkonsentrering og bytte av buffer.....	46
3.6.4	Bestemmelse av proteinkonsentrasjon med Bradford-metoden	46
3.7	Nedbrytning av kitin.....	46
3.7.1	Aktivitetsassay	46
3.7.2	Metting av CBP21	47
3.7.3	Konsentrasjonsbestemmelse av mettet CBP21 med A ₂₈₀	48
3.7.4	Aktivitetsassay med CBP21.....	49
3.7.5	HPLC.....	49
3.7.6	Databehandling: Beregning av A- og b-verdier.....	49
4	Resultater.....	50
4.1	Residuanalyse.....	50
4.1.1	Residuanalyse i HCHT	50
4.1.2	Residuanalyse i ChiA og ChiB	51
4.2	Isolering av de ulike proteinene	52
4.2.1	Rensing av HCHT	52
4.2.2	Rensing av enzymer fra det kitinolytiske maskineriet til <i>S. marcescens</i>	53
4.3	Kitosan- og kitindegradering ved hjelp av HCHT50-W99A og HCHT39-W218A ..	56
4.4	Kitinnedbrytning med og uten CBP 21	63
5	Diskusjon.....	65
5.1	Effekt av aromatiske residuer og CBM	65
5.2	Hastighetsøkende effekt av CBP21	68
5.3	Oppsummering og videre arbeid	69
6	Referanser.....	71

Forkortelser

α_{\max}	Nedbrytningsgrad av kitosan
μg	Mikrogram
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar
A1	N-acetyl-D-glucosamine
A2	di-acetyl kitobiose
A3	Tri-acetyl kitotriose
A4	Tetra-acetyl kitotetraose
A5	Penta-acetyl kitopentaose
Ala (A)	Alanin
BSA	Bovine Serum Albumin
CAZy	Carbohydrate Active Enzymes
CBM	Karbohydratbindende domene
CBP21	Chitin Binding Protein 21
ChiA	Kitinase A fra <i>Serratia marcescens</i>
ChiB	Kitinase B fra <i>Serratia marcescens</i>
ChiC	Kitinase C fra <i>Serratia marcescens</i>
Da	Dalton
DDT	Ditiorteitol
dH ₂ O	Sterilt vann av Milli-Q kvalitet
DNA	Deoksyribonukleinsyre
EtOH	Etanol

F _A	Acetyleringsgrad
g	Gram
GH	Glykoylhydrolase
GlcNAc	N-acetylglukosamin
HCHT	Human chitotriosidase
HCHT50	Human chitotriosidase 50 kDa
HCHT39	Human chitotriosidase 39 kDa
His	Histidin
HLPC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl-1-tio-β-D-tiogalaktopyranosid
k_{cat}	Initiell hastighetsrate
k_{cat}^{app}	«Apparent» initiell hastighetsrate
KOS	Kitooligosakkarider
L	Liter
LPMO	Lytisk polysakkarid monooksygenase
M	Molar
MALDI-TOF-MS	Matriksassistert laser «Time of Flight» massespektrometri
mg	Milligram
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-morfolin) propansvovelsyre
NaAc	Natriumacetat
NI-NTA	Nikkel-nitrilotrieddiksyre
nm	Nanometer

NMR	Kjernemagnetisk resonans (Nuclear Magnetic Resonans)
OD	Optisk tetthet
P^{app}	Initiell prosessivitet
PMSF	Fenylmetylsulfonylfluorid
RPM	Antall omdreininger per minutt
SEC	Størrelsesekklusjonskromatografi
SDS-PAGE	Natirumdodecylsulfat polyakrylamid gelelektroforese
UV	Ultrafiolett lys
WT	Villtype
Å	Ångstrøm

Sammendrag

Denne oppgaven er skrevet som en større del av et forskningsprosjekt, der målet er å tilegne seg kunnskap om enzymatisk nedbrytning av det uløselige karbohydratet kitin. Denne biopolymeren er den nest mest vanlige naturen, etter cellulose. Kitin er N-acetyl-D-glukosaminenheter (GlcNAc), som er koplet ved hjelp av en β -1,4 glykosidbinding. Denne oppgaven er todelt, der den ene delen omhandler den humane kitinasen human chitotriosidase (HCHT) og den andre delen omhandler kitinase A (ChiA) og kitinase B (ChiB) fra *Serratia marcescens*. Felles for begge delene er at aromatiske residuer i det aktive setet er senter for oppmerksomhet.

I den første delen av oppgaven har enzymkinetiske parametre blitt bestemt for HCHT50-W99A og HCHT39-W218A ved hjelp av nedbrytningsforsøk på kitin og kitosan. De samme parametrene har tidligere blitt bestemt for villtype HCHT50 og HCHT39, samt andre mutanter. Dette gir mulighet for en større grad av sammenlikning, for å kunne diskutere rollen til de aromatiske residuene i det aktive setet og den karbohydratbindende modulen.

Nedbrytning av kitin ga følgende parametre: k_{cat}^{app} er $0,120 \pm 0,03$ for HCHT50-W99A og $0,073 \pm 0,004$ for HCHT39-W218A, P^{app} er $11,8 \pm 1,3$ for HCHT50-W99A og $3,8 \pm 0,1$ for HCHT39-W218A og degraderingen i prosent er $15,4 \pm 0,1$ for HCHT50-W99A og $4,8 \pm 0,3$ for HCHT39-W218A. Nedbrytning av kitosan ga disse verdiene: k_{cat} er 4 for HCHT50-W99A og 17 for HCHT39-W218A og α_{max} er 0,38 for HCHT50-W99A og 0,50 for HCHT39-W218A. Resultatene viser at både de aromatiske residuene i det aktive setet og den karbohydratbindende modulen er svært viktig for funksjonen til HCHT.

I den andre delen av oppgaven er det utført aktivitetsassay på kitin som er forbehandlet med en LMPO kalt CBP21 og ubehandlet kitin med både villtype og mutanter av ChiA og ChiB. Hos ChiA er det i tillegg til villtypen benyttet de to mutantene W167A og W275A, og hos ChiB er det i tillegg til villtypen benyttet mutantene W97A og W220A. Samtlige mutasjoner er av aromatiske aminosyrer i det aktive setet, og disse aminosyrene har en påvirkning på prosessiviteten til enzymet. Flere studier har vist at prosessivitet kan gå på bekostning av hastigheten til enzymet, og at mindre prosessive enzymer er mer effektive på substrater med mindre krystallinsk struktur. Aktivitetsassayene har til hensikt å undersøke om mutanter som har mutert bort aromatiske residuer som er viktige for prosessivitet kan være like effektive

eller mer effektive enn villtypeenzymet på substrat som er forbehandlet med CPB21. Resultatene viste at økningen i aktivitet på det forhandlede substrater kontra det vanlige substratet var høyere for mutantene enn for villtypeenzymene. Effekten var også generelt større hos ChiB. Spesielt interessant er at ChiB-W220A viste seg å være raskere enn ChiB-WT når substratet var blitt forbehandlet med CBP21.

Abstract

This thesis is written as a part of a larger research project, where the main goal is to acquire knowledge about enzymatic degradation of the insoluble carbohydrate chitin. Chitin is the second most abundant biopolymer in nature after cellulose. It consists of N-acetyl-D-glucosamine units, linked with β -1,4-glycosidic bonds. This thesis consists of two parts, where one part concerns a human chitinase Human Chitotriosidase (HCHT). The second part is about Chitinase A (ChiA) and Chitinase B (ChiB) from the gram-negative bacterium *Serratia marcescens*. Both parts have in common that the aromatic residues in the active site are the center of attention.

In the first part of the thesis, a number of enzyme-kinetic parameters has been determined for HCHT50-W99A and HCHT39-W218A by degradation of chitin and chitosan. The same parameters have previously been determined for wildtype HCHT50 and HCHT39, and a number of other mutants. This gives an opportunity to compare and discuss the importance of the aromatic residues in the active site and the carbohydrate-binding module. Degradation of chitin determined the following parameters: k_{cat}^{app} was $0,120 \pm 0,03$ for HCHT50-W99A and $0,073 \pm 0,004$ for HCHT39-W218A, P^{app} was $11,8 \pm 1,3$ for HCHT50-W99A and $3,8 \pm 0,1$ for HCHT39-W218A and the degradation given in percent is $15,4 \pm 0,1$ for HCHT50-W99A and $4,8 \pm 0,3$ for HCHT39-W218A. Degradation of chitosan determined the following parameters: k_{cat} was 4 for HCHT50-W99A and 17 for HCHT39-W218A and α_{max} is 0,38 for HCHT50-W99A and 0,50 for HCHT39-W218A. The results show that both the aromatic residues in the active site and the carbohydrate-binding module are of great importance to the function of HCHT.

In the second part of the thesis activity-assays have been performed both on chitin that has been pretreated with an LPMO called CBP21 and untreated chitin, with both wildtype and mutants of ChiA and ChiB. The mutants created from ChiA-WT are ChiA-W167A and ChiA-W275, and the mutants created from ChiB-WT are ChiB-W97A and ChiB-W220A. All of these mutations are aromatic residues in the active site of the enzymes, and are amino acids that have an effect on the enzyme processivity. Several studies have shown that the processivity may come at the expense of the enzyme speed and efficiency, and that less processive enzymes could be more efficient on substrates with a less crystalline structure. The activity-assays purpose is to

investigate if the mutants that has lost aromatic residues, which are of importance to its processive qualities, can be just as efficient or even more efficient than the wildtype enzyme on the substrate pretreated with CBP21. The results showed an increase in activity on the pretreated substrate compared to the untreated substrate, and the increase was higher for the mutants than for the wildtype enzymes. The effect was also in general higher with ChiB, than ChiA. The mutant ChiB-W220A was in fact faster than ChiB-WT.

1 Introduksjon

1.1 Karbohydrater

Karbohydrater er en gruppe organiske forbindelser bestående hovedsakelig av grunnstoffene karbon, hydrogen og oksygen. Den generelle grunnformelen er $(\text{CH}_2\text{O})_n$. Karbohydrater kan også ha innslag av andre grunnstoffer som nitrogen, svovel og fosfor. Den minste enheten i karbohydrater kalles monosakkarider, og består av fire til seks karbonatomer og et oksygenatom som danner en ringstruktur. Monosakkarider kan bindes sammen med hverandre ved hjelp av en glykosidbinding. To monosakkarider bundet sammen kalles et disakkarid, og to til ti monosakkarider bundet sammen kalles oligosakkarid. Er det flere enn ti monosakkarider som er bundet sammen kalles det en polysakkarid. Polysakkarider har et bredt spekter av variasjonsmuligheter, og danner ofte tredimensjonale strukturer. Denne strukturen avhenger av hvilke monosakkarider polysakkaridet er bygd opp av og på forgreininger i molekylet. Polysakkarider kan inneholde kun et type monosakkarid, dette kalles en homopolymer. En heteropolymer består av to eller flere ulike monosakkarider (Mathews et al. 2013).

1.2 Kitin

Kitin er en homopolymer av N-acetyl-D-glukosaminenheter (GlcNAc), som er koplet ved hjelp av en β -1,4 glykosidbinding. Hver monosakkarid er rotert 180° i forhold til hverandre. Kitin er et strukturelt polysakkarid, og finnes blant annet i virvelløse dyr, insekter, alger og sopp (Mathews et al. 2013). Den største kommersielle kilden til kitin er krabbe- og rekeskall (Rinaudo 2006). Kitin er den nest mest vanlige biopolymeren i naturen, etter cellulose, og har en årlig produksjon på rundt 10 gigatonn (Prashanth & Tharanathan 2007).

Kitosan er et derivat av kitin, og består av deacetylert kitin. Kitosan kan ha ulike acetyleringsgrad. I likhet med kitin er sukkerenhetene rotert 180° i forhold til hverandre (Horn et al. 2006).

1.2.1 Struktur

Som nevnt tidligere er kitin bestående av β -1,4 linkede N-acetyl-D-glukosaminenheter som er rotert 180° på hverandre. Dette gjør at den strukturelle og funksjonelle enheten til kitin er et disakkarid. Disakkaridene bindes sammen og danner lange kjeder. Disse kjedene kan bindes sammen ved hjelp av -NH og -C=O grupper på motstående kjeder, som danner hydrogenbindinger. Ved at disse kjedene bindes tett sammen, dannes den uløselige og svært kompakte polymeren kitin (Synowiecki & Al-Khateeb 2003). Hvilken retning kjedene har i forhold til hverandre, avhenger av opphavet til kitinet. Det finnes to hovedtyper kitin, α og β . Det finnes også en tredje variant γ som er mer omdiskutert, og som trolig er en variant av α -kitin (Rinaudo 2006).

α -kitin er den mest vanlig formen for kitin og svært stabil. Kjedene er orientert antiparallelt, og dette fører til sterke interaksjoner mellom kjedene i form av hydrogenbindinger (Synowiecki & Al-Khateeb 2003).

β -kitin er en mindre vanlig form for kitin, og her er kjedene ordnet parallelt. Dette gir mindre muligheter for interaksjon mellom kjedene og er derfor mindre stabilt (Synowiecki & Al-Khateeb 2003).

1.2.2 Anvendelser

Kitin til industrielt bruk kommer som nevnt i hovedsak fra krabbe- og rekeskall, og produksjonen er relativt stor. Anvendelsesområdene er mange, og blant annet innenfor medisin (Synowiecki & Al-Khateeb 2003). Kitoooligosakkarider, som er en produkt av kitin og kitosan som er syrehydrolysert, er mye brukt. Disse kitoooligosakkaridene har antitumoral effekt der de blant annet stimulerer cytotoxisk aktivitet og dermed bidrar til ødeleggelsen av kreftceller (Park & Kim 2010). I tillegg til dette brukes også kitin og kitosan hyppig i matvareindustrien. Kitosan kan benyttes til å lage en spiselig biofilm som forlenger holdbarheten til ulike matvarer. Kitosan er bedre egnet til å lage biofilm av enn cellulose. Biofilm av kitosan er sterkere i tillegg til at den har bedre vannpermeabilitet og en barriere for O_2 . Andre positive egenskaper med en biofilm av kitosan er at den reduserer modningen av maten ved å hindre CO_2 - og etylenutvikling og ved å ha antifungal effekt (Agulló et al. 2003).

1.3 Glykosylhydrolaser

Glykosylhydrolaser er en enzymgruppe som katalyserer hydrolyse av glykosidbindinger monosakkarider i mellom eller mellom et monosakkarid og en ikke-karbohydratforbindelse. Enzymene kan katalysere hydrolyse av O-, S- og N-glykosidbindinger. Nedbrytning av polysakkarider er svært viktig, spesielt i biologisk sammenheng, for eksempel i utvinning og lagring av energi og celledisintegrering (Davies & Henrissat 1995).

1.3.1 Klassifisering

Det finnes mange ulike polysakkarider, og mulighetene for stereokjemisk variasjon innenfor disse forbindelsene er stor. Dette gjør at variasjonen innenfor glykosylhydrolaser også er stor, og enzymgruppen har et bredt spekter av substratspesifisitasjon og hvilke typer reaksjoner de katalyserer (Davies & Henrissat 1995). Glykosylhydrolaser er derfor klassifisert og delt inn i ulike familier på bakgrunn av aminosyresekvensen. Denne klassifiseringen er lagret i en database kalt Carbohydrate Active enZYmes (CAZY). Konservasjon av aminosyresekvensen fører til en strukturlikhet, og dette gjør at denne klassifiseringen også til en viss grad tar hensyn til struktur og funksjon hos enzymene (CAZY 2016c).

1.3.2 Struktur

Felles for alle glykosylhydrolaser er at de består av et katalytisk domene, og et eller flere ikke-katalytiske domener. De-ikke katalytiske domene kan være involvert i substratbinding, men mange har en hittil ukjent funksjon. I det katalytiske domenet sitter det aktive setet, hvor selve reaksjonen skjer. I det aktive setet brukes en nomenklatur på subsetene, der $-n$ representerer den ikke-reduserende enden, og $+n$ representerer den reduserende enden. Mellom -1 og $+1$ skjer alltid hydrolysen av bindingen (Davies et al. 1997). Videre finnes det tre ulike topologier det aktive setet kan ha: I) Lomme eller krater II) kløft og III) tunnel. Alle tre topologiene er illustrert i Figur 1-1.

I) Lomme/krater

Denne topologien har det aktive setet i en relativt eksponert og åpen posisjon. Denne typen struktur er ofte å finne dersom substratet det bryter ned har flere lett tilgjengelige ender på overflaten, både reduserende og ikke-reduserende. Strukturen er vanlig hos monosakkaridaser, som f.eks. β -galactosidase og eksopolysakkaridaser som f.eks. glucoamylase. Siden denne strukturen er avhengig av et større antall løse ender, egner denne strukturen seg dårlig på fibrøse substrater som f.eks. cellulose (Davies & Henrissat 1995).

II) Kløft

Denne strukturen er vanlig blant endoaktive polysakkaridaser som f.eks. lysozymer og kitinaser. Topologien er relativt åpen og tillater tilfeldig binding av flere sukkerenheter i det aktive setet, noe som er hensiktsmessig hos endoaktive enzymer (Davies & Henrissat 1995).

III) Tunnel

Tunneltopologien er en kløft med lange loops over deler av kløften, slik at en tunnel dannes i det aktive setet (Davies & Henrissat 1995). Denne topologien er svært hensiktsmessig for eksoaktive enzymer, da substratet tres gjennom tunnelen. Det betyr at substratet fortsatt er bundet til enzymet, mens produktet frigis, og danner grunnlaget for prosessivitet i nedbrytningen av krystallinske substrater som kitin og cellulose (Horn et al. 2006).



Figur 1-1 De tre ulike topologiene rundt aktive setet hos glykosylhydrolaser. A) Lomme/Krater, B) Kløft, C) Tunnel. (Davies & Henrissat 1995)

1.3.3 Virkemåte

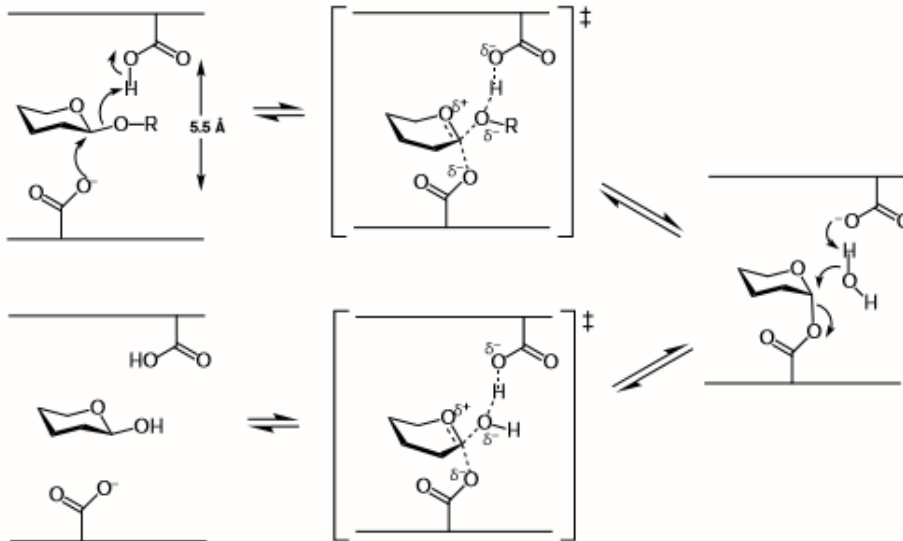
Glykosylhydrolaser kan være både prosessive og ikke-prosessive. At et enzym er prosessivt betyr at det gjør flere enn et kutt hver gang det er festet til substratet. Et ikke-prosessivt enzym fester seg til substratet, gjør et kutt og frigjøres. Denne egenskapen kan kombineres med endo- eller eksoaktivitet. Eksoaktive enzymer kløyver substratet fra enden. Blant glykosylhydrolaser er de eksoaktive enzymene ofte en preferanse for den reduserende eller ikke-reduserende enden av sukkeret. Endoaktive enzymer fester seg tilfeldig substratet, og er ikke avhengig av en ende (Davies & Henrissat 1995).

1.3.4 Mekanisme

Glykosylhydrolaser har to ulike hovedklasser for mekanismen for kløyving av glykosidbindinger. Bevarende og inverterende mekanisme avhenger av endringen i den anomeriske oksygenkonfigurasjonen (Davies & Henrissat 1995).

1.3.4.1 Bevarende mekanisme

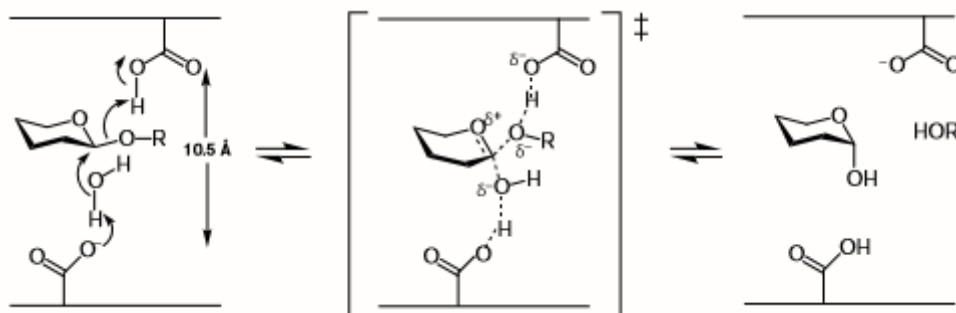
Denne mekanismen krever et residu som kan fungere både som en katalytisk syre og som en base. I tillegg kreves det en nukleofil. Begge residuene er vanligvis karboksylsyrekjeder. I den bevarende mekanismen starter reaksjonen med at en aminosyre fungerer som en katalytisk syre, og protonerer glykosidoksygenet. Samtidig angripes det anomeriske karbonet av det nukleofile residuet, og det dannes et substrat-enzym-intermediat. I det neste trinnet vil den opprinnelige katalytiske syren, nå fungere som en base ved å aktivere et vannmolekyl. Vannmolekylet utfører videre et nukleofilt angrep på enzym-substrat-intermediatet. Gjennom denne reaksjonen blir den anomeriske oksygenkonfigurasjonen bevart. Avstanden mellom residuene i denne reaksjonen er omtrent 5,5 Å (Rye & Withers 2000). Figur 1-2 illustrerte denne reaksjonen.



Figur 1-2 Illustrasjon av den bevarende mekanismen (McCarter & Withers 1994).

1.3.4.2 Inverterende mekanisme

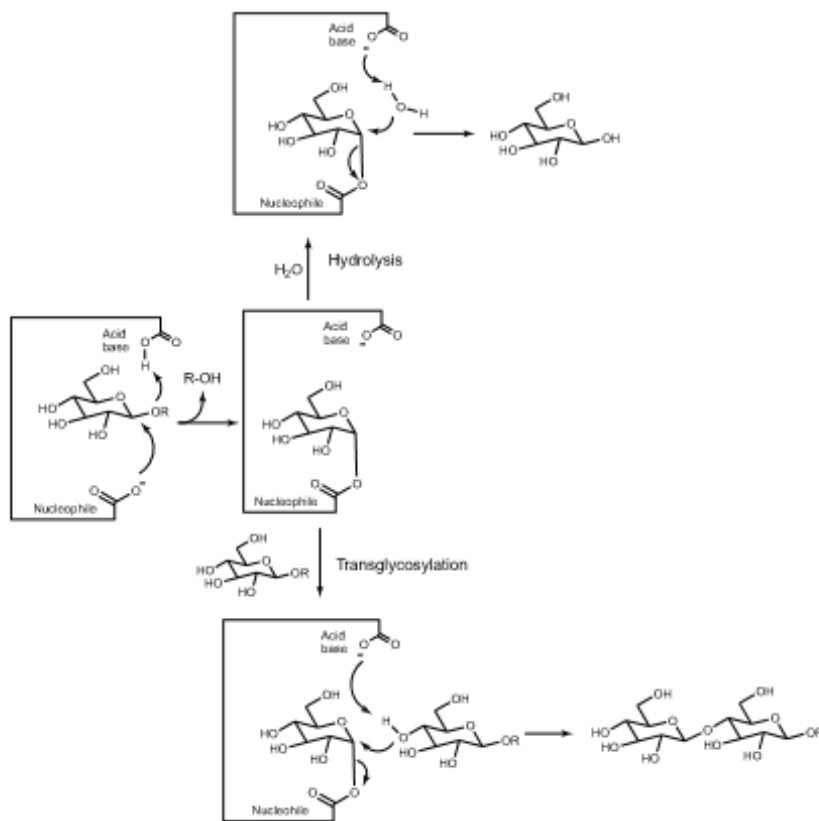
Den inverterende mekanismen skjer ved hjelp av en ett-trinnsmekanisme som kalles «direct displacement mechanism». I denne mekanismen er det behov for to aminosyrer der den ene fungerer som en syre og den andre som base, disse aminosyrene må befinne seg mellom 6-11 Å fra hverandre. Det første som skjer er at den katalytiske syren donerer et proton til oksygenatomet i glykosidbindingen. Deretter blir et vannmolekyl polarisert av den nukleofile basen, og dette vannmolekylet angriper det anomere karbonatomet. Dette fører til at glykosidbindingen hydrolyseres, og den anomere konfigurasjonen inverteres. Figur 1-3 illustrerer mekanismen. (McCarter & Withers 1994; Rye & Withers 2000)



Figur 1-3 Illustrasjon av den inverterende mekanismen. (McCarter & Withers 1994)

1.3.5 Transglykosylering

Glykosylhydrolaser hydrolyserer i all hovedsak glykosidbindinger, men i en del tilfeller utfører noen glykosylhydrolaser også transglykosyleringsreaksjoner, enzymkatalysert sammenkopling av to sakkarider. Det første trinnet i reaksjonen er likt som ved hydrolyse, der det anomeriske oksygenet protoneres av den katalytiske syren og det anomeriske karbonatomet blir utsatt for et nukleofilt angrep. I det andre trinnet er det et sakkarid (eventuelt en alkohol) som angriper det anomeriske karbonatomet, i stedet for vannmolekyl som i hydrolysen. Dette fører til at de to sakkaridene danner en glykosidbinding (Perugino et al. 2004; Zakariassen et al. 2011).



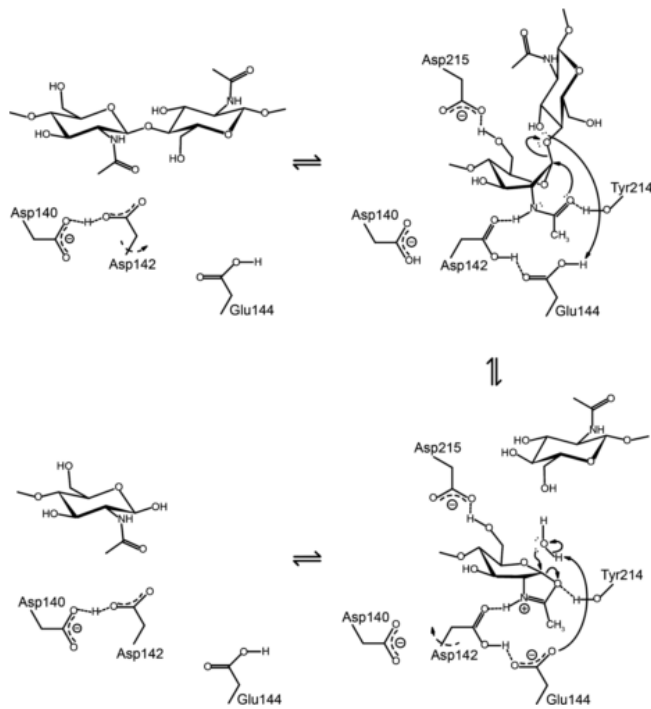
Figur 1-4 illustrerer transglykosylering og hydrolyse av glykosidbindingen (Perugino et al. 2004).

1.4 Kitinaser

Glykosylhydrolaser finnes i mange ulike varianter, og en type kalles kitinaser. Kitinaser katalyserer hydrolysen av β -1,4-glykosidbindinger mellom monomerene i kitin. Størrelsen på kitinaser kan variere mellom 20 kDa og opp til rundt 90 kDa. Kitinaser finnes i mange ulike organismer, blant annet mennesker, bakterier, sopp og planter (Hamid et al. 2013). Kitinaser er å betegne som karbohydrataktive enzymer, og er klassifisert i «Carbohydrate Active Enzymes» (CAZy). Databasen klassifiserer enzymer etter aminosyresekvensen, som nevnt tidligere. I denne databasen er kitinasene i familie glykosylhydrolase (GH) 18 og 19 (CAZY 2016c). Kitinasene i de to familiene har trolig ulikt opphav, da aminosyresekvensen er svært ulike. De benytter også to ulike mekanismer som underbygger teorien om ulikt opphav (Hamid et al. 2013). Kitinasene i familie GH18 benytter den bevarende mekanismen beskrevet i avsnitt 1.3.4.1, mens GH19 kitinasene benytter den inverterende mekanismen fra avsnitt 1.3.4.2 (Fukamizo 2000).

1.4.1 Substrat-assistert mekanisme

Kitinaser som tilhører familie GH18 benytter, som nevnt tidligere, den bevarende mekanismen ved hydrolyse av glykosidbindingen. Det er imidlertid en forskjell fra den klassiske mekanismen beskrevet i avsnitt 1.3.4.1. Nemlig at N-acetylgruppen på substratet benyttes som nukleofil, i stedet for en karboksylsidekjede (Terwisscha van Scheltinga et al. 1995). Denne mekanismen er nøye studert hos ChiB, et eksempel fra GH18 familien. Det konserverte motivet for GH18 familien er DXDXE, og for ChiB er de konserverte aminosyrene Asp¹⁴⁰ (D140), Asp¹⁴² (D142) og Glu¹⁴⁴ (E144). Disse aminosyrene spiller viktige roller i hydrolysen av glykosidbindingen. Når substratet binder til enzymet, endres konformasjonen til substratet fra stolkonformasjon til en skjev båtkonformasjon. Dette gjør det mulig med et nukleofilt angrep fra N-acetylgruppen på sukkeret som er posisjonert i subseite -1. Glu¹⁴⁴ protonerer oksygenatomet i glykosidbindingen, og deprotonerer et vannmolekyl slik at hydrolysen skjer (Synstad et al. 2004; Vaaje-Kolstad et al. 2013). Figur 1-5 viser den substrat-assisterte mekanismen.

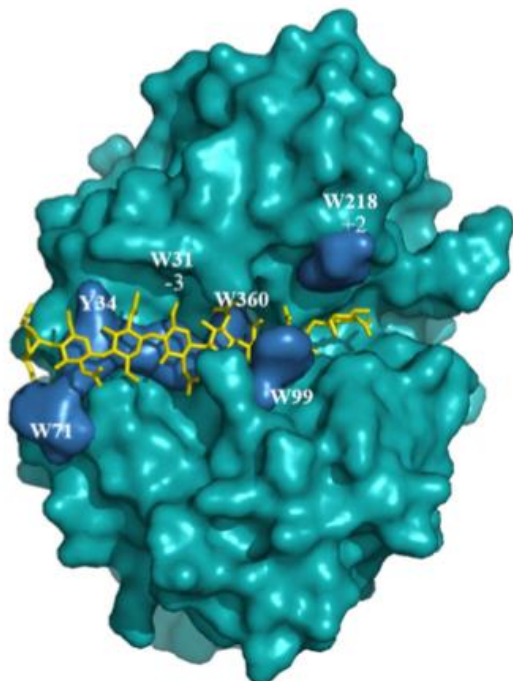


Figur 1-5 Substrat-assistert mekanisme hos ChiB fra *S. marcescens*. (Vaaje-Kolstad et al. 2013)

1.4.2 Human chitotriosidase (HCHT)

I menneskets genom finnes det gensekvenser for mange kitinaser, men kun to av de blir uttrykt og har kitinolytisk aktivitet. De to kitinasene heter human chitotriosidase (HCHT) og acidic mammalian chitinase (AMCase). Mennesket benytter seg ikke av kitin som næringsgrunnlag og produserer heller ikke kitin, så hvorfor kitinaser allikevel blir uttrykt er et relevant spørsmål. Det antas at begge disse kitinasene er har en funksjon i immunforsvaret i forbindelse med antiparasitt-respons (Gordon-Thomson et al. 2009). HCHT finnes i to isoformer, en på 39 kDa og en på 50 kDa. Disse blir videre referert til som henholdsvis HCHT39 og HCHT50. HCHT50 har et karbohydratbindende domene (CBM) i C-terminalen, som HCHT39 mangler (Eide et al. 2013). HCHT39 har et katalytisk domene bestående av en $(\alpha/\beta)_8$ barrel med et α/β insersjonsdomene, og dette gir enzymet en dyp kløft i det aktive setet. HCHT50 har den samme strukturen som HCHT39 i det katalytiske domene, men har som nevnt tidligere et karbohydratbindende domene, som hører til familie CBM 14 (Fusetti et al. 2002). Begge isoformene av HCHT tilhører familie GH18. HCHT blir primært uttrykt i aktive makrofager, og oppregulering i produksjonen av HCHT er forbundet med en rekke sykdommer, bla. Gauchers sykdom (Hollak et al. 1994). Vedrørende grad av prosessivitet og endo/ekso-aktivitet hos HCHT, er dette ennå ikke fullstendig bestemt. Sammenliknet med

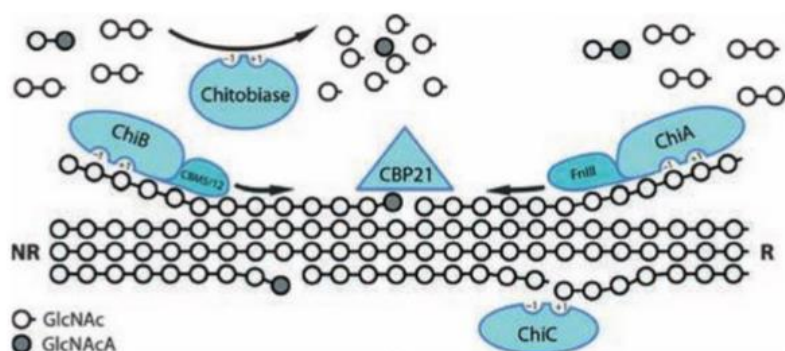
prosessive enzymer, fra for eksempel ChiA og ChiB fra *Serratia marsescens* er prosessiviteten til HCHT lav. Allikevel har HCHT en høyere prosessivitet enn hva som forventes av ikke-prosessive enzymer. HCHT har altså en viss grad av prosessivitet. Det aktive setet til HCHT er ekstremt rikt på aromater, noe som kan sammenliknes med det aktive setet til eksoaktive enzymer som ChiA og ChiB. Allikevel er det aktive setet relativt grunt sammenliknet med de eksoaktive enzymene, og dette trekket er mer vanlig hos endoaktive enzymer som ChiC (også fra *S. marsescens*). HCHT har en høy degraderingsprosent på krystallinsk kitin. Det kan virke som HCHT kan fungere som en komplett kitinolytisk maskineri alene, ulikt for eksempel det kitinolytiske maskineriet i *Serratia marsescens* som består av flere enzymer (Eide et al. 2016). Krystallstrukturen til HCHT39 er vist i Figur 1-6.



Figur 1-6 Strukturen til HCH39 med (GlcNAc)₈ i det aktive setet. (Fusetti et al. 2002)

1.4.3 Kitinaser fra *Serratia marsescens*

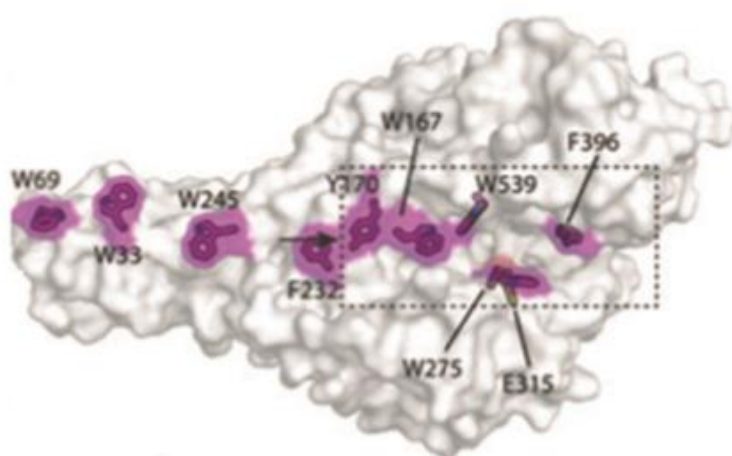
Det kitinolytiske maskineriet til den gramnegative bakterien *Serratia marsescens* er meget godt studert, og består av ChiA, ChiB, ChiC, CBP21 og kitobiase. ChiA, ChiB og ChiC er kitinaser, mens CBP21 er en lytisk polysakkarid monooxygenase (LPMO) (Vaaje-Kolstad et al. 2013). Figur 1-7 illustrerer det kitinolytiske maskineriet.



Figur 1-7 illustrerer det kitinolytiske maskineriet til *S. marcescens* (Vaaje-Kolstad et al. 2013)

1.4.3.1 Kitinase A (ChiA)

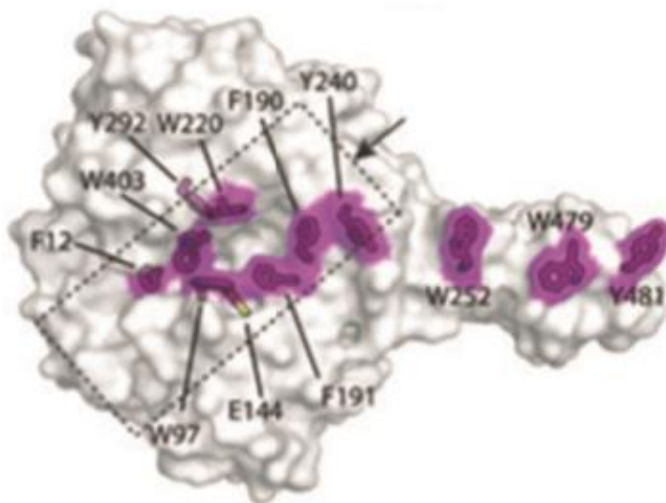
ChiA har et katalytisk domene typisk for GH18 med en $(\alpha/\beta)_8$ barrel og de katalytiske residuene på β -strand 4. ChiA har en N-terminal CBM med en fibronectin III (Fn III) fold. ChiA er et eksoprosessivt enzym, og binder i den reduserende ende av sukkeret. (Vaaje-Kolstad et al. 2013). Proteinene er 540 residuer langt og har en molekylvekt på 58,5 kDa. Det aktive setet er en dyp kløft som er åpen i begge ender og rikt på aromatiske residuer. Setet har seks subseter, i posisjon -4 til +2. Den åpne strukturen i det aktive setet har reist spørsmål om hvorvidt ChiA også kan ha noe endoaktivitet, som har vist seg å svære tilfelle spesielt på uløselige substrater (Brurberg et al. 2001). Krystallstrukturen til ChiA er vist i Figur 1-8.



Figur 1-8 Krystallstruktur av ChiA med de aromatiske aminosyrene i det aktive setet og CBM markert. (Vaaje-Kolstad et al. 2013)

1.4.3.2 Kitinase B (ChiB)

ChiB har det samme katalytiske domene som ChiA, men har en C-terminal CBM5. Dette kitinbindende domene er budet til det katalytiske domenet ved hjelp av en linker. Det kitinbindende domenet består av tre antiparallele β -tråder, som assisterer substratbindingen. ChiB består av 498 residuer og har en molekylvekt på 55,4 kDa (van Aalten et al. 2000). ChiB er også et eksoprosessivt enzym, men i motsetning til ChiA jobber ChiB fra den ikke-reduserende enden. I likhet med ChiA, har også ChiB en dyp kløft i det aromatiske setet, og har i tillegg loops over denne kløften som danner en tunneltopologi. Denne tunnelen har også mange aromatiske residuer, og dette er typisk trekk for eksoaktive prosessive enzymer (Vaaje-Kolstad et al. 2013). Det aktive setet har seks sub seter, som strekker seg fra -3 til +3. Den katalytiske syren E144 er plassert i -1 setet (van Aalten et al. 2000). Krystallstrukturen til ChiB er vist i Figur 1-9.

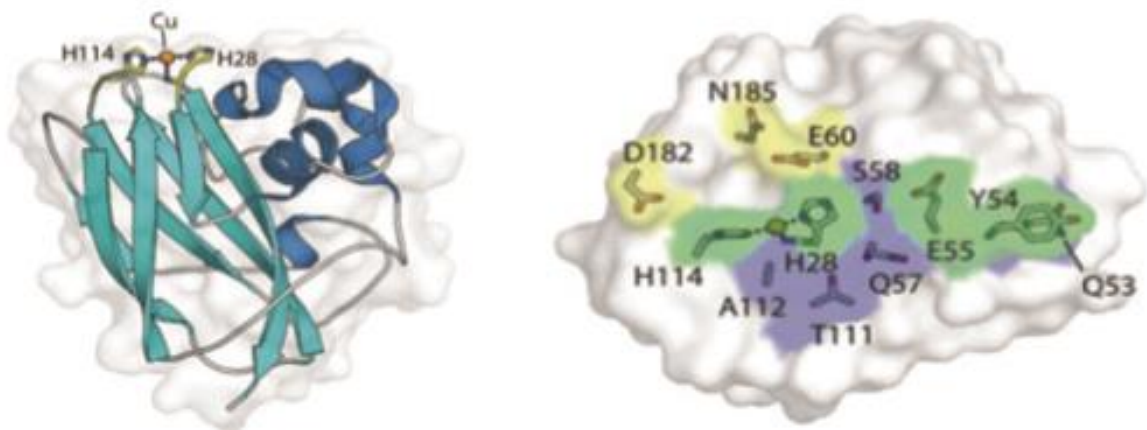


Figur 1-9 Krystallstruktur av ChiB med de aromatiske aminosyrene i det aktive setet og CBM markert. (Vaaje-Kolstad et al. 2013)

1.4.3.3 Chitin Binding Protein (CBP21)

CBP21 er en del av det kitinolytiske maskineriet til *S. marcescens*, men fungerer på en annen måte en kitinasene som er beskrevet i avsnitt 1.4.3.1 og 1.4.3.2. CBP21 hører til Auxiliary Activities familie 10 (AA10) i CAZY-databasen, og denne klassen beskrives som redokszymer som fungerer i konjugasjon med karbohydrataktive enzymer (CAZY 2016a). Da CBP21 først ble karakterisert, ble det oppdaget en sterk affinitet for β -kitin men ingen

enzymatisk aktivitet ble målt. Senere studier viste av CBP21 kunne øke kitinasers degradering av kitin, ved å depolymerisere kitin. Dette gir kitinasene et mer tilgjengelig substrat, som øker degraderingen (Vaaje-Kolstad et al. 2010). Strukturen til CBP21 består av to β -sheets, som er koplet sammen ved hjelp av to disulfidbindinger. Dette gir en β -sandwich, der kjernen er hydrofobisk og rik på aromatiske residuer. Det aktive setet er flatt, og består av flere sterkt konserverte polare residuer som er viktige i substratbinding (Vaaje-Kolstad et al. 2005). NMR-analyse av strukturen til CBP21 viser et kobberbindingssete, bestående av en imidazolsidekjede og to konserverte histidinresiduer. CBP21 er et kobberavhengig enzym. Mekanismen til CBP21 er avhengig av både kobber og molekylært oksygen, og fungerer ved at molekylært oksygen binder til kobber i redusert tilstand. Denne bindingen skjer ved at et elektron overføres fra Cu^+ til O_2 , og danner et superoksointermediat. Dette intermediet kan starte en oksidasjonsreaksjon ved å trekke til seg en hydrogenatom fra substratet (Aachmann et al. 2012). Krystallstruktur av CBP21 er illustrert i Figur 1-10.



Figur 1-10 Krystallstruktur av CBP21. Til venstre: De to histidinresiduene involvert i kobberbinding er markert, samt kobberatomet. Til høyre: Residuer som er involvert i substratbinding er markert. (Vaaje-Kolstad et al. 2013).

1.4.4 Aromatiske residuer og CBM

Aromatiske residuer og karbohydratbindene domener er viktige for kitinase. Det finnes 4 aromatiske aminosyrer; fenylalanin, tryosin, tryptofan og histidine (Mathews et al. 2013). Det aktive setet hos kitinaser og cellulaser er ofte rikt på aromatiske residuer, som er godt konserverte, og det antas at aromatenes er spesielt viktige for prosessive enzymer. De aromatiske aminosyrene danner hydrofobiske plater i det aktive setet, som assisterer i binding av substratet og gir substratet en flate og gli over. De hydrofobiske interaksjonene er uspesifikke og brer seg over store flater. Dette gir sterk interaksjon, men unngår sterke bindinger på spesifikke steder som kan hindre prosessiviteten (Zakariassen et al. 2009).

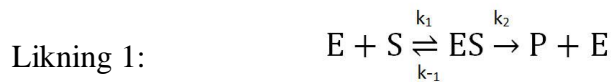
En karbohydratbindende modul (CBM) er ofte en del av et karbohydrataktivt enzym (CAZY 2016b). CBM øker enzymets affinitet til substratet (Horn et al. 2006). Det antas at CBM har to hovedfunksjoner i forhold til substratet, nærhet til substratet og målrettethet (Stockinger et al. 2015). Prosessivitet antas å være svært viktig i nedbrytningen av krystallinske substrater, og CBM spiller derfor en viktig rolle i nedbrytningen av kitin (Boraston et al. 2004).

1.5 Enzymkinetikk

Enzymkinetikk er studie av de forhold og faktorer som påvirker og bestemmer hastigheten til enzymatiske reaksjoner (Lesk 2010). I denne oppgaven brukes to modeller for å beskrive enzymkinetikken, en modell av Michaelis og Menten fra 1913 og en modell av Kostylew og Wilson fra 2013. Michaelis-Menten modellen har flere parametere som ikke bestemmes eller benyttes i denne oppgaven. Denne modellen benyttes dermed ikke fullt ut.

1.5.1 Michaelis-Menten modell

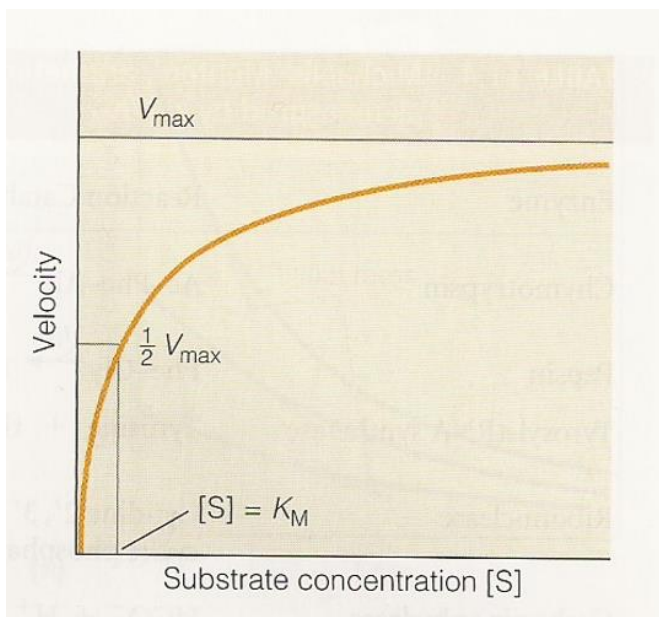
Michaelis-Menten modellen fra 1913 er en av de mest vanlige modellene i forbindelse enzymkinetikk, og enzymkatalyserte reaksjoner blir ifølge modellen beskrevet slik:



I likning 1 er E = enzym, S = substrat, ES = enzym-substratkompleks og P = produkt. k_1 og k_{-1} er hastighetskonstanten for henholdsvis dannelsen og oppløsningen av enzym-substratkomplekset. k_2 er hastighetskonstanten for dannelsen av produktet fra enzym-substratkomplekset, og blir også ofte referert til som k_{cat} , reaksjonshastigheten til den katalyserte reaksjonen. Videre er det utarbeidet en formel for beregning av initiell hastighet:

Likning 2:
$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{(K_M + [S])}$$

V_0 er den initielle hastigheten, V_{max} er maks hastighet og K_M er michaelis konstanten. K_M er substratkonsentrasjonen ved $\frac{1}{2} V_{max}$. Det er av flere grunner det er viktig at det er den initielle hastigheten som beregnes, blant annet fordi det er minimalt med produkt som er dannet enda og kan dermed ikke påvirke likevekten i likning 1. Faktorer som enzymdegradering og produktinhibering er også neglisjerbare i starten av reaksjonen. Denne modellen blir ofte fremstilt som et plot av substratkonsentrasjonen mot den initielle reaksjonshastigheten, og et eksempel på et slikt plott er vist i Figur 1-11



Figur 1-11 Et Michaelis-Menten plott. (Mathews et al. 2013)

1.5.2 «Kostylew og Wilson»-modellen

I 2013 publiserte Kostylew og Wilson en artikkel der de presenterer en ny kinetisk modell, spesielt tilpasset nedbrytning av krystallinske substrater. For nedbrytning av krystallinske substrater kan det være problematisk med den klassiske Michaelis-Menten modellen, da noen av forutsetningene for denne modellen ikke blir oppfylt. Blant disse kriteriene er antagelsene om «steady-state» reaksjonsforhold og homogent substrat. I denne modellen introduserer man et tidsaspekt, da reaksjonen også er avhengig av tid, og ikke bare substratkonsentrasjon.

Modellen uttrykkes gjennom denne formelen:

Likning 3: $X = Ab^t$

Parameterne i denne modellen er A, b og t. A er et uttrykk for den totale enzymaktiviteten, b kalles hydrolysefaktoren og t er tid. (Kostylev & Wilson 2013)

1.6 Mål med oppgaven

Denne oppgaven er todelt, der den første delen omhandler den humane kitinasen human chitotriosidase (HCHT). Dette enzymet er det allerede gjort omfattende forskning på fra før av vedrørende effekten av aromatiske residuer og det karbohydratbindende domenet. I denne oppgaven utføres det ytterligere arbeid for å fullføre dette puslespillet. Målet er å kunne se hvilken effekt de aromatiske aminosyrene og det karbohydratbindende domenet har på hastighet og prosessivitet hos HCHT.

I del to ble enzymer fra det kitinolytiske maskineriet til den gramnegative bakterien *Serratia marcescens* studert. Målet var å se om en aromatløs GH18-kitinase blir like rask eller raskere enn villtypeenzymet, assistert av en LPMO. Det er vist at prosessivitet kan gå på bekostning av hurtigheten til enzymer. Ved nedbrytning av mindre krystallinske substrater kan mindre prosessive enzymer være bedre egnet. Ved depolymerisere substratet med en LPMO, blir strukturen mindre krystallinsk. Aromatløse GH18-kitinaser er mindre prosessive enn villtypen, da aromatiske residuer er viktig for prosessivitet.

2 Materialer

2.1 Laborieutstyr

Tabell 2-1 Laborieutstyr

Laborieutstyr	Spesifikasjon	Leverandør
Autoklavteip	13 mm	VWR
Automatpipetter	Finnpipetter	Thermo Scientific
Blåkorkflasker	1000 mL 500 mL 250 mL 100 mL	VWR
Cellstar® tubes, blåkorkrør	15 mL 50 mL	Greiner Bio-One
Bordsentrifuge	Sigma 1-14	LABEX
Cryorør	2 mL	Starsted
Dyrkningskolber	2 L 1 L 250 mL	Nalgene
Eppendorfrør	1,5 mL	Axygen
Filter	Steritopp 0,22 µm Duapore Membrane 0,45 µm	Millipore Millipore
Fryser	(-20 °C)	Bosch
Fryser	(-80 °C) Ultra-Low	SANYO
Gelfotoutstyr	Gel Doc EZ Imager	Bio-Rad
Glassutstyr		Schott-Duran/ VWR
HPLC-system	Dionex Ultimate 3000 Autoinjektor UV/VIS detektor Pumpe	Thermo Scientific

HPLC-kolonne	Rezex Fast Fruit H ⁺ kolonne 100 mm length 7,8 mm inner diameter	Phenomenex
HPLC forkolonne	Carbo-H 4 x 3,0 mm	Phenomenex
HPLC rør og løkk		VWR
Inkubator		Termaks
Isbitmaskin	KF 145	PORKKA
Kjøleskap		Gram
Kyvette	1 x 1 cm UV-etter	VWR Eppendorf
LP-kromatografisystem	BioLogic LP system Kolonne Stempel	Bio-Rad
Magnetrører	Hotplate/stirrer	VWR
MALDI-TOF-MS	MTP 384 target ground steel Ultraflex MALDI-TOF/TOF	Bruker
Mikrobølgeovn	L17MSB13E	Logik
Mikrovekt	Sartorius CP-2P	VWR
NMR	Topspin v1.2 Carbohydrate 85°C	Bruker
Oppkonsentreringsrør	Macrosep-30K Amicon Ultracel® 10 K	Pall Corporation Merck Millipore
Parafilm	5 cm	VWR
PD MiniTrap™ G-25		GE Health Care
Petriskåler	9 cm	Heger
pH-meter	SevenEasy Mettler SI series pH meter	Toledo Sentron
Pipettespisser	«Next Generation Tip Refill»	VWR
Risteinkubator	Multitron Standard Multitron Eco	Infors
Sentrifuge	Avanti™ J-25 Avanti™ J-26S x P Sentrifuge-5430R	Beckman Beckman Eppendorf

Sentrifugerotor	JA-10	Beckman
	JLA 8.1000	Beckman
	5430/5430 R	Eppendorf
Sentrifugerør	1 L	Nalgene
	500 mL	
	50 mL	
Sonikeringsbad	Transonic 460/H	Elma
SpeedVac		Thermo Scientific
Spektrofotometer	AG Biophotometer	Eppendorf
	Nanodrop 2000	Thermo Scientific
Sprøytefilter	0,2 µm	Sarstedt
Sprøyter	1 mL	BD plastipak
	2 mL	
	5 mL	
Sterilfilter	0,22 µm	Millipore
Sterilskap	Av-100	TelStar
Størrelseseksklusjonkromatografi	HiLoad™ 26/60	GE Healthcare
	Superdex™ 30	
	SuperFrac	Pharmacia LKB
	Pump 307	Gilson
Thermomikser	Comfort	Eppendorf
Vannbad	Eco Temp TW12	Julabo
Vekt	LC621P	Sartorius Basic
Whirlmikser	Vortex-Genie 2	Scientific Indutries
	MS 3 Basic	IKA

2.2 Programvare til dataanalyse

Tabell 2-2 Programvarer

Bruksområde	Programvare	Leverandør
LP-kromatografisystem	LP Data View	Bio-Rad
Gel visualisering	ImageLab	Bio-Rad
HPLC	Chromelon Chromatography Studio	Chromeleon
NMR	MestRenova	Mestrelab Research
SEC	Adam View RunTime	Advantec
MALDI-TOF	FlexAnalysis FlexControl	Bruker

2.3 Kjemikalier

Tabell 2-3 Kjemikalier

Kjemikalie	Leverandør
3-(N-morfolin) propansvovelsyre (MOPS)	Invitrogen
SDS buffer (20x)	
Aceton, CH₃CHCH₃	Sigma-Aldrich
N-acetyl-D-glucosamine (A1)	Megazyme
Agar	Merck
Ampicillin, C₁₆H₁₉N₃O₄S	Sigma-Aldrich
Bacto™ Gjærekstrakt	Merck
Bacto™ Trypton	Merck
Bio-Rad Protein Assay Fargereagens	Bio-Rad
Kitinkuler	New England Biolabs
Coomassie® Brilliant Blue R-2502	Bio-Rad
Deuteriumklorid, DCI	Sigma-Aldrich

Deuteriumoksid, D₂O	Sigma-Aldrich
Destillert vann, dH₂O (Milli-Q kvalitet)	
di-acetyl kitobiose (A2)	Megazyme
Eddiksyre, CH₃COOH	Sigma-Aldrich
Etanol, C₂H₅OH	VWR
Etylenediaminetetraeddiksyre (EDTA), C₁₀H₁₆N₂O₈	Sigma-Aldrich
Fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF), C₇H₇FO₂S	Sigma-Aldrich
Glyserol, C₃H₅O₅	VWR
Helium 6,0 Ultraplus, He	Yara Industrial AS
Hydrogenklorid, HCl	Sigma-Aldrich
Imidazol, C₃H₄N₂	Sigma-Aldrich
Isopropanol C₃H₈O	Merk
Isopropyl-1-tio-β-D-tiogalaktopyrasonid (IPTG)	Sigma-Aldrich
Magnesiumklorid, MgCl₂	VWR
Natruimdeuteriumoksid, NaOD	Sigma-Aldrich
Natriumhydroksid, NaOH	VWR
Natriumklorid, NaCl	VWR
Ni-NTA Superflow	Qiagen
NuPAGE® 10% Bis-Tris Gel 1,0mm x 10 brønner	Invitrogen
NuPAGE® prøvebuffer (4x)	Invitrogen
NuPAGE® reduserende agent (10x)	Invitrogen
OneShot® BL21 Star™ (DE3) celler	ThermoFisher
OneShot® TOP10 celler	ThermoFisher
Penta-acetyl kitopentaose (A5)	MegaZyme
Svovelsyre H₂SO₄	Sigma-Aldrich
Sukrose, C₁₂H₂₂O₁₁	VWR
Tetra-acetyl kitotetraose (A4)	Megazyme
Tri-acetyl kitotriose (A3)	Megazyme
Trizma base, C₄H₁₁NO₃	Sigma-Aldrich

2.4 Proteiner og substrater

Tabell 2-4 Proteiner og substrater

Protein/Enzym/Substrat	Spesifikasjoner	Leverandør
BenchMark protein ladder		Invitrogen
Bovin Serum Albumin (BSA)	100 x, 10 mg/mL	New England Biolabs
Human Chitrosidase	HCHT50-W99A HCHT39-W218A	SINTEF
Kitinaser	ChiA WT ChiA W167A ChiA W275A ChiB WT ChiB W97A ChiB W220A	Selvlaget Laget av Daniel Schaupp Laget av Daniel Schaupp Selvlaget Selvlaget Selvlaget
Kitosan	F _A = 0,62	Laget på NMBU
β-kitin	180 μm microparticulate	France Chitin

2.5 Medier

Tabell 2-5 Selvlagde medier

Medium	Innhold	Mengde	Fremgangsmåte
LB-medium med agar og 115 µg/mL ampicillin	Trypton	10 g	Løses i dH ₂ O til
	Gjærekstrakt	5 g	en sluttvolum på
	NaCl	10 g	1 L.
	Agar	15 g	Autoklaveres.
	Ampicillin (115 mg/mL)	1 mL	Ampicillin tilsettes ved t <50 °C. Mediet fordeles i petriskåler.
LB-medium uten agar	Trypton	10 g	Løses i dH ₂ O til
	Gjærekstrakt	5 g	et sluttvolum på 1
	NaCl	10 g	L.

Tabell 2-6 Ferdige medier

Medium	Leverandør
SOC-medium	Life Technologies

2.6 Kit

Tabell 2-7 Kit

Kit	Innhold	Leverandør
E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit I	Oppsamlingsrør Løsning I/÷ RNase Løsning II: NaOH Løsning III: Guanidin-HCl, Eddiksyre HiBind™ DNA minikolonne Ekvilibreringsbuffer: NaOH HB-buffer: Guanidin-HCl, isopropanol DNA vaskebuffer Elueringsbuffer	Omega BIO-TEK
Qubit® dsDNA BR Assay Kits	Qubit® dsDNA BR buffer Qubit® dsDNA BR reagent Qubit® rør	Life Technologies

2.7 Buffere og løsninger

Tabell 2-8 Buffere og løsninger

Buffer/Løsning	Innhold	Mengde	Fremgangsmåte
2 mM A1	A1	0,621 mg	
	dH ₂ O	1404 µL	
A1/A2- standard 1	2mM A1	50 µL	
	5 mM A2	50 µL	
	dH ₂ O	900 µL	
A1/A2- standard 2	2mM A1	200 µL	
	5 mM A2	200µL	
	dH ₂ O	600 µL	
A1/A2- standard 3	2mM A1	500 µL	
	5 mM A2	500 µL	

5 mM A2 løsning	A2	1,278 mg
	dH ₂ O	602,5 µL
A2/A3/A4/A5- standard 1	5mM A2	30 µL
	1 mM A3	50 µL
	1 mM A4	50 µL
	1 mM A5	5 µL
	dH ₂ O	865 µL
A2/A3/A4/A5- standard 2	5mM A2	120 µL
	1 mM A3	125 µL
	1 mM A4	125 µL
	1 mM A5	25 µL
	dH ₂ O	605 µL
A2/A3/A4/A5- standard 3	5mM A2	300 µL
	1 mM A3	250 µL
	1 mM A4	250 µL
	1 mM A5	100 µL
	dH ₂ O	100 µL
1 mM A3	A3	0,635 mg
	dH ₂ O	1012 µL
1 mM A4	A4	0,831 mg
	dH ₂ O	1001 µL
1 mM A5	A5	1,616 mg
	dH ₂ O	1123 µL
115 mg/mL Ampicillin	Ampicillin	4600 mg
	dH ₂ O	40 mL
0,2 M Askorbinsyre	Askorbinsyre	0,3522 mg
	dH ₂ O	10 mL
Avfargingsløsning til	Etanol (96 %)	100 mL
SDS-page	Eddiksyre (konsentrert)	75 mL
	dH ₂ O	825 mL
Arbeidsløsning til SDS-PAGE	Blå buffer	500 µL
	Reduserende agent	200 µL
	dH ₂ O	300 µL

Buffer A til Ni-NTA	1 M Tris-HCl	10 mL	
	1 M NaCl	250 mL	
	dH ₂ O	240 mL	
Buffer B til Ni-NTA	1 M Tris-HCl	10 mL	
	1 M NaCl	250 mL	
	1,5 M Imidazol	6,67 mL	
	dH ₂ O	233,33 mL	
Buffer C til Ni-NTA	1 M Tris-HCl	10 mL	
	1 M NaCl	250 mL	
	1,5 M Imidazol	83,32 mL	
	dH ₂ O	157,7 mL	
Fargeløsning til SDS-PAGE	Comassie Brilliant Blue R250	0,50 g	
	Etanol (96 %)	200 mL	
	Eddiksyre (konsentrert)	50 mL	
	dH ₂ O	250 mL	
20 mM H₂SO₄	2 M H ₂ SO ₄	5 mL	
	dH ₂ O	495 mL	
3 M Imidazol	Imidazol	204,23 g	Tilsettes dH ₂ O til 1 L
	dH ₂ O		
1 M IPTG	IPTG	2,38 g	
	dH ₂ O	10 mL	
Matriks (MALDI)	Acetonitrill	150 µL	
	dH ₂ O	350 µL	
	2,5-dihydroksybenzosyre	10 mg	
1 M MgCl₂	MgCl ₂	50,83 mg	Tilsettes dH ₂ O til 250 mL
	dH ₂ O		
1 M NaAc-buffer pH 5,5	1 M natriumacetat	920 mL	pH justeres med
	1 M eddiksyre	25 mL	CH ₃ COOH og NaOH
	dH ₂ O		til 5,5. Tilsettes dH ₂ O til 1 L.

0,1 M NaAc-buffer pH 6,1	0,2 M natriumacetat 0,2 M eddiksyre dH ₂ O	57,3 mL 48 mL	pH justeres med CH ₃ COOH og NaOH til 6,1. Tilsettes dH ₂ O til 1 L..
1 M NaCl	NaCl dH ₂ O	58,44 mg	Tilsetter dH ₂ O til 1 L
Spheroplastbuffer	1 M Tris-HCl pH 8,0 Sukrose 0,5 M EDTA pH 8,0 50 mM PMSF dH ₂ O	10 mL 17,1 g 100 µL 200 µL	Tilsette dH ₂ O til 100 mL.
1 M Tris-HCl pH 8	Trizma base dH ₂ O	121 g	pH justres med 6M HCl til pH 8,0. Tilsettes dH ₂ O til 1 L.

3 Metoder

3.1 Oppdyrking av HCHT

Etter gjentatte forsøk på å få uttrykt HCHT50-W99A og HCHT39-W218A uten hell, ble oppgaven satt bort til SINTEF i Trondheim. Hos SINTEF ble gensekvensen for HCHT50-W99A og HCHT39-W218A med en C-terminal his-tag ligert inn i pTT5V5H8Q-plasmid. Dette plasmidet ble klonet inn i HEK293-6E celler. HEK293-6E cellene ble dyrket i F17-medium tilsatt L-glutamat (4 mM) og Kolliphor P188 (0,1 %) ved 37 °C og 70 rpm. Cellene ble induisert etter 48 timer med PEIpro, og høstet etter 96 timer. Cellene ble rensset med en HisTrap HP kolonne, og renheten ble kontrollert ved SDS-PAGE gel. (Stockinger et al. 2015)

3.2 Rensing av HCHT

3.2.1 Rensing med Ni-NTA Superflow agarose

De humane chitotriosidasene, HCHT50-W99A og HCHT39-W218A ble rensset ved hjelp av en kolonne pakket med Ni-NTA Superflow agarose. Dette kolonnematerialet inneholder en chelaterende agent kalt nitroleddisyre (NTA) og nikkellioner. Et nikkellion har seks bindingssteder, og i dette kolonnematerialet er fire av bindingssetene okkupert av NTA. De to resterende bindingssetene er ledige, og kan binde his-taggede proteiner. For å eluere de his-taggede proteinene, ble det brukt en buffer med høy konsentrasjon av imidazol ettersom imidazol har høyere affinitet til nikkelbindingssetene enn histidin. Vaskebufferen (buffer A) inneholder en lavere konsentrasjon av imidazol for å hindre at andre proteiner binder seg til kolonnen under renseprosessen.

Materialer:

- Proteiner i ekstrakt med HCHT50-W99A og HCHT39-W218A
- Ni-NTA Superflow agarose
- Buffer A til Ni-NTA
- Buffer B til Ni-NTA
- Buffer C til Ni-NTA
- 0,5 M NaOH
- 20 % Etanol

Metode:

Kolonnen ble pakket med cirka 5 mL Ni-NTA Superflow agarose. Buffer B ble påsatt kolonnen med en hastighet lik 2,5 mL/min til baselinjen var stabil. Deretter ble proteinekstraktet påsatt kolonnen, og videre ble kolonnen vasket med buffer A til baselinjen var stabil. Ønsket his-tagget protein ble eluert ved å sette på buffer C. Proteinene ble samlet opp. Da baselinjen igjen var stabil, ble kolonnematerialet vasket i med 5 kolonnevolum av henholdsvis 0,5 M NaOH og 20 % etanol.

3.2.2 Natrium dodecyl sulfate-polyakrylamide gel elektroforese (SDS-PAGE)

Natrium dodecyl sulfate-polyakrylamide gel elektroforese er en metode som benyttes til å undersøke renheten og størrelsen til proteiner. Før gelelektroforese må proteinene denatureres. Dette skjer ved at prøvene behandles med natriumdodecylsulfat (SDS) og ditiotreitrol (DTT) ved en temperatur på 70-100 °C. SDS tilfører negative ladninger til aminosyrene i proteinet, og fører til ødeleggelse av de to- og tredimensjonale strukturene. DTT er en sterk reduktant som reduserer disulfidbindinger i molekylet. Varmen bidrar til økt molekylhastighet, og gjør at denatureringen skjer raskere (Caprette 2000). Etter denne behandlingen appliseres proteinprøvene på en polyakrylamidgel. Gelen påføres et spenningsfelt, noe som gir en negativ og en positiv pol. De negativt ladede proteinene trekkes mot den positive polen. Porer i gelen med varierende størrelse og mønster gjør at det er lettere for små proteiner og vandre enn store, og på denne måten separeres proteinene etter størrelse (Siuzdak 1996). For å kunne bedømme størrelsen på proteinene påsettes gelen en størrelsesmarkør, en såkalt ladder som består av varierende mengde av proteiner med kjente størrelser (ThermoFisher 2014). For å visualisere proteinene på gelen benyttes et fargestoff kalt Coomassie brilliant blue, et trifenylmetan-molekyl med to svovelatomer. Dette fargestoffet binder til de basiske aminosyrene i proteinet, og mengden fargestoff som binder er proporsjonal med mengde protein. Fargestoffet har høyere affinitet til proteinene enn til polyakrylamidgelen, og gelen kan derfor avfarges til bakgrunnen er lav, og proteinene er godt synlige.

Materialer:

- NuPAGE® 10% Bis-Tris Gel 1,0 mm x 10 brønner
- MOPS SDS running buffer (1x)
- Arbeidsløsning
- Proteinmarkør, BenchMark Protein Ladder
- Proteinfraksjon(er)
- SDS-fargeløsning
- SDS-avfargningsløsning
- dH₂O

Metode:

10 µL proteinfraksjon og 10 µL arbeidsløsning ble blandet og inkubert i 10 minutter ved 70 °C. En ferdigstøpt polyakrylamidgel ble satt i gelkammeret. Det indre kammeret ble fylt med MOPS-buffer, mens det ytre gelkammeret ble fylt halvfullt. 7,5 µL størrelsesmarkør og 20µL denaturert proteinfraksjon ble applisert i hver sin ferdigstøpte brønn. Gelen ble så påført en spenning på 200 V i 50 minutter. Deretter ble gelen tatt ut av kammeret og tilsatt cirka 1 dl fargeløsning. Gel med fargeløsning og ble varmet i mikrobølgeovn i 1 minutt, før den ble inkubert på ristebrett i 5 minutter. Fargeløsningen ble videre helt av, og avfargningsløsning ble tilsatt og varmet 1 minutt i mikrobølgeovn. Gelen ble inkubert i 5-10 minutter på ristebrett. Avfargingstrinnet ble gjentatt to ganger. Avslutningsvis ble gelen avbildet med en EZ-imager fra Bio-Rad.

3.2.3 Oppkonsentrering og bytte av buffer

Etter rensing kan det være behov for å bytte buffer proteinet er løst i eller oppkonsentrere proteinet i løsningen, og til dette benyttes ofte rør med sentrifugefilter. Macrosep® Advance sentrifugefilter har en Omega™ membran, som er laget for å unngå uspesifikk binding til proteiner (PallCorporation 2014). Membranene i sentrifugerørene finnes med ulike porestørrelser, blant annet 10 kDa eller 30 kDa. Proteiner som har en lavere molekylvekt enn størrelsen filteret angir vil slippe gjennom filteret, mens de med en høyere molekylvekt vil forbli på oversiden av filteret.

Materialer:

- Macrosep® Advance 30K sentrifugerør
- Rene proteinfraksjoner
- Lagringsbuffer 0,1 M Tris-HCl pH 8

Metode:

Den rene proteinfraksjonen ble overført til Macrosep® Advance 30K sentrifugerør og røret ble fylt opp med lagringsbuffer. Sentrifugerøret ble sentrifugert ved 4300 rcf og 4 °C til det var igjen cirka 1,5 mL løsning i filteret. Flow through ble helt av og røret ble etterfylt med lagringsbuffer, og igjen sentrifugert under samme betingelser. Dette ble gjort 4 ganger, for å sikre at elueringsbufferen ble byttet ut med lagringsbufferen. Løsningen over filteret ble overført til et kryorør, og lagret ved 4 °C.

3.2.4 Bestemmelse av proteinkonsentrasjon med Bradford-metoden

I Bradford-metoden vil en fargeløsning som er rød under sure forhold, binde seg til sure og aromatiske aminosyrer i proteinet og skifte farge til blå. Mengde protein påvirker fargen på løsningen. Denne fargeendringen fører til at absorpsjonsmaksimumet til løsningen forskyves fra 470 nm til 595 nm. Absorbansen måles spektrofotometrisk ved 595 nm, og mengden protein i løsningen bestemmes ut fra en standardkurve.

Materialer:

- Lagringsbuffer 0,1 M Tris-HCl pH 8,0
- Proteinløsning
- BioRad Protein Assay Dye Reagent

Metode:

Proteinløsningen ble fortynnet i lagringsbufferen til et totalvolum på 800 µL. En blankprøve med kun lagringsbuffer ble også laget. Deretter ble 200 µL fargeløsning tilsatt hver prøve, før de ble inkuberet i romtemperatur i 5 minutter. Spektrofotometeret ble nullstilt med blankprøven før absorbansen i prøvene ble målt. Dersom absorbansen er utenfor standardkurven må fortynningsgraden til proteinet endres.

3.3 Nedbrytning av kitin

3.3.1 Nedbrytning av kitin for bestemmelse av enzymprosessivitet

Enzymprosessivitet er en egenskap som er interessant i forbindelse med degradering av krystallinske substrater som kitin. Det kreves svært mye energi å binde til krystallinsk substrat, og det er derfor energetisk gunstig å forbli bundet til enzymet så lenge som mulig. I dette forsøket ble prosessivitet målt, og oppgitt som P_{app} (apparent processivity), ved å kvantifisere produktene som dannes. Det antas at det første produktet som dannes, vil gi like mye partallsoligomerer som oddetallsoligomerer. Dette varierer avhengig av topologien til det aktive setet, men normalt dannes det enten en dimer eller en trimer. Trimerer vil videre hydrolyseres til en monomer og en dimer. De videre kuttene vil dimerer. Høyere grad av prosessivitet vil dermed gi mye et mye større antall dimerer i forhold til monomerer. Forholdet mellom antall monomerer og dimerer vil dermed gi et slags uttrykk for prosessiviteten til enzymet.

Materialer:

- 180 μm β -kitin
- 50 mM natriumacetatbuffer pH 6,1
- HCHT50-W99A og HCHT39-W218A
- 20 mM H_2SO_4
- Duapore Membrane 0,45 μm
- Sonikeringsbad
- Termomikser

Metode:

β -kitin ble løst opp i 50 mM natriumacetatbuffer pH 6,1 til en sluttkonsentrasjon på 2 mg/mL. Løsningene ble sonikeret i 20 minutter for å øke overflatearealet til kitinet. Videre ble de inkubert ved 37°C og 800 rpm i en termomikser. Løsningene ble tilsatt enzym til en sluttkonsentrasjon på 2,5 μM . Reaksjonen ble stoppet etter: 0 sekunder, 30 sekunder, 60 sekunder, 2 minutter, 5 minutter, 10 minutter, 20 minutter, 60 minutter, 5 timer, 24 timer, 48 timer og 144 timer ved å ut 75 μL prøve som ble blandet med 75 μL 20 mM H_2SO_4 . Prøvene ble deretter filtrert gjennom et 0,45 μm Duapore Membran filter for å fjerne rester av protein og store kitinpartikler. Etter filtrering ble prøvene overført til HPLC-rør og oppbevart i -20°C frem til analyse.

3.3.2 Nedbrytning av kitin for bestemmelse av «apparent» k_{cat}

Den initielle hastighetskonstanten kalles k_{cat}^{app} , og denne gir et mål på hvor raskt enzymet er. For å bestemme denne konstanten eksperimentelt analyseres produktene som dannes initielt i reaksjonen. Mengde produkt plottes mot tid, og stigningstallet til denne grafen brukes til videre beregninger. Stigningstallet deles på konsentrasjonen av enzym, og dette gir k_{cat}^{app} .

Materialer:

- 180 μm β -kitin
- 50 mM natriumacetatbuffer pH 6,1
- HCHT50-W99A og HCHT39-W218A
- 20 mM H_2SO_4
- Duapore Membrane 0,45 μm
- Sonikeringsbad
- Termomikser

Metode:

β -kitin ble løst opp i 50 mM natriumacetatbuffer pH 6,1 til en sluttkonsentrasjon på 20 mg/mL. Løsningene ble først inkubert i 10 minutter ved 37°C i en termomikser, før enzymet ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 170 nM. Underveis ble rørene vendt tilfeldig for hånd, for å imitere naturen. Uttak på 75 μL ble tatt ut etter 0 minutter, 4 minutter, 8 minutter, 12 minutter og 16 minutter og reaksjonen ble stoppet ved å tilsette 75 μL 20 mM H_2SO_4 . Som i avsnitt 3.3.1 ble prøvene klargjort til HPLC-analyse, og lagret ved -20 °C frem til analyse.

3.3.3 High performance liquid chromatography (HPLC)

HPLC er en type væskechromatografi som benytter høyt trykk til å føre analyseløsningen gjennom kolonnen. Dette fører til god resolusjon på separeringen av molekylene i løsningen. HPLC har et relativt stort bruksområde da teknikken åpner for analyse av molekyler med høy molekylvekt og høyt kokepunkt. Prinsippet bak separasjonen i HPLC er at ulike molekyler har ulik affinitet til både den stasjonære og den mobile fasen i systemet. Dette fører til at ulike molekyler vil ha oppholde seg ulikt tid i de to fasene. Dermed vil ulike molekyler ha ulik retensjonstid, og elueres ut på forskjellige tidspunkter (Miller 2010).

I denne oppgaven ble et Dionex Ultimate 3000 HPLC system benyttet, med en Rezex Fast Fruit H⁺ kolonne og en UV-detektor. Kolonnematerialet (den stasjonære fasen) i denne kolonnen består av sulfonert styrene-divinyl benzene (SDVB) som er negativt ladede, med H⁺ bundet til seg. Svovelsyren er den mobile fasen i systemet, og sørger for å protonere monomerene og dimerene som skal analyseres. De protonerte monomerene og dimerene kan dermed fungere som H⁺-atomer og bytte plass med protonet som er bundet til den stasjonære fasen, og blir dermed eluert ved ulike tidspunkter.

Materialer:

- Prøver i HPLC-rør
- Dionex Ultimate 3000 HPLC system
- Mobilfase: 5 mM H₂SO₄
- Rezex RFO-Fast Fruit H⁺ kolonne
- Forkolonne: Carbo-H 4 x 3,0 mm
- Standarder
 - Til bestemmelse av prosessivitet og A- og b-verdier: A1/A2-standard
 - Til bestemmelse av k_{cat}^{app} : A1/A2/A3/A4/A5

Metode:

Ved bruk av en autoinjektor ble 8 µL prøve injisert på kolonnen. Kitoooligosakkaridene i prøvene ble separert med isokratisk eluering ved 85 °C og en flow på 1 mL/min. De ble detektert ved 195 nm. Kromatogrammene ble analysert i programvaren Chromeleon. Basert på standardene ble det laget en standardkurve som ble brukt til å bestemme konsentrasjonen av de aktuelle kitoooligosakkaridene.

3.4 Nedbrytning av kitosan

Kitosan er en vannløselig derivat av kitin, og ble i dette forsøket brutt ned av HCHT. Kitosan kan ha ulik acetyleringsgrad, og denne graden blir angitt som en F_A-verdi. Denne verdien er definert som den molare konsentrasjonen av acetylerede enheter dividert på den totale molare konsentrasjonen av monomerer (Sikorski et al. 2006). I dette forsøket ble det benyttet kitosan med F_A=0,64. Nedbrytningsproduktene ble analysert ved hjelp av kjernemagnetisk resonans (NMR), størrelseseksklusjonskromatografi (SEC) og matriksassistert laser «Time of Flight» massespektrometri (MALDI-TOF-MS).

3.4.1 Oppløsning av kitosan

Materialer:

- Kitosan $F_A=0,64$
- Nedbrytningsbuffer: 80 mM natriumacetatbuffer pH 5,5
- dH_2O
- 10 mg/mL BSA

Metode:

150 mg kitosan ble løst i nedbrytningsbuffer og dH_2O (1:1 forhold) til en sluttkonsentrasjon på 10 mg/mL. BSA ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon lik 0,1 mg/mL. Løsningene ble inkubert ved 37 °C og 200 rpm i risteskap til all kitosanen var løst opp.

3.4.2 Nedbrytning av kitosan

Materialer:

- HCHT50-W99A og HCHT39-W218A
- Oppløst kitosan 10 mg/mL
- 1 M HCl
- Sprøytefilter 0,22 μm
- SpeedVac

Metode:

Enzym ble tilsatt kitosanløsningen til en konsentrasjon på 0,075 μg HCHT per mg kitosan. Prøver a 1 mL ble tatt ut stoppet etter: 10 minutter, 15 minutter, 30 minutter, 60 minutter, 90 minutter, 7 timer, 8 timer, 24 timer, 48 timer, 72 timer, 6 dager og 7 dager. Reaksjonene ble stoppet ved å endre pH i prøven til 2,5, og ble deretter kokt i 2 min. Prøvene ble deretter filtrert gjennom et 0,22 mm sprøytefilter, før de ble tørket i Speedvac. Dag 6, etter prøveuttak, ble reaksjonen tilsatt samme mengde enzym som ved start for å sikre at endepunktet var nådd.

3.4.3 Prøveopparbeidelse til analyse ved hjelp av kjernemagnetisk resonans (NMR)

Nedbrytningsproduktene fra nedbrytningen av kitosan vha. HCHT ble analysert med H^1 -NMR (proton-NMR). I H^1 -NMR er det viktig å bruke deutererte løsemidler for å unngå å forstyrre signalene fra analytten. I dette forsøket ble det i tillegg benyttet deuteriumoksid for å unngå overlapping med OH-signalene fra sukkeret (Williams & Fleming 2008). Dette innebærer at alt løsemiddelet må byttes ut fra H_2O til D_2O .

Materialer:

- D_2O
- NaDO
- DCI
- pH-meter
- SpeedVac

Metode:

Tørkede prøver (avsnitt 3.4.2) ble løst i 500 μL D_2O og pD-justert til 4,2 før de på ny ble tørket ved hjelp av SpeedVac. Denne prosessen ble gjentatt 1 gang, før prøvene ble løst i 700 μL D_2O og pD-justert til 4,2. Prøvene ble til slutt overført til 5 mm NMR-rør.

3.4.4 Kjernemagnetisk resonans (NMR)

For å bestemme nedbrytningsgraden av kitosan etter nedbrytning ble det benyttet proton-NMR (H^1 -NMR). NMR er en metode som benytter seg av enkelte atomkjerners reaksjon ved påvirkning av et sterkt magnetiske felt. Alle atomkjerner har en spinntall, og dersom dette tallet er ulikt fra null kan kjernene observeres ved NMR-analyse. Kjernen kan ha en lav-energisk tilstand og en høy-energisk tilstand, og under NMR eksiteres kjernene fra lav- til høy-energisk tilstand. Når kjernene går tilbake til den opprinnelige tilstanden, emitteres energi. Det er denne frigjøringen av energi som gir NMR-spektrene. Ulike kjemiske forbindelser kan derfor identifiseres ved hjelp av NMR-analyse, da de gir ulike spektra (Williams & Fleming 2008). Ved hjelp av denne analysemetoden kunne grad av nedbrytning blir bestemt, ved å kvantifisere ulike nedbrytningsprodukter.

Metode:

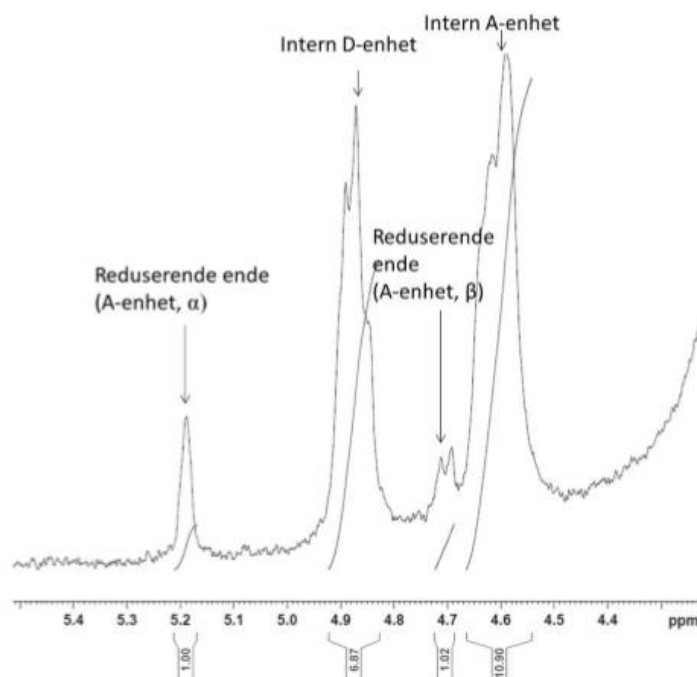
Prøvene ble analysert ved 400 Mz på 85°C. Deuteriumsresonansen i D₂O ble brukt som feltfrekvenslås. Referansen til de kjemiske skiftene ble referert til intern natrium-3-(metylsilyl)propionat-d₄. Antall scans ble satt til 64. Spektralvidden ble satt til 8,99 ppm, pulsvinkelen er 9,50 og blokkstørrelsen er satt til 8. «Aquisition time» er 4,5548 sekunder.

3.4.5 Tolking av spektre fra NMR-analyse

Metode:

De ulike toppene i spektrene ble integrert ved hjelp av programvaren mestRenova. Ved hjelp av integralene til utvalgte topper i spekteret, ble grad av polymerisering (DP_n) bestemt. DP_n tilsvarer antall sukkerenheter i en polymer, og ble bestemt med utgangspunkt i anomer (H-1) resonansene på bakgrunn av følgende formel: $DP_n = [\text{areal av alle H-1 resonanser (interne og ikke-reduserende ender)}] / (\text{areal av reduserende-ende resonanser})$. Dette gjorde det mulig å bestemme nedbrytningsgraden (α) ved hjelp av følgende formel: $\alpha = 1 / DP_n$. (Sørbotten et al. 2005)

Figur 3-1 illustrerer et NMR-spekter med de toppene som benyttet til å beregne DP_n, og de er merket med hva slags topp dette er.



Figur 3-1 Et eksempel på et ¹H-NMR spekter med toppene som benyttes til beregning av α avmerket.

3.4.6 Størrelsesekslusjonskromatografi (SEC)

SEC er en metode som separerer molekyler i en løsning basert på molekylstørrelse. Denne metoden ble benyttet for å separere ulike kitoooligosakkarider fra nedbrytningen av kitosan. SEC består av en mobilfase og en stasjonærfase. Den stasjonære fasen er satt sammen av dekstran og krysskoplett agarose, med en gitt porestørrelse. Molekyler som er for store til å gå inn i stasjonærfasen, vil følge med mobilfasen gjennom kolonnen og vaskes ut i voidtoppen. Små molekyler vil trenge inn i porene og retarderes. Dette gjør at molekylene separeres basert på størrelse. De minste molekylene retarderes mest og kommer sist ut (Miller 2010). Det er prøver der $\alpha \approx 0,04$ og $0,08$, samt α_{\max} som er analysert ved hjelp av SEC og MALDI-TOF-MS.

Materialer:

- Mobilfase, 0,15 M NH₄Ac pH 4,6
- Nedbrutt kitosan
- SEC-system (Se Tabell 2-1 Laboratorieutstyr for komplett liste)

Metode:

Tre seriekoblede Superdex™ 30 kolonner ble påsatt mobilfase med en flow på 0,8 mL/minutt. De tørkede prøvene med nedbrutt kitosan ble løst i 1000 µL mobilfase og injisert inn i systemet. Systemet var koplet til en RI-detektor som var igjen var koplet til en datalogger. Systemet var også koplet til en fraksjonssamler som samlet opp fraksjoner på 4 mL. Disse fraksjonene ble oppbevart ved -4 °C til videre analyse.

3.4.7 Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS)

MALDI er en ionisasjonsteknikk som er godt egnet til å produsere intakte ioner i gassfase fra store, lite flyktige og termisk stabile molekyler som for eksempel proteiner og sukre. Metoden benytter en laser som desorberer og ioniserer molekyler fra prøveplaten slik at det dannes positive ioner. Time of Flight Mass Spectrometry (TOF-MS) er en type MS som ofte blir brukt i kombinasjon med MALDI. Ionene som er produsert av MALDI, påføres et elektrisk felt og akselereres inn i et feltfritt område. Avhengig av forholdet mellom massen og ladningen (m/z -ratioen) til ionene bruker ulike molekyler ulik tid gjennom dette området, og

de kan dermed separeres. En detektor i enden registrerer hvor lang tid molekylene bruker, og danner et spekter med samtlige m/z-ratioer og mengden av de.

Materialer:

- Matriks: 15 mg/mL DHB i 30 % etanol
- Fraksjoner fra SEC
- Standard av A2/A3/A4/A5/A6
- MALDI-plate, MTP 384 target ground steel TF
- Ultraflex MALDI-TOF/TOF

Metode:

1 µL prøve og 1 µL matriks ble satt på MALDI-platen, og blandet. Før analyse av prøvene ble løsemiddelet fordampet, slik at analytten og matriksmolekylene dannet krystaller som kan ioniseres av laseren. Prøvene ble deretter analysert med et Ultraflex MALDI-TOF/TOF-instrument som er kontrollert av programmet FlexControl 3.3. En nitrogen 337 nm laserstråle ble benyttet. Alle spektra ble tatt med en akselerasjonsspenning på 25 kV, refletorspenning på 26 og en pulset ioneekstraksjon på 40 ns i positiv analysemodus. Hvert spektrum ble tatt opp fra m/z 200 til 3000. Standarden ble brukt til å kalibrere instrumentet. m/z-rasjonen til toppene i spektrene ble sammenliknet med teoretiske masser for ulike sukkerenheter, noe som gjorde det mulig å annotere toppene.

3.5 Uttrykking av det kitinolytiske maskineriet til *S. marcescens*

I denne oppgaven gjøres det forsøk med tre ulike enzymer fra det kitinolytiske maskineriet til *S. marcescens*, ChiA, ChiB og CBP21. Frysestocker med innsatt vektor for uttrykk av både villtype ChiA og ChiB, samt alle mutantene og for CBP21 brukt i dette forsøket eksisterte fra tidligere forsøk. Enkelte av disse frysestockene uttrykte imidlertid ikke proteinet så godt lenger. Dette kan skyldes f.eks. gamle celler eller mange opptiningar av frysestockene. Noen ganger kan dette løses med å isolere plasmidet med vektoren og transformere den inn i nye celler. Dette ble gjort for ChiB villtype og ChiB W220A.

3.5.1 Oppdyrking av bakteriestamme

Til plasmidisolering er det behov for celler som plasmidet kan isoleres fra. Derfor ble det først dyrket opp en liten kultur, som brukes videre i avsnitt 3.5.2.

Materialer:

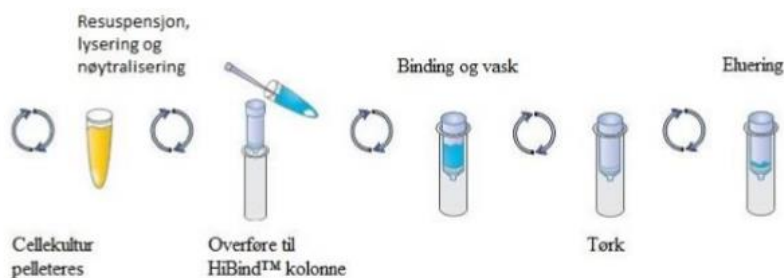
- Frysestock
- LB-meduim
- Ampicillin 115 mg/mL

Metode:

5 mL LB-meduim og 5 μ L 115 mg/mL ampicillin overføres til et reagensrør, og mediet tilføres celler fra en frysestock. Kulturen settes i risteskap på 37 °C og 225 rpm over natt.

3.5.2 Isolering av plasmid

Isolering av plasmid fra cellekultur ble gjort med E.N.Z.A.® Plasmid Mini Kit I. Cellene blir først alkalisk lysert. Deretter blir DNAet bundet til en HiBind® DNA kolonnemembran. Kolonnen vaskes før plasmidet elueres ut med en buffer med lavt saltinnhold (VWR 2016). Figur 3-2 illustrerer plasmidisoleringen som beskrevet i dette avsnittet.



Figur 3-2 Plasmidisolering med E.N.Z.A.® Plasmid Mini Kit I (VWR 2016)

Materialer:

- Cellekultur
- E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I

Metode:

Cellekultur ble overført til eppendorfrør og spunnet ned ved 10 000 x g i 1 min og høstet. Cellene ble deretter resuspendert i 250 µL løsning I. 250 µL løsning II ble tilsatt, og røret ble forsiktig vendt til det ble dannet et klart lysat. Deretter ble 350 µL løsning III tilsatt. Løsningen ble blandet til det ble dannet en hvitt utfall. Denne løsningen ble sentrifugert ved 13 000 x g i 10 min. Mens løsningen sentrifugeres ble HiBind® DNA kolonnene ekvibrert med 100 µL ekvibreringsbuffer. Kolonnen ble plassert i et 2 mL oppsamlingsrør og sentrifugert ved 13 000 x g i 1 min. Løsningen med plasmidet ble forsiktig overført til kolonnen og sentrifugert i 1 min. ved 13 000 x g. Flow through helles av og 500 µL HBC buffer ble tilsatt kolonnen, før den igjen ble sentrifugert ved 13 000 x g i 1 min. Flow through ble igjen helt av, og 700 µL DNA vaskebuffer ble tilsatt og sentrifugeringstrinnet gjentatt. Flow through ble helt av, og for å sikre at kolonnen var helt tørr ble den sentrifugert ved 13 000 x g i 2 minutter. Kolonnen ble flyttet over i et rent eppendorfrør, og 30 µL elueringsbuffer ble tilsatt. Røret med kolonnen ble sentrifugert i 1 min på 13 000 x g for å eluere plasmidet. Det isolerte plasmidet ble oppbevart ved -20 °C.

3.5.3 Konsentrasjonsbestemmelse av DNA med Qubit®

Konsentrasjonen av det isolerte plasmidet ble bestemt ved å bruke et Qubit® fluorometer med et tilhørende Qubit® dsDNA BR Assay Kit. Fluorometeret kan måle DNA-konsentrasjoner mellom 1 og 1000 ng/µL (LifeTechnologies 2015).

Materialer:

- Renset plasmid
- Qubit® fluorometer
- Qubit® dsDNA BR Assay Kit

Metode:

En arbeidsløsning bestående av 199 µL BR buffer og 1 µL BR reagent ble laget for hver prøve som skulle måles. For hver prøve ble det laget to paralleller av 2 µL plasmid og 198 µL arbeidsløsning i Qubit® rør. Prøvene ble vortexet og inkubert i romtemperatur i 2 min. Ved hjelp av en tidligere laget standardkurve på Qubit® fluorometeret ble konsentrasjonen i prøvene bestemt.

3.5.4 Transformering av plasmid inn i OneShot® TOP10 celler

Isolert plasmid, som beskrevet i avsnitt 3.5.2, ble transformert i inn i OneShot® TOP10 superkompetente *Escherichia coli* celler. Disse cellene har en transformasjonseffektivitet på 1×10^9 cfu/ μ g plasmid DNA med en stabil reproduksjon av plasmidet. I tillegg er de godt egnet til å ta opp fremmed DNA (LifeTechnologies 2013).

Materialer:

- Plasmid
- OneShot® TOP10 *E. coli* celler
- SOC-medium
- LB-agarplater (100 μ g/mL ampicillin)

Metode:

OneShot® TOP10 *E. coli* cellene ble tint forsiktig på is. Omtrent 10 ng plasmid ble tilsatt cellene, og blandet forsiktig. Løsningen ble inkubert på is i 30 minutter. Videre ble den varmebehandlet ved 42°C i 30 sekunder, før den ble inkubert på is i 2 minutter. Deretter ble 250 μ L forvarmet (42°C) SOC-medium tilsatt i sterilskap. Løsningen ble så inkubert ved 37°C og 225 rpm i minst 1 time før 25 μ L og 50 μ L av kulturene ble platet ut på hver sin LB-agarplate. Platene ble inkubert ved 37 °C over natten.

3.5.5 Oppdyrking av transformanter

Transformanter fra avsnitt 3.5.4 ble dyrket opp, slik at de kan behandles videre.

Materialer:

- Plate med tranformanter
- LB-meduim
- Ampicillin 115 mg/mL

Metode:

5 mL LB-meduim og 5 μ L 115 mg/mL ampicillin overføres til et reagensrør. En av koloniene fra petriskålen overføres til mediet. Kulturen settes i risteskap på 37 °C og 225 rpm over natt.

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

Plasmid fra cellekultur med OneShot® TOP10 celler fra avsnitt 3.5.5, ble isolert som beskrevet i avsnitt 3.5.2. Dette plasmidet transformeres videre inn i OneShot® BL21 Star™ (DE3) celler. Disse cellene har en noe lavere transformasjonseffektivitet (1×10^8 cfu/ μ g plasmid DNA) men er designet for høy ekspresjon av plasmid (LifeTechnologies 2010).

Materialer:

- Plasmid
- OneShot® BL21 Star™ (DE3) *E. coli* celler
- SOC-medium
- LB-agarplater (100 μ g/mL ampicillin)

Metode:

Transformering ble utført som beskrevet i avsnitt 3.5.4.

3.5.7 Oppdyrking av transformanter

Oppdyrking av transformanter fra LB-agarplatene ble utført som beskrevet i avsnitt 3.5.5.

3.5.8 Tillaging av frysestocker

Det ble laget frysestocker av cellekulturene fra avsnitt 3.5.7. Dette gjør langtidsoppbevaring ved -80 °C mulig.

Materialer:

- Cellekultur
- 87 % glyserol

Metode:

500 μ L cellekultur ble blandet med 700 μ L autoklavert glyserol i et kryorør. Frysestockene ble oppbevart ved -80 °C.

3.5.9 Overekspressjon

For å uttrykke ønsket enzym ble de ulike bakteristammene dyrket i LB-medium tilsatt ampicillin. Enzymene som ble dyrket opp var ChiA villtype, ChiB villtype, ChiB W220A, ChiB W97A og CBP21.

Materialer:

- LB- medium
- Frysestock av ønsket cellekultur
- Ampicillin 115 mg/mL

Metode:

En 2 L dyrkningskolbe ble tilsatt 500 mL LB-medium og 235 μ L ampicillin (115mg/mL) i sterilitet. Mediet ble inokulert med den ønskede frysestocken, og inkubert ved 37°C og 225 rpm over natt.

3.5.10 Tillaging av periplasmatiske ekstrakt

E.coli er en gramnegativ bakterie og har derfor et område mellom ytre cellevegg og peptidoglykanlaget som kalles periplasma. ChiA og CBP21 har et N-signalpeptid, som gjør at proteinet transporteres ut i periplasmaen. ChiB har ikke dette signalpeptidet men proteinet ser ut til, av ukjente grunner, å sive ut til periplasmaen allikevel (Brurberg et al. 2001). For å ekstrahere proteiner fra periplasmaen, tilsettes en buffer med høy sukkerkonsentrasjon som cellene kan ta opp. Cellene gis deretter et osmotisk sjokk med kaldt vann og magnesiumklorid, som gjør at det periplasmatiske ekstraktet ble frigjort.

Fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF) kan tilsettes for å hemme eventuelle proteaser i ekstraktet.

Materialer:

- Fersk, iskald spheroplastbuffer
- Iskaldt dH₂O
- 1 M MgCl₂
- 50 mM PMSF
- Sterilfilter 0,22 μ m

Metode:

Cellene ble først høstet ved å sentrifugere mediet ved 8000 rpm og 4 °C i 10 minutter. Videre ble cellene resuspendert i 25 mL spheroplastbuffer, og inkubert på is i 5 minutter. Deretter ble løsningen sentrifugert ved 8000 rpm og 4°C i 10 minutter. Supernatanten ble dekantert, og pelleten inkubert i romtemperatur i 10 min. Pelleten ble videre resuspendert i 15 mL iskaldt vann og avkjølt på is i 45 sekunder, før 1,5 mL 1 M MgCl₂ ble tilsatt. Suspensjonen ble sentrifugert igjen ved 8000 rpm og 4°C i 10 minutter. Supernatanten ble steriltfiltrert med et 0,22 µm filter og tilsatt 2 µL PMSF/mL løsning dersom den skulle lagres. Det periplasmatiske ekstraktet ble lagret ved 4 °C frem til rensing.

3.6 Rensing av enzymer fra det kitinolytiske maskineriet til *S. marcescens*

3.6.1 Rensing av periplasmatiske ekstrakt på kitinkuler

Det periplasmatiske ekstraktet inneholder ofte flere ulike proteiner, og for å isolere kitinasen brukes kitinkuler. Kitinkuler er en form for affinitetskromatografi, der kitinasenes affinitet til kitin utnyttes for å binde enzymet til kolonnen. Andre enzymer vil gå gjennom kolonnen uten å binde, og på den måten kan kitinasen isoleres.

Materialer:

- Periplasmatiske ekstrakt
- Buffer A: 50 mM Tris-HCl pH 8,0
- Buffer B: 20 mM eddiksyre
- 0,3 M NaOH
- Kitinkuler
- 20 % etanol

Metode:

Forbehandling av det periplasmatiske ekstraktet av CBP21: Før rensing saltes løsningen med 3 M (NH₄)₂SO₄ til konsentrasjonen i ekstraktet er 1 M.

Kolonnen ble pakket med 8 mL kolonnemateriale. Buffer A ble påsatt kolonnen, med en hastighet på 2,5 mL til baselinjen var stabil. Periplasmatiske ekstrakt ble deretter påsatt før buffer A igjen ble påsatt til baselinjen var stabil for å vaske ut proteinene som ikke bandt til

kolonnematerialet. Videre ble buffer B påsatt og proteinet eluert ut. Kolonnen ble regenerert med 0,3 M NaOH og vasket med 20 % etanol.

3.6.2 SDS-PAGE

Fraksjoner fra rensingen ble analysert med SDS-PAGE som beskrevet i 3.2.2

3.6.3 Oppkonsentrering og bytte av buffer

Fraksjoner fra rensingen ble oppkonsentrert og byttet buffer på som beskrevet i avsnitt 3.2.3. Lagringsbufferen for disse enzymene var 0,1 M Tris-HCl pH 8,0. For CBP21 ble Amicon Ultracel® 10 K, oppkonsentreringsrør benyttet.

3.6.4 Bestemmelse av proteinkonsentrasjon med Bradford-metoden

Proteinkonsentrasjonen på det oppkonsentrerte proteinet ble bestemt som beskrevet i avsnitt 3.2.4.

3.7 Nedbrytning av kitin

3.7.1 Aktivitetsassay

I dette forsøket ble ChiA villtype (WT), ChiA W167A, ChiA W275A, ChiB villtype (WT), ChiB W220A og ChiB W97A brukt. Hensikten var å undersøke enzymenes aktivitet på kitin, og deretter sammenlikne resultatene. For å gjøre den tilgjengelige overflaten på kitin større, ble kitinet sonikert før tilsats av enzym. Ulike forhold mellom enzym- og substratkonsentrasjon ble testet, for å skape best mulig betingelser for reaksjonen. Når aktiviteten skal testes er det viktig at enzymet til enhver til er mettet med tilgjengelig substrat, for å få et mest mulig korrekt anslag. Dersom enzymet ikke er mettet, vil tilgangen på substrat være en begrenset faktor for aktiviteten. Aktiviteten måles ved å analysere mengden dimerer og monomerer som blir dannet, og beregne andelen av disse i forhold til opprinnelig substratkonsentrasjon.

Materialer:

- Ønsket kitinase
- 50 mM natriumacetatbuffer pH 6,1
- 20 mM H₂SO₄
- 180 µm β-kitin
- Sonikeringsbad
- Termomikser

Metode:

β-kitin ble løst i 50 mM natriumacetatbuffer pH 6,1 til en konsentrasjon på 20 mg/mL og sonikert i 20 minutter. Deretter ble prøvene inkubert i en termomikser ved 37°C og 800 rpm. Prøvene ble preinkubert i 10 minutter før enzymet ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 100 nM. Reaksjonen ble stoppet hver time i 7 timer, ved å ta ut 75 µL prøve og blande den med 75 µL H₂SO₄. En nullprøve ble tatt ut før enzymtilsetning. Prøvene ble deretter filtrert gjennom et 0,45 µm Duapore Membran filter for å fjerne rester av protein og store kitinpartikler. Etter filtrering ble prøvene overført til HPLC-rør og oppbevart i -20°C frem til analyse.

3.7.2 Metting av CBP21

Innledningsvis (avsnitt 1.4.3.3) er det beskrevet om mekanismen CBP21 benytter i kløyvningen av glykosidbindinger. CBP21 er avhengig av kobber og molekylært oksygen for å fungere, og derfor må CBP21 mettes med kobber før det benyttes i forsøk.

Materialer:

- CBP21
- 5 mM CuSO₄
- PD MiniTrap™ G-25 kolonne
- 50 mM natriumacetatbuffer pH 6,1 (lagringsbuffer)

Metode:

100 μL CBP21 ble inkubert i romtemperatur i 30 minutter med en 3 ganger molarkonsentrasjon av CuSO_4 i forhold til enzymkonsentrasjon. Overskuddet av kobber ble fjernet ved å benytte en PD MiniTrapTM G-25 kolonne. Kolonnen ble først ekvilibrert med 8 mL lagringsbufferen. Da lagringsbufferen var trukket ned i kolonnematerialet, ble prøven applisert. Totalt prøvevolum skal være 500 μL , og dette ble justert ved å applisere 400 μL lagringsbuffer. Kobbermettet CBP21 ble eluert ved å applisere 200 μL av lagringsbufferen 5 ganger. Dette ble samlet opp i 5 ulike rør hvor rent CBP21 befant seg i fraksjon 2.

3.7.3 Konsentrasjonsbestemmelse av mettet CBP21 med A_{280}

Konsentrasjon av mettet CBP21 ble bestemt ved å måle absorbans ved 280 nm (A_{280}). Denne metoden for konsentrasjonsbestemmelse er rask og enkel, og ikke noe av proteinet går til spille. Aminosyrer har to absorpsjonsmaksimum for UV-lys, ved 200 nm og 280 nm. A_{200} skyldes peptidbindingene mellom aminosyrene. A_{280} er forårsaket av aromatiske aminosyrer, og ligger i et område av spekteret som er lett å studere. Sammenhengen mellom absorbans og konsentrasjon er gitt ved:

Likning 4: $A_\lambda = \epsilon_\lambda lc$

A_λ er absorbansen ved bølgelengde λ , l er lengden på lysveien (kyvetten), c er konsentrasjonen og ϵ_λ er ekstinksjonskoeffisienten ved bølgelengde λ .

Ekstinksjonskoeffisienten kan beskrives som molar absorptivitet, og hvert molekyl har en egen verdi. Denne verdien kan beregnes ved å bruke den overnevnte likningen (Mathews et al. 2013). Når konsentrasjonen er ukjent, slik som i dette forsøket, må ekstinksjonskoeffisienten være kjent. For CBP21 er $\epsilon_{280} \approx 35\ 000$

Materialer:

- Mettet CBP21, fraksjon 2
- 50 mM natriumacetatbuffer pH 6,1 (lagringsbuffer)
- UV-etter
- Spektrofotometer

Metode:

Lagringsbufferen ble brukt som blankprøve for å nullstille spektrofotometeret. Deretter ble A_{280} bestemt for enzymet, og konsentrasjonen ble beregnet.

3.7.4 Aktivitetsassay med CBP21

CBP21 og askorbinsyre ble tilsatt rørene etter sonikering, til en sluttkonsentrasjon på henholdsvis 1 μ M og 2 mM. Rørene ble inkubert ved 37 °C og 800 rpm i 2,5 timer før kitinasen ble tilsatt. Resten av assayet ble utført som beskrevet i avsnitt 3.7.1

3.7.5 HPLC

Prøvene som ble laget i avsnitt 3.7.1 og 3.7.4 ble analysert med HPLC som beskrevet i avsnitt 3.3.3. I denne analysen ble det benyttet standarder som inneholdt A1 og A2.

3.7.6 Databehandling: Beregning av A- og b-verdier

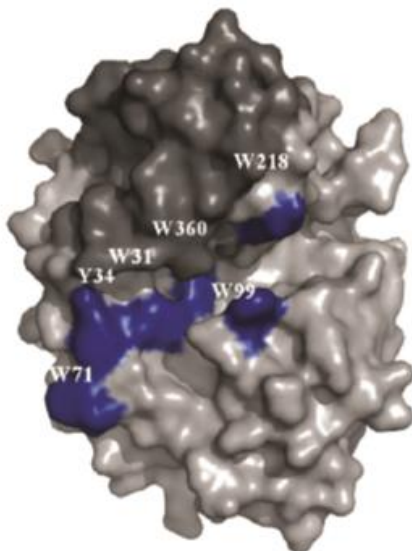
Data fra HPLC ble behandlet ved hjelp av OriginPro 8. Graden av nedbrytning (%) for alle tidspunkter ble trukket fra graden av nedbrytning som ble observert i nullprøven, og ble dermed plottet mot tid. A- og b-verdier ble kalkulert ved å bruke «nonlinear least-square fit» i origin og likningen for modellen: $x = Ab^t$.

4 Resultater

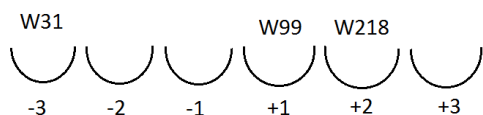
4.1 Residuanalyse

4.1.1 Residuanalyse i HCHT

Det aktive setet i HCHT inneholder flere aromatiske residuer, og har en relativt grunn kløft sammenliknet med for eksempel ChiA og ChiB. De aromatiske residuene er vesentlige for substratbinding, da de interagerer med substratet ved hjelp av hydrofobe interaksjoner. Figur 4-1 viser krystallstrukturen til HCHT39, med de aromatiske aminosyrene merket av. I HCHT består det aktive setet av seks subseter, henholdsvis -3 til +3. I denne oppgaven ble effekten av de aromatiske residuene W99 og W218 på substratnedbrytning, som er plasser henholdsvis subsete +1 og +2 studert. Figur 4-2 illustrerer posisjonen til W99 og W218 i det aktive setet, samt W31. W31 er mutert i det tidligere arbeidet utført i dette prosjektet, disse resultatene brukes til sammenlikning. W218 regnes som en analog til ChiB W220, som er kjent for å ha en avgjørende virkning på prosessivitet (Eide et al. 2016; Horn et al. 2006). W99 er en analog til W97 i ChiB, og har en katalytiske rolle i kløyvingen i tillegg til binding av substrat. Dette arbeidet skal, som nevnt tidligere, utfylle tidligere arbeid utført av Stockinger og Eide (Eide et al. 2016; Stockinger et al. 2015). I denne oppgaven er derfor mutasjonen i W99 utført i HCHT50 og W218 mutasjonen utført HCHT39.



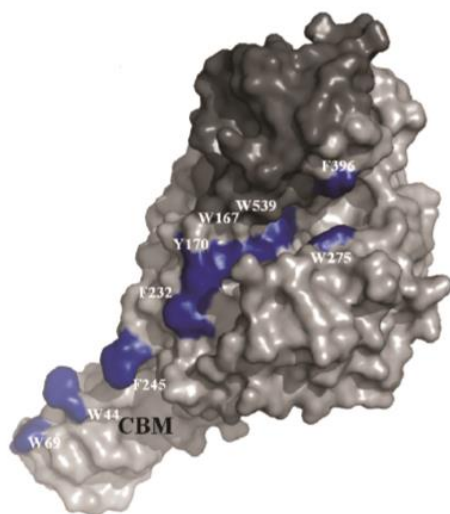
Figur 4-1 HCHT39 med aromatiske aminosyrer i det aktive setet farget blått, og α/β -insersjonsdomenet farget mørkegrått. (Eide et al. 2011)



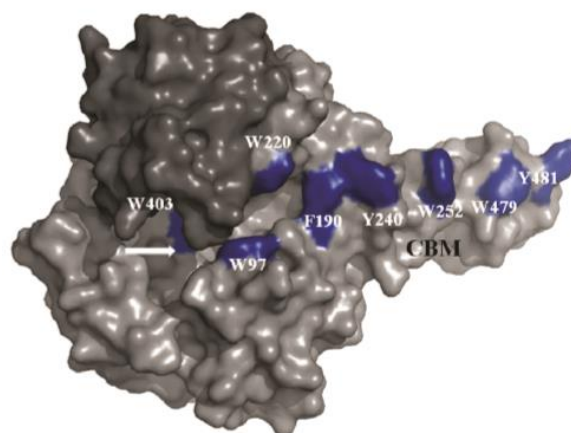
Figur 4-2 Illustrer de seks subsetene i det aktive setet til HCHT, der tryptofanresiduen er merket av.

4.1.2 Residuanalyse i ChiA og ChiB

ChiA og ChiB er prosessive enzymer. ChiA har en dyp kløft i det aktive setet mens ChiB har en tunnel. De aktive setene til ChiA og ChiB har flere aromatiske residuer, og disse er uthevet i krystallstrukturen i henholdsvis i figur 4-3 og 4-4. ChiA har et aktivt sete bestående av subseter fra -4 til +2. W167 er plassert i subsete -3 og er ansett for å være svært viktig for substratbinding og prosessivitet. I tillegg er denne aminosyren vesentlig i prosessen med å skyve substratet gjennom kløften samt å holde substratet assosiert med enzymet under kløyvingen (Norberg et al. 2011). W275 er plassert i subsete +1, og binder til produktet før det fjernes fra det aktive setet. W275 påvirker også grad av prosessiviteten, men trolig ikke like mye som W167 (Zakariassen et al. 2009). ChiB har seks subseter nummerert fra -3 til +3. W97 og W220 sitter i henholdsvis subsete +1 og +2, som er substratbindende seter (Horn et al. 2006). Sørli et al. (2012) har vist at W97 er viktig for grad av prosessivitet under nedbrytning av krystallinsk kitin. Dette aromatiske residuet befinner seg i taket av tunnelen i det aktive setet. W220 spiller også en viktig rolle for den prosessive karakteren til ChiB, men i mindre grad enn W97. W220 sitter i en loop i α/β -domenet.



Figur 4-4 ChiA med aromatiske aminosyrer i det aktive setet farget blått, og α/β -insersjonsdomenet farget mørkegrått. (Eide et al. 2011)

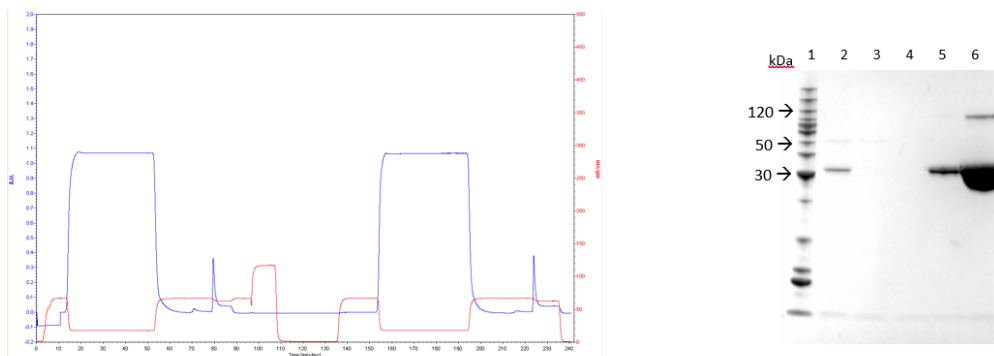


Figur 4-3 ChiB med aromatiske aminosyrer i det aktive setet farget blått, og α/β -insersjonsdomenet farget mørkegrått. (Eide et al. 2011)

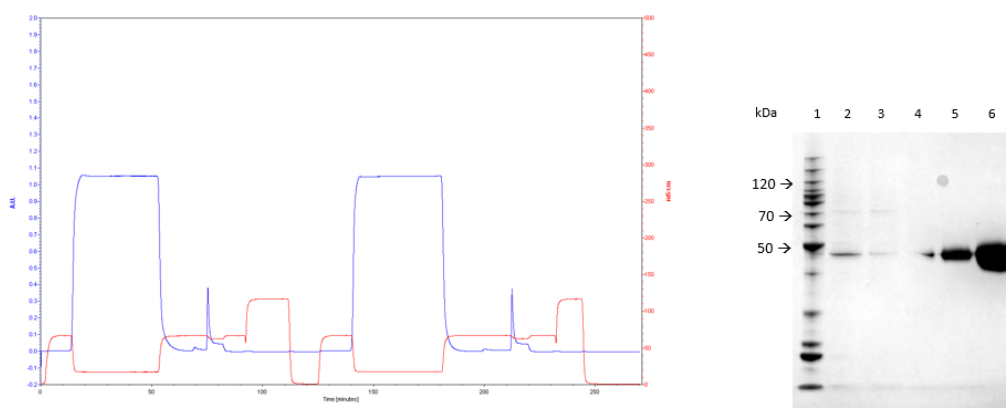
4.2 Isolering av de ulike proteinene

4.2.1 Rensing av HCHT

Overekspresjon og tillaging av proteinekstrakt av HCHT50-W99A og HCHT30-W218A ble utført av SINTEF som beskrevet i avsnitt 3.1. Proteinekstraktet ble renset ved hjelp av Ni-NTA superflow agarose som beskrevet i avsnitt 3.2.1. Kromatogrammene fra rensingen, samt SDS-PAGE gel er vist i Figur 4-5 og Figur 4-6.



Figur 4-5 Kromatogram (til venstre) og SDS-PAGE gel (til høyre) for isolering av HCHT50-W99A. Proteinet er påsatt i to runder for ikke å overbelaste kolonnen, og kromatogrammet viser derfor to runder med rensing. Den første toppen i kromatogrammet er voidtoppen,, den andre toppen er proteiner som binder svakt til kolonnen, og vaskes ut først, mens topp tre er det eluerte proteinet. På SDS-PAGE gelen er det i brønn 1 påsatt en størrelsesmarkør, i brønn 2 det periplasmatiske ekstraktet, i brønn 3 voiden, i brønn 4 topp 2, i brønn 5 eluertet og i den siste brønnen det eluerte proteiner etter bytte av buffer og oppkonsentrering



Figur 4-6 Kromatogram (til venstre) og SDS-PAGE gel (til høyre) for isolering av HCHT39-W218A. Proteinet er påsatt i to runder for ikke å overbelaste kolonnen, og kromatogrammet viser derfor to runder med rensing. Den første toppen i kromatogrammet er voidtoppen, den andre toppen viser proteiner som binder svakt til kolonnen, og vaskes ut først, mens topp tre er det eluerte proteinet. På SDS-PAGE gelen er det i brønn 1 påsatt en størrelsesmarkør, i brønn 2 det periplasmatiske ekstraktet, i brønn 3 voiden, i brønn 4 topp 2, i brønn 5 eluertet og i den siste brønnen det eluerte proteiner etter bytte av buffer og oppkonsentrering

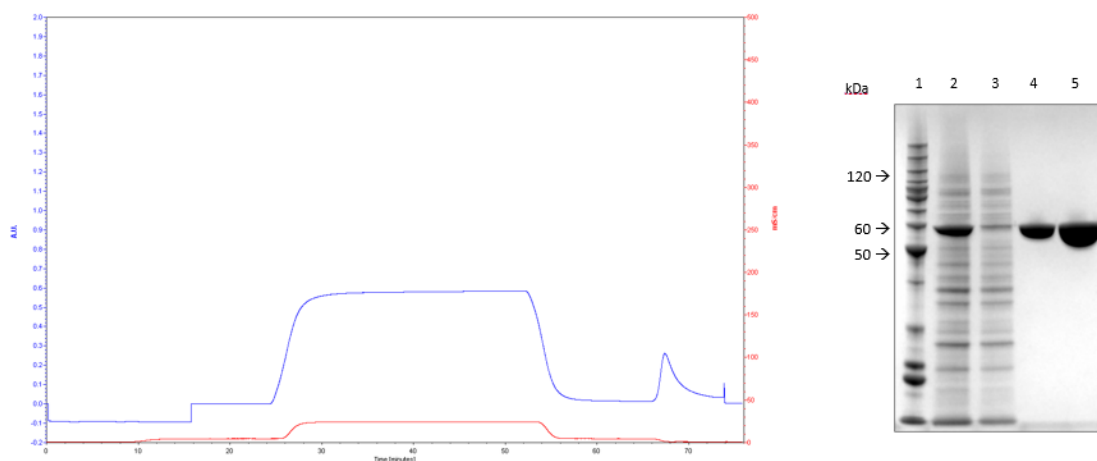
SDS-PAGE gelen for HCHT50-W99A viser at det oppkonsentrerte proteinet inneholder en forurensing på rundt 120 kDa. Dette er imidlertid så lite i forhold til mengden HCHT50-W99A at det ansees for å ikke være forstyrrende eksperimentelt. HCHT identifiseres ved et bånd ved cirka 50 kDa. Tabell 4-1 viser utbytte av rensingene.

Tabell 4-1 Utbytte fra rensingen av HCHT50-W99A og HCHT39-W218A.

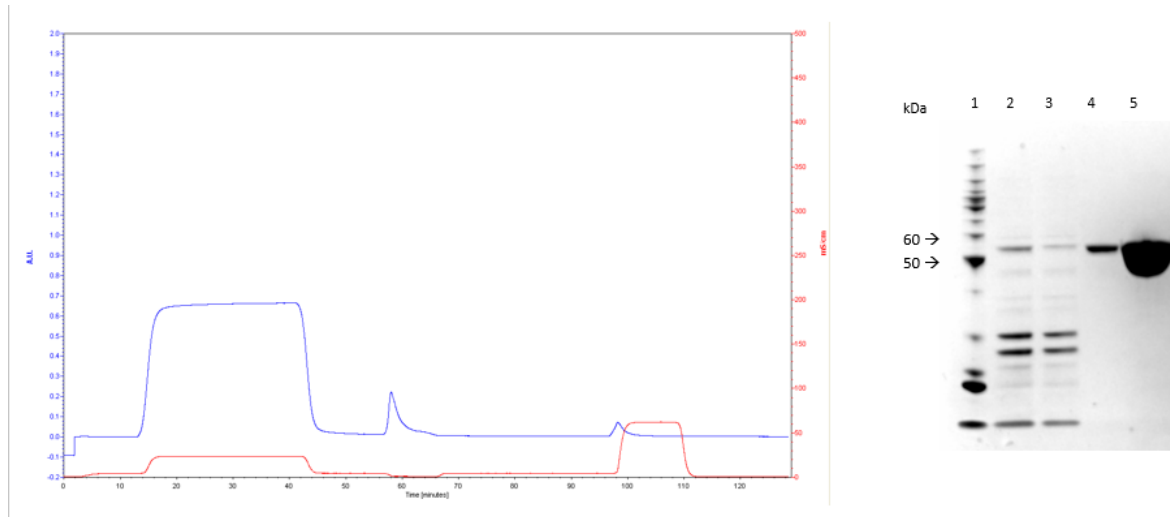
Enzym	Konsentrasjon (μM)	Volum (mL)
HCHT50-W99A	61,9	1,8
HCHT39-W218A	68,2	2,1

4.2.2 Rensing av enzymer fra det kitinolytiske maskineriet til *S. marcescens*

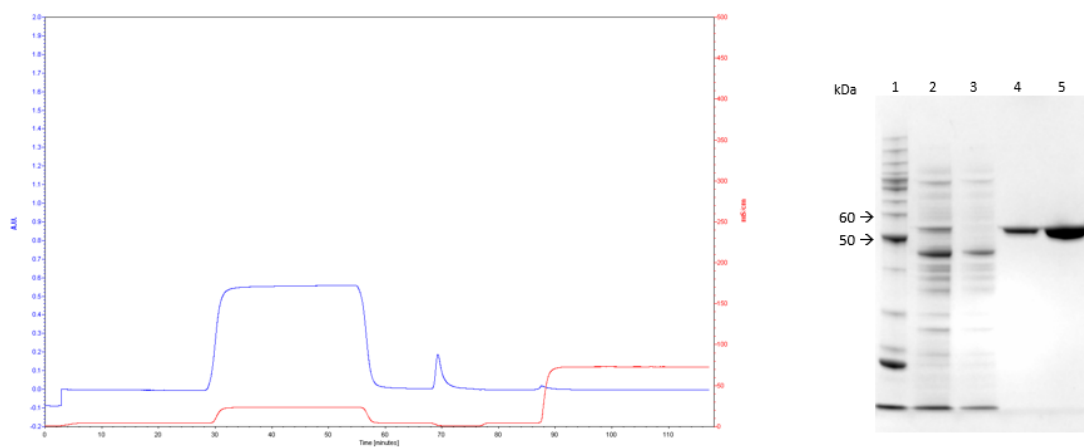
ChiA, ChiB og CBP21 ble isolert ved å rense det periplasmatiske ekstraktet på en kolonne av kitinkuler. Dette kolonnematerialet binder kitinaser, mens andre proteiner vaskes ut i voidtoppen. Videre elueres kitinasen med 20 mM eddiksyre som gir topp nummer to i kromatogrammet. Figur 4-7 – 4-10 viser kromatogrammene og SDS-PAGE gelene for isolering av ChiA-WT, ChiB-WT, ChiB-W97A, ChiB-W220A og CBP21. Molekylvektene til ChiA er omtrent 58 kDa og ChiB er omtrent 55 kDa. CBP21 har en molekylvekt på cirka 21 kDa



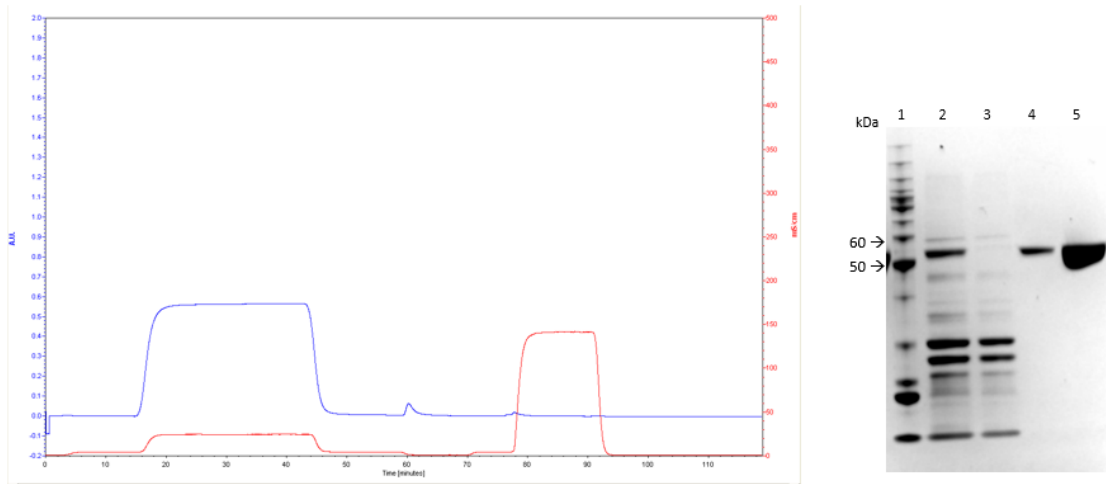
Figur 4-7 Kromatogram (til venstre) og SDS-PAGE gel (til høyre) for isolering av ChiA-WT. Den første toppen i kromatogrammet viser voidtoppen mens den andre toppen er det eluerte proteinet. På SDS-PAGE gelen er det i brønn 1 påsatt en størrelsesmarkør, i brønn 2 det periplasmatiske ekstraktet, i brønn 3 voiden, i brønn 4 eluatet og i den siste brønnen det eluerte proteinet etter bytte av buffer og oppkonsentrering.



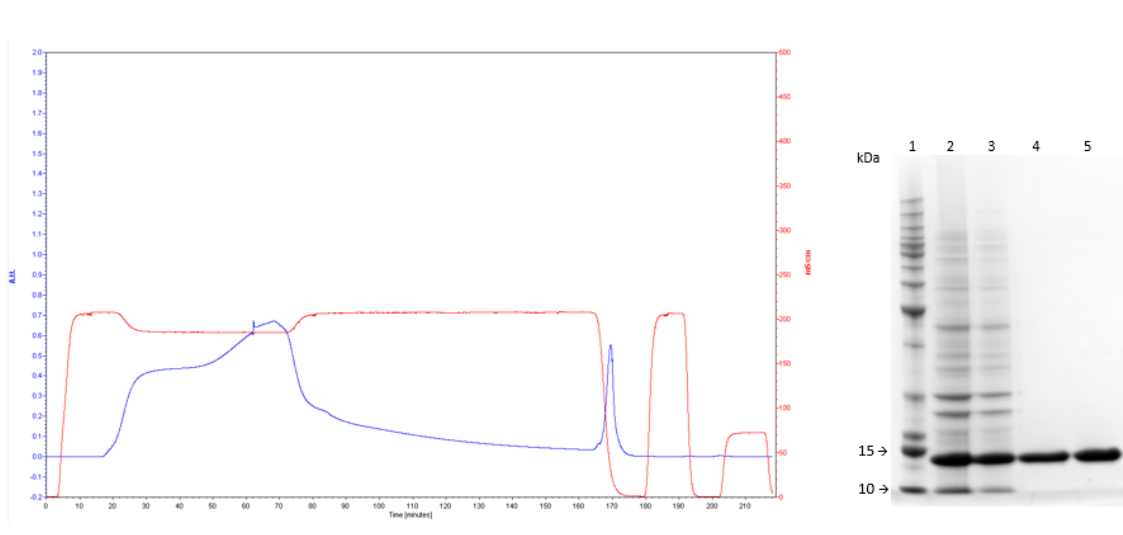
Figur 4-8 Kromatogram (til venstre) og SDS-PAGE gel (til høyre) for isolering av ChiB-WT. Den første toppen i kromatogrammet er voidtoppen mens den andre toppen er det eluerte proteinet. Den siste toppen er forurensinger som kom ut under vask av kolonnen. På SDS-PAGE gelen er det i brønn 1 påsatt en størrelsesmarkør, i brønn 2 det periplasmatiske ekstraktet, i brønn 3 voiden, i brønn 4 eluatet og i den siste brønnen det eluerte proteinet etter bytte av buffer og oppkonsentrering.



Figur 4-9 Kromatogram (til venstre) og SDS-PAGE gel (til høyre) for isolering av ChiB-W97A. Den første toppen i kromatogrammet er voidtoppen mens den andre toppen er det eluerte proteinet. Den siste toppen er forurensinger fra vask av kolonnen. På SDS-PAGE gelen er det i brønn 1 påsatt en størrelsesmarkør, i brønn 2 det periplasmatiske ekstraktet, i brønn 3 voiden, i brønn 4 eluatet og i den siste brønnen det eluerte proteinet etter bytte av buffer og oppkonsentrering.



Figur 4-10 Kromatogram (til venstre) og SDS-PAGE gel (til høyre) for isolering av ChiB-W220A. Den første toppen i kromatogrammet er voidtoppen mens den andre toppen viser det eluerte proteinet. Den siste toppen er forurensinger fra vask av kolonnen. På SDS-PAGE gelen er det i brønn 1 påsatt en størrelsesmarkør, i brønn 2 det periplasmatiske ekstraktet, i brønn 3 voiden, i brønn 4 eluatet og i den siste brønnen det eluerte proteinet etter bytte av buffer og oppkonsentrering.



Figur 4-11 Kromatogram (til venstre) og SDS-PAGE gel (til høyre) for isolering av CBP21. Den første toppen i kromatogrammet er voidtoppen mens den andre toppen viser det eluerte proteinet. På SDS-PAGE gelen er det i brønn 1 påsatt en størrelsesmarkør, i brønn 2 det periplasmatiske ekstraktet, i brønn 3 voiden, i brønn 4 eluatet og i den siste brønnen det eluerte proteinet etter bytte av buffer og oppkonsentrering

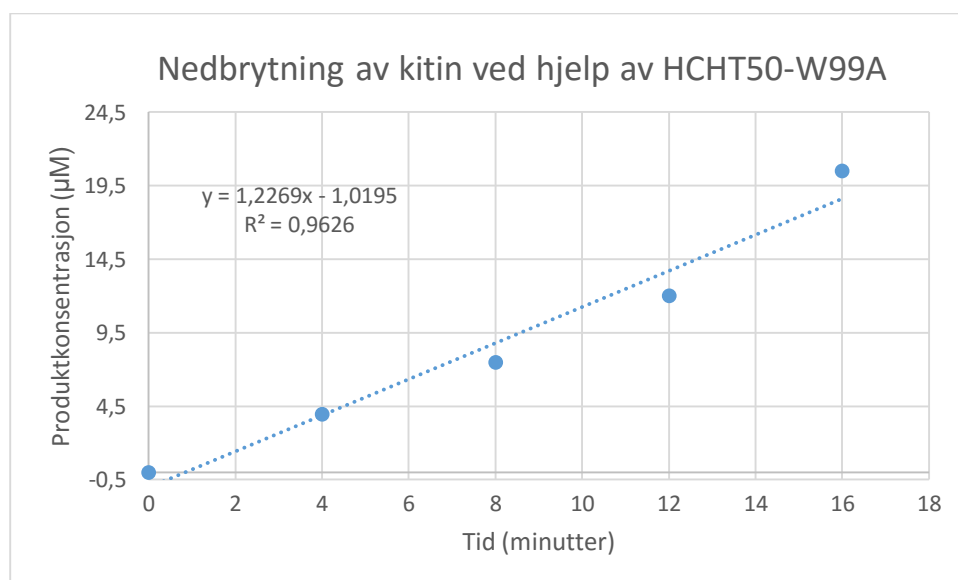
Etter rensing ble samtlige proteiner oppkonsentrert og byttet buffer på (avsnitt 3.6.3) før konsentrasjonen til proteinet ble bestemt (avsnitt 3.6.4). Tabell 4-2 viser utbyttet for hvert protein.

Tabell 4-2 Proteinkonsentrasjonen, volumet til den oppkonsentrerte løsningen og hvor mye medium som ble benyttet under opparbeidelse av ChiA-WT, ChiB-WT, ChiB-W97A, ChiB-W220A og CBP21.

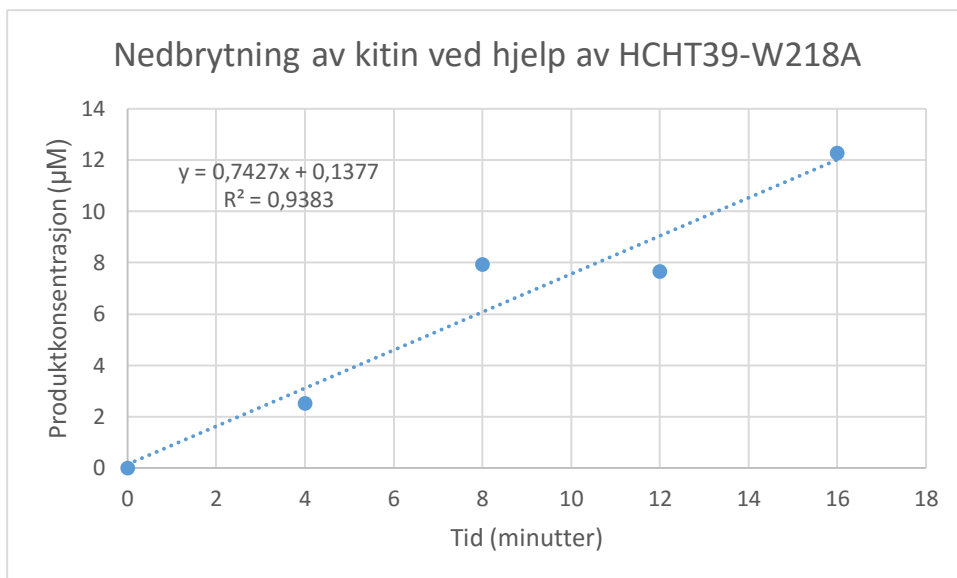
Enzym	Konsentrasjon (μM)	Volum (mL)	Mengde vekstmedium (L)
ChiA-WT	22,2	1,5	4
ChiB-WT	7,06	1,25	4
ChiB-W97A	7,8	1	3
ChiB-W220A	27,3	0,250	4
CBP21	103,4	~4	3

4.3 Kitosan- og kitindegradering ved hjelp av HCHT50-W99A og HCHT39-W218A

Nedbrytning av kitin for bestemmelse av $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ og P^{app} er beskrevet i henholdsvis avsnitt 3.3.1 og 3.3.2, og her oppgis det også hvordan parameterne beregnes. P^{app} er som nevnt er forhold mellom mengde monomer og dimer, og denne er oppgitt i Tabell 4-3. $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ er oppgitt i den samme tabellen. For å bestemme $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ brukes stigningstallet fra produktkonsentrasjon plottet mot tid, og disse plottene er illustrert i Figur 4-12 og Figur 4-13.

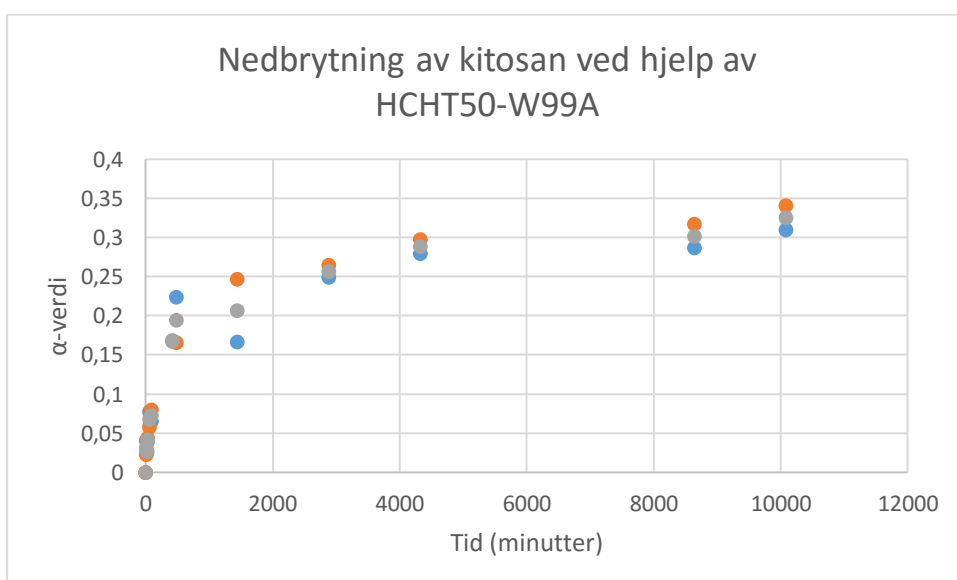


Figur 4-12 Plott av produktdannelse mot tid for nedbrytning av kitin ved hjelp av HCHT50-W99A

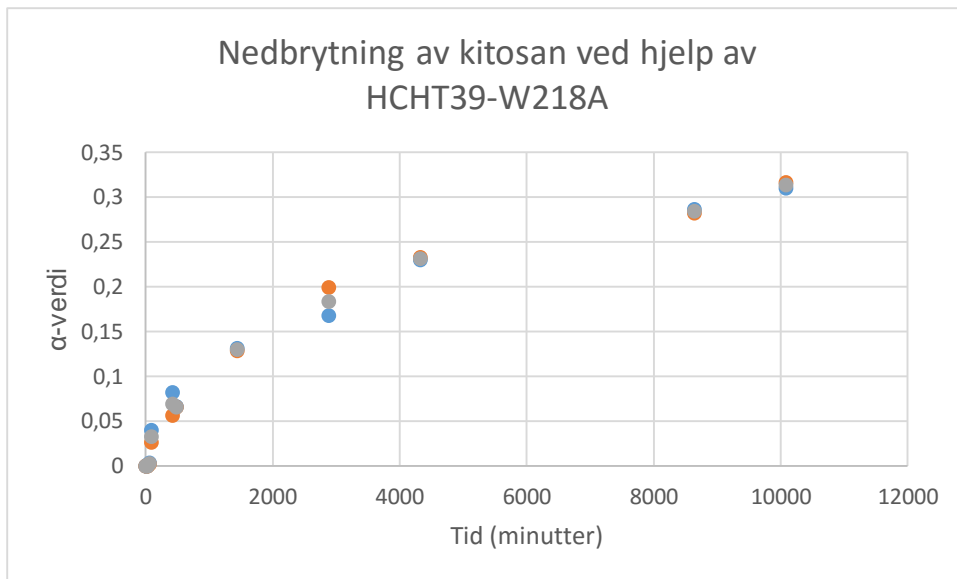


Figur 4-13 Plott av produktdannelse mot tid for nedbrytning av kitin ved hjelp av HCHT39-W218A

Nedbrytningsgraden (α) av kitosan ved hjelp av HCHT50-W99A og HCHT39-W218A ble bestemt med en NMR-analyse nedbrytningsproduktene ved forskjellige tidspunkter. Beregningen av α -verdiene er beskrevet i avsnitt 3.4. I Figur 4-14 og Figur 4-15 er α -verdien plottet mot tid, og grafene illustrerer nedbrytningen av kitosan. To paralleller er utført, og gjennomsnittet av de to parallellene er regnet ut. Alle tre verdiene for hvert tidspunkt er plottet inn i grafen.



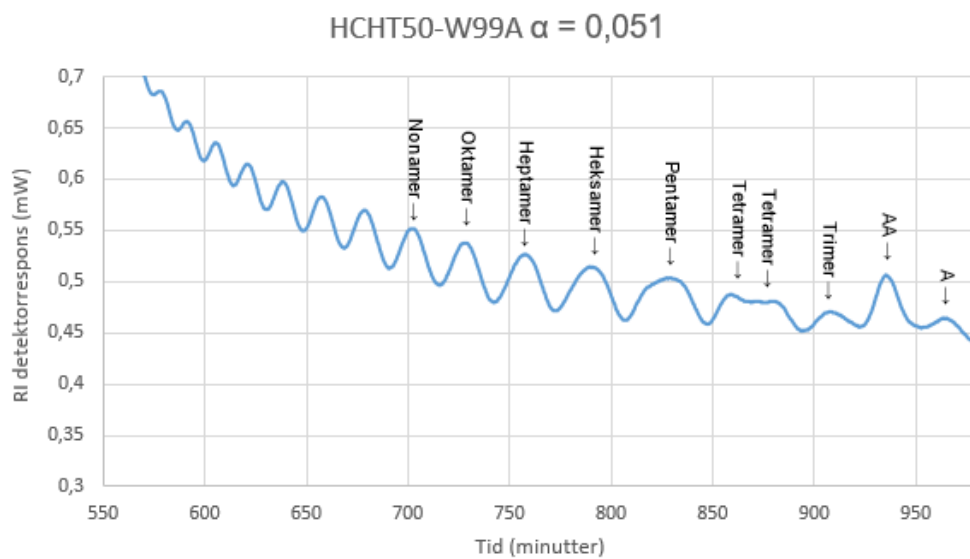
Figur 4-14 α -verdier plottet mot tid for HCHT50-W99A. Blå og oransje er de to parallelle forsøkene, og grått er gjennomsnittet for de to parallellene.



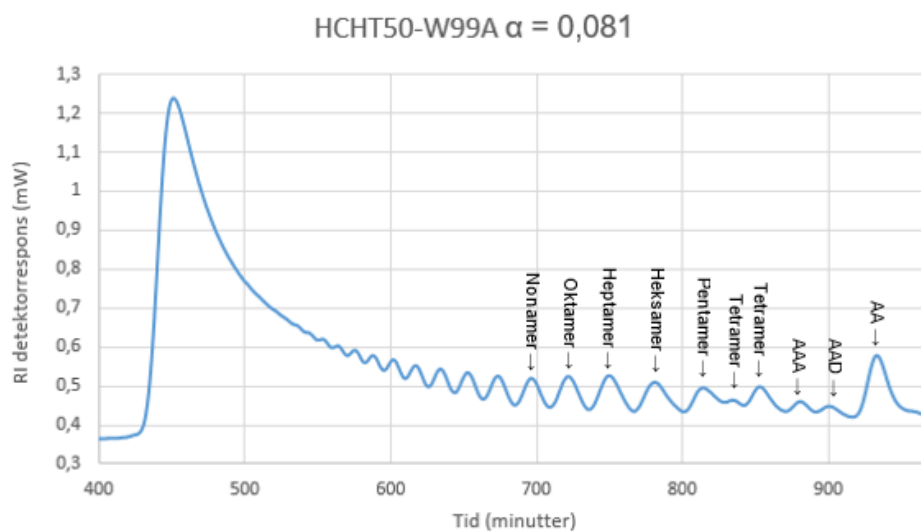
Figur 4-15 α -verdier plottet mot tid for HCHT39-W218A. Blå og oransje er de to parallelle forsøkene, og grått er gjennomsnittet for de to parallellene.

Nedbrytningsproduktene ved $\alpha \approx 0,04$ og $\alpha \approx 0,08$, samt ved fullstendig nedbrytning ble separert med størrelseseksklusjonskromatografi og toppene ble annotert ved hjelp av MALDI-TOF-MS. Kromatogrammene med de annoterte toppene vises i

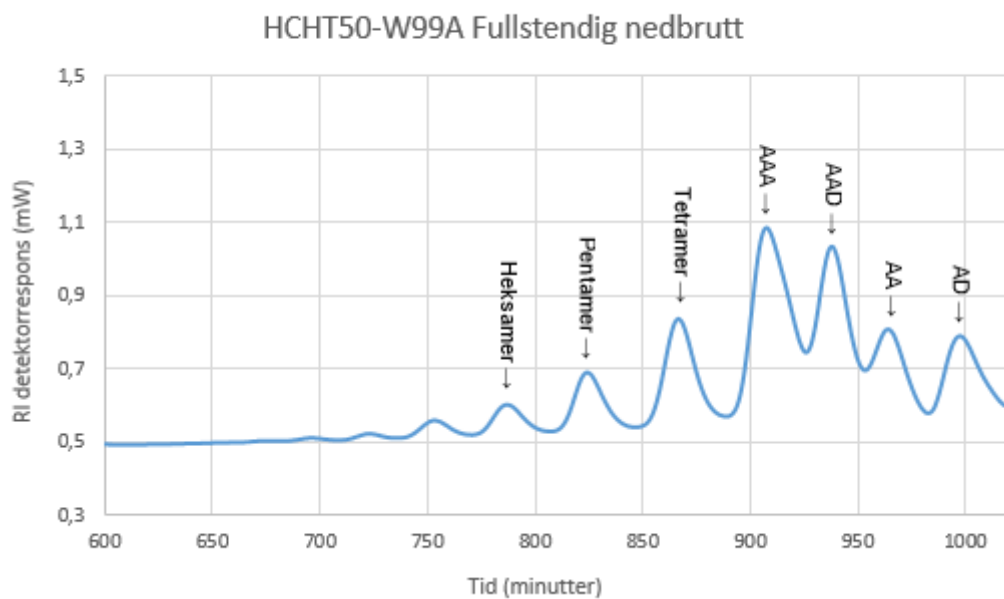
Figur 4-16 SEC-kromatogram for produkter etter hydrolyse av kitosan (FA = 0,64) ved en $\alpha \approx 0,04$ med HCHT50-W99A. Toppene er annotert ved hjelp av MALDI-TOF-MS. Figur 4-16 til Figur 4-21. For $\alpha \approx 0,08$ er polymertoppen tatt med i kromatogrammene, da denne har betydning for å tolke grad av prosessivitet. For HCHT39-W218A er polymertoppen svært høy, og hele toppen kunne derfor ikke tas med i kromatogrammet.



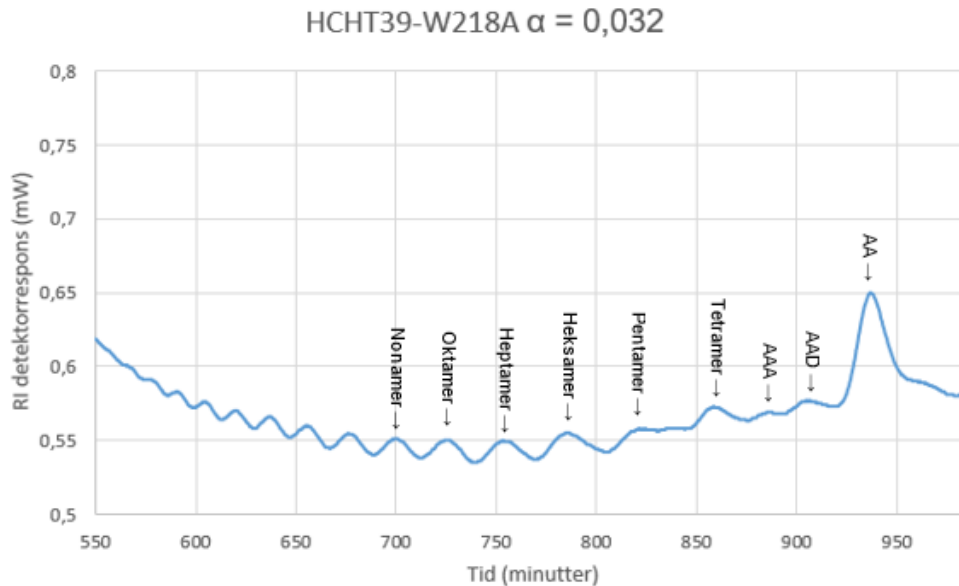
Figur 4-16 SEC-kromatogram for produkter etter hydrolyse av kitosan ($F_A = 0,64$) ved en $\alpha \approx 0,04$ med HCHT50-W99A. Toppene er annotert ved hjelp av MALDI-TOF-MS



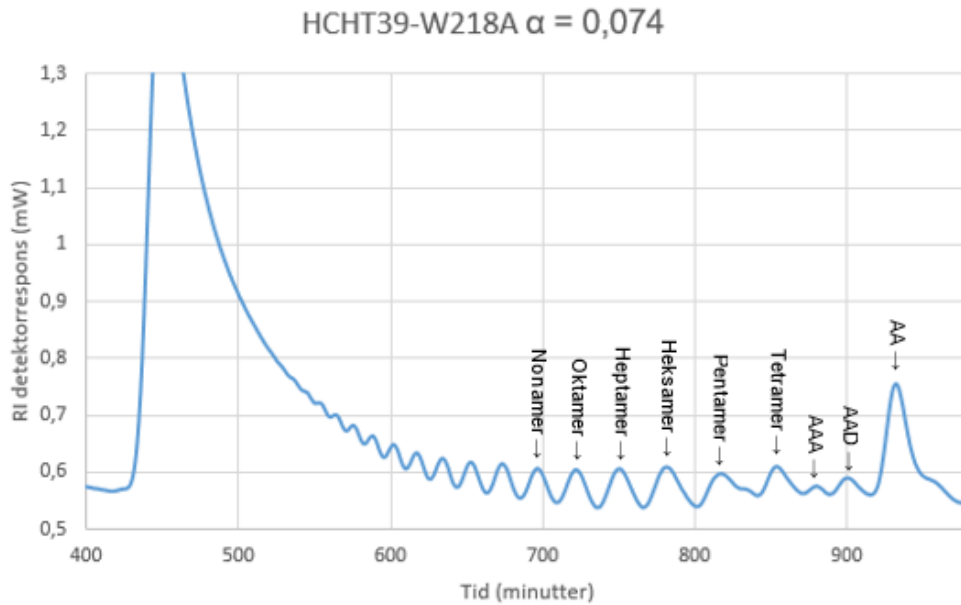
Figur 4-17 SEC-kromatogram for produkter etter hydrolyse av kitosan ($F_A = 0,64$) ved en $\alpha \approx 0,08$ med HCHT50-W99A. Toppene er annotert ved hjelp av MALDI-TOF-MS



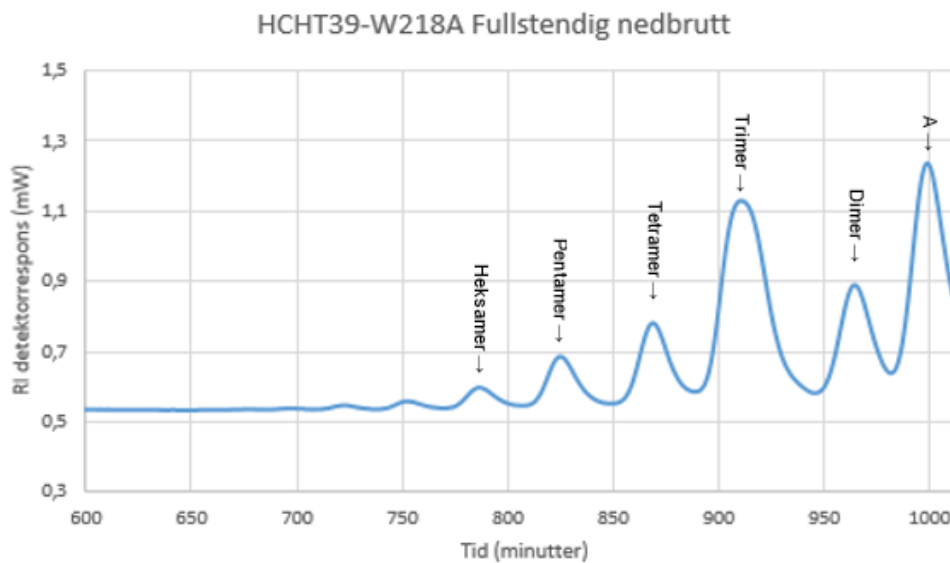
Figur 4-18 SEC-kromatogram for produkter etter hydrolyse av kitosan ($F_A = 0,64$) ved en α_{max} med HCHT50-W99A. Toppene er annotert ved hjelp av MALDI-TOF-MS



Figur 4-19 SEC-kromatogram for produkter etter hydrolyse av kitosan ($F_A = 0,64$) ved en $\alpha \approx 0,04$ med HCHT39-W218A. Toppene er annotert ved hjelp av MALDI-TOF-MS



Figur 4-20 SEC-kromatogram for produkter etter hydrolyse av kitosan ($F_A = 0,64$) ved en $\alpha \approx 0,08$ med HCHT39-W218A. Toppene er annotert ved hjelp av MALDI-TOF-MS



Figur 4-21 SEC-kromatogram for produkter etter hydrolyse av kitosan ($F_A = 0,64$) ved en α_{max} med HCHT50-W99A. Toppene er annotert ved hjelp av MALDI-TOF-MS

Nedbrytning av kitin og kitosan, som beskrevet i henholdsvis avsnitt 3.3 og 3.4 har gitt grunnlag for bestemmelse av en rekke parametere som er listet opp i Tabell 4-3. Degradering, k_{cat}^{app} , P^{app} er bestemt etter nedbrytning av kitin, mens k_{cat} og α_{max} er bestemt ved etter nedbrytning av kitosan.

Tabell 4-3 Gir et sammendrag av parameterne som er bestemt for HCHT50-W99A og HCHT39-W218A

Enzym	k_{cat}^{app}	P^{app}	Degradering (%)	k_{cat}	α_{max}
HCHT50- W99A	$0,120 \pm 0,03$	$11,8 \pm 1,3$	$15,4 \pm 0,1$	17	0,38
HCHT39- W218A	$0,073 \pm 0,004$	$3,8 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,3$	4	0,50

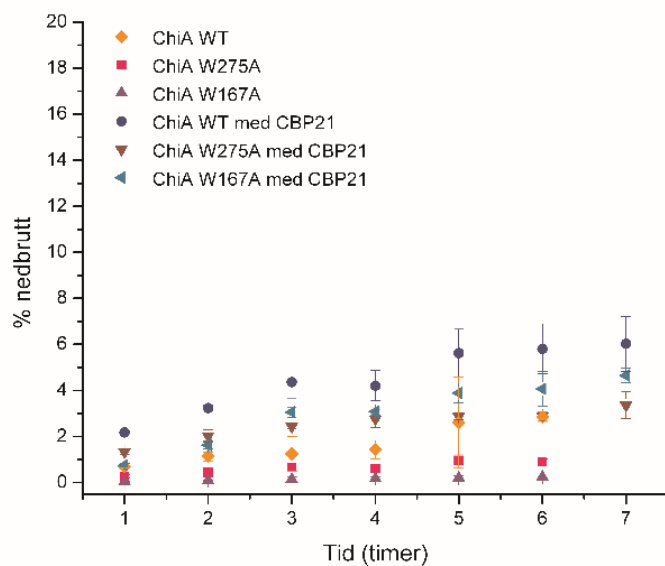
4.4 Kitinnedbrytning med og uten CBP 21

Som beskrevet tidligere benyttes det i denne oppgaven en modell for enzymkinetikk som uttrykkes i parameterne A og b (Kostylev & Wilson 2013). Tabell 4-4 viser A- og b-verdiene for ChiA og ChiB villtype og mutanter. A-verdien er et mål på den totale enzymaktiviteten mens b-verdien er et mål på enzymets evne til å overkomme hindringer i det krystallinske substratet.

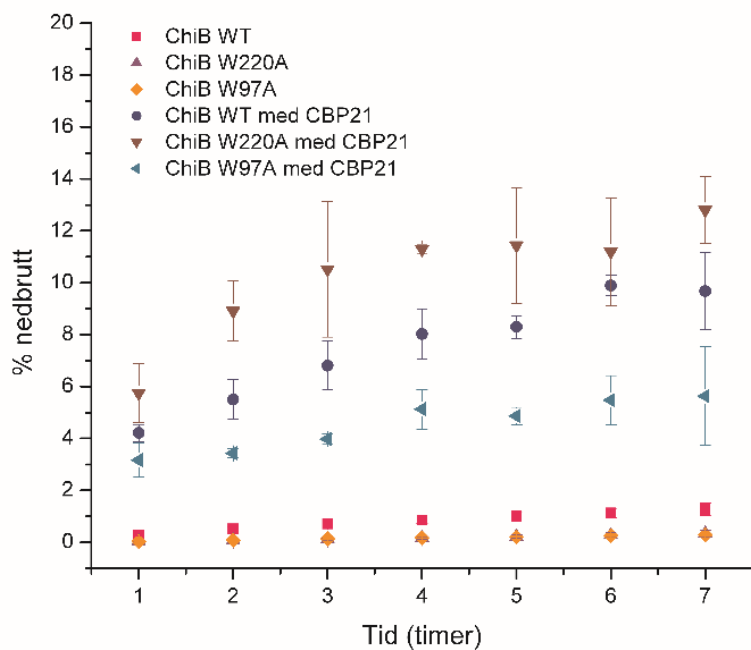
Tabell 4-4 viser A- og b-verdiene til ChiA og ChiB samt deres mutanter med og uten CBP21.

Enzym	A	b
ChiA		
WT	0,32 ± 0,06	0,65 ± 0,13
W167A	0,05 ± 0,02	0,90 ± 0,25
W275A	0,06 ± 0,02	0,62 ± 0,21
ChiA med CBP21		
WT	2,29 ± 0,28	0,51 ± 0,08
W167A	1,51 ± 0,08	0,38 ± 0,04
W275A	1,09 ± 0,14	0,75 ± 0,07
ChiB		
WT	0,31 ± 0,04	0,73 ± 0,1
W97A	0,05 ± 0,01	0,96 ± 0,1
W220A	0,04 ± 0,01	1,16 ± 0,2
ChiB med CBP21		
WT	4,16 ± 0,31	0,45 ± 0,05
W97A	2,71 ± 0,23	0,40 ± 0,06
W220A	6,48 ± 0,74	0,30 ± 0,08

I Figur 4-22 og Figur 4-23 er grad av nedbrytning over tid plottet mot tid, for ChiA og ChiB samt deres mutanter både med og uten CBP21.



Figur 4-22 Grad av nedbrytningen mot tid for ChiA-WT, ChiA-W275A og ChiA-W167A med og uten CBP21.



Figur 4-23 Grad av nedbrytning mot tid for ChiB-WT, ChiB-W97A og ChiB-W220A med og uten CBP21.

5 Diskusjon

5.1 Effekt av aromatiske residuer og CBM

Arbeid utført i denne oppgaven, samt tidligere publisert materiale gir et bilde over effekten av CBM og overflateeksponerte aromatisk aminosyrer har på nedbrytning av et uløselig (kitin) og et løselig (kitosan) substrat. Tabell 5-1 oppsummerer alle parametere som er bestemt på de ulike mutantene, samt villtype enzymene, til nå.

Tabell 5-1 viser k_{cat}^{app} , P^{app} , degrading, k_{cat} og α_{max} for HCHT50 og HCHT39, samt tre mutanter av disse enzymene.

Enzym	$k_{cat}^{app, a}$	$P^{app, a}$	Degradering (%)	k_{cat}^b	α_{max}^b
HCHT50	0.8 ± 0.1	7.6 ± 0.3	100	n.a	0.28
HCHT50-W99A	$0.120 \pm 0,03$	11.8 ± 1.3	15.4 ± 0.1	17	0.38
HCHT50-W218A	0.09 ± 0.02	3.5 ± 0.4	20 ± 4	5	0.32
HCHT50-W31A	0.040 ± 0.006	8.2 ± 0.2	8 ± 1	n.a	0.24
HCHT39	0.55 ± 0.02	11.4 ± 1.3	15	102,14	0.33
HCHT39-W99A	0.08 ± 0.14	2.4 ± 1.2	2		0.33
HCHT39-W218A	$0.073 \pm 0,004$	3.8 ± 0.1	4.8 ± 0.3	4	0.50
HCHT39-W31A	0.049 ± 0.005	10 ± 1.5	4 ± 1		0.27

^a kitin som substrat, ^b kitosan som substrat

HCHT50 evner å bryte ned kitin fullstendig i benyttet forsøksoppsett mens HCHT39 bryter kun ned 15 % av substratet under samme betingelser. Alle HCHT mutanter (tryptofan til alanin) gir en kraftig reduksjon i evnen til å bryte med kitin (fra 100 % til under 25 %). Når både CBM fjernes og tryptofan muteres til alanin reduseres degradingen ytterligere (under 5 %). Dette viser at aromaterne i det aktive setet og CBM er svært viktige for evnen til å degradere kitin.

Forholdet mellom monomer og dimer som dannes i nedbrytningen av kitin, danner grunnlaget for et mål på prosessivitet. Hvorfor dette forholdet kan si noe om prosessivitet er forklart i avsnitt 3.3.1. Kort oppsummert så vil et prosessivt enzym gi en overvekt av dimerer som produkt. Det antas at det første kutt etter dannelse av enzym-substratkompleks gir lik andel oddetall- og partalloligomerer (normalt vil dette være enten en dimer eller en trimer grunnet topologien til det aktive setet). En trimer vil hydrolyseres videre til en monomer og en dimer. Dersom et enzym har høy grad av prosessivitet så vil antall dimerer være særs høyere enn

monomerer. Denne måten å måle prosessivitet på, kan være problematisk på flere måter. Blant annet antagelsen om at det dannes lik andel partalls- og oddetallsoligomerer ved første kutt. Ulike enzymer har ulik preferanse for plasseringen av substratet i det aktive setet. Hvis enzymet har noen grad av endoaktivitet, vil dette heller ikke passe med modellen med tanke på hvilke produkter som da dannes under hydrolyse. Selv om denne måten å måle prosessivitet på kan være unøyaktig, vil det kunne gi et godt sammenlikningsgrunnlag for mutanter og villtype av samme enzym. Når det gjelder prosessivitet viser samtlige varianter av HCHT lav grad av prosessivitet sammenliknet med ChiA og ChiB fra *S. marcescens* (P^{app} mellom 2 og 12). HCHT39 er mer prosessiv enn HCHT50. For HCHT39 er samtlige av mutantene mindre prosessive enn villtypen mens for HCHT50 er to av de tre mutantene mer prosessiv enn villtypen. Uansett er verdiene for P^{app} for alle HCHT varianter lavere enn for ChiC som er ansett for å være et ikke-prosessivt enzym. (Hamre et al. 2014)

Bestemmelsen av den initielle hastighetskonstanten for nedbrytning av kitin forklart i avsnitt 3.3.2. HCHT har en høyere initiell hastighet med CBM enn uten. Allikevel ser det ut til at tap av aromatiske residuer har en større innvirkning på den initielle hastigheten enn hva tap av CBM har. Tap av aromatiske residuer medfører en sterk reduksjon i den initielle hastigheten, for samtlige mutasjoner. k_{cat}^{app} reduseres mest som følge av mutasjon av W31 og minst av W99. Dette er felles for både HCHT50 og HCHT39.

Nedbrytningen av kitosan angis som en α -verdi. Hvordan denne verdien utledes er beskrevet i avsnitt 3.4.5. Figur 4-14 og Figur 4-15 viser α -verdien til HCHT50-W99A og HCHT39-W218A plottet mot tid. Standardavviket for de to parallellene er lave. α_{max} for villtype HCHT50 og HCHT39 er relativt lav sammenliknet med en del av mutantene. Dette skyldes trolig høy grad av transglykosylering hos villtypen. Noen av mutantene har en høyere α_{max} , som kan forklares ved at tap av aromatiske residuer gjør at enzymet minster bindingsstyrke. Lavere bindingsstyrke gir igjen en lavere grad av transglykosylering. α_{max} for HCHT39-W218A er svært høy, og det er grunn til å være skeptisk til hvorvidt dette tallet er korrekt. Et slikt høyt tall har ikke vært observert or en familie 18 kitinase tidligere. Kontrollforsøk må utføres for å undersøke om dette kan være riktig. Figur 4-21 viser at restproduktene består av mye mer monomer enn hva som har vært observert tidligere, og dette kan være en årsak til den høye α -verdien.

For HCHT50-W99A og HCHT39-W218A er produktsammensetningen analysert for tre ulike α -verdier, $\alpha \approx 0,04$, $\alpha \approx 0,08$ og α_{\max} . Ved $\alpha \approx 0,04$ er det for begge mutantene er det lik partalls- og oddetallsoligomersammensetning i produktene. Dette er også i overenstemmelse med samtlige varianter for HCHT. Videre tyder dette på liten grad av prosessivitet som er i overenstemmelse med resultatene observert for kitinnedbrytning. Ved høyere grad av prosessivitet dannes det en overvekt av partallsoligomerer spesielt ved lave α -verdier (Sørbotten et al. 2005). For $\alpha \approx 0,08$ er polymertoppen fortsatt tilstede for både HCHT50-W99A og HCHT39-W218A. Dette antyder en viss grad av prosessivitet. Eide et al. (2016) utførte disse forsøkene på både 50 kDa og 39kDa av HCHT-W31A, og her forsvinner polymertoppen ved $\alpha \approx 0,08$. Dette antyder enda større grad redusert prosessivitet (Eide et al. 2016). Ved α_{\max} er polymertoppen forsvunnet for både HCHT50-W99A og HCHT39-W218A. For HCHT50-W99A er restproduktene oligomerer med hovedvekt av trimer. For HCHT39-W218A er det mest av trimer og monomer. Det er som nevnt tidligere ikke vært observert så store mengder monomer ved α_{\max} , og dette er vanskelig å forklare årsaken til.

k_{cat} for nedbrytning av kitosan er tidligere bestemt for HCHT39. Grunnet høy grad av transglykosylering kunne denne ikke bestemmes for HCHT50. Allikevel er det klart at denne er høyere for HCHT50 enn for HCHT39 (Stockinger et al. 2015). Videre er det klart at alle tryptofan til alanin mutasjoner senker k_{cat} . Dette er i sterk kontrast til hva som er observert for bakterielle kitinaser. Dette kan være på grunn av at degraderingen av kitosan ved hjelp av HCHT50 er veldig høy sammenliknet med ChiA og ChiB. HCHT50 er ikke veldig prosessiv, og som nevnt tidligere er dette fordelaktig i nedbrytningen av det løselige substratet kitosan (Eide et al. 2016).

5.2 Hastighetsøkende effekt av CBP21

Prosessivitet er en egenskap som er ansett som svært viktig i nedbrytningen av krystallinske substrater, som for eksempel kitin og cellulose. Enzymer med høy grad av prosessivitet viser ofte høy degradering. Prosessivitet ansees som hensiktsmessig og energibesparende vedrørende nedbrytning av krystallinsk substrat, av flere grunner. Når en polymer først er løsnet fra krystallstrukturen, er det hensiktsmessig at denne ikke reassosieres. Dette oppnår man med et prosessivt enzym, som vil holde seg påkopleet polymeren gjennom flere hydrolyseaksjoner. Denne prosessiviteten er i stor grad forbundet med de aromatiske aminosyrene i det aktive setet, som bidrar til substratbinding og et hydrofobt området substratet kan gli over. Prosessivitet er dermed fordelaktig for høy degradering av substratet, men denne prosessiviteten går trolig på bekostning av enzymets hastighet (Horn et al. 2006). Flere studier har vist at dersom noen av de aromatiske residuene i det aktive setet muteres bort, senker dette prosessiviteten drastisk og degraderingen av uløselige, krystallinske substrater går ned. Samtidig har det i flere tilfeller resultert i at hastigheten til enzymet øker i nedbrytningen av mindre krystallinske substrater, som kitosan. For nedbrytning av kitin er dannelsen av substrat-enzymkomplekset det hastighetsbestemmende trinnet (Kuusk et al. 2015; Zakariassen et al. 2010). I nedbrytningen av kitosan som er et mer tilgjengelig substrat, er det dissosiasjonskonstanten av produkt som er det hastighetsbegrensende trinnet. (Horn et al. 2006; Kurašin et al. 2015)

CBP21 depolymeriserer kitin, som tidligere beskrevet i avsnitt 1.4.3.3, ved å gjøre tilfeldige kutt som igjen gir flere løse ender. Det har tidligere blitt undersøkt effekten av aromatløse mutanter på substrater med ulike grad av krystallinsk struktur. I denne oppgaven er hensikten å benytte et annet enzym til å gjøre substratet mer tilgjengelig ved hjelp av en forbehandling. Den totale aktiviteten til enzymet er uttrykt i form av parameteren A . A -verdi for samtlige enzymer i dette forsøket er gitt i Tabell 4-4. For ChiA-WT, ChiA-W167A og ChiA-W275A er A -verdien henholdsvis 7 ganger, 30 ganger og 18 ganger større for substratet som er forbehandlet med CBP21 enn ubehandlet kitin. For ChiB-WT, ChiB-W97A og ChiB-W220A er økningen i A -verdi henholdsvis 13 ganger, 54 ganger og 162 ganger. Det er dermed en økning i aktivitet for samtlige av enzymene i forsøket. Økningen er lett å observere i den grafiske fremstillingen i Figur 4-22 og Figur 4-23. Økningen ser ut til å være større hos mutantene enn hos villtypen. Det er også verdt å merke seg at økningen er større hos ChiB, enn den er hos ChiA. Det mest interessante med resultatene er imidlertid at med CBP21

tilstede er ChiB-W220A mutanten klart mer effektiv enn ChiB-WT. W220 er som nevnt tidligere (avsnitt 4.1.2) et aromatisk residu i det aktive setet, og har påvirkning på prosessiviteten til ChiB. Dette er i tråd med teorien om at prosessivitet kan til en viss grad gå på bekostning av effektiviteten til enzymet.

Enzymets evne til å overkomme hindringer i nedbrytningen av substratet er beskrevet med b-verdien. Denne verdien kan også kalles kromningsfaktoren eller hydrolysefaktoren. Det ser ut til at denne verdien generelt sett synker for samtlige enzymer, men unntak av ChiA-W275A. Dette er ikke i tråd med hva som ble observert av Kostylev og Wilson (2013) vedrørende cellulaser, der b-verdien generelt økte. Det er vanskelig å tolke hva dette betyr.

5.3 Oppsummering og videre arbeid

En oppsummering er at både det karbohydratbindende domenet og de aromatiske aminosyrene spiller en vesentlig rolle i HCHTs evne til å bryte ned kitin. HCHT50 har kan bryte ned kitin 100 % under de gitte betingelser hvilket det krever tre *S. marsescens* enzymer for å få til. Hver for seg klarer ChiA, ChiB og ChiC og bryte ned henholdsvis 74 %, 45 % og 28 % (Hamre et al. 2014). HCHT ser ut til å kunne bryte ned kitin uten å ha en stor grad av prosessivitet, og kombinerer ulike trekk fra forskjellige GH18 som utgjør et raskt og effektivt enzym til tross for relativt lav prosessivitet. (Eide et al. 2016; Stockinger et al. 2015). Tap av en eller begge disse komponentene fører til drastisk reduksjon i evnen til å bryte ned kitin og kitosan. CBM og aromatiske i subsete +1 og +2 er viktige for transglykosyleringsaktiviteten til HCHT.

Kitin forbehandlet med CBP21 øker hastigheten av kitindegradering ved hjelp av GH18 kitinaser i stor grad. Mutering av tryptofanresiduer i det aktive setet, som forårsaker tap av prosessivitet kan gi økt hastighet når substratet er forbehandlet med CBP21. Dette er i overenstemmelse med teorien om at prosessivitet kan gå på bekostning av hastighet. Det er åpenbart gjennom disse forsøkene at tilgjengelig substrat også er en begrensende faktor for kitinasene, da samtlige enzymer økte hastigheten ved at substratet ble forbehandlet med CBP21.

Innledningsvis er det skrevet kort om kitin og kitosan, i avsnitt 1.2. Som nevnt er kitin den nest mest vanlige biopolymeren, og det pågår mye forskning rundt nedbrytningen av kitin. Muligheten for utnyttelse av biprodukter fra kitin er store, men siden det er et vanskelig nedbrytbart, krystallinsk substrat er behovet for effektive nedbrytningsmetoder en utfordring. Det er derfor det er svært viktig med forskning som skaper bedre forståelse av den enzymatiske nedbrytningen av kitin. Utvikling av metoder og mutasjoner som gjør enzymer raskere er dermed svært nyttig. Resultatene som viser at ved forbehandling av en LPMO, kan en ChiB-mutant blir raskere enn villtypen, er derfor meget interessant. Det betyr at selv om prosessivitet kan være en avgjørende egenskap ved nedbrytning av kitin, kan det gå på bekostning av hastigheten til enzymet. Strategier som gjør substratet mer tilgjengelig, for deretter å bryte ned substratet med et mindre prosessivt enzym kan være en god ide.

Videre arbeid som kunne vært aktuelt og meget interessant er å undersøke om forbehandling av kitin ved hjelp av LMPOen CBP21 kan gjøre aromatløse HCHT-mutanter raskere enn villtypeenzymet, på samme måte som for den bakterielle kitinasen ChiB. HCHT er et svært velfungerende enzym, og ser ut til å ha en relativt lav prosessivitet. Det er derfor interessant å se om hastigheten til HCHT er begrenset av de prosessive egenskapene. I Tabell 5-1 mangler det i tillegg k_{cat} for HCHT39-W99A og HCHT39-W31A, dette er under utarbeidelse.

6 Referanser

- Aachmann, F. L., Sørлие, M., Skjåk-Bræk, G., Eijsink, V. G. & Vaaje-Kolstad, G. (2012). NMR structure of a lytic polysaccharide monoxygenase provides insight into copper binding, protein dynamics, and substrate interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (46): 18779-18784.
- Agulló, E., Rodríguez, M. S., Ramos, V. & Albertengo, L. (2003). Present and future role of chitin and chitosan in food. *Macromolecular Bioscience*, 3 (10): 521-530.
- Boraston, Alisdair B., Bolam, David N., Gilbert, Harry J. & Davies, Gideon J. (2004). Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochemical Journal*, 382 (3): 769-781.
- Brurberg, M. B., Synstad, B., Klemsdal, S. S., van Aalten, D. M., Sundheim, L. & Eijsink, V. G. (2001). Chitinases from *Serratia marcescens*. *Recent Research Developments Microbiology*, 5: 187-204.
- Caprette, D. R. (2000). *Preparing Protein Samples for Electrophoresis*. Tilgjengelig fra: <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/sds-page/denature.html> (lest 08.04).
- CAZY, C. A. E. (2016a). *Auxiliary Activities family classification*. Tilgjengelig fra: <http://www.cazy.org/Auxiliary-Activities.html> (lest 16.04).
- CAZY, C. A. E. (2016b). *Carbohydrate-Binding Module family classification*. Tilgjengelig fra: <http://www.cazy.org/Carbohydrate-Binding-Modules.html> (lest 17.04).
- CAZY, C. A. E. (2016c). *Glycoside Hydrolase family classification*. Tilgjengelig fra: <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html> (lest 12.04).
- 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. *Biochemical Journal*, 321 (Pt 2): 557.
- Eide, K. B., Norberg, A. L., Heggset, E. B., Lindbom, A. R., Vårum, K. M., Eijsink, V. G. & Sørлие, M. (2011). Human chitotriosidase-catalyzed hydrolysis of chitosan. *Biochemistry*, 51 (1): 487-495.
- Eide, K. B., Lindbom, A. R., Eijsink, V. G., Norberg, A. L. & Sørлие, M. (2013). Analysis of productive binding modes in the human chitotriosidase. *FEBS letters*, 587 (21): 3508-3513.
- Eide, K. B., Stockinger, L. W., Lewin, A. S., Tøndervik, A., Eijsink, V. G. & Sørлие, M. (2016). The role of active site aromatic residues in substrate degradation by the human chitotriosidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1864 (2): 242-247.
- Fukamizo, T. (2000). Chitinolytic enzymes catalysis, substrate binding, and their application. *Current Protein and Peptide Science*, 1 (1): 105-124.
- Fuseti, F., von Moeller, H., Houston, D., Rozeboom, H. J., Dijkstra, B. W., Boot, R. G., Aerts, J. M. & van Aalten, D. M. (2002). Structure of human chitotriosidase implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (28): 25537-25544.
- Gordon-Thomson, C., Kumari, A., Tomkins, L., Holford, P., Djordjevic, J., Wright, L., Sorrell, T. & Moore, G. (2009). Chitotriosidase and gene therapy for fungal infections. *Cellular and molecular life sciences*, 66 (6): 1116-1125.

- Hamid, R., Khan, M. A., Ahmad, M., Ahmad, M. M., Abdin, M. Z., Musarrat, J. & Javed, S. (2013). Chitinases: an update. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, 5 (1): 21.
- Hamre, A. G., Lorentzen, S. B., Väljamäe, P. & Sørli, M. (2014). Enzyme processivity changes with the extent of recalcitrant polysaccharide degradation. *FEBS letters*, 588 (24): 4620-4624.
- Hollak, C., van Weely, S., Van Oers, M. & Aerts, J. (1994). Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *Journal of Clinical Investigation*, 93 (3): 1288.
- Horn, S. J., Sikorski, P., Cederkvist, J. B., Vaaje-Kolstad, G., Sørli, M., Synstad, B., Vriend, G., Vårum, K. M. & Eijsink, V. G. (2006). Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (48): 18089-18094.
- Kostylev, M. & Wilson, D. (2013). Two-parameter kinetic model based on a time-dependent activity coefficient accurately describes enzymatic cellulose digestion. *Biochemistry*, 52 (33): 5656-5664.
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 290 (48): 29074-29085.
- Kuusk, S., Sørli, M. & Väljamäe, P. (2015). The predominant molecular state of bound enzyme determines the strength and type of product inhibition in the hydrolysis of recalcitrant polysaccharides by processive enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 290 (18): 11678-11691.
- Lesk, A. M. (2010). *Introduction to protein science : architecture, function, and genomics*. 2. utg. Oxford: Oxford University Press.
- LifeTechnologies, T. (2010). *OneShot® BL21 Star™ (DE3) Chemically Competent Cells*. Tilgjengelig fra: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/oneshotbl21star_man.pdf (lest 08.04).
- LifeTechnologies, T. (2013). *OneShot® TOP10 Competent Cells*. Tilgjengelig fra: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/oneshottop10_man.pdf (lest 08.04).
- LifeTechnologies, T. (2015). *Qubit® dsDNA BR Assay Kit*. Tilgjengelig fra: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Qubit_dsDNA_BR_Assay_UG.pdf (lest 08.04).
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E., Appling, D. R. & Anthony-Cahill, S. J. (2013). *Biochemistry*. 4. utg. Toronto, Ont: Pearson.
- McCarter, J. D. & Withers, G. S. (1994). Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current opinion in structural biology*, 4 (6): 885-892.
- Miller, J. M. (2010). *Chromatography: Concepts and Contrasts*. 2. utg., b. 72: Wiley. 369 s.
- Norberg, A. L., Dybvik, A. I., Zakariassen, H., Mormann, M., Peter-Katalinić, J., Eijsink, V. G. & Sørli, M. (2011). Substrate positioning in chitinase A, a processive chito-biohydrolase from *Serratia marcescens*. *FEBS letters*, 585 (14): 2339-2344.
- PallCorporation. (2014). *Macrosep® Advance Centrifugal Device*. Tilgjengelig fra: http://www.pall.com/pdfs/Laboratory/1344_89113B_nc.pdf (lest 08.04).
- Park, B. K. & Kim, M.-M. (2010). Applications of chitin and its derivatives in biological medicine. *International journal of molecular sciences*, 11 (12): 5152-5164.

- Perugino, G., Trincone, A., Rossi, M. & Moracci, M. (2004). Oligosaccharide synthesis by glycosynthases. *Trends in biotechnology*, 22 (1): 31-37.
- Prashanth, K. H. & Tharanathan, R. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview. *Trends in food science & technology*, 18 (3): 117-131.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in polymer science*, 31 (7): 603-632.
- Rye, C. S. & Withers, S. G. (2000). Glycosidase mechanisms. *Current opinion in chemical biology*, 4 (5): 573-580.
- Sikorski, P., Sørbotten, A., Horn, S. J., Eijsink, V. G. & 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.
- Siuzdak, G. (1996). *Mass spectrometry for biotechnology*. Academic press.
- Stockinger, L. W., Eide, K. B., Dybvik, A. I., Sletta, H., Vårum, K. M., Eijsink, V. G., Tøndervik, A. & Sørli, M. (2015). The effect of the carbohydrate binding module on substrate degradation by the human chitotriosidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1854 (10): 1494-1501.
- Synowiecki, J. & Al-Khateeb, N. A. (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43 (2): 145-171.
- Synstad, B., Gåseidnes, S., Van Aalten, D. M., Vriend, G., Nielsen, J. E. & Eijsink, V. G. (2004). Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase. *European Journal of Biochemistry*, 271 (2): 253-262.
- Sørbotten, A., Horn, S. J., Eijsink, V. G. & Vårum, K. M. (2005). Degradation of chitosans with chitinase B from *Serratia marcescens*. *FEBS journal*, 272 (2): 538-549.
- Sørli, M., Zakariassen, H., Norberg, A. L. & Eijsink, V. G. (2012). Processivity and substrate-binding in family 18 chitinases. *Biocatalysis and Biotransformation*, 30 (3): 353-365.
- Terwisscha van Scheltinga, A. C., Armand, S., Kalk, K. H., Isogai, A., Henrissat, B. & Dijkstra, B. W. (1995). Stereochemistry of chitin hydrolysis by a plant chitinase/lysozyme and x-ray structure of a complex with allosamidin evidence for substrate assisted catalysis. *Biochemistry*, 34 (48): 15619-15623.
- ThermoFisher. (2014). *BenchMark™ Unstained Protein Ladder Protocol*. Tilgjengelig fra: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/BenchMarkUnstainedProteinLadder_man.pdf (lest 08.04).
- Vaaje-Kolstad, G., Houston, D. R., Riemen, A. H., Eijsink, V. G. & van Aalten, D. M. (2005). Crystal structure and binding properties of the *Serratia marcescens* chitin-binding protein CBP21. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (12): 11313-11319.
- Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Horn, S. J., Liu, Z., Zhai, H., Sørli, M. & Eijsink, V. G. (2010). An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science*, 330 (6001): 219-222.
- Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., Sørli, M. & Eijsink, V. G. (2013). The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens*—a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *FEBS Journal*, 280 (13): 3028-3049.

- van Aalten, D. M. F., Synstad, B., Brurberg, M. B., Hough, E., Riise, B. W., Eijsink, V. G. H. & Wierenga, R. K. (2000). Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1.9-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (11): 5842-5847.
- VWR. (2016). *Nucleic Acid Purification Kits*. Tilgjengelig fra: https://us.vwr.com/assetsvc/asset/en_US/id/8477994/contents (lest 08.04).
- Williams, D. H. & Fleming, I. (2008). *Spectroscopic methods in organic chemistry*. 6th ed. utg. European chemistry series. London, New York: McGraw-Hill.
- Zakariassen, H., Aam, B. B., Horn, S. J., Vårum, K. M., Sørli, M. & Eijsink, V. G. (2009). Aromatic residues in the catalytic center of chitinase A from *Serratia marcescens* affect processivity, enzyme activity, and biomass converting efficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (16): 10610-10617.
- Zakariassen, H., Eijsink, V. G. & Sørli, M. (2010). Signatures of activation parameters reveal substrate-dependent rate determining steps in polysaccharide turnover by a family 18 chitinase. *Carbohydrate Polymers*, 81 (1): 14-20.
- Zakariassen, H., Hansen, M. C., Jøranli, M., Eijsink, V. G. & Sørli, M. (2011). Mutational effects on transglycosylating activity of family 18 chitinases and construction of a hypertransglycosylating mutant. *Biochemistry*, 50 (25): 5693-5703.



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway