

TSAd SH2-domenet.

Uttrykking i bakterier og initiell karakterisering av nye bindings-partnere i T-celler.

Kjersti Hildebrand



Masteroppgave i molekylærbiologi for graden Master of Science ved
Institutt for molekylær biovitenskap, Universitetet i Oslo 2006.

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2006

Forord

Det praktiske arbeidet med denne oppgaven ble utført ved avdeling for anatomi, institutt for medisinsk basalfag, medisinsk fakultet, Universitetet i Oslo, i perioden våren 2005 til våren 2006.

Jeg ønsker å takke alle i Anne Spurklands gruppe, spesielt min veileder, stipendiat Thorny C.B. Andersen for veldig god hjelp med praktiske og teoretiske spørsmål, gjennomlesing av masteroppgaven og god støtte under arbeidet. Videre vil jeg takke ingeniør Bjørg Simonsen for praktisk hjelp i laben, professor Anne Spurkland for veiledning og kommentarer til masteroppgaven og internveileder, professor Tor Lea for gjennomlesing av masteroppgaven. Tilslutt ønsker jeg å takke familie og venner for god støtte under studietiden.

Oslo, mai 2006

Kjersti Hildebrand

Sammendrag

T-cellespesifikt adapterprotein (TSAd), kodet av *SH2D2A* genet, blir uttrykt i aktiverte T-celler, NK-celler og i endotelceller. TSAd består hovedsakelig av et SH2-domene og et prolinrikt område og inneholder 10 tyrosiner som potensielt kan fosforyleres. Funksjonen til TSAd er enda ukjent, men det har noen kjente bindingspartnere, bl.a. Lck. Lck har en rolle i aktivering av T-cellen og tidligere forskning har vist at TSAd inhiberer aktiviteten til Lck. Det er i flere studier funnet en sammenheng mellom TSAd og utvikling av autoimmune sykdommer. Det er derfor mulig at TSAd spiller en rolle i etablering av immunologisk toleranse som skal hindre utvikling av autoimmune sykdommer.

TSAds SH2-domene er viktig for TSAds funksjon, da det er ett av få steder på TSAd som kan interagere med andre proteiner. TSAds SH2-domene er derfor en viktig nøkkel til å forstå TSAds funksjon. Ved å finne ligander for TSAds SH2-domene, og å bestemme strukturen til dette domenet, kan en få nye holdepunkter for hvilken rolle TSAd spiller i cellene. Human GST-TSAd SH2 fusjonsprotein har vist seg å være vanskelig å uttrykke i *E. coli*. Målet med denne oppgaven var derfor å undersøke om mus og rotte GST-TSAd SH2 ble bedre uttrykt. Det var også et mål å lage mutanter av human TSAd SH2 og bruke disse som kontroller i initial karakterisering av nye bindingspartnere i T-celler.

I denne oppgaven ble det forsøkt å optimalisere uttrykket av GST-TSAd SH2 ved å endre parametere som IPTG-konsentrasjon, temperatur og tid for ekspresjon av GST-TSAd SH2. Ekspresjon ved 15 °C ga ca 25 % mer protein enn ved 20 °C, endring av de andre parameterne ga liten forskjell. GST-TSAd SH2 ble funnet å interagere med Lck i pulldown-forsøk. Tilsvarende forsøk i lysat fra SDF-1 stimulerte Jurkat E6.1 celler viste at GST-TSAd SH2 interagerer med proteiner med størrelse ~18 kDa, og ~60 kDa. Mutanter av GST-TSAd SH2, der den konserverte argininresiduen, R120, ble mutert til alanin eller leusin bandt ikke ~18 kDa og ~60 kDa båndet, men mutantene (R120A/L) bandt Lck.

Forkortelser

AAA	ATPase assosiert med varierte aktiviteter
Ag	antigen
Amp	ampicillin
APC	antigen presenterende celle
APS	ammoniumpersulfat
bp	basepar
BSA	bovint serum albumin
cAMP	syklisk adenosin monofosfat
CBB	comassie brilliant blue
CD 3/4/8	"cluster of differentiation" 3/4/8
Da	dalton
DNA	deoksyribonukleinsyre
dNTP	deoksyribonukleosid 5'-trifosfatnukleotid
DTT	ditiotreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	etylen-diamin-tetra-eddiksyre
ER	endoplasmatisk retikulum
EtBr	etidumbromid
Fc	fragment krystalliserbart
FCS	føtalt kalveserum
GA	guaninidin adenin
GST	glutation-s-transferase
HLA	human leukocyt antigen
HRP	"Horse radish peroxidase"
Ig	immunoglobulin
IL-2	interleukin 2
IPTG	isopropyltio- β -D-galaktosid
Itk	interleukin-2-induserbar tyrosinkinase
JRA	juvenil revmatoid artritt
k	kilo
K _D	dissosiasjonskonstanten
l	liter
LAD	Lck assosiert adapterprotein
λ	lambda, bølgelengde
LB	Lurium Broth
Lck	lymfoidcellekinase
MALDI-TOF	"matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight
MS	mass spectrometry"

MAPK	mitogenaktivert proteinkinase
MBP	maltosebindende protein
µg	mikrogram
MHC	hovedvevsforlikelighets-antigenkomplekset
µl	mikroliter
ml	milliliter
µM	mikromolar
M	molar
MS	massespektrometri
NK-celle	naturlig drepercelle
nm	nanometer
nM	nanomolar
OD	optisk tetthet
ODG	n-oktyl-β-d-glukosid
ON	overnatt
PCR	polymerase kjedereaksjon
PH	proteasehemmer
PLC-γ	fosfolipase C-γ
PMSF	fenylmetansulfonyl fluorid
pS	fosfoserin
pT	fosfotreonin
PTB	fosfotyrosinbindende protein
PV	pervanadat
PVDF	polyvinylidendifluorid
pY	fosfotyrosin
RA	revmatoid artritt
RF	revmatoid faktor
RIBP	Rlk/Itk-bindende protein
Rlk	hvilende lymfocyttkinase
RO	revers osmose
SDS	natrium dodecyl sulfat
SDS-PAGE	SDS polyakrylamid gel-elektroforese
SH(1-4)	Src homologi (1-4) domene
Src	Rous sarcomviruskinaser
t	timer
TAE-buffer	tris-eddiksyre-EDTA buffer
T _C	T-drepercelle
TCR	T-cellereseptor
TEMED	N, N, N, N-tetrametylendiamin (C ₆ H ₁₆ N ₂)
T _H	T-hjelpercelle
T _m	smeltetemperatur

T _{reg}	T-regulatorcelle
Triton	polythylene glycol tert-octylfenyl ether
TSA _d	T-cellespesifikk adapterprotein
UV	ultrafiolett
VCP	Valocin-inneholdende protein
VEGF	vaskulær endotelial vekstfaktor
VEGFR-2	VEGF reseptor-2
wt	villtype

Innhold

FORORD	I
SAMMENDRAG	II
FORKORTELSER	III
INNHOOLD	VI
1. INTRODUKSJON	1
1.1 IMMUNSYSTEMETS OPPBYGGING OG VIRKEMÅTE	1
1.2 TSAD	4
1.3 SRC KINASER	5
1.4 SH2-DOMENET	6
1.5 AUTOIMMUNITET	9
1.6 MULTIPPEL SKLEROSE	10
1.7 REVMATOID ARTRITT	10
1.8 KJENTE BINDINGSPARTNERE TIL TSAD OG TSAD SH2	11
2. MÅL MED OPPGAVEN	14
3. MATERIALER	15
3.1 KJEMIKALIER	15
3.1.1 <i>Organiske kjemikalier</i>	15
3.1.2 <i>Uorganiske kjemikalier</i>	16
3.2 BAKTERIESTAMMER	17
3.3 CELLE LINJER	17
3.4 VEKST/DYRKINGSMEDIER	17
3.4.1 <i>Dyrkingsmedier for Escherichia coli</i>	17
3.4.2 <i>Vekstmedium for Jurkat E6.1 og 293T celler</i>	18
3.5 BUFFERE OG LØSNINGER	18
3.5.1 <i>Buffere og løsninger for cellelysning</i>	18
3.5.2 <i>Buffere og løsninger for SDS-PAGE og Western blotting</i>	19
3.5.3 <i>Buffere til GST fusjonsprotein systemet</i>	20
3.5.4 <i>Buffere til DNA arbeid</i>	20
3.5.5 <i>Tris-Hcl løsninger</i>	21
3.5.6 <i>Andre buffere</i>	22

3.6	ENZYMER.....	23
3.7	OLIGONUKLEOTIDER.....	23
3.8	ANTISTOFF.....	24
3.9	MEMBRANER.....	24
3.10	STANDARDER.....	24
3.11	FERDIGKJØPTE "KITS".....	24
3.12	UTSTYR.....	24
4.	METODER.....	25
4.1	MOLEKYLÆRBIOLOGISKE METODER.....	25
4.1.1	<i>Rensing og analyse av DNA.....</i>	<i>25</i>
	Agarose gelelektroforese.....	25
	Isolering av plasmid DNA fra <i>E. coli</i>	26
	Isolering av DNA fra agarose gel.....	27
	Bestemmelse av DNA konsentrasjon.....	27
	Sekvensering av DNA.....	28
4.1.2	<i>Enzymatisk modifisering av DNA.....</i>	<i>28</i>
	Restriksjonsfordøyelse av DNA.....	28
	Ligering av DNA fragmenter med Bakteriofag T4 DNA ligase.....	30
4.1.3	<i>Transformasjon av <i>E. coli</i> med plasmid DNA.....</i>	<i>30</i>
4.1.4	<i>Polymerase Kjede Reaksjon.....</i>	<i>31</i>
4.1.5	<i>Sete-spesifikk mutagenese.....</i>	<i>33</i>
4.2	METODER I PROTEIN BLOKJEMI.....	35
4.2.1	<i>Analytiske protein metoder.....</i>	<i>35</i>
	SDS-PAGE.....	35
	Farge SDS-PAGE med Comassie Brilliant Blue.....	36
	Western blotting.....	36
	Massespektrometri.....	37
4.2.2	<i>Protein preparasjon.....</i>	<i>38</i>
	In vitro syntese av proteiner.....	38
	Lysering av BL21 med rekombinant protein.....	39
	Rense rekombinante proteiner med GST-merke.....	40

VIII

Eluere rekombinante proteiner fra glutation-sepharosekuler	40
4.3 METODER I CELLEBIOLOGI	42
4.3.1 <i>Transfeksjon av 293T celler med plasmid DNA</i>	42
4.3.2 <i>GST-pulldown</i>	43
5. RESULTATER	45
5.1 KLONING AV MUS OG ROTTE TSAD SH2	45
PCR produkt	45
Test restriksjonsfordøyning	46
Test-PCR	46
Sekvensering	47
5.2 SETESPESIFIKK MUTAGENESE AV HUMAN TSAD SH2	49
Test-PCR	50
Sekvensering	51
5.3 EKSPRESJON AV MUS, ROTTE, HUMAN OG MUTERT GST-TSAD SH2	53
Optimalisering av proteinekspresjon	53
Uttrykk av human, mus, rotte og mutant GST-TSAd SH2	56
Kobling av GST-TSAd på glutation-sepharosekuler	57
Eluering av GST-TSAd fra glutation-sepharosekuler	58
5.4 GST-PULLDOWN	59
GST-pulldown fra PV-stimulerte Jurkat E6.1 celler	59
GST-pulldown fra SDF-1 stimulerte Jurkat E6.1 celler	60
GST-pulldown fra transfekterte 293T celler	61
Massespektrometri	63
6. DISKUSJON	64
6.1 SETESPESIFIKK MUTAGENESE	64
6.2 UTTRYKK AV MUS, ROTTE OG HUMAN TSAD SH2	65
6.3 GST-PULLDOWN	67
6.4 KONKLUSJONER	72
6.5 FORSLAG TIL VIDERE ARBEID	73
KILDELISTE	74
APPENDIKS 1	81
APPENDIKS 2	83

APPENDIKS 385

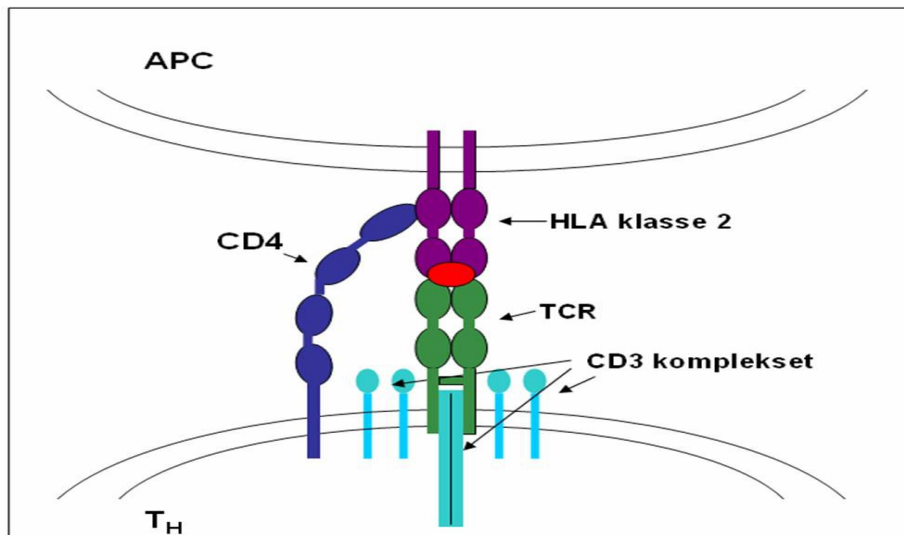
1. Introduksjon

1.1 Immunsystemets oppbygging og virkemåte

Immunsystemet er viktig i bekjempelse av skadelige inntrengere (patogener) som vi til enhver tid er omgitt av [1;2]. Det er nøye regulert slik at det kun reagerer på potensielt farlige substanser og ikke angriper kroppen selv (selv/ikke selv). Når immunforsvaret ikke virker som det skal, kan man utvikle en rekke sykdommer som for eksempel allergi og autoimmunitet. En rekke organer inngår i immunforsvaret. Tymus og beinmarg står for utvikling av alle cellene i immunforsvaret (forsvarcellene). De utgjør de primære lymfoide organene. De sekundære lymfoide organene består av milt, lymfeknuter og lymfoid vev i fordøyelseskanalen. Milten virker som et filter for bakterier som kommer med blodstrømmen. Det er omkring 500-1000 lymfeknuter i menneskekroppen. De er assosiert med årene i lymfesirkulasjonen. Der virker de som kontrollstasjoner av lymfen for immunforsvarets celler. Immunforsvaret deles i to deler; medfødt- og ervervetimmunforsvar (hhv. ikke-adaptivt og adaptivt immunforsvar). Monocytter/makrofager, granulocytter, mastceller, dendritiskeceller og de naturlige drepercellene (NK) representerer det medfødte immunforsvar. T-celler og B-celler representerer det ervervede immunforsvaret. Det er et tett samarbeid mellom alle de ulike cellene for at immunforsvaret skal fungere som det skal.

B-cellene dannes fra stamceller i beinmargen og modnes i beinmargen. De aktiveres blant annet av antigen (Ag) og utvikles da til effektor B-celler/plasmaceller. B-cellene uttrykker immunoglobuliner (Ig) i cellemembranen eller som løselige Ig som skilles ut av B-cellen (antistoff). Antistoff beskytter oss mot infeksjon ved å binde seg til patogener. Pattedyr har fem klasser Ig; IgG, IgD, IgM, IgA og IgE. Hver type Ig har sin egen funksjon, for eksempel beskytter IgE kroppens ytre hudoverflater, IgM er viktig i innledende fase av immunresponsen og IgD er antigenreseptor på B-cellen. Alle Ig som dannes av en B-celle har samme antigenbindingssete.

T-cellene dannes fra de samme stamcellene som B-cellene i beinmargen. De bringes over til tymus i form av tymocytter, som er et forstadium til T-cellen. I tymus spesialiseres de til immunkompetente T-celler. Det er to hovedtyper T-celler; T-hjelpeceller (T_H) og T-drepeceller (T_C). T_H deles videre inn i tre undergrupper; T_{H0} , T_{H1} og T_{H2} . I det senere er det også oppdaget to nye typer T-celler, T-regulatorcelle (Treg) [1] og T_{H17} [3]. T_C dreper celler som er infisert av virus eller andre intracellulære patogener. T_H hjelper med å stimulere responsen til andre celler ved å produsere cytokiner (kjemiske stoff som er viktig for intracellulær signalering). Funksjonen til Treg er noe uklar, men har noe med regulering av immunresponsen å gjøre, trolig inhibering av autoimmunitet og beskyttelse mot vevsskade [1]. T_{H17} virker trolig motsatt av Treg, ved å indusere autoimmunitet [4]. Det som er spesielt med T-cellene i forhold til de andre forsvarscellene er at de er avhengig av at andre celler viser frem fremmed materiale på deres membran til T-cellen. De viser frem fremmed materiale ved hjelp av hovedvevsforlikelighetsantigenkomplekset (MHC, Major Histocompatibility Complex). Hos mennesker kalles MHC for HLA (humant leukocyttantigen). Dette er membranmolekyler som har en bindingsgrop for peptider. Alle kjerneholdige celler i kroppen har HLA-molekyler. Det er to klasser HLA-molekyler. HLA klasse 1 uttrykkes på celleoverflaten til alle kjerneholdige celler. HLA klasse 2 uttrykkes på celleoverflaten til de såkalte profesjonelle antigenpresenterende celler (APC); B-celler, dendritiske celler i blod og lymfeknuter, makrofager og monocytter. HLA klasse 1 presenterer fremmede peptider til T_C og HLA klasse 2 presenterer fremmede peptider til T_H . T-cellerreseptor (TCR) bindes til HLA molekyler som presenterer fremmed peptid (figur 1.1).



Figur 1.1. TCR/HLA komplekset. TCR binder HLA med fremmed peptid (rødt). CD4 på T_H -celler hjelper med å stabilisere interaksjonen og videreføre signaler intracellulært i T_H . CD3 komplekset uttrykkes sammen med TCR på celleoverflaten og hjelper med å bringe signaler videre inn i T_H . (Figuren er basert på tilsvarende figur i Basal og klinisk immunologi av Tor Lea)

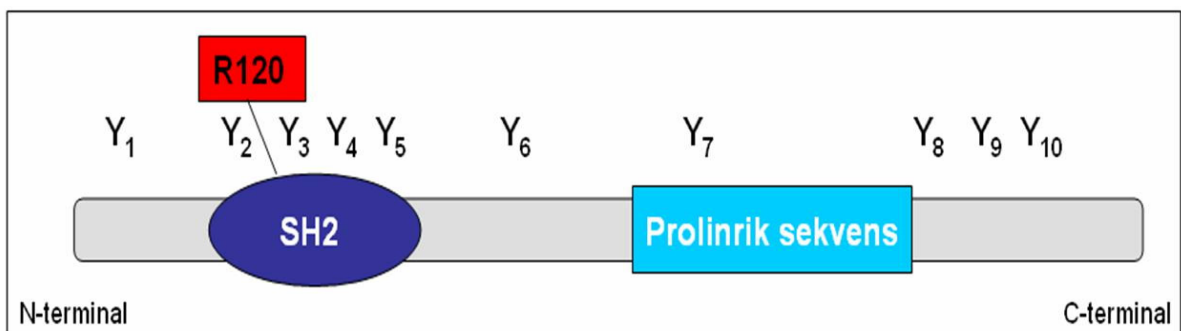
Når TCR og HLA er i kompleks fører det til initiering av intracellulære celledelingssignaler. Til slutt vil det føre til aktivering, proliferering (celledeling) og differensiering av T-cellen. TCR har en veldig kort intracellulær hale. For at TCR skal kunne overføre signaler videre, er den assosiert med CD3-komplekset. CD3 består av 6 transmembrane proteiner. Transmembranmolekylene, CD4 på T_H og CD8 på T_c , er også viktige i videreføring av signalene.

Det er viktig at signaliseringsveier reguleres nøye. Proteiner må aktiveres og deaktiveres. En måte å aktivere proteiner på er ved fosforylering. Proteinkinaser fosforylerer og protein fosfataser defosforylerer proteiner. Adapterproteiner er viktige i signaloverføring fra TCR og videre inn i cellen.

T-cellespesifikt adapterprotein (TSAd) er et intracellulært adapterprotein som blir induisert ved aktivering av T-cellen [5]. Hvilken funksjon TSAd har er ikke helt klart enda, men det viser seg at den har en inhiberende effekt på aktiveringen av T-cellen [6].

1.2 TSAd

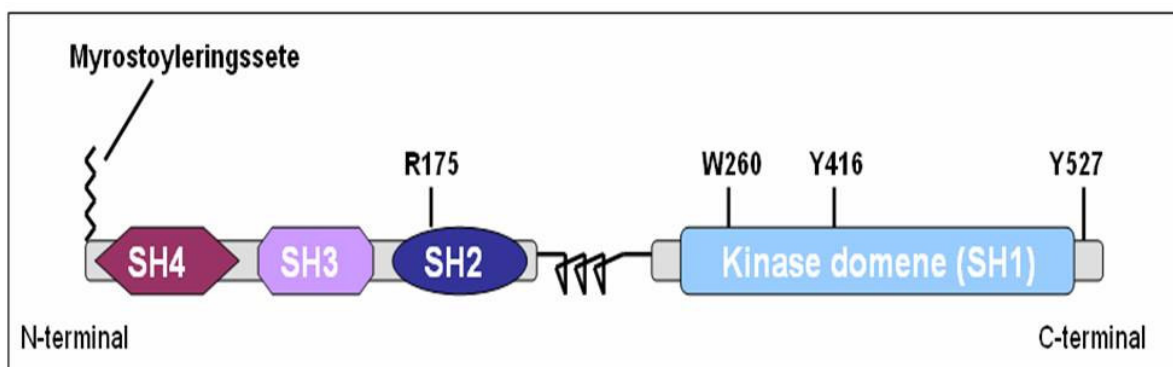
T-cellespesifikt adapterprotein (TSAd) er et intracellulært adapterprotein som blir induisert ved aktivering av T-cellene gjennom TCR. Adapterprotein er en generell betegnelse for proteiner i intracellulære signaleringsveier uten katalytisk aktivitet. Adapterproteinene virker som broer mellom andre katalytisk aktive proteiner [2]. TSAd ble først klonet fra et cDNA bibliotek fra CD8+ T-celler i 1998 [5]. Proteinets kodes av *SH2D2A* genet som er på humant kromosom 1. TSAd er også blitt kalt LAD for Lck-assosiert adapterprotein i mus [7] og RIBP for Rlk/Itk-bindende protein [8]. Lad skiller seg fra human TSAd ved at den har et sinkfingermotiv. TSAd uttrykkes i aktiverte T-celler [6], NK-celler [9] og i endotelceller [10]. Man finner konstitutivt høye nivåer av TSAd i CD4+ og CD8+ T-celler under utvikling i tymus, men noe TSAd uttrykkes også i perifere T-celler. En oppregulering av TSAd skjer i perifere T-celler etter aktivering. TSAd er lokalisert både i cytoplasma og i kjernen i T-celler [11]. TSAd består av et SH2-domene og et prolinrikt område. Det er til sammen 10 tyrosiner (Y1-10) i TSAd, der fire er i SH2-domenet. Tyrosinene kan potensielt fosforyleres av fosfotyrosinkinaser [5;7] (figur 1.2). Y6 og Y8 er i NPXY motiver som fosfotyrosinbindende (PTB)-proteiner kan binde seg til [12].



Figur 1.2. Skjematisk fremstilling av TSAd. Arginin 120 (R120) i TSAd SH2-domenet kan interagere med fosforylert tyrosin i andre proteiner. Det er et prolinrikt område som kan gjenkjennes av andre proteins SH3-domener. Foruten SH2-domenet og prolinrikt område, inneholder TSAd 10 tyrosiner som potensielt kan fosforyleres. Y6 og Y8 er såkalte NPXY motiv som PTB-proteiner kan binde seg til.

1.3 Src kinaser

Mange overflatereseptorer på celler er avhengige av tyrosinfosorylering for å kunne formidle signaler inn i cellen. Noen overflatereseptorer er selv også tyrosinkinaser og ved binding av ligand blir kinasen aktivert, men en del reseptorer mangler selv et tyrosinkinasedomene og virker gjennom cytoplasmatiske tyrosinkinaser istedenfor. Mange av disse reseptorene er avhengige av den største familien av cytoplasmiske tyrosinkinaser, Rous sarcomaviruskinaser (Src) [2]. Src-familie-kinaser finnes i nesten alle kroppens celler. Der regulerer de aktivering av forskjellige vekstfaktorer, cytokiner, adhesjon og antigen-reseptorer. Dette gjør de ved å generere riktig respons på ytre stimuleringer av cellen [13;14]. Det er minst ni medlemmer av Src familie kinaser; lymfoidcellekinase (Lck), Hck, Fyn, Blk, Lyn, Fgr, Yes og Yrk. De har overlappende, men spesifikke, funksjoner i cellen. Lck, Fyn og Lyn er for eksempel assosiert med forskjellige sett av reseptorer i lymfocytter. Alle Src kinasene assosieres direkte med T-cellereseptorkomplekset og CD8/CD4 [14]. Kinasene aktiveres når en ekstracellulær ligand binder til kinasens reseptor. Alle medlemmene i Src-familien deler ett eller flere konserverte Src-homologi domener (SH): SH1, SH2, SH3 og SH4-domene (figur 1.3).



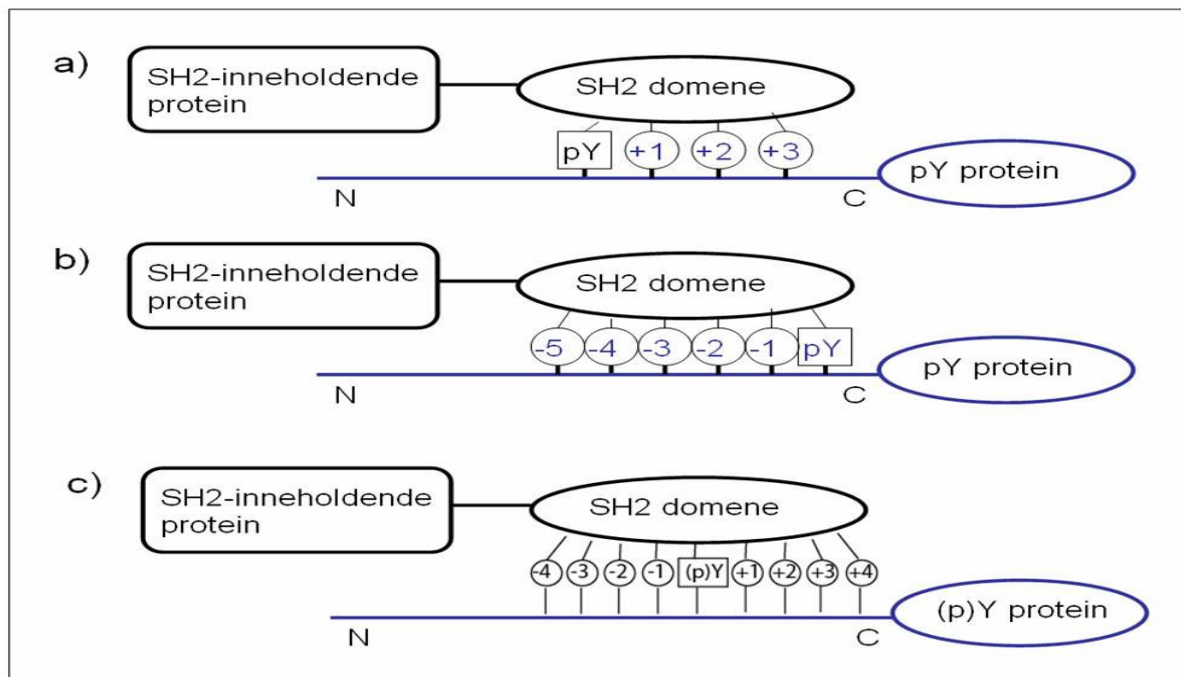
Figur 1.3 Skjematisk fremstilling av Src kinase. Den konserverte argininresiduen (R175) gjenkjenner fosfotyrosin (pY) i pY-inneholdende proteiner. Tryptofan (W260) er den helt N-terminale aminosyren i SH1-domenet og er viktig for autoinhibering. Tyrosin 416 er i aktiveringsløkken i SH1 domenet og fosforylering av Y416 aktiverer kinasen. Ved fosforylering av den C-terminale tyrosinresiduen (Y527) blir kinasen autoinhibert. SH1 og SH2-domenet er koblet sammen av en polyprolin type II heliks.

SH4-domenet er den delen av proteinet som binder membranen, det er alltid myristoylert [15] og noen ganger palmitoylert [16], dvs. modifisert med fettsyrer. Det er en 50-70 aminosyrers sekvens etter SH4-domenet som er unikt for de forskjellige Src-kinasene. SH3-domenet binder en kort prolinrik aminosyresekvens som ofte danner en type II heliks [2]. SH2-domenet binder fortrinnsvis fosforylerte tyrosiner (pY) og SH1-domenet har tyrosinkinaseaktiviteten. Src-kinaser har en kort C-terminal ende som inneholder et autoinhibitorisk fosforyleringssete (tyrosin 527 i Src). Tryptofan 260 er helt N-terminalt i SH1-domenet og er viktig for autoinhiberingen [17]. For full aktivering av kinasen trenger den å bli fosforylert i den såkalte aktiveringsløkken i SH1-domenet (Tyrosin 416 i Src). Det vil si at kun en av de to fosforyleringssetene kan være fosforylert samtidig, det ene er aktiverende og det andre er inhiberende [18]. Defosforylering av Tyr 527 eller binding av ligander til SH2- eller SH3-domenet aktiverer Src-kinasen. Aktiveringstilstanden opprettholdes av autofosforylering av Tyr 416. Når Tyr 527 er fosforylert, og ingen aktiveringsfosfopeptider er tilgjengelige, er Src autoinhibert [19]. Fosforylering av Tyr 527 gjør at SH2, SH3 og kinasedomenet går inn i en autoinhiberende konformasjon som opprettholdes av interaksjoner mellom domenenene [20].

1.4 SH2-domenet

SH2-domener er konserverte domener på ca 100 aminosyrer. De finnes i mange proteiner som er involvert i intracellulære signaloverføringer. De regulerer kinaseaktivitet og virker på en rekke celleresponser; proliferering, apoptose, vekst og regulering av enzymaktivitet [21]. De gjenkjenner som regel sekvensen pY- X1-X2-X3, der X1-3 refererer til den første, andre og tredje C-terminale posisjonen innen peptid sekvensen [22] (figur 1.4.1a). Det har også blitt vist at det N-terminale SH2-domenet til SHP-2 gjenkjenner 5 residuer N-terminalt til pY og ikke C-terminalt [23] (figur 1.4.1 b). Mesteparten av bindingsenergien for fosfopeptidgjenkjennelse av SH2-domener kommer fra binding til pY, men SH2-domenene til Vav1, SAP, Grb10 og Grb 7 kan binde ligander med ufosforylerte tyrosiner [24-28]. SAP (*SH2DIA*) binder både fosforylerte og ufosforylerte tyrosininnholdende peptider [24]. For at

SAP kan binde ufosforylerte peptider må både N- og C-terminale residuer av pY være tilstede for å bidra med bindingsenergi (figur 1.4.1 c).

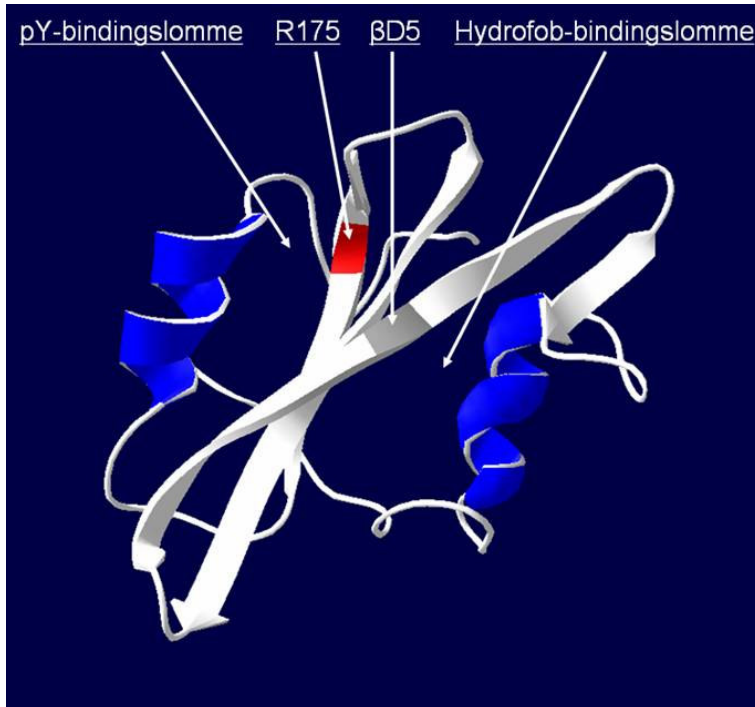


Figur 1.4.1. Binding av SH2-domene til pY protein. a) SH2-domenet binder pY og aminosyre residuer C-terminalt til pY, b) SH2-domenet binder pY og aminosyre residuer N-terminalt til pY, c) SH2-domenet binder pY eller Y og aminosyre residuer både N- og C-terminalt til pY.

TSAd SH2 har blitt vist å interagere med Valosin-inneholdende protein (VCP). VCP er en ATPase med mange forskjellige aktiviteter i cellen. Det er vist at VCP pY805 er nødvendig for binding til SH2 [11]. Y805 er den nest siste aminosyren i VCP og trolig gjenkjenner TSAd SH2 residuer N-terminalt til pY. Hvilke aminosyrer C- eller N-terminalt de forskjellige SH2-domenene gjenkjenner varierer og gir de forskjellige domenene sin selektivitet. Dissosiasjonskonstanten (K_D) mellom SH2-domene og ligand er mellom 0,2 og 1 μ M [29], som er en nokså svak interaksjon.

Strukturen til mange SH2-domener er blitt bestemt. Disse viser at de fleste SH2-domener har en konservert struktur (figur 1.4.2). De består av en fem-trådet antiparallell β -plate imellom to α -helikser. N- og C-terminale residuer i SH2-domenet er nær hverandre på overflaten på motsatt side av peptid bindingssetet. Det er to definerte lommer i strukturen, en ladet pY-bindingslomme og en hydrofob bindingslomme. Det er en positivt ladet argininresidue i bunnen av pY-

bindingslommen (posisjon $\beta B'1$) som gjenkjenner pY (R120 i TSAAd SH2 og R175 i Src SH2). Det er tre typer SH2-domener [30;31]. Type I SH2-domener finnes i ikke-reseptortyrosinkinaser. De har en aromatisk aminosyre i posisjon $\beta D5$ (Tyr i Src SH2), i motsetning til type III SH2-domener som har en ikke-aromatisk aminosyre i den posisjonen. Type II SH2-domener har treonin i posisjon $\beta D5$. TSAAd SH2 er av type I. Det er $\beta D5$ som interagerer med posisjon X1 i liganden.



Figur 1.4.2. Src SH2-domenet. Viser strukturen av SH2-domenet til Src (PDB kode 1o4o). Konservert arginin er merket med rødt. Posisjon $\beta D5$ er merket med grått. Alfa-heliks er indikert med blått og β -plate strukturen i hvitt.

Når SH2-domenet binder sin ligand, skjer det en liten konformasjonsendring i nærheten av peptidbindingssetet. Fosforylert serin (pS) og fosforylert treonin (pT) gjenkjennes ikke av SH2-domenet [19]. Dette kan forklares ved at de har kortere sidekjeder enn tyrosin. Dersom det ikke skjer noen stor konformasjonsendring i SH2-domenet ved binding, rekker ikke pS og pT ned til argininen i bindingslommen. Den hydrofobe bindingslommen dannes av to løkkeområder og binder en eller flere hydrofobe residuer C- eller N-terminalt til pY.

1.5 Autoimmunitet

Immunforsvaret skal beskytte oss mot infeksjoner og må da skille mellom selv og ikke-selv [1]. For at ikke immunforsvaret skal angripe kroppens egne molekyler utvikles toleranse. Toleranse deles i sentral- og perifertoleranse, der sentral toleranse induseres i de primære lymfoide organene (tymus og beinmarg). Under utvikling av T-cellene skjer det en positiv og negativ seleksjon i tymus. Under positiv seleksjon velges de T-cellene ut som har en TCR som gjenkjenner egne HLA-molekyler. De som ikke gjenkjenner egne HLA-molekyler vil gjennomgå apoptose. Den negative seleksjonen sikrer at de T-cellene som gjenkjenner egne peptider sammen med egne HLA-molekyler også gjennomgår apoptose. Men noen selv-reaktive T-celler unnslipper seleksjonen i tymus. Autoimmunitet oppstår når immunforsvaret gjenkjenner selv. En årsak til at det ikke utvikles autoimmune sykdommer, kan være at mengde peptid og HLA må være innen en viss konsentrasjon for aktivering av T-cellen. Når det er store mengder peptid og HLA-komplekser, induserer det anergi. Toleranse blir da opprettholdt. Toleranse hos B-cellene avhenger i stor grad av toleranseutviklingen hos T-celler. B-cellene krever ko-stimulerende signaler fra T-celler for aktivering. Under utvikling av B-celler blir kun de cellene med reseptor for ikke-selv selektert. Autoimmune sykdommer deles i organspesifikke og systemiske. Ved organspesifikke autoimmune sykdommer angriper immunforsvaret et antigen som er karakteristisk for et bestemt vev eller organ. Her er det antistoffer eller effektor T-celler som fører til vevsskade. Eksempler på organspesifikke autoimmune sykdommer er diabetes mellitus type 1, multippel sklerose og myastenia gravis. Ved systemisk autoimmun sykdom er det antigener som er i store deler av kroppen som blir angrepet. T-celler, antistoffer og immunkomplekser utgjør immunresponsen her. Eksempel på en systemisk autoimmun sykdom er revmatoid artritt (RA).

1.6 Multippel Sklerose

Aksonene til nevronene i nervesystemet er dekket med myelin for å gi isolasjon [32]. Det skal sikre at aksjonspotensialet ikke lekker ut slik at det kan gå raskere gjennom aksonet. Ved demyelineringssykdommer mangler det myelin på aksonene. Det vil føre til lekkasje, og aksjonspotensialet vil minske etter hvert som det går nedover aksonet. Multippel sklerose er den mest vanlige demyelineringssykdommen. Multippel sklerose fører til flekkvis demyelinisering i hele sentralnervesystemet. Den karakteriseres ved nevrologiske plager, tretthet, muskelsvakhet, vanskeligheter med å gå og synssvekkelse. Multippel sklerose er en autoimmun sykdom. Aktiverte autoreaktive T-celler i cerebrospinalvæsken til multippel sklerose -pasienter infiltrerer hjernevevet og fører til demyelinering [1]. Det er blitt vist sammenheng mellom multippel sklerose og TSA_d [33]. *SH2D2A* genet som koder for TSA_d har variable antall repeterte GA-enheter (Guanidin-Adenin) i promotorområdet. Antall GA-enheter som repeteres varierer mellom 13 og 33. Slike polymorfier av GA-enheter i regulatorområdet til gener kan gi sykdommer [34-36]. Hos multippel sklerose -pasienter har man funnet at korte alleler av *SH2D2A* kan disponere for multippel sklerose. De korte allelene til *SH2D2A* gir mindre uttrykk av TSA_d [33]. TSA_d er som nevnt tidligere (avsnitt 1.2) blant annet med på å inhibere tidlige T-celle-signaliseringshendelser. En hypotese er derfor at ved mindre uttrykk av TSA_d vil flere T-celler aktiveres og kan være med på å gi autoimmunitet. Det kan være at en av TSA_d sine funksjoner er å være med på induksjon av perifertoleranse hos T-cellene.

1.7 Revmatoid artritt

I tiden rett etter skade eller patogen invasjon produseres det akutfaseproteiner av leveren. De inkluderer molekyler som virker som opsoniner, proteasehemmere som hindrer vevsskade og andre proteiner med mer uklare funksjoner [1]. Nivåene av akutfaseproteiner minker utover i immunresponsen, men hos pasienter med revmatoid artritt (RA) vil nivåene ikke minke. RA er en kronisk betennelsessykdom i ledd og bindevev. Hos pasienter med RA er det funnet aktiverte T-celler og

plasmaceller. 80 % av pasientene med RA har revmatoid faktor (RF). Dette er et autoantistoff som binder Fc-delen av IgG-molekyler. RF kan være av IgM, IgG og IgA isotype. I likhet med multippel sklerose er det vist at polymorfier i *SH2D2A* er assosiert med juvenil RA (JRA). Her er det også det korte allelet som har økt forekomst hos pasienter med JRA [37].

1.8 Kjente bindingspartnere til TSA_d og TSA_d SH₂

En rekke proteiner er vist å interagere med TSA_d (Lck, Rlk, Itk, MEKK2, Grb-2 SH₂ og PLC- γ), men kun to proteiner har så langt vist å binde TSA_ds SH₂-domene (VCP og VEGFR-2). Ved å finne bindingspartnere kan en avsløre hvor TSA_d har sin plass i signaleringsveiene og hvilken betydning det har.

Lck er et 56 kDa protein i Src-kinasefamilien. Cytoplasmatisk hale av CD8 og CD4 molekylerne er assosiert med Lck. Lck aktiveres gjennom autofosforylering av Y394 på dens eget kinasedomene [38] som beskrevet under 1.3. Lck fosforylerer forskjellige intracellulære proteiner på tyrosiner og er da med på aktiveringen av T-cellerne [2]. TSA_d inhiberer aktiviteten til Lck ved å hindre Lck i å fosforylere andre proteiner på deres tyrosiner [39]. Senere forskning har vist at TSA_d kan aktivere Lck [40].

TSA_d binder også til reseptor-lignende-kinase (Rlk) og interleukin-2-induserbar tyrosinkinase (Itk) [8]. Rlk og Itk er proteiner i Tec-kinasefamilien. Itk (72 kDa) uttrykkes i T-celler og NK-celler og blir induisert av IL-2 [41;42]. Itk er vist å være en del av T-celleaktiveringen og cytoskelettorganiseringen. Rlk uttrykkes primært i T-celler, mastceller og i testikler. Det er et 62 kD protein som blir nedregulert i naive T-celler etter aktivering [43;44]. Hvilken virkning binding av TSA_d til Itk og Rlk har, er fortsatt ukjent.

MEKK2 er en type mitogenaktivert proteinkinaser kinase kinase (MAPK kinase kinase), som er i MAPK familien. Det er et 62 kDa protein. MAPK fosforylerer serin og treonin som er en mer langvarig fosforylering enn tyrosinfosforylering, som er svært kortvarig. Aktivering av MAPK krever fosforylering av både en treonin og en

tyrosin, der disse kun har én aminosyre mellom seg i sekvensen. MAPK kinase utfører fosforylering av MAPK. Hos pattedyr kalles MAPK kinase (i Ras signaliseringsveien) for MEK. MAPK er med i flere signalveier som fører til forandringer i proteinaktiviteten og/eller forandring i genuttrykket [2]. MEKK2 og TSAd kolokaliserer til kontaktflaten mellom T-celle reseptoren (TCR) og APC [45]. Hvilken rolle TSAd spiller her er også ukjent.

Vekstfaktor-reseptorbundet-protein 2 (Grb-2) SH2 og fosfolipase- γ (PLC- γ) ble vist å binde LAD (TSAd) i et tyrosinfosforylert "Yeast Two-Hybrid system" [46;47]. Det har kun blitt testet *in vitro*. Foreslått funksjon er at når LAD er aktivert (fosforylert av Lck), blir Grb-2 SH2 og PLC- γ rekruttert. Det fører til nedstrøms signaliseringshendelser som Ras/MAPK aktivering, Ca^{2+} økning og proteinkinase C aktivering.

Vaskulær endotelial vekstfaktor (VEGF) er med på å kontrollere angiogenesen. Angiogenese er utvikling av nye blodårer. VEGF er et mitogen som bindes til VEGF reseptor 2 (VEGFR-2) [32]. VEGFR-2 er et 210 kDa protein som har fem fosforyleringssteder: Y951, Y1054, Y1059, Y1175 og Y1214. Fosforylering av Y951 fører til binding av TSAd via dets SH2-domene. Binding av TSAd til VEGFR-2 fører til regulering av aktinreorganisering og celledeling [10].

Valocin-inneholdende protein (VCP) er den andre kjente bindingspartneren til TSAd SH2-domene i T-celler [11]. VCP er en type II AAA (ATPase assosiert med varierte aktiviteter) protein. Som andre AAA-proteiner katalyserer VCP ATP-hydrolyse for å frigjøre energi og bruker energien til å utføre mekanisk arbeid i cellen. VCP er et 97 kDa protein som er kjent som VAT i archaeobakterier, CDC48 i gjær, TER94 i *Drosophila*, p97 i *Xenopus* og VCP i planter og pattedyr. Det er et av de mest evolusjonært konserverte proteiner [48] og utgjør omtrent 1 % av den totale mengden cellulære proteiner. VCP er involvert i en rekke biologiske funksjoner. Det virker som et molekylært chaperon under membranfusjon, celledeling, stressrespons, apoptose, B- og T-celleaktivering, transkripsjonell aktivering, endoplasmatisk retikulum (ER) assosiert degradering av proteiner, annen

proteindegradering og transport av transkripsjonsfaktorer fra cytoplasma til kjernen. Det har blitt vist at VCP frakter TSAd inn i kjernen [11]. Men det er ikke kjent hvilken betydning assosiasjonen til VCP har for TSAds funksjon.

2. Mål med oppgaven

TSAd består av et SH2-domene og et prolinrikt område. For å forstå funksjonen til TSAd er TSAds SH2-domene sentralt. Det humane TSAd SH2-domenet har vist seg å være vanskelig å få uttrykt i *E. coli* i høy konsentrasjon. Ett av målene med denne oppgaven var å få bedre uttrykk av human TSAd SH2 ved å optimalisere proteinekspressjonen. En mulig årsak til dårlig uttrykk kan være at human TSAd SH2-domene har en sekvens som gir problemer. Oppgaven har derfor også vært å samtidig sammenligne uttrykk av mus og rotte TSAd SH2, som har litt annerledes sekvens enn human TSAd SH2. TSAd SH2 skal uttrykkes i fusjon med GST, kun human TSAd er fra før klonet inn i pGEX-6P-1 vektor. Oppgaven var:

1. Klone sekvensen for mus og rotte TSAd SH2 over i pGEX-6P-1 vektor.
2. Human GST-TSAd SH2 konstruert skal benyttes i pulldown-forsøk for prøve å finne nye ligander.
3. Mutanter av human GST-TSAd SH2 må konstrueres der det konserverte argininresidue R120 skal muteres. De skal benyttes som kontroller i pulldown-forsøk.
4. Eventuelle nye ligander fra pulldown-forsøk skal undersøkes videre med massespektrometri.

3. Materialer

3.1 Kjemikalier

3.1.1 Organiske kjemikalier

<u>Forbindelse</u>	<u>Produsent</u>
2- mercaptoethanol	Sigma
30 % BSA	Biotest
Agar-agar	Merck KGaA
Akrylamid-Bis 40 %	Merck KGaA
Ampicillin	Calbiochemicals
Antipain	Sigma
Aprotinin	Sigma
BamHI buffer 10x	New England Biolabs
Bromfenylblått	Fluka AG
BSA 100x	New England Biolabs
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	Riedel-de Haën AG
CH ₃ CN, acetonitril	Acros organics
C ₂ H ₄ O ₂ , eddiksyre	Normapur
CH ₃ COONa	R.P.Normapur™AR
Chymostatin	Sigma
dNTP	Pharmacia Biotech
DpnI buffer 10x	New England Biolabs
EDTA, C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	Sigma
Føtalt kalveserum	PAA laboratories
Gentamicin	Fluka AG
Glucose	Sigma
Glycin	VWR international
Hepes	Gibco
Igepal (NP40)	Sigma
Leupeptin	Sigma
Lipofectin®Reagent	Invitrogen Corporation
Metanol	Merck
MgCl fri buffer 10x	Sigma
n-oktyl-β-d-glukosid	Sigma
Non-essential amino acids	Gibco
OptiMEM®I	Gibco
Penicillin	Alpharma

Peptone from casein	Merck
Protease inhibitor cocktail tablets	SigmaRoche Diagnostics GmbH
Quick ligase buffer 10x	New England Biolabs
RPMI	Gibco
SDF-1	Peptidech EC
SDS	Sigma
SeaKem®LE Agarose	Cambrex Bio Science
TEMED	VWR international
Trypsin Sol. 0,25 %	Gibco
Tween 20	Prolabo
Tørr melk (Skim Milk Powder)	Fluka AG
Yeast extract granulated	Merck

3.1.2 Uorganiske kjemikalier

Alle kjemikalier som ble benyttet var av pro analysi kvalitet

<u>Forbindelse</u>	<u>Produsent</u>
Coomassie®Brilliant BLUE G-250	MP Biomedicals, Inc.
DTT	Sigma
Etidiumbromid	Sigma
Glutathione Sepharose™ 4B	Amersham Biosciences
H ₂ O ₂	Merck
HCl	Prolabo
IPTG	Promega
KCl	R.P Normapur™AR
KH ₂ PO ₄	R.P Normapur™AR
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Sigma
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , APS	Sigma
Na ₂ HPO ₄	Merck
Na ₃ VO ₄	Sigma
NaCl	Merck
NaF	Fluka AG
NaN ₃	Ferak Berlin
NaOH	Merck
Natriumpyrovat	Sigma
Pfu ultra buffer 10x	Stratagene
PMSF	Sigma
Glutathione reduced form 98% purity gamma-Glu-Cys-Gly, GSH	Sigma
Tris base	Roche Diagnostics GmbH

Triton x100	Fluka AG
Trypan blå	Gibco

3.2 Bakteriestammer

<u>Stamme</u>	<u>Produsent</u>
E.coli BL21-codon Plus®-RP competent cells	Stratagene
E.coli X11 Blue	Stratagene

3.3 Celle linjer

<u>Celletype</u>	<u>Linje</u>
Jurkat E6.1	Leukemi T-celle
293T celler	Fibroblast (nyreepitelcellelinje)

3.4 Vekst/Dyrkingsmedier

3.4.1 Dyrkingsmedier for Escherichia coli

Lurium Broth (LB) medium, 1 l:

Peptone from casein	10.0 g
Yeast extract granulated	5.0 g
NaCl	10.0 g

RO- H₂O til 1 l. pH ble justert til 7.0 med 5M NaOH. LB mediet ble autoklavert ved 121 °C i 30 min. Ampicillin ble tilsatt mediet før bruk i en sluttkonsentrasjon på 50µg/ml. Lagret ved romtemperatur.

LB agar skåler med ampicillin, 500 ml (20 stk):

LB medium	500 ml
Agar-agar	7,5 g

LB mediet med agar ble autoklavert ved 121 °C i 30 min. Ampicillin (50µg/ml) ble tilsatt når løsningen var avkjølt til omtrent 50 °C. Deretter helt ut i sterile petriskåler, avkjølt, satt opp-ned og lagret ved 4 °C i mørket.

S.o.c.-medie, 1 l:

Peptone from casein	20 g
Yeast extract granulated	5 g
NaCl	0,5 g
250 mM KCl	10 mL
2 M NaOH	Til justering av pH
RO- H ₂ O	950 mL
2 M MgCl ₂	5 mL
1 M glucose	20 mL

Blander alt til og med RO- H₂O, justerer pH til 7,0 med 2 M NaOH, autoklaverer ved 121 °C i 20 min. Etter avkjøling tilsettes sterilfiltrert MgCl₂ og glucose. Mediet oppbevares ved -20 °C til det skal benyttes.

3.4.2 Vekstmedium for Jurkat E6.1 og 293T celler

RPMI 1640	500 mL
FCS	50 mL (10 %)
Ikke essensielle aminosyrer	5 mL (1 %)
Na pyrovat	5 mL (1 %)
Penicillin 60mg/mL	500 µl
Gentamicin løsning	250 µl

Medium lages i sterilbenk og lagres ved 4 °C.

3.5 Buffere og løsninger

Bufferne og løsningene lagres ved romtemperatur hvis ikke annet er spesifisert.

3.5.1 Buffere og løsninger for cellelysering2xTris-saltløsning, 1 l:

NaCl	11,7 g
40 mM Tris HCl pH 7,4til 1 l	

2xLyseringsbuffer til 293T celler, 5 mL:

0,5M Octyl β -D-glucopyranoside	500 μ l
10 % Iglpal	500 μ l
NaF, stamløsning x10	500 μ l
0,1 M Na_3VO_4	100 μ l
25xPH	167 μ l
2xTris salt løsning pH 7,4	3,233 mL

NaF stamløsning, 100 mL:

NaF 3,1 g

Tilsetter 2x Tris-saltløsning til 100 mL

3.5.2 Buffere og løsninger for SDS-PAGE og Western blotting

Coomassie Blue fargeløsning, 1 l:

Coomassie Brilliant Blue G-250	1 g
Metanol	450 mL
Eddiksyre	100 mL
RO- H_2O	450 mL

Avfargingsløsning for Coomassie Blue farging, 1 l:

Metanol	300 mL
Eddiksyre	100 mL
RO- H_2O	600 mL

Løsningen lages i avtrekk.

5xSDS loading buffer, 9,5 mL:

1 M Tris-HCL pH 6,8	0,6 mL
50 % Glyserol	5 mL
10 % SDS	2 mL
β -merkaptoetanol	0,5 mL
1 % Bromfenylblått	1,0 mL
RO- H_2O	0,9 mL

10 % SDS-kjørebuffer, 1 l:

Tris	30 g
Glycin	144 g
SDS	10 g

RO- H₂O til 1 l.Overføringsbuffer til Western blotting, 1 l:

Tris	3 g
Glycin	14,4 g
Metanol	100 mL

RO- H₂O til 1 l.10 X TBS buffer, 5 l:

Tris	60,55 g
Nacl	438,3 g

RO- H₂O til 5 l.TBS med 0,1 % tween (TBST) buffer, 2 l:

TBS buffer	2 l
Tween 20	2 ml

3.5.3 Buffere til GST fusjonsprotein systemetElueringsbuffer til glutation-sepharosekuler, 100 mL:

Redusert glutation	0.31 g
--------------------	--------

50 mM Tris-HCl pH 8 til 100 mL. Oppbevares ved 4 °C.

3.5.4 Buffere til DNA arbeid10xDNA loading buffer, 1,08 mL:

Glyserol (85 %)	500 µl
0,2 M EDTA	500 µl
Bromfenolblått	80 µl

TAE buffer, 1 l:

Tris	242 g
Eddiksyre	57,1 mL
0,5 M EDTA pH 8,0	100 mL
RO- H ₂ O til 1 l.	

TE buffer, 10 mL:

0,5 M Tris	200 µl
0,2 M EDTA pH 8,0	50 µl
RO- H ₂ O til 10 mL.	

3.5.5 Tris-HCl løsninger1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 1 l:

Tris	181,5 g
HCl	Til justering av pH
RO- H ₂ O til 1 l. Justere pH til 8,8 med HCl	

1 M Tris-HCl, pH 7, 1 l:

Tris	121 g
HCl	Til justering av pH
RO- H ₂ O til 1 l. Justere pH til 7 med HCl.	

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 1 l:

Tris	60,5 g
HCl	Til justering av pH
RO- H ₂ O til 1 l. Justere pH til 6,8 med HCl	

50 mM Tris-HCl, pH 8, 1 l:

Tris	11 g
HCl	Til justering av pH
RO- H ₂ O til 1 l. Justere pH til 8 med HCl	

40 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 l:

Tris	4,8 g
HCl	Til justering av pH
RO- H ₂ O til 1 l. Justere pH til 7,4 med HCl	

3.5.6 Andre buffereLyseringsbuffer til BL21, 10mL:

10 % Triton 100x	1 mL
100 med mer PMSF	200 µl
Lysozym	5 mg
10 µg/µl DNase	10 µl
25xPH	100 µl
PBS pH 7,4	8,8 mL
1 M DTT	25 µl

n-oktyl-β-d-glukosid løsning, 10 mL:

n-oktyl-β-d-glukosid	1,46 g
2x trisbuffer til 10 mL. Lagres ved 4 °C	

1xPBS, pH 7,4, 1 l:

NaCl	8 g
KCl	0,12 g
Na ₂ HPO ₄	1,14 g
KH ₂ HPO ₄	0,24 g
HCL	Til justering av pH
RO- H ₂ O til 1 l. Justere pH til 7,4 med HCl.	

100xPH, 1 mL:

Protease inhibitor cocktail tablets	2 tabletter
Tablettene løses opp i 1 mL RO- H ₂ O. Oppbevares i alikvoter ved -20 °C.	

3.6 Enzymer

<u>Enzym</u>	<u>Type</u>	<u>Produsent</u>
Quick T4 ligase	DNA ligase	New England Biolabs
<i>Pfu</i> polymerase	DNA polymerase	Stratagene
<i>Taq</i> polymerase	DNA polymerase	Promega
DNase	DNase	Roche
Lysozym fra eggehvite	Lysozym	Fluka AG
Presission™ Protease	Protease	Amersham Biosciences
BamHI	Restriksjonsenzym	New England Biolabs
DpnI	Restriksjonsenzym	New England Biolabs
EcoRI	Restriksjonsenzym	New England Biolabs

3.7 Oligonukleotider

<u>Navn</u>	<u>Sekvens (fra 5' til 3')</u>	<u>T_m, °C</u>
mTSAAd-bamH-p310F	ACTGGCTCGGATCCAAGACTGCCCTC	96 °C
mTSAAd-noti-p680R	GGCTCAGCGGCCGCTCGAGCGAGGGG	106 °C
pGEX-P5	CCAAAATCGGATCTGGAA	56 °C
F2771-p435mut	ACTTGGTGCTGTTCAGCGAG	62 °C
F2771-p452mut	CGCTGAACAGCACCAAGTAGC	66 °C
TSAAd-R120K-P3	CGCTGAACCTCACCAATGAGC	64 °C
TSAAd-R120K-P5	ACTTGGTGAAGTTCAGCGAG	60 °C
TSAAd-R120A-P3	CGCTGAACGCCACCAAGTAGC	63,7 °C
TSAAd-R120A-P5	ACTTGGTGGCGTTCAGCGAG	61,4 °C

Primerne er konstruert av A. Spurkland, bortsett fra pGEX-P5 som er konstruert av produsent og R120A/V som er konstruert av undertegnede. Grønn markør viser der hvor mutasjonen innføres. Smeltetemperatur (T_m) for primerne ble oppgitt av produsentene. Eurogenetic har produsert de sju første primerne, MWG Biotech AG har produsert de to siste.

3.8 Antistoff

<u>Antistoff</u>	<u>Ver</u>	<u>Isot</u>	<u>Produsent</u>
Anti-Lck (klon IF6),	mus	IgG	Gave fra Joseph B. Bolen
Goat anti-mouse (GAM)	geit	IgG	Jackson ImmunoReserch
Anti-GST, monoklonal	mus	IgG	Santa Cruz Biotechnology
Anti-HA, monoklonal	mus	IgG	Santa Cruz Biotechnology
Anti-pY, 4G10, monoklonal	mus	IgG	Gave fra Kjetil Taskén

3.9 Membraner

<u>Membran</u>	<u>Produsent</u>
Immun-Blot™ PVDF Membrane	Bio-Rad Laboratories

3.10 Standarder

<u>Standard</u>	<u>Produsent</u>
GenRuler DNA ladder 100 bp	Fermentas, life sciences
Lambda DNA –Bst II digest	Fermentas, life sciences
Precision plus protein, dual color	Fermentas, life sciences
Prestained Protein marker, Broad Range	New England Biolabs

3.11 Ferdigkjøpte "Kits"

<u>Kit</u>	<u>Produsent</u>
QIAprep®spin Miniprep Kit	VWR international
Restore™Western Blot	Pierce
SuperSignal®WestPico	Perce
Chemiluminescent Substrate	
Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up	Promega

3.12 Utstyr

Standard laborieutstyr ble brukt.

PCR-maskin: GeneAmp®PCR system 9700, PE Applied Biosystem
 Sonikator: Ultrasonics Ltd
 Digital fremkaller: Kodak Image Station 2000R

4. Metoder

4.1 Molekylærbiologiske metoder

4.1.1 Rensing og analyse av DNA

Agarose gelelektroforese

DNA molekyler kan separeres etter størrelse i agarose gelelektroforese. Under elektroforesen vil ladete partikler bevege seg i det elektriske feltet [49]. Positive ioner (kationer) beveger seg mot katoden og negative ioner (anioner) beveger seg mot anoden. Ved gelelektroforese beveger de ladete DNA-partiklene seg gjennom en gel som er et fast medium med porer i. Gelens porer er fylt med en elektroforesebuffer med passende pH-verdi og en passende konsentrasjon av ioner. Her ble TAE buffer (pH=8) benyttet. For å detektere DNA-molekylene benyttes det et fargestoff.

Etidiumbromid (EtBr) er det mest anvendte fargestoffet til DNA i agarosegeler. EtBr-molekylene binder seg til basene i den dobbeltrådige DNA. De inkorporerte EtBr-molekylene sender ut fluoriserende lys når det belyses med UV-lys, 300 nm UV-lys er den optimale bølgelengde når EtBr-molekyl komplekset skal fluorisere.

Det ble benyttet en standard med DNA-molekyler av kjente lengder for å sjekke lengden på DNA-molekylene som skulle separeres.

Fremgangsmåte: (benytter SeaKem®LE agarose fra Cambrex)

1. Agarosegelen ble lagd etter anvisning fra produsent av agarose (Merck KgaA) og agarosegelen ble kjørt etter anvisning fra produsent av agarose (Merck KgaA). Mengde agarose i gelen bestemmes av hva som skal separeres. Her ble 1 og 1,5 % agarosegeler benyttet.
2. Visualiserte agarosegelen ved hjelp av UV-lys på digital fremkaller.

Isolering av plasmid DNA fra E. coli

Isolering av plasmid DNA (minipreparasjon) fra *E.coli* kan utføres på forskjellige måter som for eksempel ved alkalisk lysering, koke-lysring, SDS-lysring, lysring og så presipitering med polyetylenglykol eller lysring og så rensing ved kromatografi [49]. Lyseringsmetodene virker ved at bakteriene blir lysert, kromosomal DNA og proteiner blir denaturert og plasmid DNA vil være i løsnig etter sentrifugering. DNA bindes reversibelt til silica, det er utnyttet til rensing av plasmid DNA ved kromatografi metoder, som gir et veldig rent utbytte.

Minipreparasjon vil kunne gi et utbytte fra ca 50ng til 50µg DNA, avhengig av metode og vektor. Her ble QIAprep®spin Miniprep Kit benyttet. Metoden går ut på at en først lyserer bakteriene med en alkalisk løsning, spinner ned og overfører supernatanten til en kolonne som har et gelfilter med silica som binder plasmid DNA. Metoden ble benyttet for å rense plasmid DNA fra X11 Blue kultur. X11 Blue var transformert med pGEX-6P-1 vektor med rotte, mus, human eller mutert human TSA_d SH2 sekvens. Utbyttet var på ca 100ng/µl (5µg totalt).

Fremgangsmåte:

1. 10mL overnatt (ON) kultur av koloni fra transformasjonene ble satt.
2. Minipreparasjon ble utført etter beskrivelse fra produsenten (VWR international).
3. Plasmidene ble oppbevart ved 4 °C.

Isolering av DNA fra agarose gel

Etter at et PCR produkt har blitt restriksjonsfordøyd med restriksjonsnukleaser må det renses for å fjerne avkuttete nukleotider og for å fjerne restriksjonsnukleasene. I denne oppgaven ble isolering av DNA benyttet i kloningen av mus og rotte TSAd SH2 sekvens fra pEF-HA vektor til pGEX-6P-1 vektor.

Fremgangsmåte (benyttet Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System fra Promega):

1. Hele prøven ble separert på agarose gelelektroforese.
2. Utførte isoleringen etter beskrivelse fra produsenten (Promega).
3. Det rensede PCR produktet ble videre ligert inn i pGEX-6P-1 vektor.

Bestemmelse av DNA konsentrasjon

Måling av DNA konsentrasjon kan gjøres ved spektrofotometri, fluorometri eller ved agarose gelelektroforese [49]. Et spektrofotometer måler absorbans etter innsending av lys med bestemt bølgelengde. DNA absorberer lys ved 260nm. Det er de aromatiske ringene i basene, som er med på å danne DNA molekyler, som absorberer ved 260nm. Det kan være vanskelig å få en nøyaktig måling av DNA konsentrasjon ved bruk av absorbans. Det er fordi en DNA løsning ikke er homogen og ofte viskøs. En løsning på det siste problemet er å fortynne prøven. Fluorometri er en mer nøyaktig måte å måle DNA konsentrasjon på. Der bruker man fluoriserende forbindelser som binder spesifikt til dobbelt trådig DNA. Ved agarose-gelelektroforese sammenligner man en DNA prøve med en eller flere standarder med kjent konsentrasjon eller et DNA konstrukt med kjent konsentrasjon. Hvis man skal finne konsentrasjonen på et plasmid må det restriksjonsfordøyes først. Det er fordi intakte plasmider ikke vandrer som ett bånd i en gel på grunn av forskjellig kveiling.

I denne oppgaven ble spektrofotometer og agarose gelelektroforese benyttet. Det var utbyttet av minipreparasjon som skulle måles før prøvene ble sendt til sekvensering.

Fremgangsmåte (spektrofotometer):

1. Hver prøve som skulle måles ble fortynnet 1:50 i TE buffer, TE buffer ble brukt til kalibrering.
2. Fulgte anvisningen på spektrofotometeret.

Fremgangsmåte (agarose gelelektroforese):

1. Kjørte agarose gelelektroforese med en fortynningsrekke av et plasmid med kjent konsentrasjon, for så å bestemme konsentrasjonen ved å sammenligne intensiteten av båndene.

Sekvensering av DNA

Sekvensering av kloningsresultatet av mus og rotte GST-TSAd SH2 og R120 mutantene ble utført av firmaet Medigenomix. Dette ble gjort for å detektere eventuelle mutasjoner og verifisere kloningen.

For teori og utførelse se www.medigenomix.de.

4.1.2 Enzymatisk modifisering av DNA

Restriksjonsfordøyelse av DNA

Restriksjonsnukleaser finnes naturlig i bakterier som et forsvar mot fremmed DNA, for eksempel ved en virusinfeksjon [2]. De kutter DNA dobbeltheliksen på spesifikke steder. Hver restriksjonsnuklease har sitt spesifikke kuttsete, sekvensen de gjenkjenner er 4-8 nukleotider lang. Restriksjonsfordøyning ved hjelp av restriksjonsnukleaser kan gi to typer ender på DNA sekvensen, enten butte ender eller overlappende ender. Overlappende ender kan da enkelt basepare med et annet DNA molekyl som er restriksjonsfordøyd med samme restriksjonsnuklease (eller en annen restriksjonsnuklease med samme spesifisitet) for å danne et rekombinant DNA molekyl.

I denne oppgaven ble restriksjonsnukleasene BamHI, NotI og DpnI benyttet. De har følgende restriksjonsseter:

BamHI	NotI	DpnI
5' G GATCC 3' 3' CCTAG G 5'	5' GC GGCCGC 3' 3' CGCCGG CG 5'	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ 5' \text{GA} \text{TC} 3' \\ 3' \text{CT} \text{AG} 5' \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$

BamHI og NotI ble benyttet til å restriksjonsfordøye PCR produktet av mus og rotte TSAd SH2 sekvensen og pGEX-6P-1 vektoren de skulle limeres inn i. DpnI ble benyttet i mutagenese av human GST-TSAd SH2 sekvens i pGEX-6P-1 vektor.

Fremgangsmåte for BamHI og NotI:

1. Hele PCR prøven ble restriksjonsfordøyd etter beskrivelse av produsent.
2. Før det restriksjonsfordøyd PCR produktet kan limeres inn i restriksjonsfordøyd pGEX-6P-1 vektor må vektoren renses fra gel (se under 4.1.1). Dette for å fjerne ukuttet vektor, hindre religering av avkuttet sekvens og for å fjerne restriksjonsnukleasene.

Fremgangsmåte for DpnI restriksjonsfordøying:

1. 9µl fortynnet (1:5) PCR produkt ble benyttet til restriksjonsfordøyingen.
2. Utførelse etter beskrivelse fra produsenten av DpnI.
3. Det restriksjonsfordøyd PCR produktet ble transformert inn i X11 Blue bakterier uten videre opprensing.

Ligering av DNA fragmenter med Bakteriofag T4 DNA ligase

DNA-ligaser katalyserer dannelsen av fosfodiesterbindinger mellom 3' hydroksyl ende og 5' fosforyl ende av nukleinsyremolekyler [49]. DNA-ligaser benyttes i celler under replikasjon av DNA, DNA-reparasjon og genetisk rekombinasjon. *In vitro* benyttes DNA-ligaser blant annet til å koble sammen en DNA-sekvens med en vektor. Her ble restriksjonsfordøyd PCR-produkt ligert inn i pGEX-6P-1 vektor.

Fremgangsmåte:

1. pGEX-6P-1 vektor og innskudd ble ligert sammen i forholdet 1:1 av Quick T4 DNA-ligase etter anvisning fra produsent (New England Biolabs).
2. Ligatet ble transformert inn i X11 Blue umiddelbart.

4.1.3 Transformasjon av *E. coli* med plasmid DNA

Bakteriestammene X11 Blue og BL21-codon Plus®-RP competent cells fra Stratagene ble benyttet. Transformasjonen skjer ved varmpuls på 42 °C i 40 sekunder. Varmepulsen får bakteriene til å åpne seg og plasmidet kan komme inn i bakterien. X11 Blue ble benyttet for minipreparasjon og BL21 ble benyttet for *in vitro* syntese av proteiner.

Fremgangsmåte:

1. 1µl plasmid DNA ble transformert inn i 50µl bakterier etter anvisning fra produsent (Stratagene).

4.1.4 Polymerase Kjede Reaksjon

Polymerase kjedereaksjon (PCR) er en teknikk som brukes for å amplifisere et spesifikt område av DNA. Det benyttes to primere, den ene til 3' ende og den andre til 5' ende av mål-DNA [50]. DNA polymerasen må være varmestabil. Her ble *Pfu* og *Taq* DNA polymerase benyttet. *Pfu* DNA polymerase har en større feilrettingsaktivitet enn *Taq* DNA polymerase. *Taq* DNA polymerase ble derfor kun benyttet til test-PCR av kolonier.

PCR program:

1.	1 syklus	95 °C, 1 min	Inaktivering av nukleaser og denaturering av DNA templatet
2.	30 sykler	95 °C, 30 s	Denaturering
		55 °C, 30 s	Primer hybridisering
		72 °C, 2-12 min	DNA syntese (2min/kbp som skal syntetiseres)
3.	1 syklus	72 °C, 10 min	Siste DNA syntese trinn
4.	Avkjøling til 4 °C		

PCR blandinger (100µl):

	Blanding 1	Blanding 2
	<u>(Pfu Ultra</u>	<u>(Taq DNA</u>
RO- H ₂ O,	86µl	79,6µl
10x Pfu ultra reaksjons	10µl	-
Mg fri buffer	-	10 µl
25 mM MgCl	-	7 µl
20pmol/µl primer 1	1µl	1µl
20pmol/µl primer 2	1µl	1µl
25mM dNTP	1µl	1µl
2,5U/µl DNA polymerase	1µl	-
5U/µl DNA polymerase	-	0,4 µl

Fremgangsmåte for PCR med *Pfu* Ultra DNA polymerase:

Utføres under avtrekk for å hindre kontaminasjon av prøvene.

1. 30µl PCR blanding 1 til hver PCR prøve. Tilsatte 50ng plasmid DNA. Negativ kontroll var uten plasmid.
2. Prøvene ble analysert på en 1,5 % agarose gel.

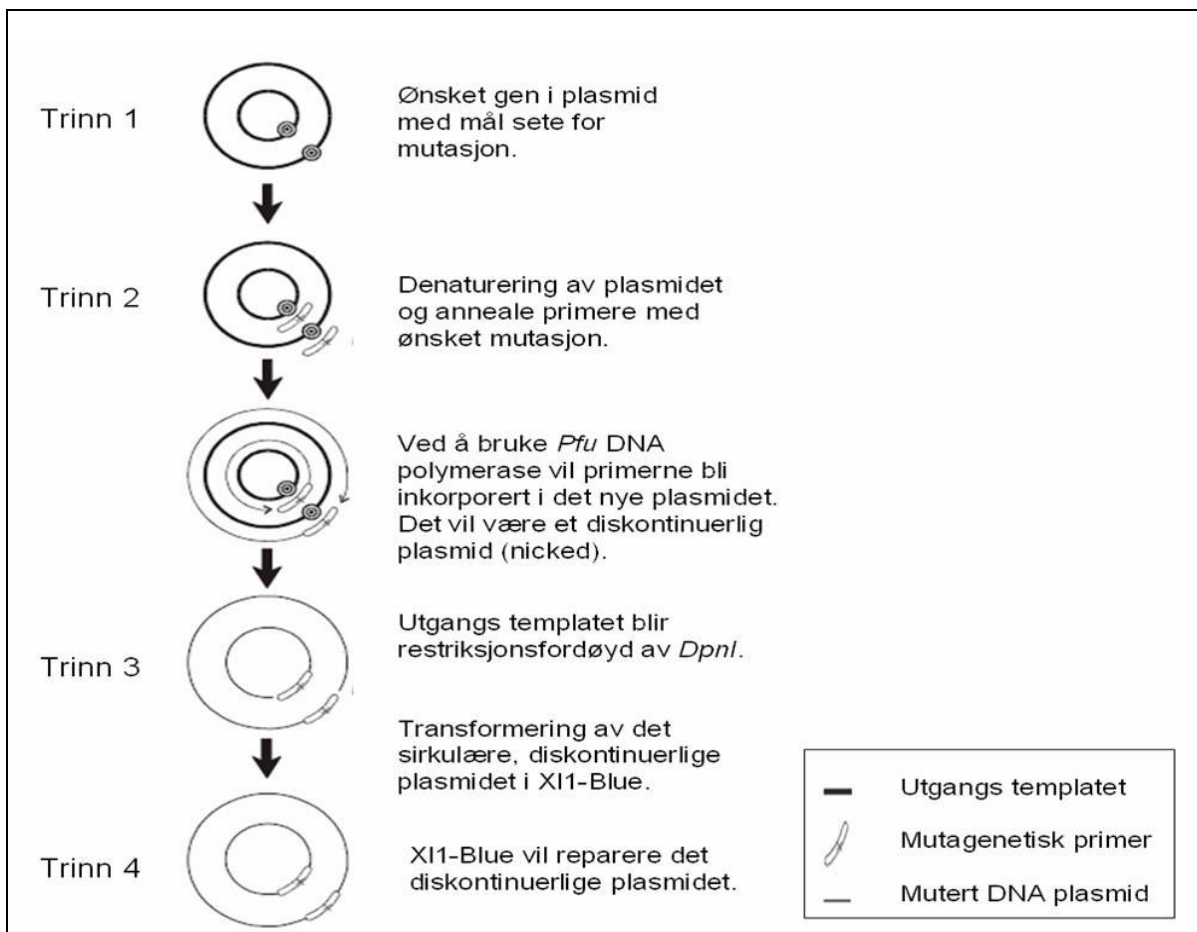
Fremgangsmåte for test-PCR av kolonier med *Taq* DNA polymerase:

Utføres under avtrekk for å hindre kontaminasjon av prøvene.

1. Bakteriekolonier ble plukket og blandet med 50µl RO- H₂O. 1µl bakterieblending til 15µl PCR blanding 2. Negativ kontroll var uten bakterieblending og positiv kontroll inneholdt pGEX-6P-1 vektor med human eller rotte TSAAd SH2.
2. Prøvene ble analysert på en 1,5 % agarose gel.
3. Overnatt-kultur (ON-kultur: 10ml s.o.c.-medie, 50µg/ml Amp og en bakteriekoloni) av to positive prøver ble satt for minipreparasjon.

4.1.5 Sete-spesifikk mutagenese

Prinsippet bak QuickChange sete-spesifikk mutagenese fra Stratagene ble fulgt. Mutasjonen innføres ved hjelp av primere og PCR (figur 4.1.5). Plasmid DNA er metylert, noe PCR produktet ikke er. Ved å utnytte restriksjonsnukleasen DpnI, som er avhengig av metylerte adeniner for restriksjonsfordøyning, vil utgangsvektoren bli kuttet opp i mindre fragmenter.



Figur 4.1.5: Oversikt over Quickchange sete-spesifikk mutagenese. (figuren er basert på lignende figur i manualen fra Stratagene)

Aminosyren som man ønsket å endre i TSAAs SH2-domene var det konserverte argininen i posisjon 120 (R120).

Primerne som ble konstruert er listet opp under oligonukleotider (3.7).

PCR program:

1 syklus:	95 °C i 2 minutter
23 sykler:	95 °C i 30 sekunder
	58 °C i 30 sekunder
	72 °C i 12 minutter
1 syklus:	72 °C i 10 minutter, deretter 4 °C

PCR blanding (50µl):

RO- H ₂ O,	42,2µl
10x Pfu ultra reaksjons buffer	5µl
20pmol/µl primer 1	1µl
20pmol/µl primer 2	1µl
25mM/l dNTP	0,5µl
25U/µl <i>Pfu</i> Ultra DNA	0,3µl

Fremgangsmåte:

1. 25µl PCR blanding til hver PCR prøve. Tilsatte 50ng plasmid DNA (pGEX-human TSA_d SH2). Negativ kontroll var prøve uten enzym. Resultatet ble undersøkt på en 1 % agarose gel.
2. Etter PCR reaksjonen ble prøvene restriksjonsfordøyd av DpnI (beskrevet under 4.1.2.)
3. Prøvene ble deretter transformert inn i X11 Blue (beskrevet under 4.1.3).
4. Test-PCR av kolonier ble utført som beskrevet under 4.1.4.
5. Deretter ble ON-kultur av positive kolonier, minipreparasjon, konsentrasjonsbestemmelse og sekvensering utført.

4.2 Metoder i protein biokjemi

4.2.1 Analytiske protein metoder

SDS-PAGE

SDS-polyakrylamidgelelektroforese (SDS-PAGE) benyttes for å separere proteiner etter størrelse. SDS er en anionisk detergent som bindes til hydrofobe deler av proteiner. Det gjør at proteinene strekkes ut, blir stavformete og får ens ladning. De fleste proteiner binder ca 1.4g SDS per gram protein, dvs. ca ett SDS molekyl for hver andre aminosyre [50].

SDS: $[\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{SO}_3^-]\text{Na}^+$

Siden SDS er negativt ladet vil det delvis skjule proteinets egen ladning slik at SDS-behandlede proteiner har tendens til identisk ladning i forhold til andre proteiner med lik masse. Konsekvensen er at ved elektroforese av proteiner i en SDS inneholdende polyakrylamidgel, vil gelen separere proteiner etter størrelse.

SDS-PAGE utføres i et diskontinuerlig buffersystem med en todelt gel. Den øverste delen er en konsentrerende gel med 4 % akrylamid og omtrent nøytral pH (pH=6.8). Den nederste delen er den separerende delen med 7.5-18 % akrylamid etter størrelse på proteinene man skal separere. pH på den separerende gel er 8.8. I denne oppgaven ble det brukt separerende geler på 10-12%. Gelene ble laget som beskrevet [50].

Prøvene som ble kjørt med SDS-PAGE ble først kokt i en prøvebuffer som inneholder SDS, β -merkaptoetanol, glyserol og bromfenolblått. β -merkaptoetanol bryter disulfide bindinger, glyserol gjør at proteinprøvene får en tetthet som er ideell når prøvene skal pipetteres i brønnene på gelen og bromfenolblått synliggjør vandringen til proteinene.

Farge SDS-PAGE med Comassie Brilliant Blue

Comassie Brilliant Blue (CBB) farging er en sensitiv metode for deteksjon av proteiner i SDS-PAGE, man kan detektere ned til 0.1µg protein i et bånd [50]. Syre-metanol løsningen i CBB virker som en denaturerende agent slik at proteinene blir fiksert i gelen og hindrer derfor at proteinene blir vasket ut av gelen under fargingen.

Fremgangsmåte:

1. Gelene ble farget i ca 1-2 timer under vipping ved romtemperatur.
2. Fargeløsningen ble fjernet og avfarget i en avfargingsløsning (se punkt 3.5.2) til bakgrunnsfargen forsvinner, og proteinbånd kommer tilsyne.

Western blotting

Western blotting brukes til å identifisere og kvantifisere spesifikke proteiner i komplekse proteinløsninger [51]. Proteiner detekteres ved hjelp av antistoff. Epitopene som antistoffet gjenkjenner er enten konformasjons- eller sekvens-avhengig. Prøvene som skal undersøkes separeres i SDS-PAGE og overføres til en membran (PVDF ble benyttet i denne oppgaven). Proteiner blir denaturert i SDS-PAGE og kun sekvensepitoper kan gjenkjennes av antistoff.

Fremgangsmåte:

1. Prøvene ble separert på SDS-PAGE.
2. PVDF-membranen ble forberedt ved å legge den i metanol under risting i ca 20 sekunder. Membranen ble deretter lagt i overføringsbuffer (se under punkt 3.5.2) i minimum 10 minutter.
3. Overføring fra gel til membran ble gjort ved semi-tørr elektroblotting. En kromatografipapir-membran-gel-kromatografipapir stabel ble lagd. Kromatografipapiret ble mettet med overføringsbuffer. Eventuelle luftbobler ble fjernet og deretter ble strømmen satt på (65mA/gel i 1t, gelene var ~50cm² store).

4. Før probingen, ble membranen blokket med 3 % BSA eller 3 % melk i TBST (se under punkt 3.5.2). Lot stå under vipping fra en time (ved romtemperatur) til ON (ved 4°C).
5. Blokkeringsløsning ble fjernet og primært antistoff (1:3000 i 3 % BSA eller 3 % melk i TBST) ble tilsatt. Lot stå under vipping fra ca 1 time (ved romtemperatur) til ON (ved 4°C).
6. Membranen ble vasket 3x10min i TBST.
7. Sekundært antistoff (1:3000 i 3 % BSA eller 3 % melk i TBST) ble tilsatt. Lot stå under vipping i ca 1 time. Det sekundære antistoffet er enzymkonjugert.
8. Membranen ble vasket 3x10 minutter i TBST.
9. Signalene ble fremkalt ved at man tilsatte en framkallingsløsning (SuperSignal®WestPico Chemiluminescent Substrate) til membranen i 5 minutter, overførte til en lystett mappe, la en film over membranen i mørkerom og fremkalte i en fremkallermaskin. Hvor sterke signaler en får er avhengig av mengde protein detektert med antistoff og hvor lenge man eksponerer filmen for blottet (fra 1 sekund til 1 time).

Massespektrometri

Massespektrometri (MS) er mye benyttet for å identifisere proteiner i løsning etter separering på SDS-PAGE. I denne oppgaven ble MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) benyttet for å identifisere proteiner detektert ved CBB fargete SDS-PAGE fra pulldown-forsøk. I MALDI-TOF blir massen av peptider som er fordøyd med trypsin bestemt [52]. Massen av et sett peptider blir målt, det gir et "fingeravtrykk" som er spesifikt for et gitt protein. Av utvalgte peptider ble det utført MS/MS. I MS/MS blir massen til et spesifikt peptid bestemt for så å bli isolert fra peptid-blandingen (i MS). Prøven blir utsatt for gassmolekyler som vil dele peptidet langs peptid-ryggraden. Det gir peptider med forskjellige lengder der fragmentene er forskjellig fra hverandre med én aminosyre hver.

Det er veldig viktig at man behandler gelen så sterilt som mulig, dette for å hindre kontaminasjon av gelen (for eksempel kreatin fra huden).

Fremgangsmåte:

1. Etter at spesifikke proteiner ble identifisert ved pulldown-forsøk, ble lysat fra pulldown-forsøket separert på SDS-PAGE og detektert med CBB (se 4.2.1).
2. De spesifikke proteinbåndene ble så kuttet ut og oppbevart i et sterilt eppendorfrør.
3. Prøvene ble sendt til PROBE, for trypsin behandling og utførelse av MS og MS/MS av utvalgte topper.

Se www.probe.uib.no for mer informasjon.

4.2.2 Protein preparasjon

In vitro syntese av proteiner

pGEX-6P-1 vektoren som benyttes til proteinekspresjon har en bakteriofag T7 promotor. BL21 bakteriestammen som benyttes uttrykker T7. Ved å tilsette IPTG til bakteriekulturen vil T7 bli uttrykt og promotoren blir skrudd på (Stratagene).

Her ble human GST-TSAd SH2 wt og mutanter uttrykt for bruk i pulldown-forsøk. Mus og rotte GST-TSAd SH2 ble også uttrykt for å sammenligne ekspresjonsnivå og løseligheten i forhold til human GST-TSAd SH2.

Fremgangsmåte:

1. 10mL ON-kultur ble satt av ønsket transformert BL21 koloni i LB medium med 50µg/ml amp.
2. 5mL ON-kultur til 500mL LB medium med 50µg/ml amp ble tilsatt. Satt på risting ved 37 °C til optisk tetthet (OD) var 0,6 når $\lambda=600$.
3. IPTG (0,2mM sluttkonsentrasjon) ble tilsatt. Satt på risting ved romtemperatur i ca 3 timer.

4. Prøvene ble sentrifugert ved 6000xg ved 4 °C i 15 minutter.
5. Supernatant ble kastet og bakteriepellet ble lysert.

Lysering av BL21 med rekombinant protein

I denne oppgaven ble lysering ved sonikering eller ved frysing benyttet. I begge tilfellene ble det benyttet samme lyseringsbuffer. *E. coli* er en gram negativ bakterie som vil si at den er omsluttet av et ytre lipopolysakkarid membran, et peptidoglykan lag og en plasmamembran (ytterst til innerst) [50]. Lipopolysakkarid membranen og peptidoglykan laget brytes ved hjelp av lysozym og en ikke-ionisk detergent. Lav temperatur og proteasehemmere (PH) i bufferen hindrer proteolytiske enzymer å degradere proteinene. Ved sonikering sendes høyfrekvente lydbølger ut i løsningen som vil ødelegge cellemembranene. Det utvikles varme under sonikering, prøvene må derfor ikke sonikeres lenge av gangen, eller sonikeringen utføres på is.

Fremgangsmåte: (ved sonikering)

1. Prøvene ble holdt på is under hele prosedyren.
2. Pelletene fra punkt 4 under forrige metode ble løst i 20mL lyseringsbuffer (se 1.13.6).
3. Prøvene ble overført til et lite glassbeger og ble sonikert ved 50μA i ca 3 minutter.
4. Prøvene ble overført til 50mL plastrør og satt på vipping ved 4 °C i ca 5 timer.
5. Prøvene ble spunnet ned ved 9000xg ved 4 °C i 15 minutter
6. Lysatet ble overført til eget 50mL plastrør og pelleten ble løst opp i 20mL PBS.
7. Lysat og pellet ble undersøkt på 10 % SDS-PAGE.
8. Prøvene ble frosset ned ved -20 °C eller ble bundet opp på glutation-sepharosekuler med en gang.

Fremgangsmåte: (ved frysing)

1. Prøvene ble holdt på is under hele prosedyren.
2. Pelleten fra punkt 4 under forrige metode (*in vitro* syntese av proteiner) ble løst i 10mL PBS med 25mg Lysozym. Frøs ned ved -80 °C ON.
3. Prøvene ble tint og tilsatt 10mL lyseringsbuffer (se 1.13.6).
4. Prøvene ble satt på vippe ved 4 °C til lysatet var klart og ikke seigt (1-3 timer).
5. Prøvene ble spunnet ned ved 9000xg ved 4 °C i 15 minutter
6. Lysatet ble overført til eget 50mL plastrør og pelleten ble løst opp i 20mL PBS.
7. Lysat og pellet ble undersøkt på 10 % SDS-PAGE.
8. Prøvene ble frosset ned ved -20 °C eller ble bundet opp på glutationsepharosekuler med en gang.

Rense rekombinante proteiner med GST-merke

Vektoren som ble benyttet i proteinekspresjon er pGEX-6P-1, denne inneholder en sekvens som koder for glutation-s-transferase (GST). Proteinet som uttrykkes vha denne vektoren vil da være i fusjon med GST. Ved å benytte glutationsepharose-4B-kuler kan fusjonsproteinet enkelt bli rensset fra lysatet.

Fremgangsmåte:

1. GST-TSAd konstrukter fra 10mL lysat ble bundet opp på 1ml glutationsepharosekuler. Utførelse etter beskrivelse fra produsent.
2. Oppbindingen ble undersøkt på 10 % SDS-PAGE og CBB farget.

Eluere rekombinante proteiner fra glutationsepharosekuler

Fusjonsproteinet kan elueres fra glutationsepharosekulene ved hjelp av reduserende glutation som vil konkurrere ut bindingen av GST til glutationsepharosekulene.

Fremgangsmåte:

1. Protein fra 50 μ l glutation-sepharosekuler ble eluert i 50 μ l elueringsbuffer (se 3.5.3) etter beskrivelse fra produsent.
2. Eluerte tre ganger fra de samme kulene, for hver eluering ble det målt optisk tetthet (OD) i et massespektrofotometer, ved λ_{280} . μ M human GST-TSAd SH2 ble beregnet utifra formelen $A_{280}=\epsilon \cdot C \cdot l$.

4.3 Metoder i cellebiologi

4.3.1 Transfeksjon av 293T celler med plasmid DNA

Det finnes flere metoder for å introdusere gener i eukaryote celler [49]. Teknikkene faller inn under tre grupper: Biokjemiske metoder, fysiske metoder og ved hjelp av virus. Her ble transfeksjon ved hjelp av lipider benyttet. Det er en metode som passer for adherente celler, primære cellelinjer og for celler i løsning. Kationiske lipider blir benyttet for å danne et liposom rundt DNA som skal transfekteres. Disse liposomene vil så adherere til og fusjonere med den negativt ladete cellemembranen.

Transfektanter ble i denne oppgaven lagd for bruk i pulldown med human GST-TSAd SH2, wt og mutanter. Dette for å eventuelt detektere interaksjon mellom human GST-TSAd SH2 og Lck og GST-TSAd SH2 og TSAd.

Transfeksjonene som ble gjort var: **1.** 4µg tom vektor (pEF-HA), **2.** 2µg tom vektor og 2µg Lck (pEF-Lck), **3.** 2µg tom vektor og 2µg TSAd-HA (pEF-TSAd-HA) og **4.** 2µg Lck og 2µg TSAd-HA.

Fremgangsmåte:

1. 293T celler ble dyrket i vekstmedium (avsnitt 3.5) til en tetthet på 1×10^6 /mL medie i celleskap med 5 % CO₂. Cellene ble løsnet fra celle-dyrkingsflasken ved hjelp av 1 % trypsin i PBS pH 7.4, telt i celleteller, spunnet ned, løst opp i dyrkingsmedie (avsnitt 3.4.2) før utsåing på sterile celle-skåler.
2. $4-6 \times 10^6$ 293T celler ble transfektert med plasmid DNA etter anvisning fra produsent av lipofectin (Invitrogen).

4.3.2 GST-pulldown

GST-fusjonsprotein pulldown er en mye benyttet metode for å identifisere nye interaksjoner mellom et fusjonsprotein og et ukjent protein [11;53;54]. Fordelen med GST-pulldown i forhold til andre metoder for å finne nye ligander, er at det er mulig å rense proteiner fra et lysat i ett trinn og da kan selv svake interaksjoner detekteres [49]. Metoden krever ikke store mengder av den nye liganden i lysatet. Men man kan ikke være sikker på at det man binder under en pulldown binder direkte til fusjonsproteinet eller om det er et proteinkompleks man har dratt ned.

Lysatene som har blitt benyttet i denne oppgaven er lysater fra pervanadat (PV) stimulerte Jurkat E6.1 celler, SDF-1 stimulerte Jurkat E6.1 celler eller lysat fra transfekterte 293T celler. PV er en tyrosinfosfatasehemmer og alle fosforylerte proteiner vil da beholdes fosforylerte. SDF-1/CXCL12 er et kjemokin som virker på naive T-celler og progenitor B-celler. Den bindes til CXCR4 på celleoverflaten og virkningen av SDF-1 er blant annet B-celleutvikling og lymfocyttmigrering [51].

Et pulldown-forsøk består i hovedsak av fire trinn:

1. Transfeksjon eller stimulering av celler.
2. Preabsorbering
3. Pulldown
4. Western blotting

Transfeksjon er beskrevet under 4.3.1.

Stimuleringer:

Jurkat E6.1 ble dyrket i vekstmedium (avsnitt 3.5) til en tetthet på 2×10^5 til 1×10^6 celler/mL medie i celleskap med 5% CO₂. Før stimulering ble cellene telt i en celleteller og spunnet ned.

PV-stimulering: 30×10^6 Jurkat E6.1 celler ble løst i 150µl PBS, stimulert med 150µl 2xPV løsning (100xPV: 1µl 30 % H₂O₂ og 30µl 100mM Na₃VO₄) i 5 minutter og lysert i 300µl 2xlysisbuffer (se 3.5.1).

SDF-1 stimulering: 20×10^6 Jurkat E6.1 celler ble løst i 200µl PBS, stimulert med 0,02µg SDF-1 i 0 og 5 minutter. De SDF-1 stimulerende cellene ble lysert i 200µl 2x lysisbuffer.

Preabsorbering:

Lysat fra transfekterte 293T celler eller stimulerende Jurkat E6.1 celler ble overført til 50µl GST-glutation-sepharosekuler (50:50 med glutation-4B-sepharosekuler), satt på forsiktig rotering ved 4 °C i 45 minutter. Prøvene ble deretter sentrifugert (380xg, 4 °C, i 5 min) og lysatene ble overført til neste preabsorbering. Det var i alt 3 preabsorberinger.

Pulldown:

Etter sentrifugering (380xg, 4 °C, i 5 min) ble lysatene overført til egne eppendorfrør med 20µl GST-TSAd SH2 på glutation-sepharosekuler eller 80µl GST- TSAd SH2 R120A/L på glutation-sepharosekuler. Prøvene ble satt på vipping ved 4 °C i 1 time, og deretter sentrifugert ved 380xg, 4 °C, i 5 min.

Western blotting:

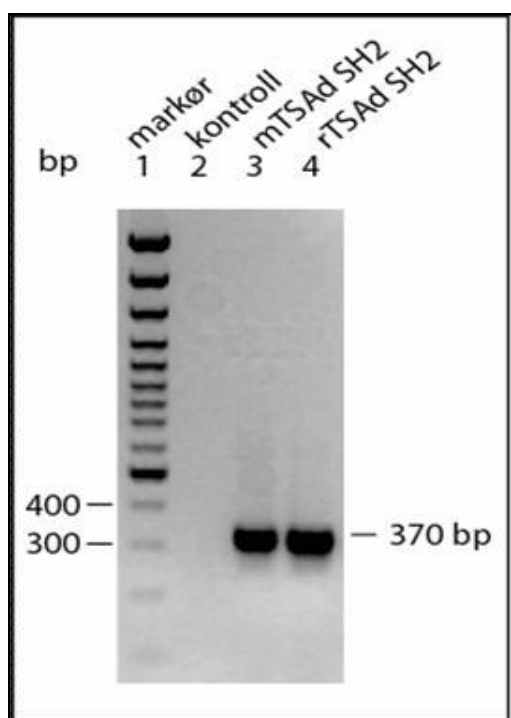
Prøvene ble separert på en 10 % SDS-PAGE og Western blotting ble utført som beskrevet under 4.2.1.

5. Resultater

5.1 Kloning av mus og rotte TSAd SH2

Nukleotidsekvensene på 370bp for mus og rotte TSAd SH2 ble klonet inn i pGEX-6P-1 vektor, beskrevet under 4.1. Vi ønsket å sammenligne uttrykk av mus og rotte GST-TSAd SH2 med human GST-TSAd SH2 i bakterier. Sekvensene ble klonet ved hjelp av PCR, restriksjonsfordøyd og ligert, som beskrevet i kapittel 4.1. PCR produkt er vist i figur 5.1.1.

PCR produkt

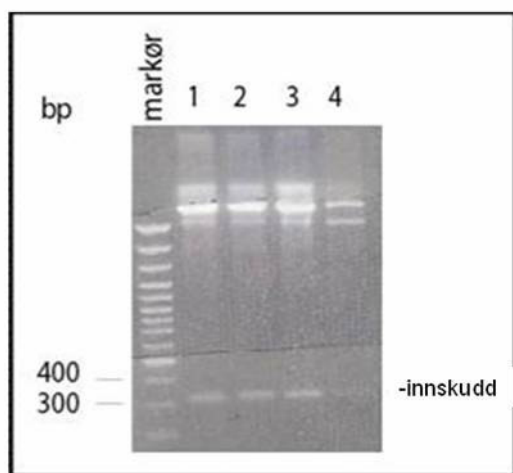


Figur 5.1.1. PCR av mus og rotte TSAd SH2 sekvensene. (5µl DNA prøve/spor) Spor 1 viser en 100bp markør, spor 2 er kontroll som inneholdt alt unntatt plasmid, spor 3 og 4 viser PCR produkt av forventet størrelse av mus og rotte TSAd SH2 sekvensen

Test restriksjonsfordøying

Etter ligering av restriksjonsfordøyd PCR produkt og pGEX-6P-1 vektor ble ligatene transformert inn i X11 Blue bakterier. Minipreparasjon ble utført etter ON-kultur av to kolonier fra mus TSAAd SH2 og to kolonier fra rotte TSAAd SH2. Minipreparasjonene ble restriksjonsfordøyd med BamHI og NotI for å sjekke om vektoren inneholdt innskudd for mus og rotte TSAAd SH2 (beskrevet under 4.1.2).

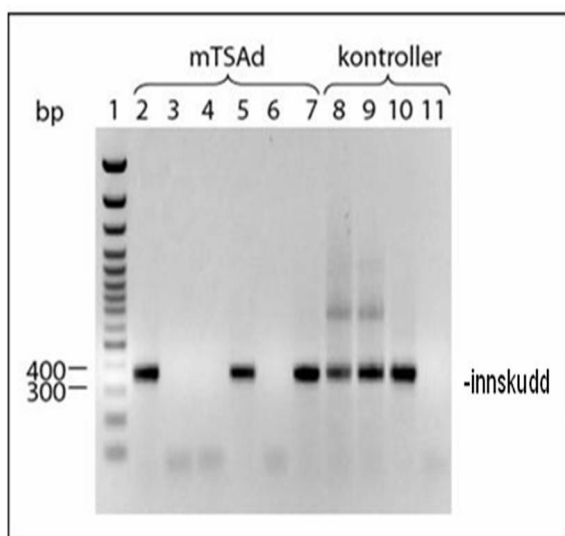
Restriksjonsfordøyingen viste at vektorene var positiv for innskudd (figur 5.1.2).



Figur 5.1.2. Test-restriksjonsfordøying av mus og rotte TSAAd SH2 sekvens i pGEX-6P-1 vektor. (5 μ l DNA prøve/spor) Første sporet viser 100bp markør, spor 1 og 2 viser restriksjonsfordøyd rotte TSAAd SH2 i pGEX-6P-1 vektor, spor 3 og 4 viser restriksjonsfordøyd mus TSAAd SH2 i pGEX-6P-1 vektor. Minipreparasjon 1-3 inneholdt vektor med innskudd

Test-PCR

Sekvensering av mus og rotte TSAAd SH2 i pGEX-6P-1 vektor viste at det var to rotte TSAAd SH2 prøver, ikke en av hver. Utførte PCR, restriksjonsfordøying, ligering og transformering på nytt for mus TSAAd SH2. I stedet for å sjekke vektor med rett innskudd ved restriksjonsfordøying, ble test-PCR utført direkte på bakterie kolonier. Kolonier ble sjekket for vektor med innskudd direkte med PCR. Primer som hybridiserte med innskuddet og en som hybridiserte med GST sekvensen ble benyttet, beskrevet under 4.1.4. Det ble påvist 3 kolonier som inneholdt vektor med mus GST-TSAAd SH2 innskudd (figur 5.1.3).



Figur 5.1.3. Test-PCR av mus TSAd SH2 kolonier. (5 μ l DNA prøve/spor) Spor 1 viser en 100bp markør, spor 2-7 viser PCR av seks kolonier fra mus TSAd SH2. Spor 2, 3 og 7 viser at koloniene inneholder plasmid med mus TSAd SH2 innskudd. Spor 8-9 viser tre positive og en negativ kontroll. Spor 8 og 9 er ligater av mus TSAd SH2, spor 10 viser rotte TSAd SH2 i pGEX-6P-1 vektor og spor 11 mangler plasmid.

Sekvensering

Minipreparasjon fra mus og rotte TSAd SH2 i pGEX-6P-1 vektor ble sendt til sekvensering. Først ble det bestemt konsentrasjonen av minipreparasjonene (metode beskrevet under 4.1.1). Sekvenseringen ble utført av Medigenomix og GATC. Sekvensene er vist i appendiks 1. Det ble utført BLAST (blastn) søk av sekvenseringsresultatet (figur 5.1.4). Resultatene fra sekvenseringen viste at mus GST-TSAd SH2 sekvensen var korrekt (figur 5.1.4), men sekvensen for rotte GST-TSAd SH2 (figur 5.1.4) viste en mutasjon, markert med gult i figuren, fra nukleotid C til T. Aminosyresekvensen ble sjekket og det viste seg å være en stille mutasjon. Det vil si at det nye (muterte) kodonet koder for samme aminosyre som utgangskodonet.

```

❑ gi|2145126|gb|U69490.1|MMU69490 U E G Mus musculus p56lck-associated adapter
protein Lad mRNA, complete
cds
Length=1485

Score = 537 bits (271), Expect = 2e-149
Identities = 271/271 (100%), Gaps = 0/271 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query  49  CTTTCATCACCAGAAGGGAAGCCGAGAGGCTGCTGCAGCCCCAGCCTCTAGGATGCTATCT  108
      |||
Sbjct  386  CTTTCATCACCAGAAGGGAAGCCGAGAGGCTGCTGCAGCCCCAGCCTCTAGGATGCTATCT  445

Query  109  GGTGCGCTTCAGCGAGAGTGCTGTGACCTTCGTGCTGTCTACAGGAGCCAGACCTGCTG  168
      |||
Sbjct  446  GGTGCGCTTCAGCGAGAGTGCTGTGACCTTCGTGCTGTCTACAGGAGCCAGACCTGCTG  505

Query  169  CCGTCACTTCTCCTCGCGCAGCTAGGGGATGGGCGCCACGTGGTGTAGGTGAAGACAG  228
      |||
Sbjct  506  CCGTCACTTCTCCTCGCGCAGCTAGGGGATGGGCGCCACGTGGTGTAGGTGAAGACAG  565

Query  229  TGCCCATGCGCAGCTTCAGGACCTGCTTGAACATTACAGAGTGCCCCCTCAGCCCCTA  288
      |||
Sbjct  566  TGCCCATGCGCAGCTTCAGGACCTGCTTGAACATTACAGAGTGCCCCCTCAGCCCCTA  625

Query  289  CGGAGAGATACTACCCCAACCCCTCGCTCGA  319
      |||
Sbjct  626  CGGAGAGATACTACCCCAACCCCTCGCTCGA  656

```

Figur 5.1.4. Blast søk av sekvensering av mus TSAd SH2 i pGEX-6P-1 vektor.
'Query' sekvensen er 100 % identisk med 'Sbjct' sekvensen, mus TSAd SH2 (LAD).

```

> ❑ gi|56972319|gb|BC088087.1 G Rattus norvegicus SH2 domain protein 2A, mRNA
(cDNA clone MGC:108514
IMAGE:7379832), complete cds
Length=1587

Score = 575 bits (290), Expect = 6e-161
Identities = 293/294 (99%), Gaps = 0/294 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query  51  GACTGCCCCGCTTTGGTTCCATTGGCTTCATTACCAGAAGGGAAGCTGAGAGGCTACTGCA  110
      |||
Sbjct  363  GACTGCCCCGCTTTGGTTCCATTGGCTTCATTACCAGAAGGGAAGCTGAGAGGCTACTGCA  422

Query  111  GTCCCAACCTCTAGGATGCTATCTGGTGCGCTTCAGCGAGAGCGCTGTGACCTTCGTGCT  170
      |||
Sbjct  423  GTCCCAACCTCTAGGATGCTATCTGGTGCGCTTCAGCGAGAGCGCTGTGACCTTCGTGCT  482

Query  171  GTCTTACAGGAGCCGAACCTGCTGCCGTCCTCCTCCTTGCTCAGCTAGGGGATGGGCG  230
      |||
Sbjct  483  GTCTTACAGGAGCCGAACCTGCTGCCGTCCTCCTCCTTGCTCAGCTAGGGGATGGGCG  542

Query  231  CCACGTGGTGCTGGGTGAAGACAGTGCCCACTCGCAGCTTCAGGACCTGCTTCAACACTA  290
      |||
Sbjct  543  CCACGTGGTGCTGGGTGAAGACAGTGCCCACTCGCAGCTTCAGGACCTGCTTCAACACTA  602

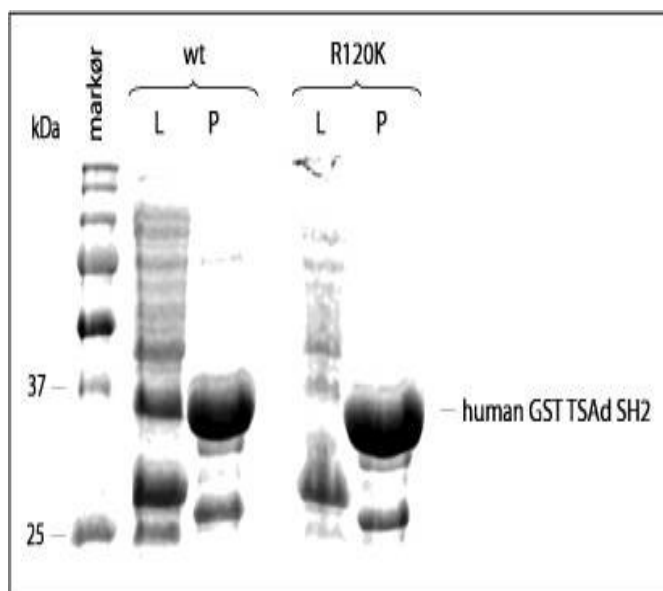
Query  291  CACAGAGTGCCCCCTCAGCCCCTACGGGGAGATGCTCACCCCAACCCCTCGCTCG  344
      |||
Sbjct  603  CACAGAGTGCCCCCTCAGCCCCTACGGGGAGATGCTCACCCCAACCCCTCGCTCG  656

```

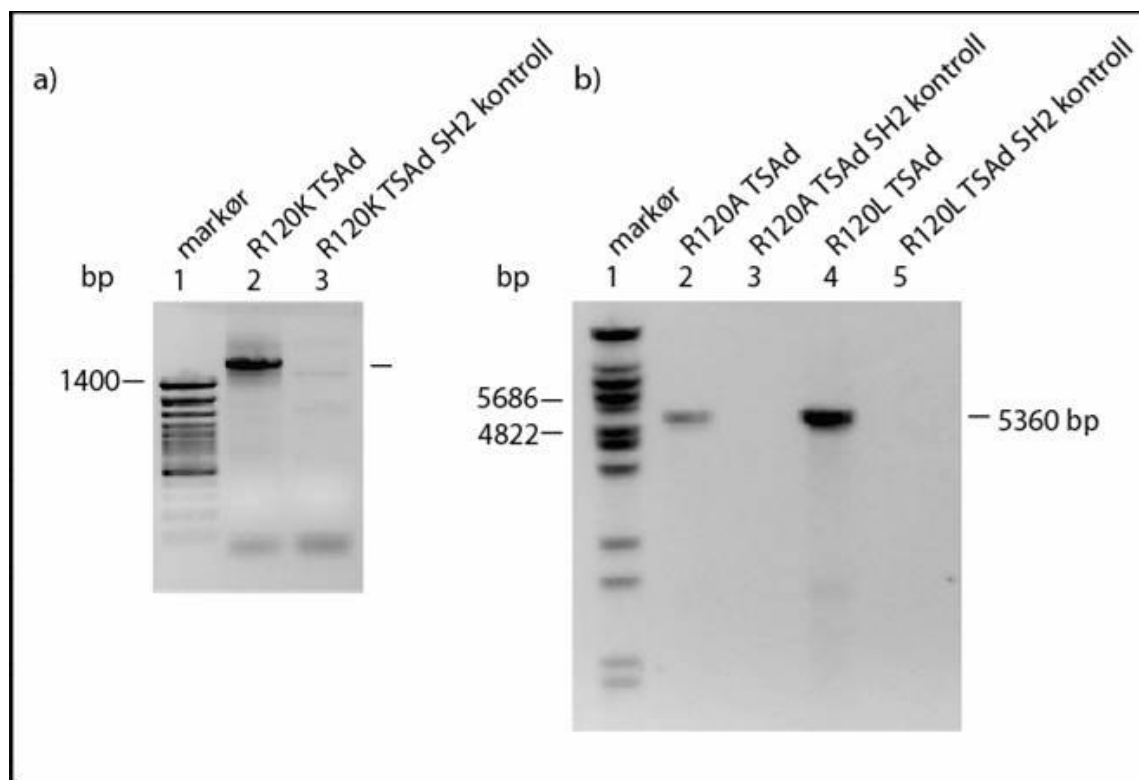
Figur 5.1.5. Blast søk av sekvensering av rotte TSAd SH2 i pGEX-6P-1 vektor.
'Query' sekvensen er 99 % identisk med 'Sbjct' sekvensen, rotte TSAd SH2.

5.2 Setespesifikk mutagenese av human TSAAd SH2

Mutanter av human GST-TSAd SH2, der den konserverte argininresiduen (R120) er byttet ut, ble konstruert for å ha kontroller til pulldown-forsøkene. Arginin (R) ble mutert til lysin (K), alanin (A) og leusin (L). R120K mutanten ble laget først, men den ga svært lite løselig protein etter uttrykking i bakterier. Nesten alt proteinet var i form av inklusjonslegemer (figur 5.2.1). R120A og R120L mutantene ble derfor konstruert. Metoden er beskrevet i avsnitt 4.1.5. PCR av pGEX-6P-1 vektor med human TSAAd SH2 sekvens med de forskjellige mutasjonsprimerne ga tydelig amplifikasjon av vektoren (figur 5.2.2).



Figur 5.2.1. Uttrykk av wt og R120K GST-TSAd SH2 lysat og pellet. (20µl prøve/spor)
Markøren er en Precision Plus Protein TM Dual Color Standard. L=lysate og P=pellet. Prøvene er applisert på en 10 % SDS-PAGE. Wt GST-TSAd SH2 er tatt med for å sammenligne uttrykket.

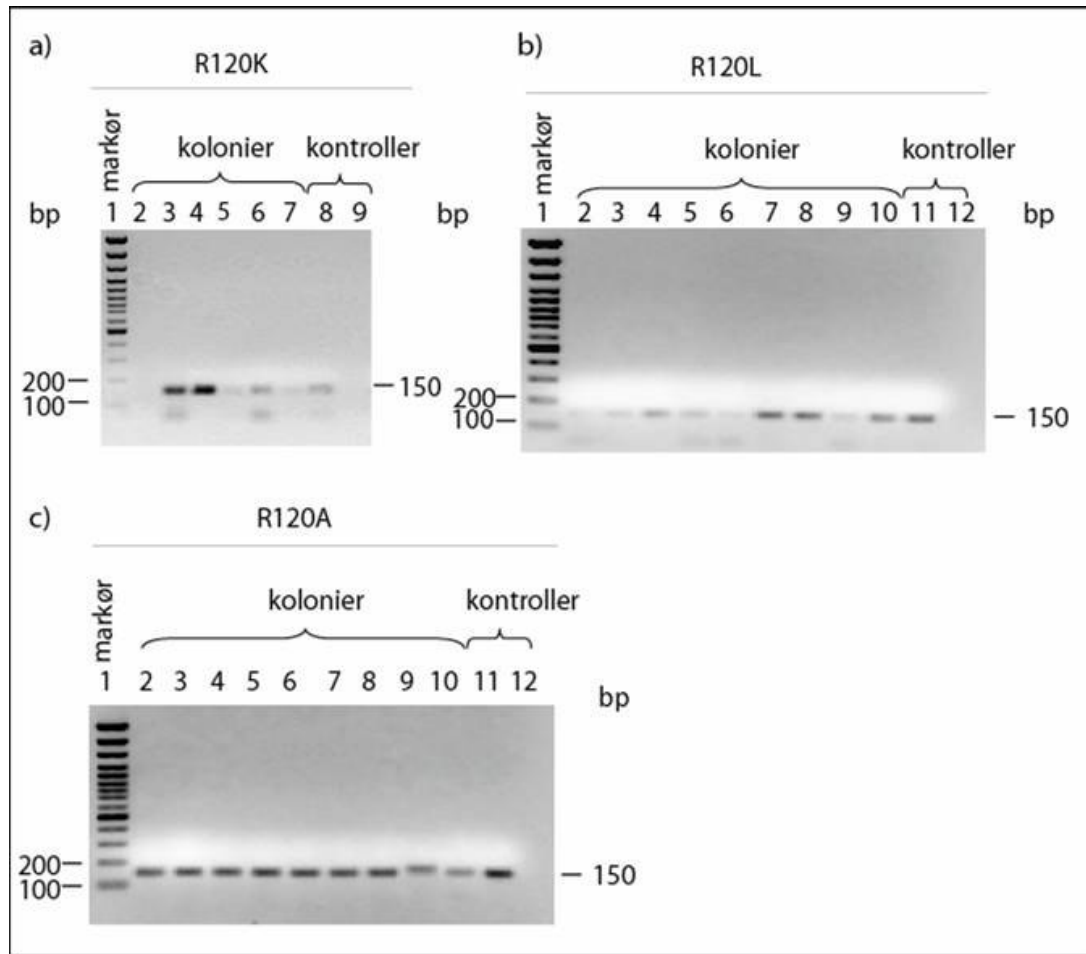


Figur 5.2.2. PCR produkt av setespesifikk mutagenese av R120K/A/L mutantene. (5 μ l DNA prøve/spor) a) Spor 1 i viser 100bp markør, spor 2 viser PCR produkt av R120K og spor 3 viser prøve uten enzym. PCR produktet er av forventet størrelse på 5360bp, b) Spor 1 viser λ DNA-BstE II digest markør, spor 2 og 4 viser PCR produkt av R120A og R120L mutantene med forventet størrelse på 5360bp. Spor 3 og 5 viser negative kontroller der prøvene var som 2 og 4, men manglet enzym.

I figur 5.2.2 a) ble det benyttet feil markør, markøren som skulle blitt benyttet er λ DNA-BstE II digest. Men man ser tydelig at det er et PCR produkt i spor 2.

Test-PCR

PCR produktene etter mutagenesen (R120K/A/L) ble restriksjonsfordøyd av DpnI for å fjerne utgangsplasmidet og deretter ble det transformert inn i X11 Blue. Kolonier ble testet for innskudd ved hjelp av PCR. Dette for å se om de inneholdt korrekt plasmid. Benyttet en primer som hybridiserte med innskuddet og en som hybridiserte med GST-sekvensen. Beskrevet under 4.1.4. Tre kolonier fra R120K- og alle koloniene fra R120A/L GST-TSAd SH2 inneholdt korrekt plasmid (figur 5.2.3).



Figur 5.2.3. Test-PCR av R120K-, R120A-, R120L- mutantene. (5µl DNA prøve/spor) Spor 1 under a), b) og c) viser λ DNA-BstE II digest markør. a) Test-PCR av R120K. Spor 2-7 viser PCR av kolonier, spor 3,4 og 6 er positive for innskudd. Spor 8 og 9 er kontroller, der spor 8 er umutert versjon av vektor og 9 inneholdt ikke vektor. b) Test-PCR av R120L. Spor 2-10 viser PCR av kolonier, alle er positive for innskudd. Spor 11 og 12 er kontroller, der spor 11 er umutert versjon av vektor og 12 inneholdt ikke vektor. c) Test-PCR av R120A. Spor 2-10 viser PCR av kolonier, alle er positive for innskudd. Spor 11 og 12 er kontroller, der spor 11 er umutert versjon av vektor og 12 inneholdt ikke vektor.

Sekvensering

Minipreparasjon av to positive prøver av hver mutant (R120A/L/K) ble sendt til sekvensering. Det ble først bestemt DNA konsentrasjonen til minipreparasjonene, beskrevet under 4.1.1. Sekvenseringen ble utført av Medigenomix. Sekvensene er vist i appendiks 1. Det ble utført BLAST (blastn) søk av sekvenseringsresultatet, som viste at korrekte nukleotider har blitt mutert (figur 5.2.4-5.2.6).

```

> gi|31543620|ref|NM\_003975.2| U E G Homo sapiens SH2 domain protein 2A (SH2D2A), mRNA
    Length=1651

Score = 567 bits (286), Expect = 2e-158
Identities = 292/294 (99%), Gaps = 0/294 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query  43  CGGGGCAGCCCTGCCTGGTTCCATGGCTTCATCACCCGGAGGGAGGCAGAGAGGCTGCT  102
      |||
Sbjct  369  CGGGGCAGCCCTGCCTGGTTCCATGGCTTCATCACCCGGAGGGAGGCAGAGAGGCTGCT  428

Query  103  GGAGCCCAAGCCTCAGGGGTGCTACTTGGTGGCGTTCAGCGAGAGCGCGGTGACCTTCGT  162
      |||
Sbjct  429  GGAGCCCAAGCCTCAGGGGTGCTACTTGGTGGCGTTCAGCGAGAGCGCGGTGACCTTCGT  488

Query  163  GCTGACTTACAGGAGCCGGACTTGCTGCCGCCACTTCTCTGCTGGCCAGCTCAGGGACGG  222
      |||
Sbjct  489  GCTGACTTACAGGAGCCGGACTTGCTGCCGCCACTTCTCTGCTGGCCAGCTCAGGGACGG  548

Query  223  GCGCCACGTGGTGCTGGGCGAGGACAGCGCCACGCGCGGCTGCAGGACCTGCTGTGCA  282
      |||
Sbjct  549  GCGCCACGTGGTGCTGGGCGAGGACAGCGCCACGCGCGGCTGCAGGACCTGCTGTGCA  608

Query  283  CTACACCGCGCACCCGCTCAGCCCCTACGGGGAGACGCTCACCGAGCCCCTCGC  336
      |||
Sbjct  609  CTACACCGCGCACCCGCTCAGCCCCTACGGGGAGACGCTCACCGAGCCCCTCGC  662

GCG=Alanin

```

Figur 5.2.4 BLAST søk av sekvenserings resultat av R120A TSA_d SH2. Mutasjonen er markert med gult. Viser at sekvensen er lik unntatt ved kodon CGG som har blitt mutert til GCG.

```

> gi|2897602|emb|AJ000553.1|HSTLADAPT U G Homo sapiens mRNA for T lymphocyte specific
adaptor protein (SH2D2A)
    Length=1592

Score = 575 bits (290), Expect = 6e-161
Identities = 293/294 (99%), Gaps = 0/294 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query  38  CGGGGCAGCCCTGCCTGGTTCCATGGCTTCATCACCCGGAGGGAGGCAGAGAGGCTGCT  97
      |||
Sbjct  353  CGGGGCAGCCCTGCCTGGTTCCATGGCTTCATCACCCGGAGGGAGGCAGAGAGGCTGCT  412

Query  98  GGAGCCCAAGCCTCAGGGGTGCTACTTGGTGCTGTTCAGCGAGAGCGCGGTGACCTTCGT  157
      |||
Sbjct  413  GGAGCCCAAGCCTCAGGGGTGCTACTTGGTGGCGTTCAGCGAGAGCGCGGTGACCTTCGT  472

Query  158  GCTGACTTACAGGAGCCGGACTTGCTGCCGCCACTTCTCTGCTGGCCAGCTCAGGGACGG  217
      |||
Sbjct  473  GCTGACTTACAGGAGCCGGACTTGCTGCCGCCACTTCTCTGCTGGCCAGCTCAGGGACGG  532

Query  218  GCGCCACGTGGTGCTGGGCGAGGACAGCGCCACGCGCGGCTGCAGGACCTGCTGTGCA  277
      |||
Sbjct  533  GCGCCACGTGGTGCTGGGCGAGGACAGCGCCACGCGCGGCTGCAGGACCTGCTGTGCA  592

Query  278  CTACACCGCGCACCCGCTCAGCCCCTACGGGGAGACGCTCACCGAGCCCCTCGC  331
      |||
Sbjct  593  CTACACCGCGCACCCGCTCAGCCCCTACGGGGAGACGCTCACCGAGCCCCTCGC  646

CTG=CUG=Leucin

```

Figur 5.2.5 BLAST søk av sekvenserings resultat av R120L TSA_d SH2. Mutasjonen er markert med gult. Viser at sekvensen er lik unntatt ved kodon CGG som har blitt mutert til CTG.

```

> gi|31543620|ref|NM\_003975.2| U E G Homo sapiens SH2 domain protein 2A
(SH2D2A), mRNA
Length=1651

Score = 567 bits (286), Expect = 2e-158
Identities = 292/294 (99%), Gaps = 0/294 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query  44  CGGGGCAGCCCCTGCCTGGTTCCATGGCTTCATCACCCGGAGGGAGGCAGAGAGGCTGCT  103
      |||
Sbjct  369  CGGGGCAGCCCCTGCCTGGTTCCATGGCTTCATCACCCGGAGGGAGGCAGAGAGGCTGCT  428

Query  104  GGAGCCCAAGCCTCAGGGGTGCTACTTGGTGAAGTTCAGCGAGAGCGCGGTGACCTTCGT  163
      |||
Sbjct  429  GGAGCCCAAGCCTCAGGGGTGCTACTTGGTGCGGTTCAGCGAGAGCGCGGTGACCTTCGT  488

Query  164  GCTGACTTACAGGAGCCGGACTTGCTGCCGCCACTTCCTGCTGGCCCAGCTCAGGGACGG  223
      |||
Sbjct  489  GCTGACTTACAGGAGCCGGACTTGCTGCCGCCACTTCCTGCTGGCCCAGCTCAGGGACGG  548

Query  224  GCGCCACGTGGTGCTGGGCGAGGACAGCGCCACGCGCGGCTGCAGGACCTGCTGCTGCA  283
      |||
Sbjct  549  GCGCCACGTGGTGCTGGGCGAGGACAGCGCCACGCGCGGCTGCAGGACCTGCTGCTGCA  608

Query  284  CTACACCGCGCACCCGCTCAGCCCCTACGGGGAGACGCTCACCGAGCCCCTCGC  337
      |||
Sbjct  609  CTACACCGCGCACCCGCTCAGCCCCTACGGGGAGACGCTCACCGAGCCCCTCGC  662

AAG=Lysin

```

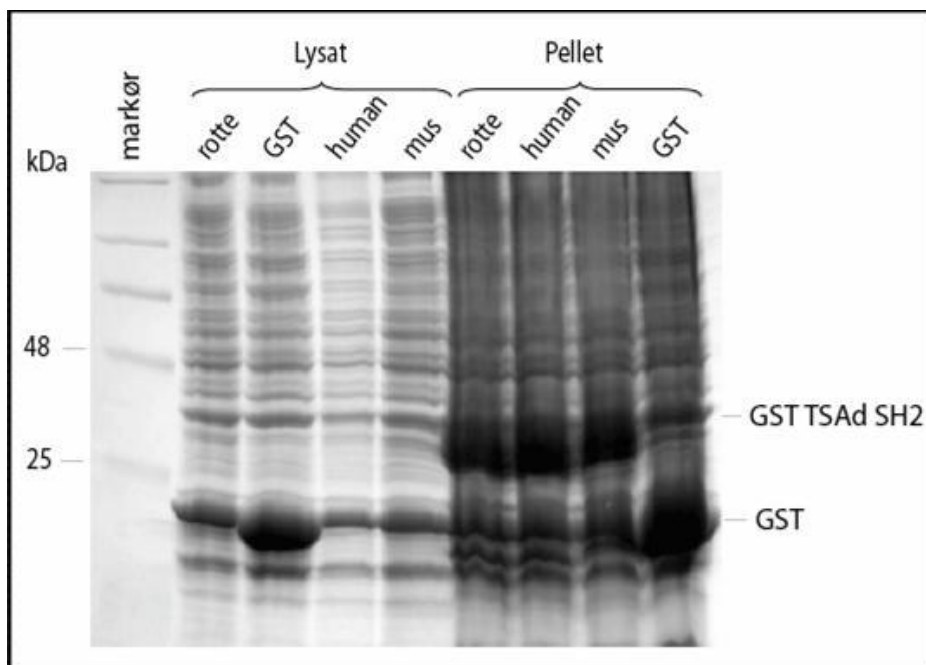
Figur 5.2.6 BLAST søk av sekvenserings resultat av R120K TSAd SH2. Mutasjonen er markert med gult. Viser at sekvensen er lik unntatt ved kodon CGG som har blitt mutert til AAG.

5.3 Ekspresjon av mus, rotte, human og mutert GST-TSAd SH2

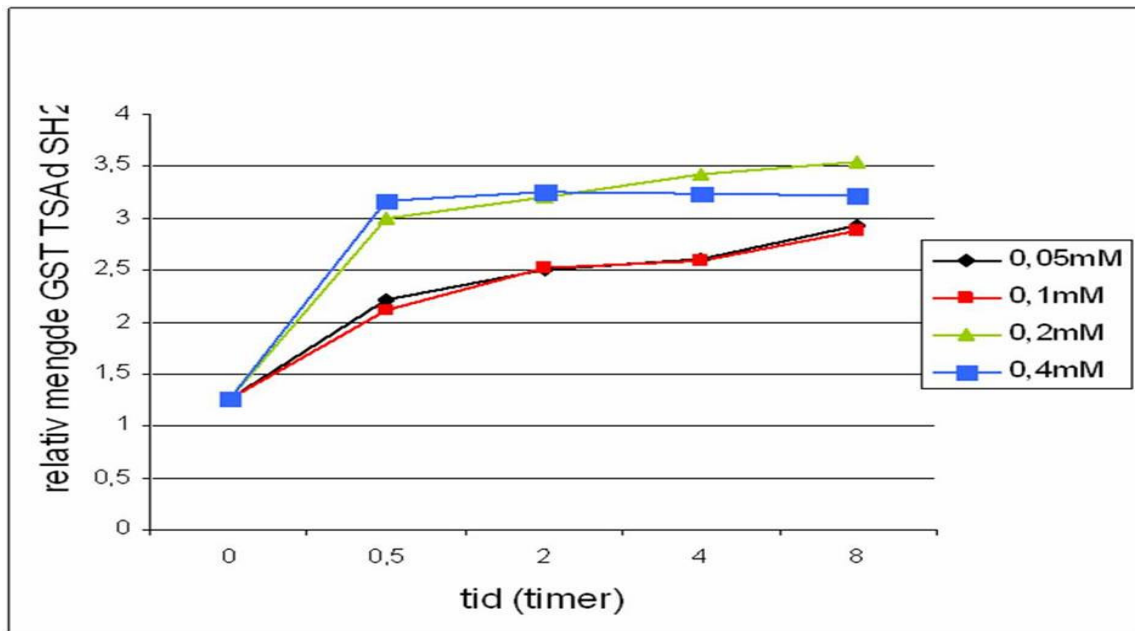
Optimalisering av proteinekspresjon

GST-TSAd SH2 ekspresjon gir lite protein i lysat og mest protein i form av inklusjonslegemer (pellet) (figur 5.3.1). Inklusjonslegemer er aggregater av proteiner som ofte dannes ved overuttrykk av rekombinante proteiner i bakterier. Vi ønsket å optimalisere proteinekspresjonen for å få best mulig utbytte av løselig protein. Dette er viktig for å kunne gjøre blant annet strukturbestemmelse ved hjelp av NMR. Ved å tilsette mindre IPTG vil kanskje mindre protein bli syntetisert samtidig og proteinene rekker å folde seg korrekt. Lavere temperatur kan kanskje også ha samme virkning ved at selve proteinsyntesen går tregere og proteinene får bedre tid til å folde seg riktig. Fem forskjellige konsentrasjoner av IPTG (0,4mM, 0,2mM, 0,1mM, 0,05mM og 0mM) ble satt opp. Til hver kultur ble det tatt ut prøver ved 0t, 0,5t, 2t, 4t og 8t. Proteinekspresjonen foregikk ved romtemperatur. Lysing ved frysing ble benyttet (se under 4.2.2) og prøvene ble kjørt på en 10 % SDS-PAGE. Gelene ble CBB farget

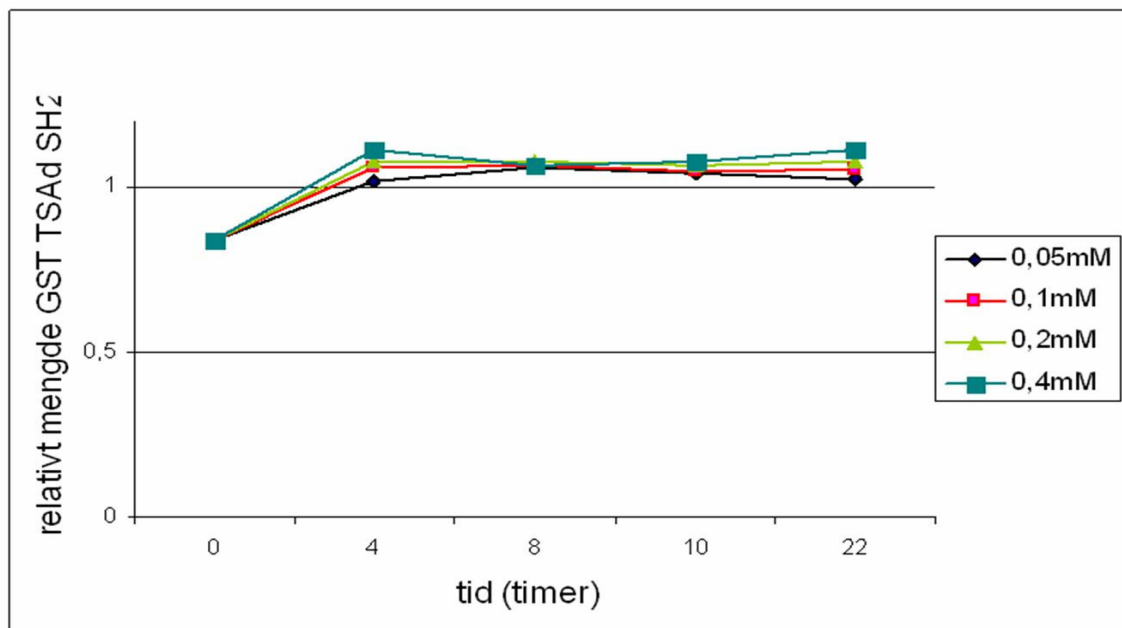
og intensiteten til hvert bånd ble målt ved hjelp av Kodak Image Station 2000R. Gelene er vist i appendiks 2, figur 2a. For å ta høyde for appliseringsforskjeller ble forholdet mellom TSA_d og et annet proteinbånd (referansebånd) i gelen som ikke påvirkes av IPTG beregnet (=relativ mengde). Alle kurvene for kinetikk ved forskjellige IPTG-konsentrasjoner (figur 5.3.2), unntatt den for 0,4mM IPTG, viste en fortsatt stigning etter 8 timer. Vi ønsket derfor å se hvor lenge denne stigningen fortsatte, og et nytt forsøk med IPTG-titrering med samme konsentrasjoner, men ved tidene; 0, 4, 8, 10 og 22 timer ble satt opp (gelene er vist i appendiks 2 figur 2b). Lavere IPTG-konsentrasjon ga ikke mer løselig protein ved lang ekspresjon (figur 5.3.3).



Figur 5.3.1. Uttrykk av human/mus/rotte GST-TSAd SH2. (20 μ l prøve/spor) Markøren er en Prestained Protein marker, Broad Range. Lysat og pellet fra proteinekspresjon er applisert på en 10 % SDS-PAGE. GST er tatt med for å sammenligne uttrykk av protein.



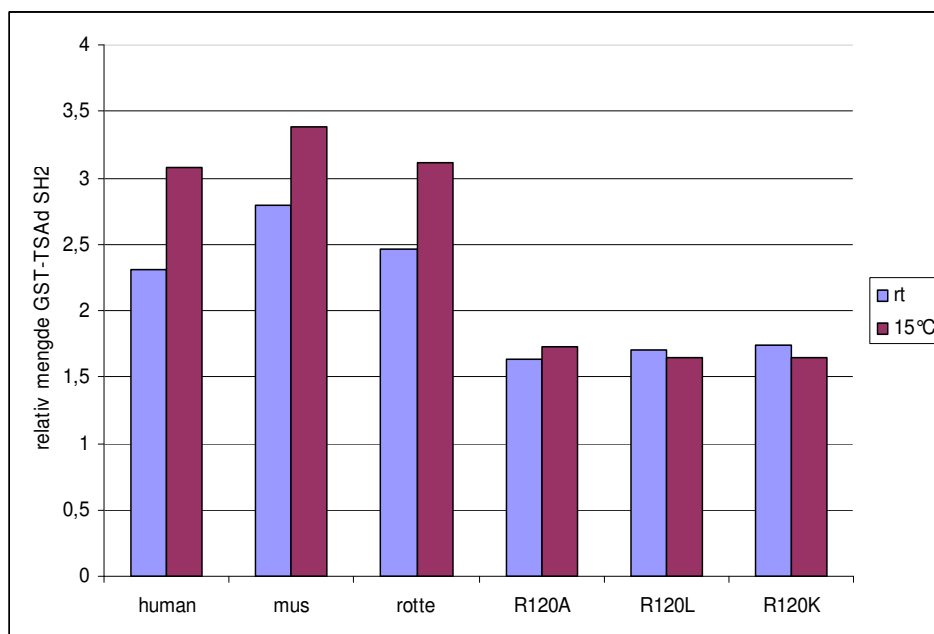
Figur 5.3.2. Kinetikk av human GST-TSAd SH2 ekspresjon, ved ulike mengder IPTG, opp til 8 timer. Relativ mengde av GST-TSAd SH2 ble beregnet i forhold til et konstant bånd (referanse bånd). Kurvene viser proteinekspresjon ved 0,4mM (blå), 0,2mM (grønn), 0,1mM (rød) og 0,05mM (svart) IPTG tilsatt.



Figur 5.3.3. Kinetikk av human GST-TSAd SH2 ekspresjon, ved ulike mengder IPTG, opp til 22 timer. Relativ mengde av GST-TSAd SH2 ble beregnet i forhold til et konstant bånd (referanse bånd). Kurvene viser proteinekspresjon ved 0,4mM (blå), 0,2mM (grønn), 0,1mM (rød) og 0,05mM (svart) IPTG tilsatt.

Uttrykk av human, mus, rotte og mutant GST-TSAd SH2

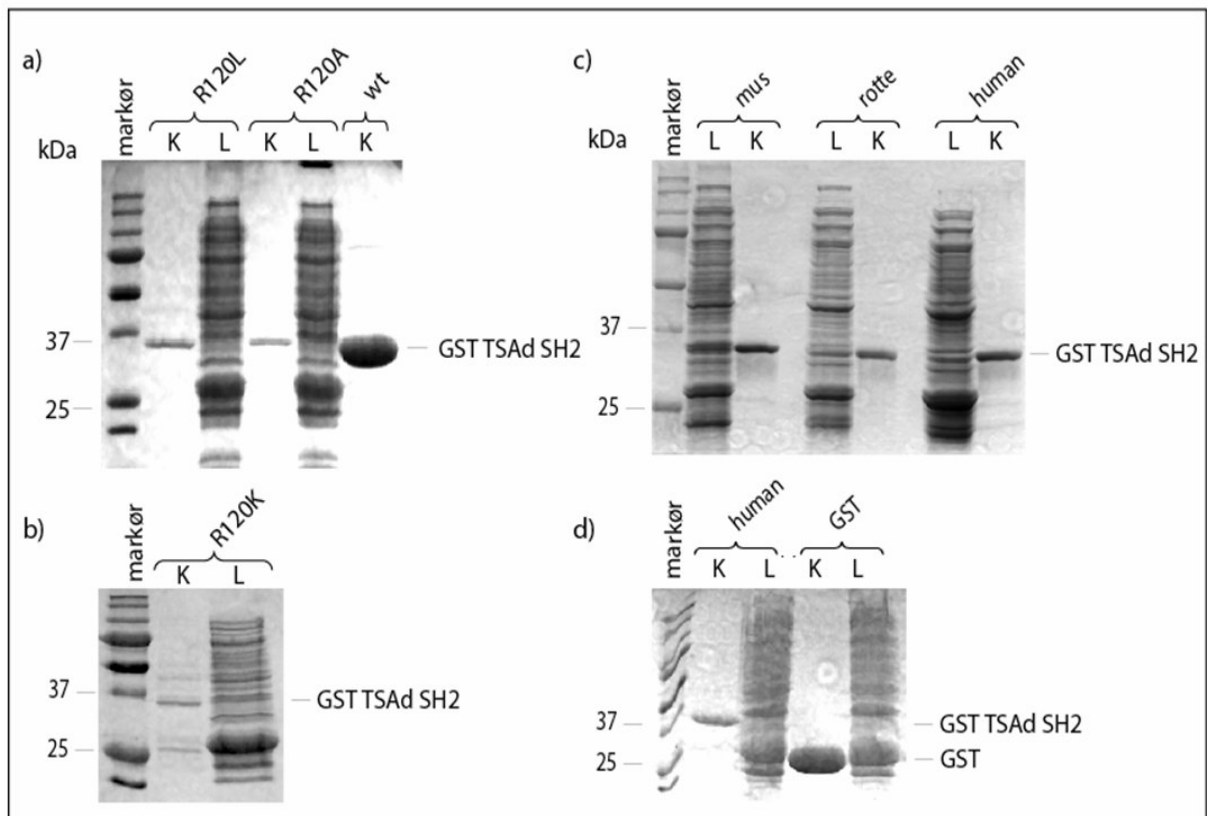
For å sammenligne uttrykk av human, mus og rotte GST-TSAd SH2 ekspresjon, ble de tre uttrykt i BL21 ved hjelp av 0,2mM IPTG. Av figur 5.3.3 kommer det fram at det er ingen eller liten endring av mengde løselig protein mellom 4 og 22 timer, uttrykte her i 22 timer. Vi ønsket samtidig å se om ekspresjon ved 15 °C gir et bedre utbytte av løselig protein. Tidligere uttrykk av mutantene (R120A/L/K GST-TSAd SH2) hadde gitt et veldig dårlig utbytte. De tre konstruktene ble tatt med i dette oppsettet, som beskrevet under 4.2.2. Gelene ble farget med CBB og båndintensiteten ble målt ved hjelp av Kodak Image Station 200R (se appendiks 2, figur 2c, for gelbilder). Relativ mengde GST-TSAd SH2 ble beregnet ved å ta forholdet mellom GST-TSAd og et referansebånd. Uttrykket av de forskjellige GST-TSAd SH2 konstruktene viste nokså lik mengde protein i lysat for rotte og human GST-TSAd SH2, mus GST-TSAd SH2 ga et noe bedre uttrykk (figur 5.3.4). De tre viste også at ekspresjon ved 15 °C ga mer protein i løsning. Mutert human GST-TSAd SH2 ble vesentlig dårligere uttrykt enn wt, det ga heller ikke mer protein i løsning ved ekspresjon ved 15 °C (figur 5.3.4).



Figur 5.3.4. Sammenligning av uttrykk av human, mus, rotte og mutant GST-TSAd SH2 ved romtemperatur og 15 °C. Relativ mengde av hvert GST-TSAd SH2 bånd ble beregnet. X-aksen viser de forskjellige GST-TSAd SH2 konstruktene og Y-aksen viser relativ mengde protein uttrykt ved 0,2mM IPTG i 22 timer.

Kobling av GST-TSAd på glutation-sepharosekuler

Humant GST-TSAd SH2 wt og mutanter ble renset fra lysat ved hjelp av glutation-sepharosekuler (beskrevet under 4.2.2) og ble videre benyttet til pulldown-forsøk. GST ble bundet opp på glutation-sepharosekuler for å bli benyttet i preabsorbering i pulldown-forsøk. Mus og rotte GST-TSAd SH2 ble også bundet opp på glutation-sepharosekuler for sammenligning med human GST-TSAd SH2. Human og Mus GST-TSAd SH2 på glutation-sepharosekuler ga mest protein på kulene og rotte GST-TSAd SH2 ga minst (figur 5.3.5c). GST på glutation-sepharosekuler gir veldig mye protein på kulene (figur 5.3.5d). Mutant GST-TSAd SH2 ga veldig lite løselig protein og dermed lite protein på glutation-sepharosekuler (figur 5.3.5a og b).



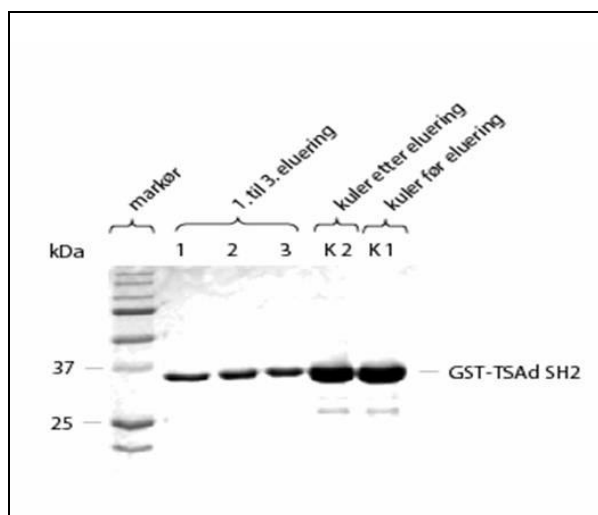
Figur 5.3.5. Oppbinding av GST-TSAd SH2 konstrukturer på glutation-sepharosekuler separert på 10 % SDS-PAGE. Markøren er en Precision Plus ProteinTM Dual Color Standard. K=protein på glutation-sepharosekuler. L=lysate etter oppbinding, a) (20µl prøve/spor) Sammenlignet mengde R120L/A GST-TSAd SH2 og wt GST-TSAd SH2 på glutation-sepharosekuler, b) (20µl prøve/spor) R120K GST-TSAd SH2 på glutation-sepharosekuler, c) (10µl prøve/spor) Mus, rotte, human GST-TSAd SH2 på glutation-sepharosekuler, d) (10µl prøve/spor) GST og human GST-TSAd SH2 på glutation-sepharosekuler.

Eluering av GST-TSAd fra glutation-sepharosekuler

GST-fusjonsprotein kan elueres fra glutation-sepharosekuler etter opprensing fra lysat. Man kan også kutte fusjonsproteinet slik at GST blir igjen på glutation-sepharosekulene. Det kan være flere grunner til at man ønsker at GST fremdeles skal være bundet til proteinet. En grunn kan være at man skal utføre Far Western og et godt antistoff for proteinet ikke finnes. Man bruker da antistoff mot GST for å detektere fusjonsproteinet. I denne oppgaven ble eluert fusjonsprotein benyttet til nettopp Far Western (Far Western er ikke blitt tatt med i oppgaven grunnet manglende resultater). Det ble utført tre elueringer fra samme glutation-sepharosekuler. Mengde protein ble målt i et spektrofotometer, ved $\lambda=280\text{nm}$, og detektert på CBB farget 10 % SDS-PAGE, som beskrevet under 4.2.1 og 4.2.2. GST-TSAd SH2 konsentrasjonen ble beregnet ved hjelp av: $A_{280}=\epsilon*C*l$ (tabell 5.3.1) hvor A =absorbans, ϵ = ekstinksjons koeffisienten, l =lengde på lysveien (kuvetten=1cm) og c =konsentrasjon. Veldig mye protein var igjen på glutation-sepharosekulene etter eluering (figur 5.3.6).

Eluering	OD ved $\lambda=280\text{nm}$	μM
1	0,325	7,9
2	0,338	8,3
3	0,392	9,6

Tabell 5.3.1. Mengde human GST-TSAd SH2 eluert fra glutation-sepharosekuler. Human GST-TSAd SH2 ble eluert fra glutation-sepharosekuler tre ganger (fra samme kulene). OD ble målt for hver eluering i spektrofotometer. μM human GST-TSAd SH2 ble beregnet fra formelen $A_{280}=\epsilon*C*l$. Teoretisk ekstinksjonskoeffisient for TSAd SH2: $40965 (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$.



Figur 5.3.6. Eluering av GST-TSAd fra glutation-sepharosekuler. (20 μ l prøve/spor) Markøren er en Precision Plus Protein TM Standard. Spor 1-3 viser GST-TSAd SH2 eluert fra glutation-sepharosekuler. Spor K2 (K= glutation-sepharosekuler) viser glutation-sepharosekuler etter eluering og K1 viser glutation-sepharosekuler før eluering.

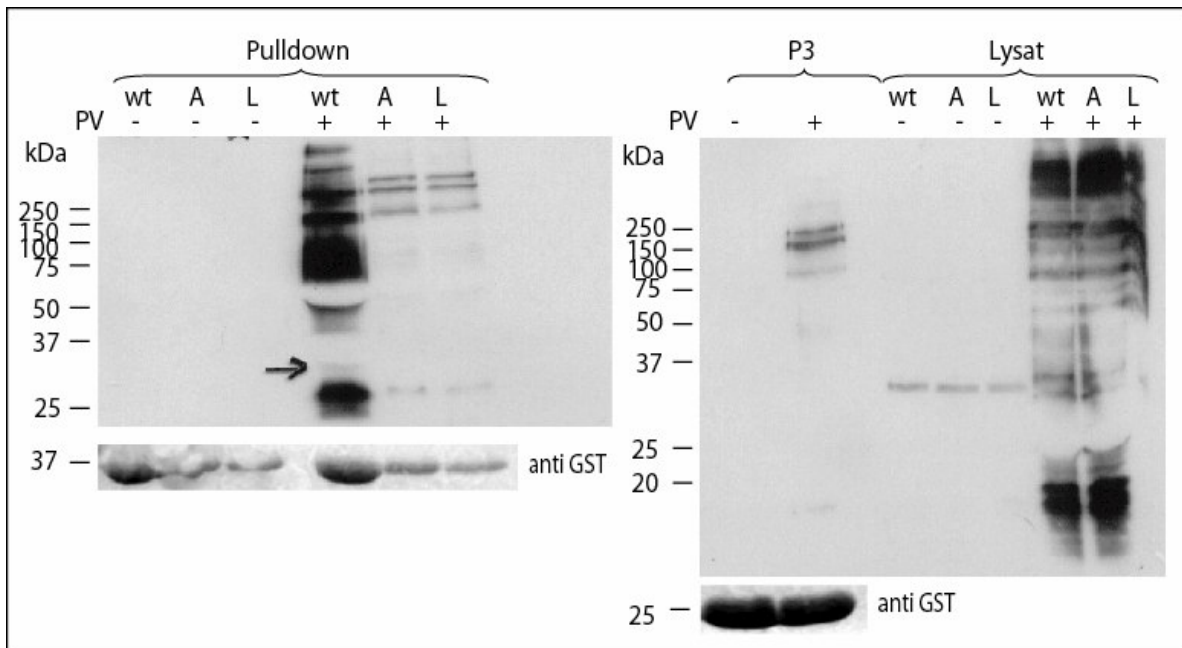
5.4 GST-pulldown

GST-pulldown er en metode for å finne nye protein-protein interaksjoner. Det er en en-trinns metode som gjør det mulig å detektere lav-affinitetsinteraksjoner. GST-pulldown ble i denne oppgaven benyttet for å finne mulige nye ligander til det humane TSAAd SH2-domenet. Muterte GST-TSAd SH2 ble benyttet som kontroller.

GST-pulldown fra PV-stimulerte Jurkat E6.1 celler

Pervanadat (PV) er en tyrosinfosfatasehemmer som hindrer defosforylering av proteiner i cellen. Som beskrevet i kapittel 1.4, binder SH2-domener som oftest fosforylerte tyrosiner (pY). I stedet for å benytte stimulering som SDF-1 eller anti-CD3/CD28, som kun gir fosforylering av proteiner i signalisering fra CXCR4 eller TCR, vil svært mange proteiner være aktivert ved fosforylering i PV-stimulerte celler. Pulldown ble utført etter 3x45 minutter preabsorbering. Til preabsorbering ble en 50:50 blanding GST-glutation-sepharosekuler med 4B-sepharosekuler brukt. Preabsorbering skal hindre uspesifikke interaksjoner. Lysater fra pulldown ble separert med 10 % SDS-PAGE, overført til PVDF-membran og blottet med et antistoff mot pY, 4G10 (beskrevet under 4.3.2). Pulldown fra PV-stimulerte Jurkat

E6.1 celler viser at GST-TSAd SH2 har bundet fosforylerte proteiner fra lysatet (figur 5.4.1). GST-TSAd SH2 wt har bundet mange flere proteiner enn mutantene. Men det er mindre mutert GST-TSAd SH2 på kulene enn GST-TSAd SH2 wt, det gjør det vanskelig å sammenligne. GST på glutation-sepharosekuler har bundet noe uspesifikt på 100-250 kDa. De tre båndene ser like ut som de tre øverste båndene GST-TSAd SH2 mutantene har dratt ned, men de har vandret noe lenger i gelen for preabsorbering og lysater. Antistoffet 4G10 har ikke detektert fosforylerte proteiner i ustimulert lysat eller i pulldown med ustimulerte lysat. Det kan ikke utelukkes at GST-TSAd SH2 har bundet ufosforylerte proteiner i dette forsøket, da dette ikke blir detektert av antistoffet 4G10.

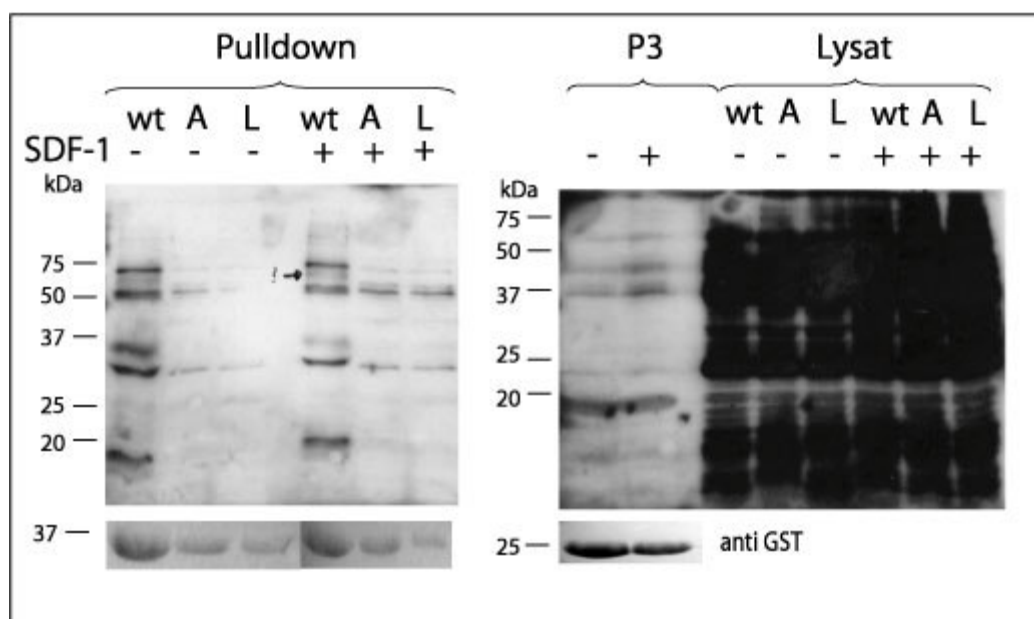


Figur 5.4.1. Western blotting av GST-pulldown fra PV-stimulerte Jurkat E6.1 celler. Pulldown ble utført med human TSAd SH2 wt (wt) og TSAd SH2 R120A/L (A og L) som kontroller. P3= tredje preabsorbering. Blottet med anti-pY og reprobet med anti-GST.

GST-pulldown fra SDF-1 stimulerte Jurkat E6.1 celler

SDF-1 er et kjemokine som binder seg til CXCR4. Aktivering av reseptor fører bl.a. til cellemigrering og TSAd SH2 har vist å binde VEGFR-2 som også fører til cellemigrering. Vi ønsker derfor å undersøke om TSAd SH2-domenet binder til proteiner som inngår i SDF-CXCR4 signalveien. Jurkat E6.1 celler ble stimulert med

SDF-1 i 5 minutter. Utførelse som for PV-stimulering (4.3.2). Tre pulldown-forsøk viser at GST-TSAd SH2 bandt bånd på ~60 kDa, ~35 kDa og ~18 kDa (figur 5.4.2). Av disse båndene har mutantene kun bundet ~35 kDa båndet. Preabsorberingen viser at mye protein har bundet uspesifikt, men ingen av de nevnte båndene har bundet uspesifikt til GST-glutation-sepharosekulene.

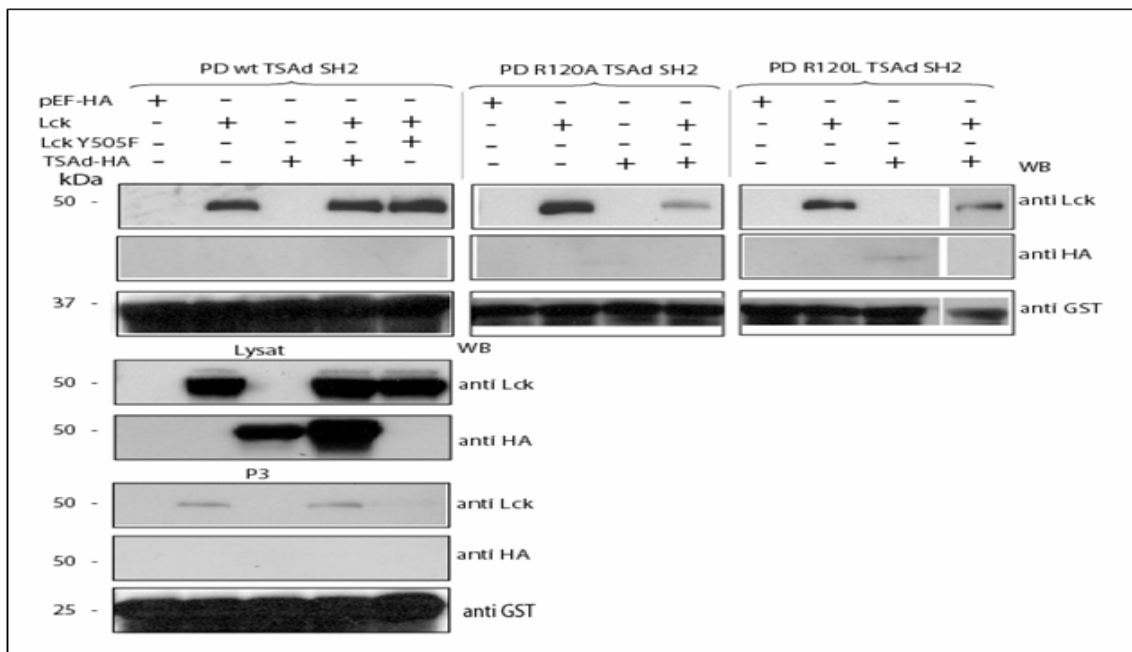


Figur 5.4.2. Western blottting av GST-pulldown fra SDF-1 stimulerede Jurkat E6.1 celler. (20µl prøve/spor) Pulldown ble utført med human GST-TSAd SH2 wt og GST-TSAd SH2 R120A/L som kontrollere. Blottet med anti-pY og reprobet med anti-GST.

GST-pulldown fra transfekterte 293T celler

Tidligere undersøkelser har vist at TSAd binder til Lck og at interaksjonen mellom TSAd og Lck er gjennom Lck sine SH2 og SH3 domener [6;39]. Det er også vist at når TSAd er til stede, fører det til økt fosforylering av Y394 og Y505 i Lck [39]. Når Lck er inaktiv, er pY505 bundet til Lck sitt SH2-domene. Ved aktivering av Lck blir pY505 defosforylert og Lck SH2 kan binde andre ligander. TSAd, som mangler bindingssete for Lck SH2 og SH3, ser ut til å aktivere Lck. Vi ønsket derfor å finne ut om TSAd SH2-domenet binder Lck og om Lck Y505 er viktig for binding til TSAd SH2. Tidligere resultater (upublisert) har tydet på at TSAd dimeriserer og at det kan være avhengig av fosforylering av Lck. 293T celler ble transfektert med Lck wt, Lck Y505F, TSAd-HA og Lck og TSAd-HA sammen. Tom vektor ble brukt som

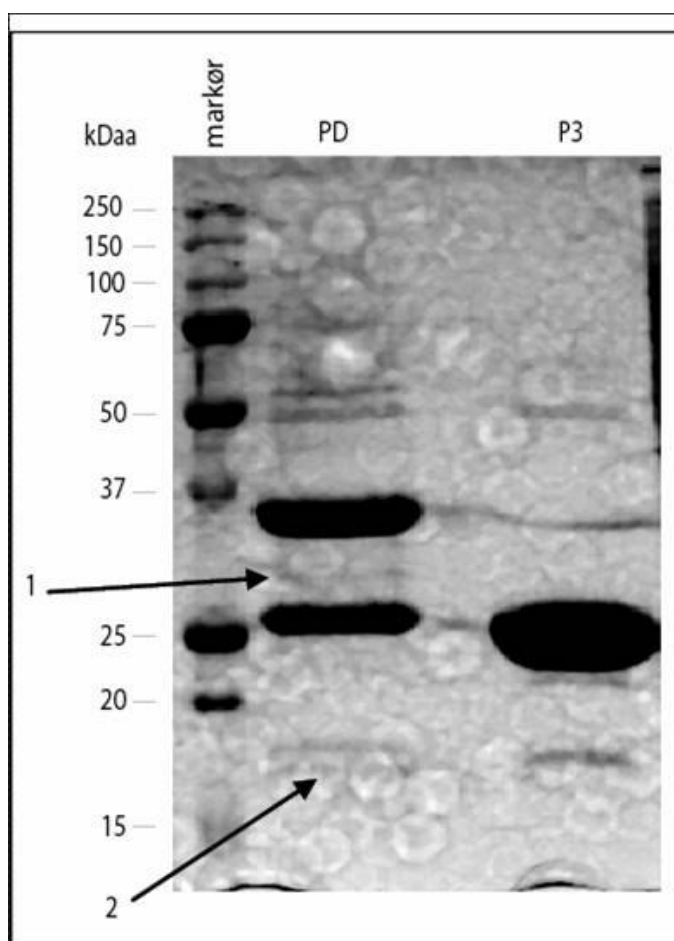
transfeksjonskontroll. Forsøket er beskrevet under 4.3.1 og 4.3.2. Pulldown med transfekterte 293T celler viser interaksjon mellom GST-TSAd SH2 (wt og mutanter) og Lck når TSAd-HA er transfektert sammen eller ikke (figur 5.4.3). TSAd SH2 binder Lck, og dette ser ut til å være uavhengig om Lck er fosforylert på Y505. Vi ser også at GST-TSAd SH2 binder noe TSAd-HA når Lck er tilstede, men at det er ganske svake signaler. Forsøk der Lck Y505F er transfektert er kun gjort en gang, resten av forsøket er gjentatt tre ganger. Det første forsøket viste at GST-TSAd SH2 wt binder TSAd-HA uavhengig om Lck er tilstede, men det har ikke latt seg reproducere. GST-glutation-sepharosekuler har bundet noe Lck, det er kun i dette forsøket Lck har bundet uspesifikt til GST-glutation-sepharosekulene. Det kan tyde på noe dårlig vasking av GST-glutation-sepharosekulene.



Figur 5.4.3. GST-pulldown fra transfekterte 293T celler. (20µl prøve/spor) Pulldown ble utført med human GST-TSAd SH2 wt og GST-TSAd SH2 R120A/L som kontroller. PD=pulldown, WB=Western blotting. Lysatene fra PD ble separert på to forskjellige geler, der den ene ble blottet med anti-HA for å detektere TSAd-HA, den andre med anti-Lck. Blottene ble reprobet med anti-GST.

Massespektrometri

For å identifisere spesifikke proteinbånd fra pulldown-forsøk, ble det utført massespektrometri (MALDI-TOF MS) med hjelp fra PROBE. Lysater fra pulldown-forsøk, med humant GST-TSAd wt fusjonsprotein på glutation-sepharosekuler (fra SDF-1 stimulerte Jurkat E6.1 celler), ble separert på 10 % SDS-PAGE og farget med CBB. To bånd ble kuttet ut og sendt til PROBE for analyse (figur 5.4.4). Disse båndene var ikke i sporet for preabsorbert lysat. MS-resultatet er vist i appendiks 3, figur 3a-c. Dette forsøket ble gjort før mutantene R120A/L var ferdig, det var da ingen kontroll i pulldown forsøket.



Figur 5.4.4. Lysater fra pulldown på en 10 % CBB farget SDS-PAGE. (20 μ l prøve/spor) PD=pulldown, P3= tredje preabsorbering. To bånd fra gelen ble kuttet ut for analyse; bånd 1 på ~30 kDa og bånd 2 ~18 kDa.

Resultatet fra massespektrometrien var at begge prøvene inneholdt mest human TSAd og GST. Spektrene for de to båndene viste spesifikke toppen, men de ble ikke undersøkt med MS/MS av PROBE.

6. Diskusjon

6.1 Setespesifikk mutagenese

Som beskrevet i avsnitt 1.4 binder SH2-domener som regel fosforylerte tyrosiner (pY) og aminosyreresiduer C- eller N-terminalt til pY. Det er den positive ladningen til arginin som interagerer med den negative ladningen til fosfatgruppen på pY. Ved å mutere R120 i TSA_d SH2 til en annen aminosyre som ikke binder pY vil binding til ligand trolig svekkes eller bli helt borte. Det er vanlig å mutere arginin til lysin (K) [11;55;56], men også mutering fra arginin til leusin (L) og alanin (A) er brukt [55;57]. K er en hydrofil aminosyre, samme som arginin, men kan ikke binde pY, antagelig pga sterisk hindring pga strukturulikheter mellom aminosyrene. K vil derfor trolig ikke ødelegge strukturen til SH2-domenet, kun binding til ligander. P.D. King har vist at TSA_d SH2 R120K ikke binder VCP [11]. L er en hydrofob aminosyre. Sidekjeden er omtrent like stor som den arginin har. Den vil passe inn i strukturen, men vil endre egenskap siden den er hydrofob. A har den nest minste sidekjeden av alle aminosyrene. Den er nøytral, liten og er mye benyttet til substitusjon.

Aminosyrer kodes som regel av flere kodon. Hver organisme bruker sine kodon og det er tRNA som reflekterer hvilke kodon som blir mer brukt enn andre. Hvis man muterer til en annen aminosyre ved bruk av tilfeldig kodon kan en få dårlig uttrykk av proteiner pga manglende tRNA til det kodonet (Newsletter of Novagen, Inc.). Det kodonet som skulle muteres i denne oppgaven var 5' CGG 3'. Lysin har kodonene AAA og AAG. AAG ble benyttet og *E. coli* har tRNA for AAG (fra NCBI). Leusin har kodonene UUA, UUG, CUA, CUC, CUG og CUU. Her ble CUG benyttet siden det er det mest brukte leusinkodonet i *E. coli*. Alanin har kodonene GCA, GCC, GCG og GCU. Her er det ingen som skiller seg ut til å bli spesielt lite eller mye brukt (fra NCBI). GCG ble derfor valgt siden det er det kodonet som er mest likt utgangspunktet.

R120A/L mutantene ble konstruert på grunn av dårlig uttrykk av R120K GST-TSA_d SH2 og veldig lite protein ble bundet opp på glutation-sepharosekuler (figur 5.3.5b).

6.2 Uttrykk av mus, rotte og human TSAAd SH2

Funksjonen til TSAAd er enda ukjent. SH2-domenet er viktig for TSAAds funksjon da det hittil er det eneste kjente domenet. Ved å kjenne strukturen til TSAAds SH2-domene kan en komme nærmere en forståelse av TSAAds funksjon.

Strukturbestemmelse som ved NMR krever store mengder protein i løsning. Det er derfor viktig å få et godt uttrykk av TSAAd SH2.

Uttrykking av eukaryote gener i *E. colis* cytoplasma fører ofte til dannelse av inklusjonslegemer. Inklusjonslegemer er aggregater av ufolda proteiner. T7 promotoren som er benyttet i denne oppgaven for proteinekspressjon er en sterk promotor. Den gir raskt mye protein. Store mengder protein kan føre til ukorrekt proteinfolding og dermed dannelse av inklusjonslegemer. En annen årsak til dannelse av inklusjonslegemer er bruk av kodon som *E. coli* ikke har tRNA for som kan føre til ufullstendig syntese av proteiner. Inklusjonslegemer inneholder ofte utelukkende det overuttrykte proteinet, noe som har blitt utnyttet av mange for rensing av rekombinante proteiner. Det er også andre fordeler ved å uttrykke et rekombinant protein i form av inklusjonslegemer [58]; (i) en kan uttrykke høye nivåer av proteinet, (ii) inklusjonslegemer er resistente mot proteaser og (iii) det er enkelt å isolere inklusjonslegemer fra bakteriekultur ved sentrifugering. Renaturering av aggregerte proteiner krever mye arbeid og utbyttet er ofte lavt [59]. Ved å fusjonere protein til høy-affinitetsmerker som maltose-bindende protein (MBP) og glutation-S-transferase (GST), kan man øke utbyttet av løselig protein [60]. Uttrykking av GST-fusjonsprotein gir ikke alltid løselige proteiner [61]. MBP har sin naturlige lokalisasjon i bakteriens periplasma. Ved å lage et MBP-fusjonsprotein blir det fraktet til periplasma. Flere proteiner har vist bedre løselighet når det blir sekretet til periplasma [62-64]. Det er spesielt proteiner som er giftige for bakterien eller som inneholder disulfidbindinger som har vist bedret løselighet i periplasma. Det er også færre proteaser i periplasma enn i cytosol. GST-TSAAd SH2 har ingen disulfidbindinger eller har blitt vist å være giftig for bakteriene. Fusjonering til MBP vil derfor trolig ikke bedre løseligheten til det uttrykte rekombinante proteinet.

Man kan også uttrykke proteiner *in vitro*. Der kan lineære templatere fra PCR direkte benyttes for ekspresjon av rekombinant protein. Spesielt proteiner som vises å være ustabile eller giftige i levende celler er egnet for denne metoden [65].

En annen metode for uttrykking av protein er ved hjelp av insektceller [66;67]. Eukaryote celler egner seg ofte best til ekspresjon av eukaryote proteiner. Flere rekombinante proteiner produsert i insektceller har gitt et bra utbytte [68;69]. Dette gjelder ofte proteiner som skal post-translasjonelt modifiseres.

Oftest kan det hjelpe og lage flere forskjellige konstrukt, for å se om endring av lengden på konstruktet kan endre løseligheten til proteinet [70]. Stipendiat Thorny C.B. Andersen har laget flere konstrukt av GST-TSAd SH2. Ingen av konstruktene utmerket seg ved å gi spesielt mye løselig protein. Konstruktet benyttet i denne oppgaven (pGEX-human TSAd SH2) var det som ga best resultat. Mer arbeid gjenstår i testing av konstrukt, så det foreligger ingen endelig konklusjon.

Endring av human TSAd SH2 konstrukt ga liten forskjell i mengde løselig protein. Mus og rotte TSAd SH2 har litt forskjellige sekvenser fra human TSAd SH2 som potensielt kan gi mer løselig protein (figur 6.2.1). Uttrykk av mus GST-TSAd SH2 ga noe mer løselig protein både ved romtemperatur og ved 15 °C (figur 5.3.4). Lysat etter oppbinding av mus GST-TSAd SH2 på glutation-sepharosekuler viser at det er mye mer protein igjen i lysatet enn for human og rotte GST-TSAd SH2 (figur 5.3.5). Det ble ikke sett på kinetikk ved forskjellige IPTG-konsentrasjoner for mus GST-TSAd SH2. Det mest ideelle er å få godt uttrykk av human GST-TSAd SH2, siden det er humane systemer vi ønsker å studere.

```

1 rotte: WFHGFITRREAERLL QSQPLGCVLV FSES AVTFVLSYRSRTCCR HFLLAQLGDGRHVVL GEDSAHSQLQDLLQH YTECPLSPYGEMLTQ 90
2 mus:   WFHGFITRREAERLL QPQPLGCVLV FSES AVTFVLSYRSQTCCR HFLLAQLGDGRHVVL GEDSAHAQLQDLEH YTECPLSPYGEILTQ 90
3 human: WFHGFITRREAERLL EPKPQGCYLV FSES AVTFVLTYSRTCCR HFLLAQLRDGRHVVL GEDSAHARLQDLLLLH YTAHPLSPYGETLTE 90

1 rotte: PLARQTAEPAGLSLR GESDSGSRRQ 115
2 mus:   PLARQTAEPAGLSLR ADSDSGSKRQ 115
3 human: PLARQT----- ----- 96

```

Figur 6.2.1. Sekvens-sammenligning av human, mus og rotte TSAd SH2.

Multippel sekvens-sammenligning ble utført ved hjelp av ClustalW.

Forskjeller i sekvensene er merket med gult og det konserverte argininresidue er merket med rødt.

På grunn av begrenset tid for denne oppgaven, ble kun optimalisering av den fra før benyttede proteinekspresjonen utført. Som beskrevet tidligere, er T7 en sterk promotor som raskt gir mye protein og det er ofte ved for rask proteinsyntese proteinene ikke rekker å folde seg korrekt. Ved lavere IPTG-konsentrasjon og lavere temperatur vil kanskje proteinsyntesen sakkes noe ned og proteinene rekker å folde seg korrekt. I kapittel 5.3 ble det testet om lav konsentrasjon av IPTG over lengre proteinekspresjon (i tid) ga et bedre utbytte enn høy IPTG-konsentrasjon over en kortere tidsperiode. Figur 5.3.2 viser ingen økt utbytte ved lave IPTG-konsentrasjoner og over lang tid. Ved lav temperatur ble ca 25 % mer human, mus rotte GST-TSAd SH2 uttrykt i lysat, men for mutantene var det uendret. Resultatene fra proteinekspresjon optimaliseringen er kun en indikasjon på hvilke betingelser som gir best uttrykk. For et mer nøyaktig resultat må proteinet renses og konsentrasjonsbestemmes.

6.3 GST-pulldown

Det finnes en rekke metoder for å lete etter nye interaksjonspartnere og ligander til proteiner. GST-pulldown er en enkel ett-trinns metode som kan detektere lav-affinitets interaksjoner (som beskrevet under 4.3.2). Men det er også ulemper forbundet med metoden. Man kan for eksempel ikke være sikker på at det man har dratt ned fra et cellysats binder direkte til fusjonsproteinet, eller om det er et protein-kompleks man har dratt ned. Man kan da bruke pulldown som en initiell

karakterisering an nye bindingspartnere. I denne oppgaven ble det laget mutanter til bruk som negativ kontroll. Men denne framgangsmåten viste seg å være vanskelig. Både var de vanskelig å uttrykke, og i det ene forsøket der vi viste at TSAAd SH2 binder Lck, bandt faktisk også mutanten til Lck. En kan ikke utelukke at mutantene har bundet Lck spesifikt, da det er andre eksempler på SH2-domener som binder ligander med ufosforylerte tyrosiner. I en artikkel utgitt i januar 2006 av Jones et. al ble alle SH2-domener testet ut som potensielle bindingspartnere til de fire ErbB reseptorene. pY peptider som representerte alle aktuelle bindingssetene på reseptorene ble laget og de samme ufosforylerte peptider som kontroller. 21 SH2-domener bandt med signifikant bindingsaffinitet (KD mellom 1.9 og 0.5 μ M) til ufosforylerte peptider [71]. Blant disse var TSAAd SH2-domenet. Det var en ikke-konkurrerende metode de benyttet, så hva som skjer *in vivo* kan en ikke si noe sikkert om. Vav1, SAP, Grb10 og Grb 7 (som nevnt i avsnitt 1.4) er eksempler på proteiner med SH2-domener som er rapportert å binde ligander med ufosforylerte tyrosiner. For at SAP kan binde ufosforylert ligand er den avhengig av bindingsenergi fra både N- og C-terminale residuer til pY [24]. En hypotese kan være at TSAAd også følger denne modellen. Det har blitt vist at VCP binder TSAAd SH2 og at den bindingen er avhengig av pY805 i VCP og at R120K TSAAd SH2 ikke binder VCP [11]. pY805 er den nest siste C-terminale aminosyren i VCP. Den er kun én residue C-terminalt til Y805, det vil da ikke være tilstrekkelig bindingsenergi for at TSAAd SH2 kan binde Y805, eller at R120K kan binde pY805. Lck har residuer N- og C-terminalt til residue Y505. Når Lck enten er ufosforylert på Y505 eller når Y505 er mutert til fenylalanin vil ikke det svekke bindingsenergien nok til at TSAAd SH2 ikke interagerer med Lck Y505F.

Felles for alle GST-pulldown-forsøkene som ble utført med GST-TSAAd SH2 mutanter, er at det ikke var samme forhold mellom TSAAd wt på kuler og mutanter på kuler. Dette kan ha ført til at GST-TSAAd SH2 mutantene har dratt ned mindre protein enn GST-TSAAd SH2 wt i pulldown fra PV og SDF-1 stimulerte Jurkat E6.1 celler.

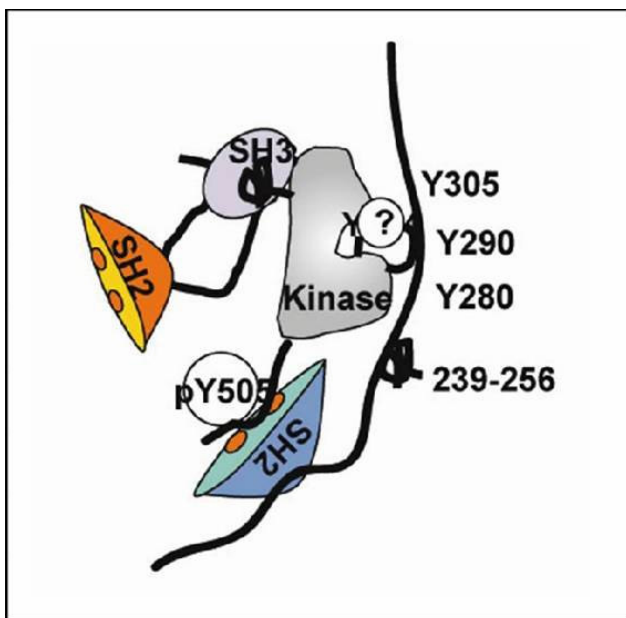
GST-pulldown fra PV-stimulerte Jurkat E6.1 celler (figur 5.4.1), blottet med anti-pY, viser at GST-TSAAd wt binder mye mer enn mutantene. Det er vanskelig å vite om

dette er reelt, siden det er mye mindre GST-TSAd mutanter på glutathion-sepharosekulene enn GST-TSAd wt. Men selv ved lang eksponering kom det ingen bånd på blottet i sporene for pulldown med GST-TSAd mutanter. PV er en tyrosinfosfatasehemmer og PV-stimulering fører til at alle fosforylerte proteiner i stimulerings-perioden forblir fosforylerte på tyrosin residuer. Det vil si at det er en veldig kunstig stimulering og man får ikke et virkelig bilde av hvilke proteiner som binder GST-TSAd SH2 ved forskjellige stimuleringer av cellen. Ved en gitt naturlig stimulering som for eksempel SDF-1 eller anti-CD3/CD28, er det kun visse proteiner som blir aktivert inne i cellen. Det blir da ingen konkurranse mellom alle cellens proteiner for binding til GST-TSAd SH2. Ett protein kan binde forskjellige ligander under forskjellige omstendigheter.

GST-pulldown fra SDF-1 stimulerende Jurkat E6.1 celler (figur 5.4.2), blottet med anti-pY, viser et klart bånd på ~18 kDa (fra både ustimulerte og stimulerende lysater) som selv ved lang eksponering viser at mutantene og GST-glutathion-sepharosekuler ikke har bundet samme proteinbånd. Blottet viser også et bånd på ~60 kDa som kun er dratt ned av GST-TSAd SH2 wt. Det ble forsøkt å utføre MALDI-TOF MS (av PROBE) på to bånd fra et GST-pulldown-forsøk fra SDF-1 stimulerende Jurkat E6.1 celler (~18 kDa og ~30 kDa proteinbånd), men GST-TSAd SH2 ga for mye bakgrunn. For å hindre at GST-TSAd SH2 overskygger resultatet kan en utføre en dobbelt rensing av lysatet. Dvs. at en først separerer lysatet på SDS-PAGE (som i denne oppgaven) og deretter kutter ut det aktuelle båndet, rensar det og eventuelt kjører det gjennom en kolonne som binder GST og TSAd SH2 for deretter å trypsinere å utføre MS. SDF-1 stimulerende av cellene ga ikke særlig forskjell i fosforylering av proteiner i ustimulert og stimulert lysat. Som forventet var det ingen forskjell i proteiner som ble dratt ned av GST-TSAd SH2 fra stimulerende og utstimulerte cellelysater. Dårlig stimulering kan komme av at cellene var stresset før stimulering (pga vasking av cellene). Det kan føre til at cellene i utgangspunktet er "aktiverte". En annen grunn til dårlig stimulering kan være teknisk utførelse, at det kan være vanskelig å få til en reell blanding, slik at alle cellene kommer i kontakt med den stimulerende substansen samtidig. TSAds binding til VEGFR-2 reseptor og

SDF-1 stimulering fører begge bl.a. til cellemigrering. Vi ønsket derfor å se om TSAAd SH2 binder til andre proteiner som er involvert i cellemigrering.

GST-pulldown fra Lck (wt og mutant) og TSAAd-HA transfekterte 293T celler (figur 5.4.3), blottet med anti-Lck og anti-HA, viste at TSAAd sitt SH2-domene binder Lck wt og Lck Y505F. Mutert GST-TSAAd SH2 binder også Lck, men når Lck er transfektert sammen med TSAAd-HA blir mindre Lck dratt ned av mutantene. Dette kan komme av at transfektert TSAAd-HA konkurrerer ut GST-TSAAd SH2 mutanter på grunn av bedre bindingsaffinitet. Vår predikasjon er at tyrosin 505 i Lck binder til TSAAd SH2-domene, (figur 6.3.1), selv om den ikke er fosforylert.



Figur 6.3.1. TSAAd og Lck interaksjoner. Figuren viser antatt binding av TSAAd SH2 til Lck pY505 (figur laget av Anne Spurkland).

Den C-terminale Lck sekvensen N'-TEGQYQQQP-C' (Y505 merket med gult), der T (treonin) er en nøytral (kan potensielt fosforyleres) aminosyre, E (glutamat) er en hydrofil, aminosyre, G (glysin) er en nøytral aminosyre, Q (glutamin) er en hydrofil aminosyre og P (prolin) er en nøytral aminosyre. SH2-domener binder som oftest fosfopeptider med hydrofobe residuer N- eller C-terminalt til pY [23;30]. Det er de hydrofobe residuene som lager hydrofobe interaksjoner i den hydrofobe bindingslommen i SH2-domenet. Aminosyrene N- og C-terminalt til Lck Y505 har ingen hydrofobe residuer som kan lage kontakt med den hydrofobe bindingslommen til TSAAd SH2-domene. Men det kan foreløpig ikke utelukkes helt at TSAAd SH2 binder Y505 i Lck.

Figur 5.4.3 viser at GST-glutation-sepharosekuler i preabsorberingen har dratt ned noe Lck. Det kan være på grunn av dårlig vasking av kulene eller at Lck har bundet uspesifikt til GST-glutation-sepharosekulene. Det er veldig lite som er dratt ned i forhold til hva GST-TSAd SH2 har bundet, det er derfor grunn til å tro at GST-TSAd SH2 binder spesifikt til Lck. Dette forsøket ble utført i alt tre ganger med samme resultat og det er kun dette forsøket som viste uspesifikk binding til GST-glutation-sepharosekulene. Tidligere forsøk har vist at GST-TSAd SH2 drar ned TSAd-HA, men det var ikke reproducerbart innenfor denne oppgavens omfang. Vi kunne ikke se av dette forsøket at TSAd dimeriserer, kun mutant GST-TSAd SH2 bandt TSAd-HA veldig svakt.

Andre metoder som er mye benyttet for å identifisere nye protein-protein interaksjoner er immunopresipitasjon i løsning og gjær-to-hybrid-systemet [8;11;25;26;28;39].

Ved immunopresipitasjon brukes et antistoff for å presipitere et bestemt antigen fra en løsning, for eksempel cellelysate. Presipitatet kan så renses med et immunoglobulinbindende protein, som protein A [50]. Hvis det proteinet man ønsker å finne nye ligander for, ko-immunopresipiterer andre proteiner, kan dette påvises ved hjelp av Western blotting. Ved at antistoffet binder målprotein, vil det samtidig presipitere ut eventuelle andre proteiner det har bundet. Fordelen med denne teknikken er at antistoffet interagerer med native antigener og ikke delvis denaturerte antigener som ved immunoblott. Ulemper med immunopresipitering er at immunkomplekser i løsning er følsomme for mekaniske rystelser, temperaturforskjeller og saltkonsentrasjoner.

Gjær-to-hybrid-systemet benytter gjær (*Saccharomyces cerevisiae*) som vert for å analysere protein-protein interaksjoner. Det ble i utgangspunktet utviklet for å identifisere proteiner som interagerer med et kjent protein [72]. Metoden går ut på å utnytte egenskapene til GAL4 proteinet i gjær. GAL4 er en transkripsjonsaktivator som trengs for uttrykking av gener som koder for enzymer for benyttelse av galaktose. Det består av to separate domener. Hvert domene er fusjonert med hvert

sitt protein. Bare når de to proteinene danner et kompleks kan de to domenene i GAL4 komme sammen og virke som transkripsjonsaktivator. Senere har metoden blitt brukt for å søke i uttrykkingsbiblioteker etter nye ligander [49]. Fordelen med denne metoden er at plasmid og gjær koster lite og er lette å manipulere. Ulempen med gjær-to-hybrid metoden er at når proteiner som skal testes for interaksjon krever post-translasjonelle modifiseringer som for eksempel fosforylering, kan dette være vanskelig å få gjort i gjærsystemet. Ved å transfektere tyrosinkinase Lck har man unngått fosforyleringsproblemet, men overuttrykk av kinaser kan være giftig for gjær. Gjær-to-hybrid-systemet er et kunstig system for identifikasjon av nye ligander. Det er også veldig tidkrevende å lage et bibliotek for søking av nye ligander.

6.4 Konklusjoner

- Uttrykk av mus GST-TSAd SH2 er litt bedre enn uttrykk av human GST-TSAd SH2.
- Ekspresjon av human, mus og rotte GST-TSAd SH2 ved 15 °C er bedre enn ved romtemperatur.
- Det er holdepunkter for at TSAd SH2-domenet interagerer med Lck. Bindingen er uavhengig av Lck pY505.
- GST-TSAd SH2-domenet interagerer med flere fosforylerte proteiner i pulldown-forsøk fra PV og SDF-1 stimulerende Jurkat E6.1 celler.

6.5 Forslag til videre arbeid

Arbeidet med uttrykking av human GST-TSAd SH2 ga ikke ett godt nok resultat til videre NMR studier av proteinet. Resultatene fra uttrykking av protein ved 15 °C så lovende ut for human, mus og rotte GST-TSAd SH2, men resultatet må videre undersøkes for å finne et mer nøyaktig mål på mengde protein. Det er også eventuelt aktuelt å prøve andre alternativer for uttrykk av GST-TSAd SH2, som for eksempel uttrykk i insektceller eller gjærceller. Mus GST-TSAd SH2 ga mer løselig protein enn human og rotte GST-TSAd SH2, det kan være aktuelt å optimalisere uttrykket av mus GST-TSAd SH2.

I denne oppgaven ble det funnet ut at GST-TSAd SH2 binder Lck, men hvor på Lck GST-TSAd SH2 binder vet man ikke enda. En interessant og mulig kandidat er Y505. For å undersøke dette, vil vi lage deleksjonsmutant av Lck, der 4-5 residuer N- og C-terminalt for Y505 er fjernet. Binder GST-TSAd SH2 også til denne varianten av Lck må man teste ut andre eventuelle bindingssteder for TSAd SH2.

MS av protein-bånd fra pulldown-forsøk viste at GST-TSAd SH2 ga mye bakgrunn. Her må vi utføre nye pulldown-forsøk der proteinbånd blir dobbelt rensset for GST-TSAd SH2. Det er også ønskelig å gjøre pulldown med andre stimuleringer, for eksempel TCR stimulering ved anti-CD3/CD28. Eventuelt kan man gjøre en paneltest med antistoff mot sannsynlige bindingspartnere etter pulldown-forsøk.

Kildeliste

1. **Lea,T.,** *Basal og klinisk immunologi 2. utgave.* 2000.
2. **Alberts,B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P.,** *Molecular biology of the cell Fourth edition.* 2002.
3. **Harrington,L.E., Mangan,P.R., and Weaver,C.T.,** Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr.Opin.Immunol.* 2006. **18:** 349-356.
4. **Bettelli,E., Carrier,Y., Gao,W., Korn,T., Strom,T.B., Oukka,M., Weiner,H.L., and Kuchroo,V.K.,** Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006. **441:** 235-238.
5. **Spurkland,A., Brinchmann,J.E., Markussen,G., Pedeutour,F., Munthe,E., Lea,T., Vartdal,F., and Aasheim,H.C.,** Molecular cloning of a T cell-specific adapter protein (TSAd) containing an Src homology (SH) 2 domain and putative SH3 and phosphotyrosine binding sites. *J.Biol.Chem.* 1998. **273:** 4539-4546.
6. **Sundvold,V., Torgersen,K.M., Post,N.H., Marti,F., King,P.D., Rottingen,J.A., Spurkland,A., and Lea,T.,** T cell-specific adapter protein inhibits T cell activation by modulating Lck activity. *J.Immunol.* 2000. **165:** 2927-2931.
7. **Choi,Y.B., Kim,C.K., and Yun,Y.,** Lad, an adapter protein interacting with the SH2 domain of p56lck, is required for T cell activation. *J.Immunol.* 1999. **163:** 5242-5249.
8. **Rajagopal,K., Sommers,C.L., Decker,D.C., Mitchell,E.O., Korthauer,U., Sperling,A.I., Kozak,C.A., Love,P.E., and Bluestone,J.A.,** RIBP, a novel Rlk/Txk- and itk-binding adaptor protein that regulates T cell activation. *J.Exp.Med.* 1999. **190:** 1657-1668.
9. **Nejad,S., Bryceson,Y., Dissen,E., Sundvold-Gjerstad,V., Naper,C., Rolstad,B., Spurkland,A., and Vaage,J.T.,** cDNA cloning of a rat orthologue of SH2D2A encoding T-cell-specific adaptor protein (TSAd): expression in T and NK cells. *Immunogenetics* 2004. **56:** 338-342.
10. **Matsumoto,T., Bohman,S., Dixelius,J., Berge,T., Dimberg,A., Magnusson,P., Wang,L., Wikner,C., Qi,J.H., Wernstedt,C., Wu,J., Bruheim,S., Mugishima,H., Mukhopadhyay,D., Spurkland,A., and Claesson-Welsh,L.,** VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSAd in tumor angiogenesis. *EMBO J.* 2005. **24:** 2342-2353.

-
11. **Marti,F. and King,P.D.**, The p95-100 kDa ligand of the T cell-specific adaptor (TSAd) protein Src-homology-2 (SH2) domain implicated in TSAd nuclear import is p97 Valosin-containing protein (VCP). *Immunol.Lett.* 2005. **97**: 235-243.
 12. **Kavanaugh,W.M., Turck,C.W., and Williams,L.T.**, PTB domain binding to signaling proteins through a sequence motif containing phosphotyrosine. *Science* 1995. **268**: 1177-1179.
 13. **Brown,M.T. and Cooper,J.A.**, Regulation, substrates and functions of src. *Biochim.Biophys.Acta* 1996. **1287**: 121-149.
 14. **Thomas,S.M. and Brugge,J.S.**, Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 1997. **13**: 513-609.
 15. **Resh,M.D.**, Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim.Biophys.Acta* 1999. **1451**: 1-16.
 16. **Koegl,M., Zlatkine,P., Ley,S.C., Courtneidge,S.A., and Magee,A.I.**, Palmitoylation of multiple Src-family kinases at a homologous N-terminal motif. *Biochem.J.* 1994. **303 (Pt 3)**: 749-753.
 17. **Cooper,J.A., Gould,K.L., Cartwright,C.A., and Hunter,T.**, Tyr527 is phosphorylated in pp60c-src: implications for regulation. *Science* 1986. **231**: 1431-1434.
 18. **Smart,J.E., Oppermann,H., Czernilofsky,A.P., Purchio,A.F., Erikson,R.L., and Bishop,J.M.**, Characterization of sites for tyrosine phosphorylation in the transforming protein of Rous sarcoma virus (pp60v-src) and its normal cellular homologue (pp60c-src). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1981. **78**: 6013-6017.
 19. **Voet,D. and Voet, J. G.**, *Biochemistry 3 edition.* 2004.
 20. **Williams,J.C., Weijland,A., Gonfloni,S., Thompson,A., Courtneidge,S.A., Superti-Furga,G., and Wierenga,R.K.**, The 2.35 Å crystal structure of the inactivated form of chicken Src: a dynamic molecule with multiple regulatory interactions. *J.Mol.Biol.* 1997. **274**: 757-775.
 21. **Sawyer,T.K.**, Src homology-2 domains: structure, mechanisms, and drug discovery. *Biopolymers* 1998. **47**: 243-261.
 22. **Campbell,S.J. and Jackson,R.M.**, Diversity in the SH2 domain family phosphotyrosyl peptide binding site. *Protein Eng* 2003. **16**: 217-227.

-
23. **Qin,C., Wavreille,A.S., and Pei,D.**, Alternative mode of binding to phosphotyrosyl peptides by Src homology-2 domains. *Biochemistry* 2005. **44**: 12196-12202.
 24. **Li,S.C., Gish,G., Yang,D., Coffey,A.J., Forman-Kay,J.D., Ernberg,I., Kay,L.E., and Pawson,T.**, Novel mode of ligand binding by the SH2 domain of the human XLP disease gene product SAP/SH2D1A. *Curr.Biol.* 1999. **9**: 1355-1362.
 25. **Mahajan,N.P. and Earp,H.S.**, An SH2 domain-dependent, phosphotyrosine-independent interaction between Vav1 and the Mer receptor tyrosine kinase: a mechanism for localizing guanine nucleotide-exchange factor action. *J.Biol.Chem.* 2003. **278**: 42596-42603.
 26. **Morrione,A., Plant,P., Valentinis,B., Staub,O., Kumar,S., Rotin,D., and Baserga,R.**, mGrb10 interacts with Nedd4. *J.Biol.Chem.* 1999. **274**: 24094-24099.
 27. **Pero,S.C., Oligino,L., Daly,R.J., Soden,A.L., Liu,C., Roller,P.P., Li,P., and Krag,D.N.**, Identification of novel non-phosphorylated ligands, which bind selectively to the SH2 domain of Grb7. *J.Biol.Chem.* 2002. **277**: 11918-11926.
 28. **Sayos,J., Wu,C., Morra,M., Wang,N., Zhang,X., Allen,D., van,S.S., Notarangelo,L., Geha,R., Roncarolo,M.G., Oettgen,H., De Vries,J.E., Aversa,G., and Terhorst,C.**, The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 1998. **395**: 462-469.
 29. **Machida,K. and Mayer,B.J.**, The SH2 domain: versatile signaling module and pharmaceutical target. *Biochim.Biophys.Acta* 2005. **1747**: 1-25.
 30. **Songyang,Z., Shoelson,S.E., Chaudhuri,M., Gish,G., Pawson,T., Haser,W.G., King,F., Roberts,T., Ratnofsky,S., Lechleider,R.J., and .**, SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 1993. **72**: 767-778.
 31. **Songyang,Z., Shoelson,S.E., McGlade,J., Olivier,P., Pawson,T., Bustelo,X.R., Barbacid,M., Sabe,H., Hanafusa,H., Yi,T., and .**, Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Mol.Cell Biol.* 1994. **14**: 2777-2785.
 32. **Silverthorn,D.U.**, *Human Physiology Second edition.* 2001.
 33. **Dai,K.Z., Harbo,H.F., Celius,E.G., Oturai,A., Sorensen,P.S., Ryder,L.P., Datta,P., Svejgaard,A., Hillert,J., Fredrikson,S., Sandberg-Wollheim,M., Laaksonen,M., Myhr,K.M., Nyland,H., Vartdal,F., and Spurkland,A.**, The T cell

regulator gene SH2D2A contributes to the genetic susceptibility of multiple sclerosis. *Genes Immun.* 2001. **2**: 263-268.

34. **Lesch,K.P., Bengel,D., Heils,A., Sabol,S.Z., Greenberg,B.D., Petri,S., Benjamin,J., Muller,C.R., Hamer,D.H., and Murphy,D.L.,** Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 1996. **274**: 1527-1531.
35. **Papachristou,C. and Lin,S.,** Microsatellites versus single-nucleotide polymorphisms in confidence interval estimation of disease loci. *Genet.Epidemiol.* 2005. **30**: 3-17.
36. **Yamada,N., Yamaya,M., Okinaga,S., Nakayama,K., Sekizawa,K., Shibahara,S., and Sasaki,H.,** Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am.J.Hum.Genet.* 2000. **66**: 187-195.
37. **Smerdel,A., Dai,K.Z., Lorentzen,A.R., Flato,B., Maslinski,S., Thorsby,E., Forre,O., and Spurkland,A.,** Genetic association between juvenile rheumatoid arthritis and polymorphism in the SH2D2A gene. *Genes Immun.* 2004. **5**: 310-312.
38. **Holdorf,A.D., Lee,K.H., Burack,W.R., Allen,P.M., and Shaw,A.S.,** Regulation of Lck activity by CD4 and CD28 in the immunological synapse. *Nat.Immunol.* 2002. **3**: 259-264.
39. **Sundvold-Gjerstad,V., Granum,S., Mustelin,T., Andersen,T.C., Berge,T., Shapiro,M.J., Shapiro,V.S., Spurkland,A., and Lea,T.,** The C terminus of T cell-specific adapter protein (TSA_d) is necessary for TSA_d-mediated inhibition of Lck activity. *Eur.J.Immunol.* 2005. **35**: 1612-1620.
40. **Marti,F., Garcia,G.G., Lapinski,P.E., MacGregor,J.N., and King,P.D.,** Essential role of the T cell-specific adapter protein in the activation of LCK in peripheral T cells. *J.Exp.Med.* 2006. **203**: 281-287.
41. **Siliciano,J.D., Morrow,T.A., and Desiderio,S.V.,** itk, a T-cell-specific tyrosine kinase gene inducible by interleukin 2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1992. **89**: 11194-11198.
42. **Tanaka,N., Asao,H., Ohtani,K., Nakamura,M., and Sugamura,K.,** A novel human tyrosine kinase gene inducible in T cells by interleukin 2. *FEBS Lett.* 1993. **324**: 1-5.

-
43. **Hu,Q., Davidson,D., Schwartzberg,P.L., Macchiarini,F., Lenardo,M.J., Bluestone,J.A., and Matis,L.A.,** Identification of Rlk, a novel protein tyrosine kinase with predominant expression in the T cell lineage. *J.Biol.Chem.* 1995. **270**: 1928-1934.
 44. **Sommers,C.L., Huang,K., Shores,E.W., Grinberg,A., Charlick,D.A., Kozak,C.A., and Love,P.E.,** Murine txk: a protein tyrosine kinase gene regulated by T cell activation. *Oncogene* 1995. **11**: 245-251.
 45. **Sun,W., Kesavan,K., Schaefer,B.C., Garrington,T.P., Ware,M., Johnson,N.L., Gelfand,E.W., and Johnson,G.L.,** MEKK2 associates with the adapter protein Lad/RIBP and regulates the MEK5-BMK1/ERK5 pathway. *J.Biol.Chem.* 2001. **276**: 5093-5100.
 46. **Park,D. and Yun,Y.,** Tyrosine phosphorylation-dependent yeast two-hybrid system for the identification of the SH2 domain-binding proteins. *Mol.Cells* 2001. **12**: 244-249.
 47. **Park,D., Choi,Y.B., Han,M.K., Kim,U.H., Shin,J., and Yun,Y.,** Adaptor protein Lad relays PDGF signal to Grb2 in lung cells: a tissue-specific PDGF signal transduction. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2001. **284**: 275-281.
 48. **Koller,K.J. and Brownstein,M.J.,** Use of a cDNA clone to identify a supposed precursor protein containing valosin. *Nature* 1987. **325**: 542-545.
 49. **Sambrook and Russell,** *Molecular Cloning a laboratory manual Third edition.* 2001.
 50. **Wilson,K.W.J.,** *Principals and Techniques of Practical Biochemistry Fifth edition.* 2000.
 51. **Lea,T.,** *Immunologi og immunologiske teknikker, 3. utgave.* 2006.
 52. **Bauer,A. and Kuster,B.,** Affinity purification-mass spectrometry. Powerful tools for the characterization of protein complexes. *Eur.J.Biochem.* 2003. **270**: 570-578.
 53. **Becamel,C., Alonso,G., Galeotti,N., Demey,E., Jouin,P., Ullmer,C., Dumuis,A., Bockaert,J., and Marin,P.,** Synaptic multiprotein complexes associated with 5-HT(2C) receptors: a proteomic approach. *EMBO J.* 2002. **21**: 2332-2342.

-
54. **Rappsilber,J., Ajuh,P., Lamond,A.I., and Mann,M.,** SPF30 is an essential human splicing factor required for assembly of the U4/U5/U6 tri-small nuclear ribonucleoprotein into the spliceosome. *J.Biol.Chem.* 2001. **276**: 31142-31150.
 55. **Bibbins,K.B., Boeuf,H., and Varmus,H.E.,** Binding of the Src SH2 domain to phosphopeptides is determined by residues in both the SH2 domain and the phosphopeptides. *Mol.Cell Biol.* 1993. **13**: 7278-7287.
 56. **Radtke,S., Haan,S., Jorissen,A., Hermanns,H.M., Diefenbach,S., Smyczek,T., Schmitz-Vandeleur,H., Heinrich,P.C., Behrmann,I., and Haan,C.,** The Jak1 SH2 domain does not fulfill a classical SH2 function in Jak/STAT signaling but plays a structural role for receptor interaction and up-regulation of receptor surface expression. *J.Biol.Chem.* 2005. **280**: 25760-25768.
 57. **Chen,R., Relouzat,F., Roncagalli,R., Aoukaty,A., Tan,R., Latour,S., and Veillette,A.,** Molecular dissection of 2B4 signaling: implications for signal transduction by SLAM-related receptors. *Mol.Cell Biol.* 2004. **24**: 5144-5156.
 58. **Singh,S.M. and Panda,A.K.,** Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J.Biosci.Bioeng.* 2005. **99**: 303-310.
 59. **Marston,F.A.,** The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem.J.* 1986. **240**: 1-12.
 60. **Smyth,D.R., Mrozkiewicz,M.K., McGrath,W.J., Listwan,P., and Kobe,B.,** Crystal structures of fusion proteins with large-affinity tags. *Protein Sci.* 2003. **12**: 1313-1322.
 61. **Kapust,R.B. and Waugh,D.S.,** *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci.* 1999. **8**: 1668-1674.
 62. **Cao,C., Shi,C., Li,P., and Ma,Q.,** A secretion expression system using promoter and signal peptide of cholera toxin B subunit gene. *Chin J.Biotechnol.* 1995. **11**: 79-86.
 63. **Nallamsetty,S., Austin,B.P., Penrose,K.J., and Waugh,D.S.,** Gateway vectors for the production of combinatorially-tagged His6-MBP fusion proteins in the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*. *Protein Sci.* 2005. **14**: 2964-2971.
 64. **Wang,H., Tong,Y., Fang,M., and Ru,B.,** High-level expression of human TFF3 in *Escherichia coli*. *Peptides* 2005. **26**: 1213-1218.

65. **Martemyanov,K.A., Spirin,A.S., and Gudkov,A.T.,** Direct expression of PCR products in a cell-free transcription/translation system: synthesis of antibacterial peptide cecropin. *FEBS Lett.* 1997. **414**: 268-270.
66. **Ikonomou,L., Schneider,Y.J., and Agathos,S.N.,** Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 2003. **62**: 1-20.
67. **Schmidt,F.R.,** Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 2004. **65**: 363-372.
68. **Bromme,D., Nallaseth,F.S., and Turk,B.,** Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases. *Methods* 2004. **32**: 199-206.
69. **Thyzel,E., Siegling,S., Brinkmann,T., Kleesiek,K., and Gotting,C.,** Expression and characterization of wild-type TFPI and the [P151L]TFPI mutant in insect cells. *Mol.Cell Biochem.* 2006. **283**: 31-38.
70. **Lamla,T., Hoerer,S., and Bauer,M.M.,** Screening for soluble expression constructs using cell-free protein synthesis. *Int.J.Biol.Macromol.* 2006.
71. **Jones,R.B., Gordus,A., Krall,J.A., and MacBeath,G.,** A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays. *Nature* 2006. **439**: 168-174.
72. **Fields,S. and Song,O.,** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 1989. **340**: 245-246.

Appendiks 1

Sekvensering av mus GST-TSAd SH2:

21-mSH2_GEXF.ab1.Seq LENGTH: 630 Sam, 22. Okt 2005 13:08 Uhr CHECK: 1058

CaAAATCGGATCTGGaAGTTCTGTTCCAGGGGCCCCCTGGGATCCAAGACTGCCCCGCTTTGGTTCC
ATGGCTTCATTACCAGAAGGGAAGCTGAGAGGCTACTGCAGTCCCAACCTCTAGGATGCTATCTG
GTGCGCTTCAGCGAGAGCGCTGTGACCTTCGTGCTGTCTACAGGAGCCGAACCTGCTGCCGTCA
CTTCTCCTTGCTCAGCTAGGGGATGGGCGCCACGTGGTGCTGGGTGAAGACAGTGCCCACTCGC
AGCTTCAGGACCTGCTTCAACACTACACAGAGTGCCCCCTCAGCCCCACGGGGAGATGCTCACC
CAACCCCTCGCTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGACTGACGATCTGCCTCGCGCTTTCGGTGATG
ACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCC
GGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGCGGGTGTGGCGGGCAGCCATGA
CCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATAATTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTA
TTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCA

Sekvensering av rotte GST-TSAd SH2:

22-rSH2_GEXF.ab1.Seq LENGTH: 630 Sam, 22. Okt 2005 13:08 Uhr CHECK: 5683

TCCTCaAAATCGGATCTGGaAGTTCTGTTCCAGGGGCCCCCTGGGATCCAAGACTGCCCCGCTTTGG
TTCCATGGCTTCATTACCAGAAGGGAAGCTGAGAGGCTACTGCAGTCCCAACCTCTAGGATGCTA
TCTGGTGCCTTCAGCGAGAGCGCTGTGACCTTCGTGCTGTCTACAGGAGCCGAACCTGCTGCC
GTCACCTCCTCCTTGCTCAGCTAGGGGATGGGCCACGTGGTGCTGGGTGAAGACAGTGCCCACT
CGCAGCTTCAGGACCTGCTTCAACACTACACAGAGTGCCCCCTCAGCCCCACGGGGAGATGCTC
ACCCAACCCCTCGCTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGACTGACGATCTGCCTCGCGCTTTCGGTG
ATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGAT
GCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGCGGGTGTGGCGGGCAGCCA
TGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATAATTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGC
CTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGAC

Sekvensering av human GST-TSAd SH2 R120K:

23-R120K_GEXF.ab1.Seq LENGTH: 630 Sam, 22. Okt 2005 13:08 Uhr CHECK: 6921

CaAAATCGGATCTGGaAGTTCTGTTCCAGGGGCCCCCTGGGATCCGGGGCAGCCCCGCTTGGTTCC
ATGGCTTCATACCCGGAGGGAGGCAGAGAGGCTGCTGGAGCCCAAGCCTCAGGGGTGCTACTTG
GTGAAGTTCAGCGAGAGCGCGGTGACCTTCGTGCTGACTTACAGGAGCCGACTTGTGCCGCCA
CTTCTGCTGGCCCAGCTCAGGGACGGGCGCCACGTGGTGCTGGGCGAGGACAG
CGCCCACGCGCGGCTGCAGGACCTGCTGCTGCACTACACCGCGCACCCGCTCAGCCCCACGGGG
AGACGCTCACCGAGCCCCTCGCGCGGCCGGCCGCATCGTGACTGACTGACGATCTGCCTCGCGCG
TTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGT
AAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGCGGG
CGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATAATTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCG
TGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCA

Sekvensering av human GST-TSAd SH2 R120A:

>79-R120A_GEXF#5184#.ab1(1>630)

CaAATCGGATCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTGGGATCCGGGGCAGCCCCTGCCTGGTCATG
GCTTCATCACCCGGAGGGAGGCAGAGAGGCTGCTGGAGCCCAAGCCTCAGGGGTGCACTTGGTG
GCGTTCAGCGAGAGCGCGGTGACCTTCGTGCTGACTTACAGGAGCCGGACTTGCGCCGCACTTC
CTGCTGGCCCAGCTCAGGGACGGGCGCCACGTGGTGCTGGGCGAGGACAGGCCCGCGCGGCTGC
AGGACCTGCTGCTGCACTACACCGCGCACCCGCTCAGCCCCTACGGGGAGACGCTCACCGAGCCC
CTCGCGCGGCCGGCCGCATCGTGACTGACTGACGATCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTG
AAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTACAGCTTTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCA
GACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGGCGCAGCCATGACCCAGTC
ACGTAGCGATAGCGGAGTGTATAATTCTTGAAGACGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTT
AATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAG

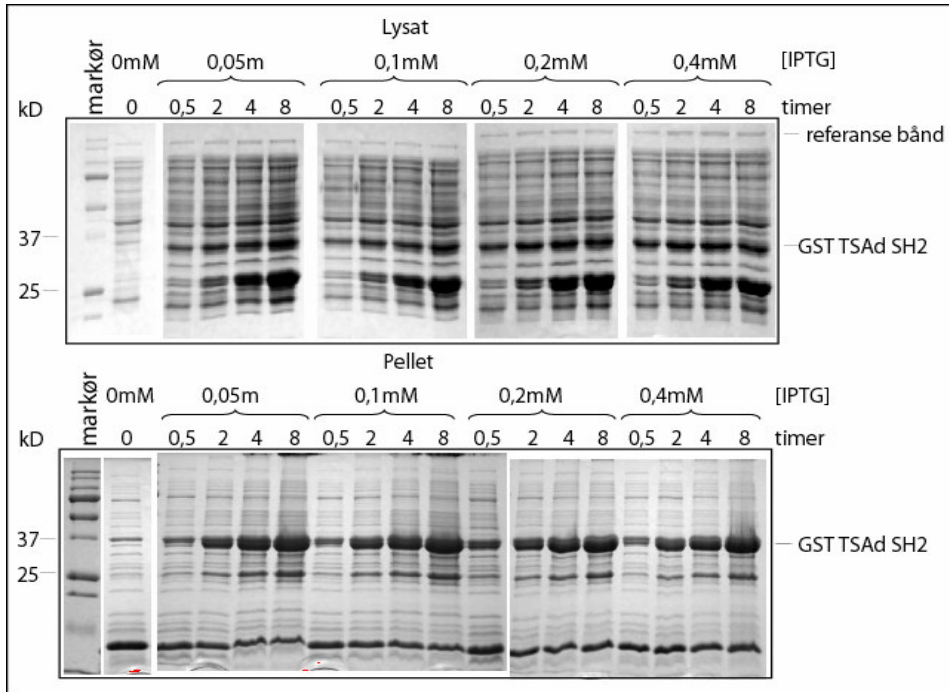
Sekvensering av human GST-TSAd SH2 R120L:

>80-R120L_GEXF#5185#.ab1(1>630)

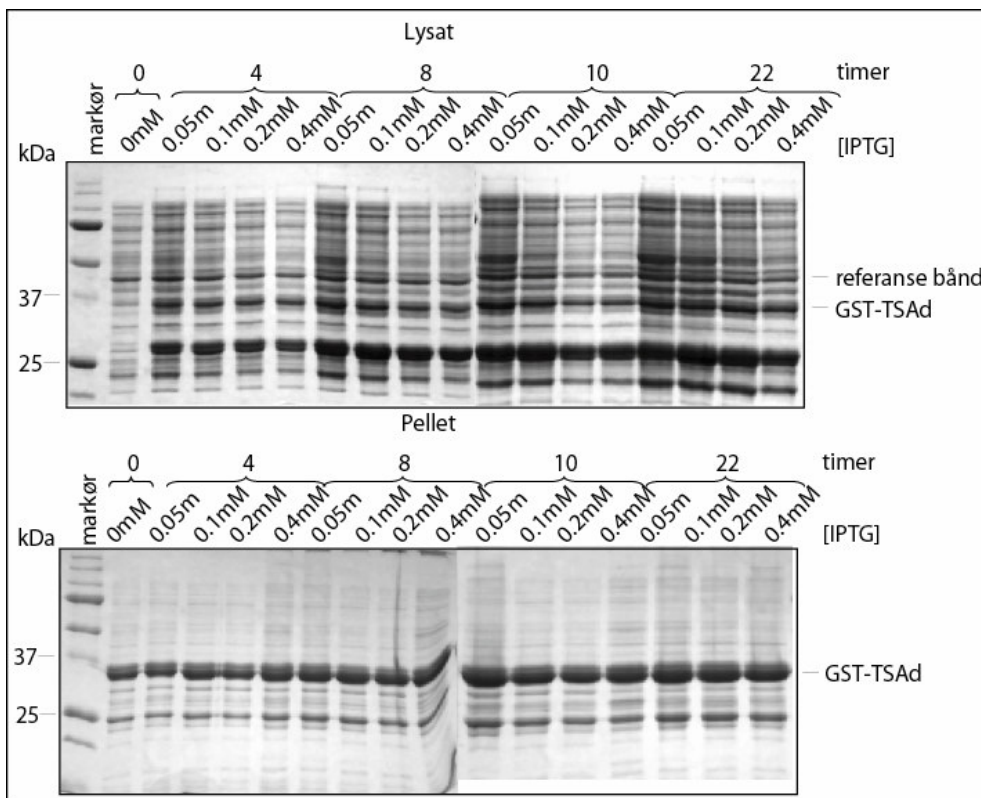
CGGATCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTGGGATCCGGGGCAGCCCCTGCCTGGTTCCATGGC
TTCATCACCCGGAGGGAGGCAGAGAGGCTGCTGGAGCCCAAGCCTCAGGGGTGCTACTTGGTGCT
GTTACAGCGAGAGCGCGGTGACCTTCGTGCTGACTTACAGGAGCCGGACTTGTCTGCCGCACTTC
TGCTGGCCCAGCTCAGGGACGGGCGCCACGTGGTGCTGGGCGAGGACAGCGCCCACGCGCGGCT
GCAGGACCTGCTGCTGCACTACACCGCGCACCCGCTCAGCCCCTACGGGGAGACGCTCACCGAGC
CCCTCGCGCGGCCGGCCGCATCGTGACTGACTGACGATCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGG
TGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGA
GCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGGCGCAGCCATGACCCA
GTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATAATTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTT
TATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGC

Appendiks 2

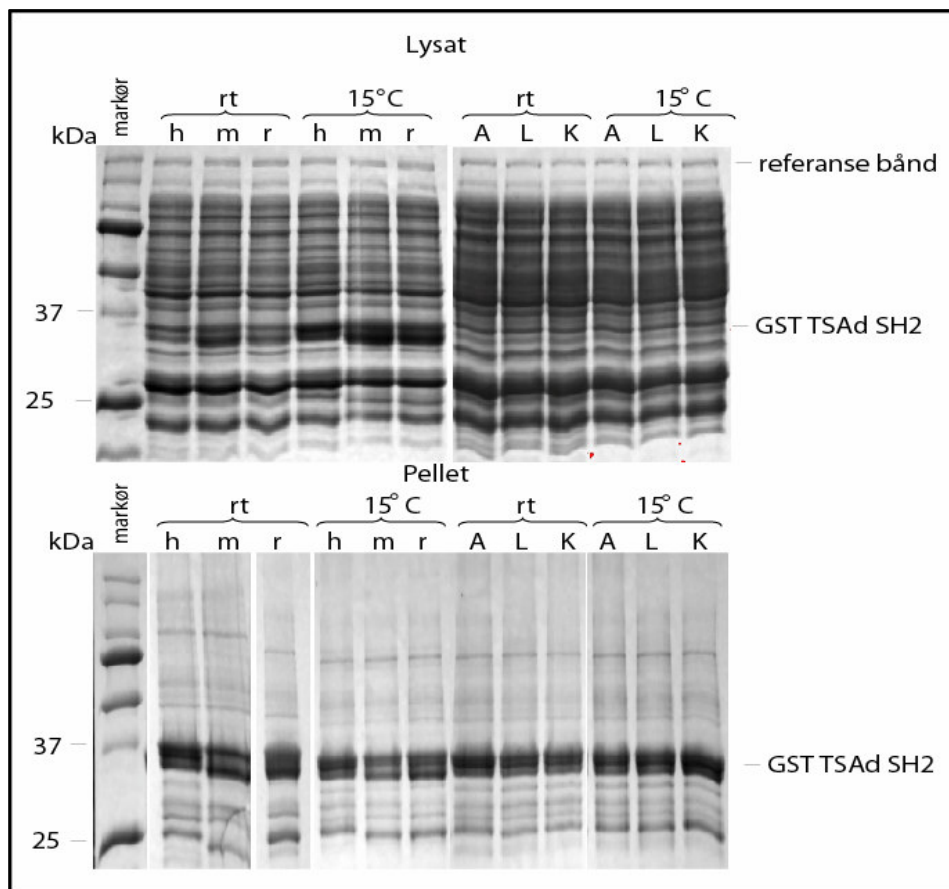
Figur 2a. Kinetikk av human GST-TSAd SH2 ekspresjon ved ulike mengder IPTG opp til 8 timer.



Figur 2b. Kinetikk av human GST-TSAd SH2 ekspresjon ved ulike mengder IPTG opp til 8 timer.



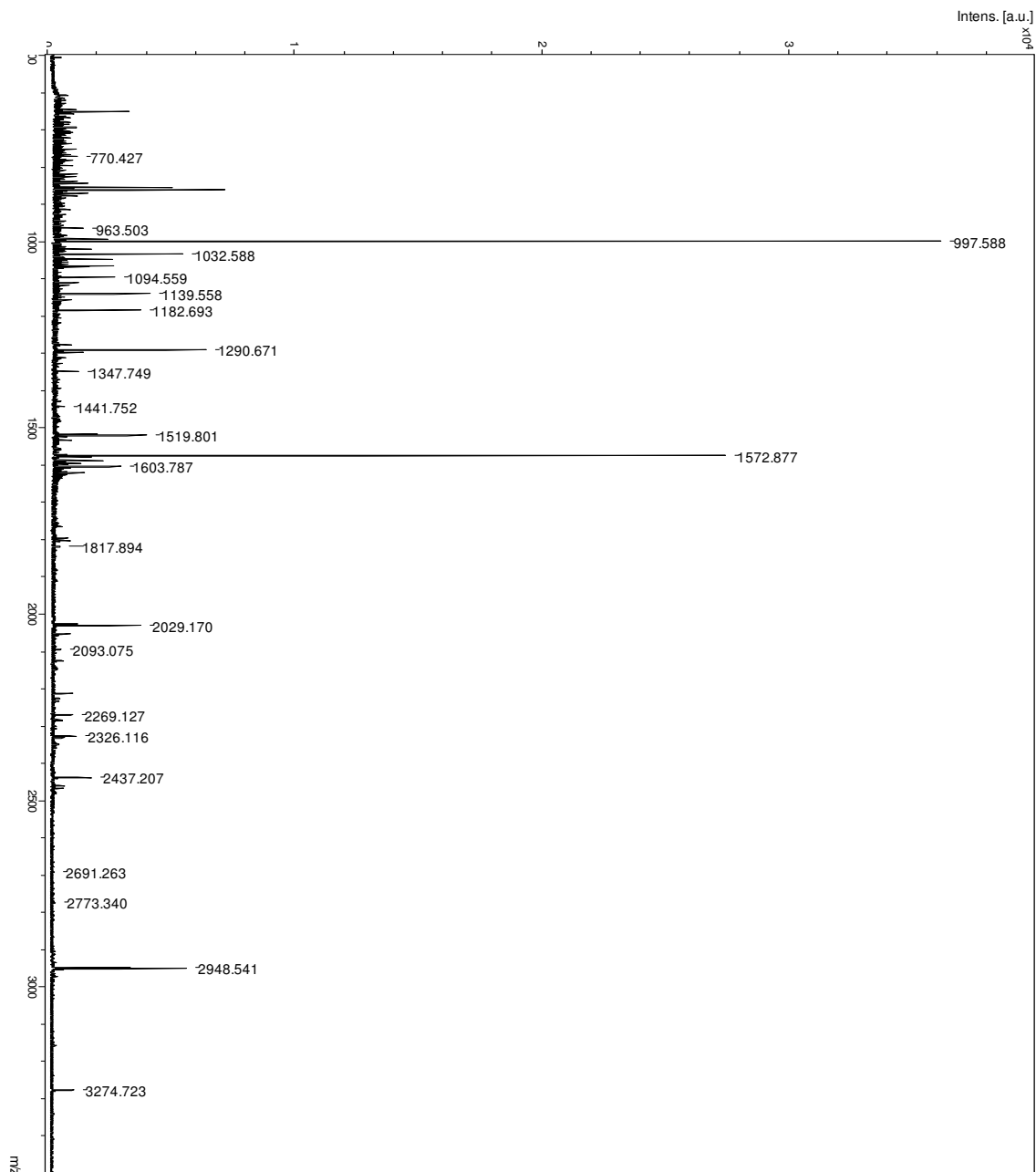
Figur 2c. Uttrykk av GST-TSAd konstrukter ved romtemperatur (rt) og 15 °C (0,2mM IPTG i 22 timer).

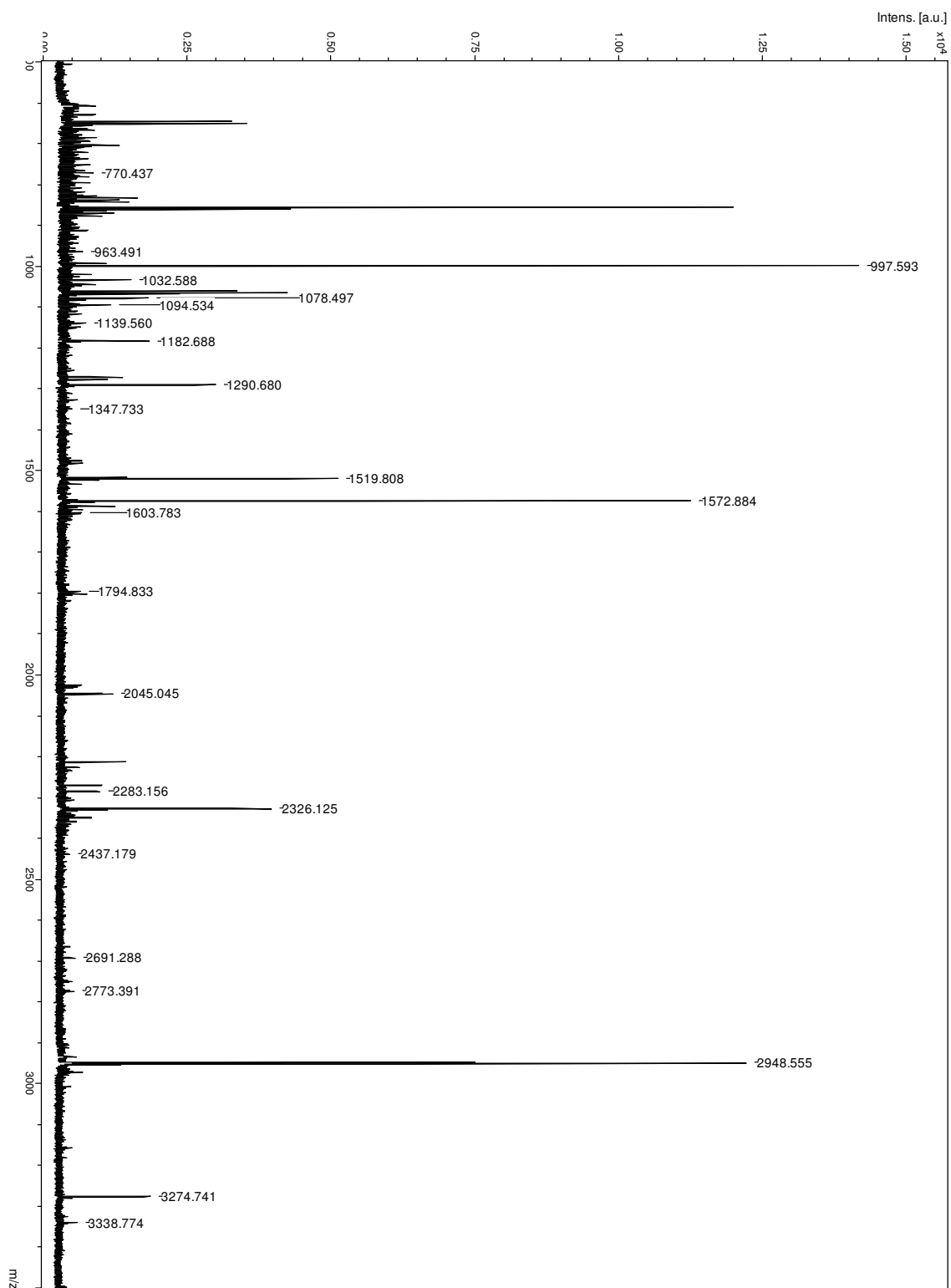


Appendiks 3

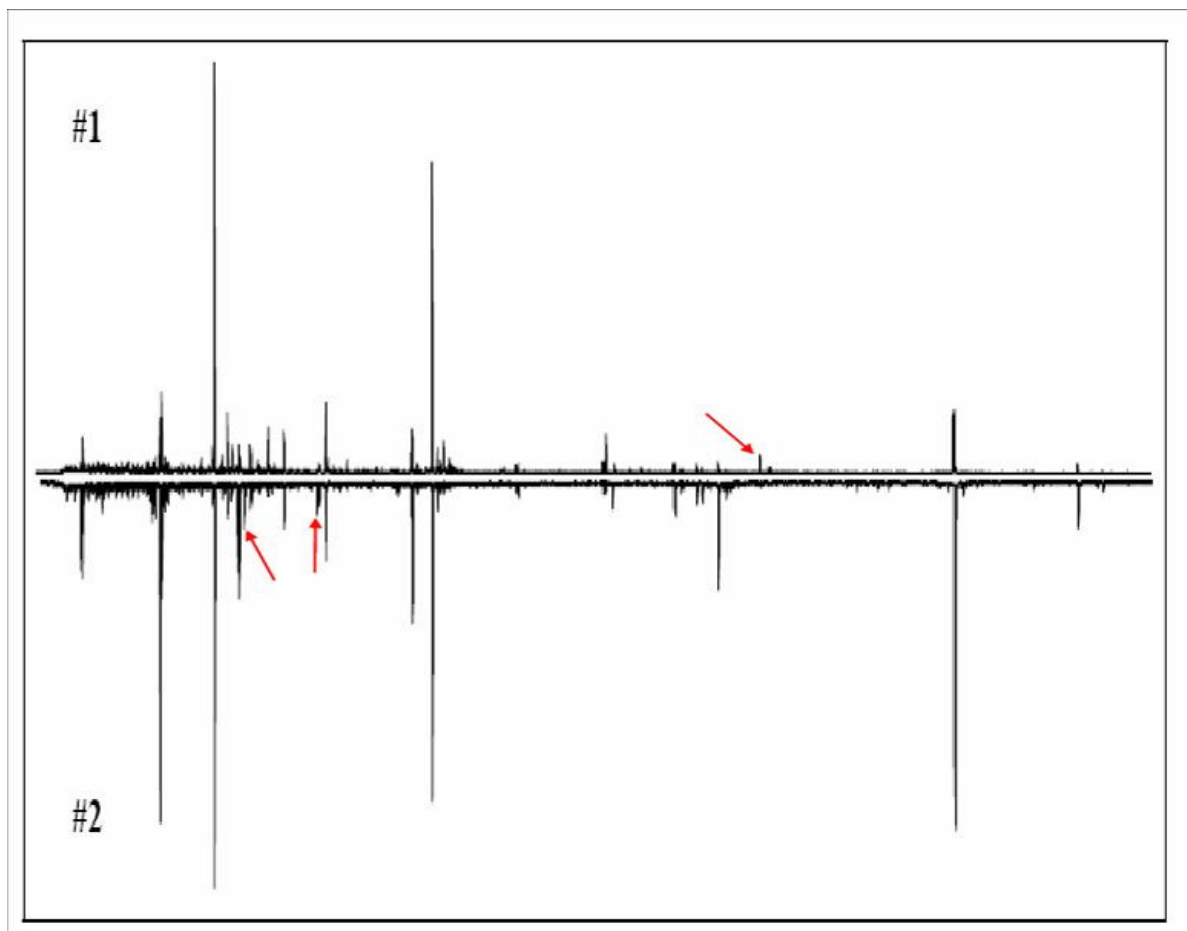
Massespektrometri utført av PROBE.

Figur 3a. Proteinbånd 1 (~30 kDa).



Figur 3b. Proteinbånd 2 (~18 kDa).

Figur 3c. Sammenligning av MS toppene fra bånd 1 og 2.



De to prøvene var svært like selv om proteinmassen avlest for prøve 1 var signifikant høyere enn for prøve to. Rød pil viser forskjeller i spekterne.