

PROTEINANALYSE VED HJELP AV MASSESPEKTROMETRI

PROTEIN ANALYSIS BY MASS SPECTROMETRY

SIGRID MARIE LARSEN

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP

INSTITUTT FOR KEMI, BIOTEKNOLOGI OG MATVITENSKAP
MASTEROPPGAVE 60 STP. 2010



FORORD

Denne masteroppgaven har blitt utført ved Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap ved Universitetet for miljø- og biovitenskap. Oppgaven ga meg en smakebit på hvordan det er å være forsker, og arbeidet har vært både lærerikt og motiverende. Jeg er glad jeg fikk være en del av et veldig bra team under bioorganisk forskningsgruppe ledet av professor Morten Sørli.

Jeg vil først takke Morten for sitt entusiastiske vesen og for sin evne til å motivere i tunge stunder. Vil takke for at du er flink med oppfølging og faglige innspill.

Jeg vil også rette en stor takk til Øyvind Løvold Busk for uvurderlig hjelp til alt jeg måtte trenge hjelp til. Din interesse og kunnskap for fagfeltet proteomikk har vært til stor hjelp og motivasjon! Du har alltid en spøk på lur og er nesten bestandig i godt humør.

Jeg vil også takke mine gode studieveninner for et godt samarbeid gjennom hele studietiden, både i faglige og sosiale lag.

Ikke minst vil jeg takke min familie og venner for den støtten og oppmuntringen dere har gitt meg gjennom hele min studietid.

Sist men ikke minst vil jeg takke meg selv for den innsatsen jeg har lagt i denne oppgaven og i min utdanning. 5 lange, men gode år er nå omme.

Ås 2010

Sigrid Marie Larsen

INNHOLDSFORTEGNELSE

FORORD

SAMMENDRAG V

ABSTRACTVII

FORKORTELSER..... IX

1. INNLEDNING..... 1

1.1 Stamceller 1

1.2 Bruk av cellekulturer som modellsystem..... 2

1.1.1 Mesenchymale stamceller 3

1.3 Subcellulær fraksjonering..... 6

1.4 Seterettet mutagenese..... 8

1.4.1 Kitinaser fra *Serratia marcescens*..... 9

1.4.2 Kitinase B (ChiB).....10

1.4.3 Prosessivitet hos ChiB.....11

1.5 Proteinanalyse ved MS 12

1.5.1 Proteomikk.....12

1.5.2 Separasjonsmetoder13

1.5.2.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)..... 13

1.5.2.2 Ionebyttekromatografi 15

1.5.2.3 Tekniske vurderinger og utfordringer med LC-ESI-MS/MS..... 15

1.5.2.4 Identifisering av proteiner 15

1.5.3 Massespektrometri (MS).....16

1.5.3.1 Tandem massespektrometri (MS/MS) 17

1.5.4 Ioniseringskilder.....18

1.5.4.1 Elektrospray ionisering..... 18

1.5.4.2 Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)..... 20

1.5.4.3 Time Of Flight (TOF) 21

1.5.4.4 Kjemisk merking..... 23

1.6 Mål med oppgaven 25

2. MATERIALER..... 26

2.1 Laboratoriestyr og instrumenter 26

2.1.1 Laboratoriestyr26

2.1.2 Instrumenter27

2.1.3 Programvare til dataanalyse28

2.2 Kjemikalier 28

2.2.1 Kjemikalier28

2.2.2 Proteinløsninger og enzymer30

2.3 Medier 30

2.4 Cellelinje..... 31

2.5 Kit 31

2.6 Buffere og løsninger 31

3. METODER..... 33

3.1 Dyrking av proteiner..... 33

3.2 Høsting av proteiner 33

3.3 Rensing og oppkonsentrering av ChiB mutanter 35

3.4 SDS-Polyakrylamid Gel Elektroferese (SDS-PAGE) 36

3.5 Celledyrking..... 38

3.6 Metoder for cellelysering 38

3.6.2 ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit, Mini. (Calbiochem®) .38

3.6.3 Manuel fraksjonerings metode.....40

3.7 Proteinpresipitering med aceton 42

3.8 Prøveopparbeidelse; reduksjon og alkylering.....	43
3.9 Prøveopparbeidelse; trypsinproteolyse	44
3.10 Prøveopparbeidelse; Peptidkstrahering.....	45
3.11 Identifisering av proteiner ved MALDI-TOF massespektrometer	46
3.12 Prøveopparbeidelse, STAGE-TIP	46
3.13 Prøveopparbeidelse, MALDI- target plate.....	47
3.14 Identifisering av proteiner ved LC/ESI-MS	47
3.15 Dataevaluering og validering med Biotools	49
4 Resultater	51
4.1 Resultatet av fraksjonering	51
4.2 Rensing av ChiB-W220A.....	55
4.3 Resultater av seterettet mutagenese.....	58
4.3.1 Mutantene analysert ved hjelp av MALDI TOF/TOF-MS/MS.....	59
4.3.2 Mutantene analysert ved hjelp av LC-MS.....	70
4.3.3 Kjemisk merking av mutantene	73
5 Diskusjon	77
5.1 Fraksjonering	77
5.2 Kontroll av seterettet mutagenese.....	78
5.2.1 Mutantene analysert ved hjelp av MALDI TOF-TOF MS/MS	78
5.2.2 Mutantene analysert ved hjelp av LC-MS/MS.....	80
5.2.3 Kjemisk merking.....	80
5.3 Videre arbeid og oppsummering	81
6. Referanser	83
7.APPENDIKS	87
7.1 Proteinlister	87
7.1.2 Subcellulær lokalisering av proteiner	87

SAMMENDRAG

Hovedmålet med oppgaven var å teste ulike prosedyrer for fraksjonering av celler. Ved å identifisere og kvantifisere proteinuttrykk ved hjelp av LC-MS (væskekromatografi-massespektrometri) som metode kan man bestemme fraksjoneringseffektiviteten til hver enkelt fraksjonerings metode.

Subcellulær fraksjonering av proteiner ble delt inn i membran-, cytosol-, cytoskjelett/mitokondrie- og cellekjernekomponent. Det ble brukt Tert celler, som er mesenchymale stamceller. Proteinene i de ulike fraksjonene ble separert med hensyn på masse ved SDS-PAGE. Hver brønn i gelen for de individuelle subcellulære fraksjonene ble delt i ti og proteinene ble ekstrahert ut av gelen og hydrolysert ved hjelp av proteasen trypsin. Videre ble peptidene separert og analysert med væskekromatografi-elektrosprayioniserings-massespektrometri/massespektrometri (LC-ESI-MS/MS).

Peptidene fra hver fraksjon ble analysert med oppsett I (tabell 2). Oppsettet ga 361 proteintreff for det kommersielle fraksjoneringskitet ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction kit og 41 proteintreff for manuell fraksjoneringsmetode.

Et delmål til oppgaven var å utvikle en metode for å kontrollere at seterettet mutagenese blir riktig utført. Kitinase B (ChiB) fra jordbakterien *Serratia marcescens* og mutanter av denne ble benyttet som modellproteiner. Det ble gjort tre forskjellige forsøk på å kontrollere at mutasjonen fant sted på riktig plass ved hjelp av Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, High Performance Liquid Chromatography (MALDI, HPLC) og kjemisk merking av mutantene.

Innvirkning ulike matriksløsninger hadde på ioniseringen av mutantene ble undersøkt og viste at det var små forskjeller i hvor lett det var å identifisere mutantene med de forskjellige matriksene. Sinapinic acid mettet med Ta30 (30% ACN (100%),70% TFA (0,1%)) ble ansett å være bedre enn sinapinic acid mettet med ETOH.

HPLC koblet med massespektrometri ble benyttet for å separere og detektere proteinene i prøvene. Hver av de syv trypsinerte proteinene ble analysert ved

hjelp av LC-MS, og sekvensene for hver mutant ble satt inn i tabell 3-9. Vi har i våre innstillinger godtatt 1 feilklyyving (missed cleavage). Feilklyyving innebærer at trypsin, som er en spesifikk serinprotease, ikke klyyver ved alle R eller K i peptidet slik den skal, men "hopper" over en aminosyre. Dette fører til flere mulige treff når man søker i databasen, og er årsaken til at tabellen inneholder mer enn en sekvens for hvert muterte peptid. Dette er en viktig innstilling da man ofte ser at trypsin ikke er 100 % effektiv.

Det ble brukt to kjemisk derivatiserings metoder (SPITC og Lys-Tag) for trypsindegraderte proteiner etterfulgt av identifisering ved hjelp av MALDI-TOF massespektrometri. Lys-Tag legger til en endring i massen på +68 Da i ϵ -amino gruppen av lysin, og omdanner denne til imidazole ring.

SPITC har en større forskyvning på +215 Da.

Derivatisering ble utført på ChiB-W220A (figur 4.18 og 4.19), men resultatene var ikke som ønsket da vi ikke fikk den ønskede forskyvningen på +68 Da for Lys-Tag og heller ikke +215 Da for SPITC.

ABSTRACT

The main goal with this master thesis is to test different procedures for fractionation of cells. By identifying and quantify protein expression with help of liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) as a method, can we decide the effectiveness of fractionation in each fractionation method.

Subcellular fractionation of proteins was divided in to a membrane component, cytosol component, cytoskeleton component and nuclear component. It was used Tert cells, which is mesenchymale stem cells. Proteins from the various fractions were separated in terms of molecular weight by SDS-PAGE. Each gel lane from the individual subcellular fractions was divided in ten and the proteins were extracted from the gel and hydrolyzed with the protease trypsin. Further on, the peptides were separated and analyzed with liquid chromatography- electrospray ionization- mass spectrometry/ mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS).

The peptides from each fraction were analyzed using LC-ESI-MS/MS setups (setup I). Setup I detected 361 proteins for the commercial fractionationkit ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction kit and 41 proteins from manual fractionations method.

A part goal with this master thesis is to develop a method that makes it easier to control Site directed mutagenesis and sees if this has been correct accomplished. Chitosan B (ChiB) from *Serratia marcescens*, can be found in environments such as dirt and mutants form this was used as model proteins. Bye using three different methods, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, High Performance Liquid Chromatography (MALDI, HPLC) and Chemical Derivatization of mutants, we could se if the mutation was done correctly.

The influence different matrix-solutions had on the ionization of mutants were examined. This showed that it was very little difference in how easy it was to identify the mutants by using different matrix-solutions. Sinapinic acid saturated with Ta30 (0% ACN (100%), 70% TFA (0,1%)) was esteemed better then sinapinic acid saturated with ETOH.

We used HPLC coupled with mass spectrometry to separated and detect proteins in a solution. The settings were put to find all the sequences opportunities with and without missed cleavage. By missed cleavage we mean setting the number of allowed missed cleavage sites to zero simulates a limit digest. We are not confident that our digest (trypsin) is perfect, with no partial fragments present, this will give maximum discrimination and the highest score. We can also see in the table 3-9 that we can control that the mutation has happened in the right spot for the mutants ChiB-F190A, ChiB-F191A and for the double mutant ChiB-W97A/W220A.

We used to chemical derivatization methods (SPITC and Lys-Tag) for trypsin degraded proteins followed by identifying proteins by MALDI-TOF mass spectrometry.

Lys-Tag makes a difference in the mass of +68 Da and makes the ϵ -amino group of lysin to an imidazole ring.

SPITC has a little bit bigger difference in the mass, +215 Da.

Derivatization was accomplished on the mutant ChiB-W220A (figure 4.18 and 4.19), but the result was not approvable because we could not see the difference in the mass of +68 Da for Lys-Tag, and +215 Da for SPITC.

FORKORTELSER

1-DE	1-dimensjonal gelelektroferese
2-DE	2-dimensjonal gelelektroferese
2-D	2-dimensjonal
Å	Ångstrøm
ACN	Acetonitrill
AmBic	Ammoniumbikarbonat
ChiB	Kitinase B fra <i>Serratia marcescens</i>
CID	Kollisjonindusert dissosiasjon
Da	Dalton
dH ₂ O	Sterilt vann av Milli-Q kvalitet
DIGE	Difference gel electrophoresis
DTT	Dithiothreitol
HPLC	High pressure liquid chromatography
IAA	Iodoacetamid
ICAT	Isotope coded affinity tag
IPG	Immobilized pH gradient
iTRAC	Isobaric tag for relative and absolute quantifikation
LC	Liquid chromatography
M	Molar (mol/L)
MALDI	Matrix-assisted laserdesorptionionization
MS	Massespektrometri
MS/MS	Tandem massespektrometri
<i>m/z</i>	Masse/ladning
PBS	Phosohate buffered saline
PMF	Peptide mass fingerprint
PTM	Posttranslasjonell modifisering
QonCAT	Qantification conCATamer
Rcf	Relative centrifugal force
Rpm	Runder per minutt
RP	Reversfasegel electrophoresis
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyakrylamide Gel Elektroforese
SILAC	Stabil isotopmerking av aminosyrer i cellekultur
TFA	Trifluoro acetic acid

1. INNLEDNING

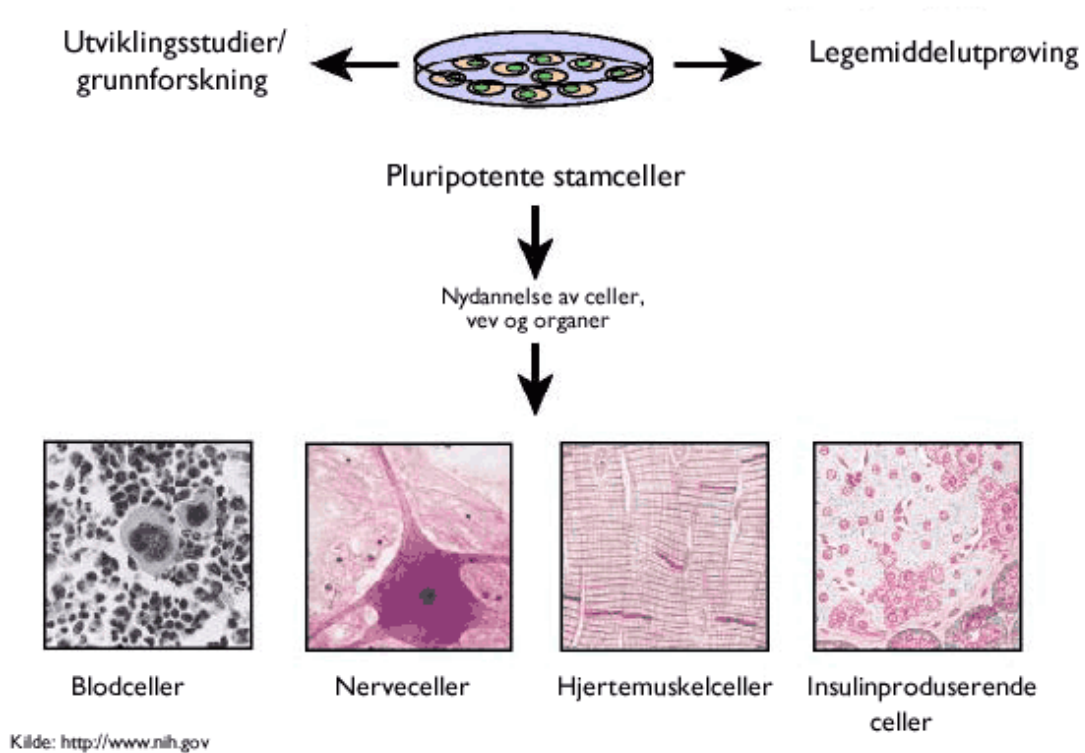
1.1 Stamceller

Flere tusen celler dør i kroppen hvert sekund, og i en frisk kropp blir disse erstattet umiddelbart. De cellene i kroppen som de nye cellene dannes fra kalles stamceller.

Stamceller er opphavet til spesialiserte kroppsceller, som for eksempel muskelceller, blodceller, epitelceller, tarmceller og nerveceller. Derfor blir stamceller ofte kalt opphavsceller.

Stamcellene kan reprodusere seg selv, de blir til nye identiske stamceller, mens vanlige celler også deler seg, men mister noe av opphavscellens egenskaper (Bioteknologinemnda 09.04.2008). Stamcelleforskning er et forskningsfelt det satses mye på, men som er svært omdiskutert av etiske årsaker (Bioteknologinemnda 09.04.2008).

Stamceller kan i prinsippet produsere hvilken som helst celletype. Man håper derfor at dette kan ha medisinsk nytte, for eksempel kan en pasient med leverskader få laget nye leverceller fra stamceller. Dette kan i teorien gjøres med alle typer celler i menneskekroppen. Bruk av stamceller kan være en behandlingsmetode uten bivirkninger, i motsetning til dagens medisiner der det ofte er en eller flere bivirkninger. Figur 1.1 viser framstillingen av pluripotente stamceller.



Figur 1.1: en skjematisk framstilling av pluripotente stamceller, fra utdyrking til endelig celle (Bioteknologinemnda 09.04.2008).

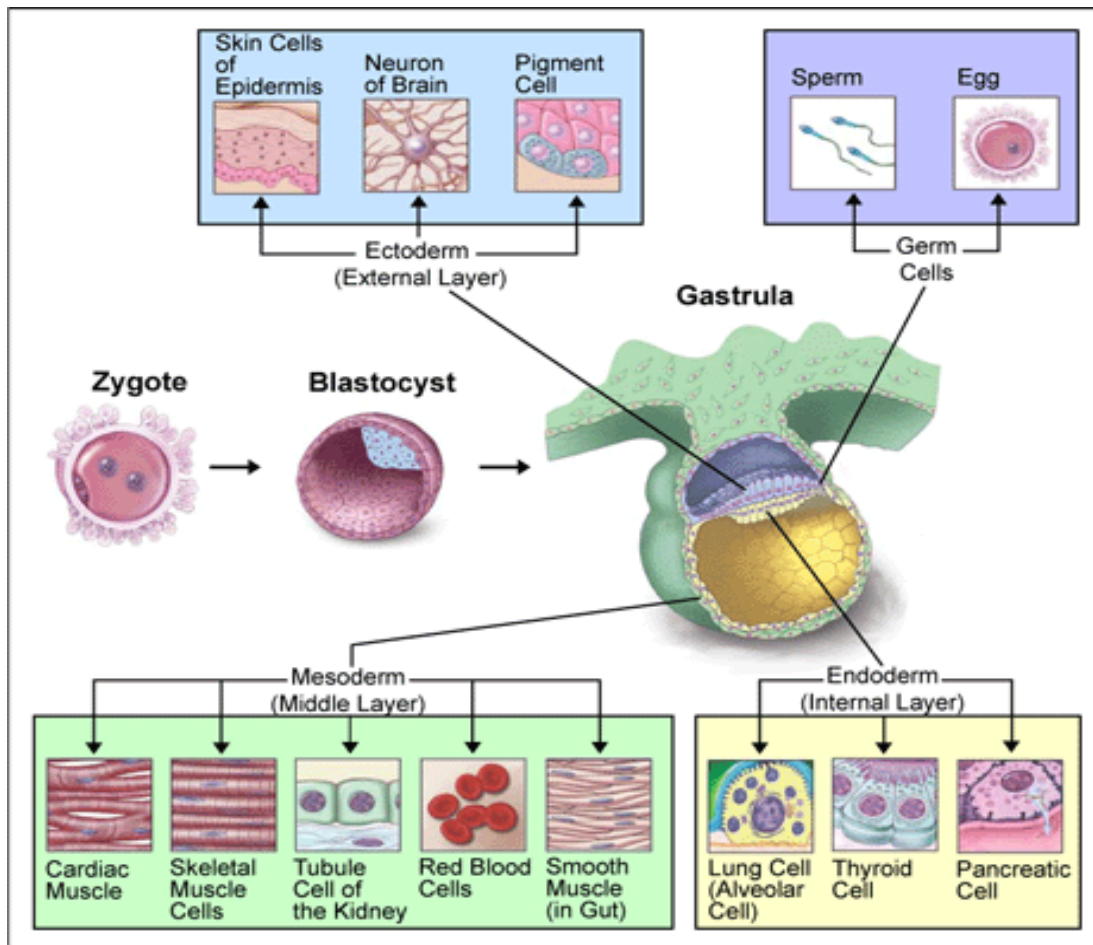
1.2 Bruk av cellekulturer som modellsystem

Det er flere forskjellige stamcellekulturer, som for eksempel Totipoten, som kan konstruere en komplett og levedyktig organisme, og disse cellene produseres fra sædceller eller egg fra livmoren (Tuch 2006).

Pluripotente stamceller er etterkommere fra totipotente stamceller og kan lage nesten alle typer celler (Tuch 2006).

I denne oppgaven ser vi på multipotente stamceller, nærmere bestemt Mesenchymale stamceller. Dette er celler i ett individ som kan danne utgangspunkt for andre eller mer spesialiserte celler (Tuch 2006). Ett eksempel på en multipotent stamcelle er hematopoietic celle, en blodstamcelle som kan bli til forskjellige blodceller, men kan ikke bli til f.eks hjerneceller eller andre typer celler (Tuch 2006).

Oligopotente stamceller kan kun bli til et fåtall celler slik som lymfoide eller myeloide stamceller, mens Unipotente stamceller kan bare reproducere seg selv (Tuch 2006). På figur 1.2 ser man en oversikt over eksempler på stamceller.



Figur 1.2: Skjematisk oversikt over de forskjellige stamcellene. Man ser at det endoderme laget blir til hud (epidermis), og nervesystemet (ectoderm) blir til det ytre laget i fordøyelsen og respirasjonssystemet. Det indre laget blir dannet til slutt, og består av bein, blod, muskler og vitale organer som hjeret og nyrer (Rowland 2009)

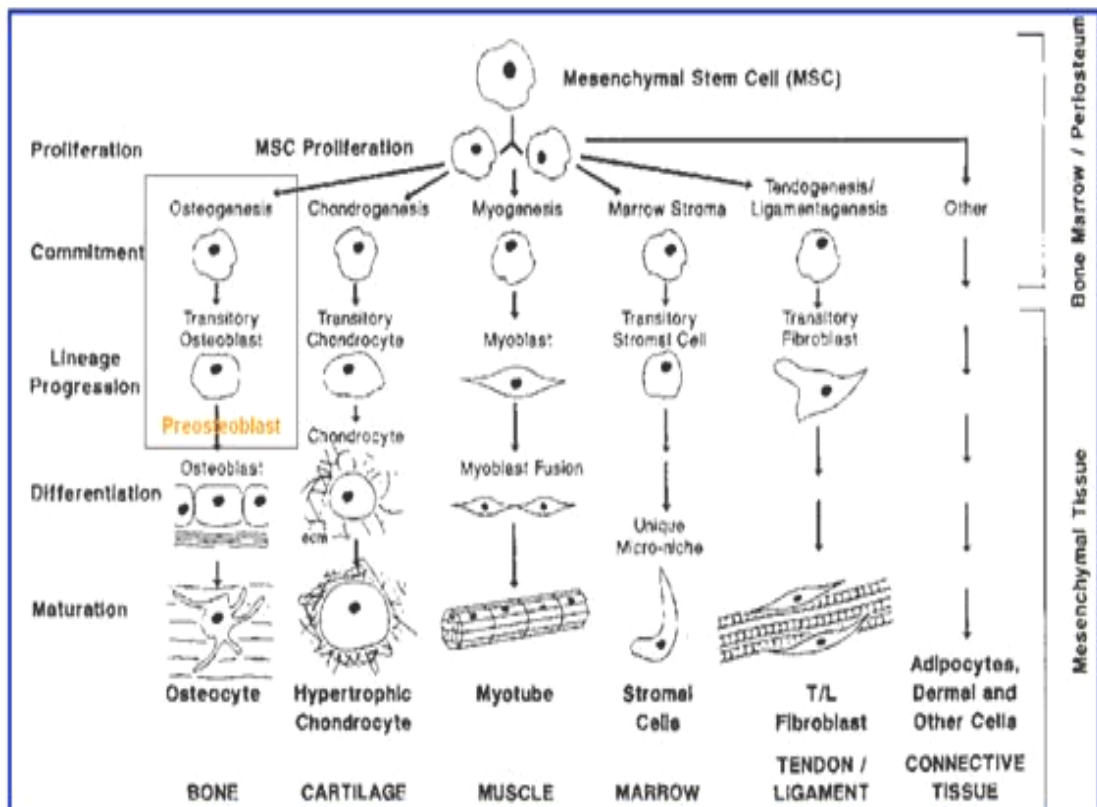
1.1.1 Mesenchymale stamceller

Mesenchymale stamceller er karakterisert ved en morfologi bestående av små, lange og tynne cellekropper, med få celleprosesser. Cellekroppen inneholder en stor, rund kjerne. Resten av cellekroppen består av Golgi apparat, rough endoplasmatisk retikulum, mitokondrie og polyribosomer (Brighton 1991). Mesenchymale stamceller har et stort potensial for celle-basert terapi. Dette fordi man kan isolere stamceller fra beinmarg og benytte disse for å lage nye friske blodceller. Før trodde forskerne at stamceller fra menneske kun laget en type celler, for eksempel at beinmarg kun laget blodceller og stamceller i hjernen kun laget nerveceller. Dette har vist seg å være feil da cellene har et større

potensial. Ut i fra mesenchymale stamceller kan flere ulike spesialceller dannes. For eksempel har de nå klart å isolere skjelettmuskel og vist at den kan gi opphav til blodceller (Bioteknologinemnda 09.04.2008).

Det er mange etiske spørsmål rundt stamcelleforskning. Mange mener det er mer akseptabelt å bruke stamceller fra et menneske enn stamceller fra et befruktet egg eller foster. Mange mener at det å bruke stamceller fra menneske kan sidestilles med blodoverføring eller transplantasjon av hjerte fra en frisk til en syk person. Skal man åpne for transplantasjon av vev fra fostre vil det for pasientens skyld være mest hensiktsmessig at man anvender vev fra fremprovoserte aborter. Man kan ikke bruke fostervev og celler til transplantasjon uten samtykke fra foreldrene til pasienten (Bioteknologinemnda 09.04.2008).

Ved bruk av multipotente stamceller blir man mindre fleksibel enn ved bruk av pluripotente stamceller. Dette er på grunn av en begrenset evne til å lage nye celler av forskjellig type og at det er vanskelig å få laget nok av dem i laboratorium for bruk i behandling (Bioteknologinemnda 09.04.2008). På figur 1.3 ser man en oversikt av hva mesenchymale stamceller kan bli til.



(Anold, Tissue Engineering, 2005)

Figur 1.3: en skjematisk oversikt over hvordan mesenchymale stamceller kan differensiere og hva de til slutt blir til (lab 2007).

Det er viktig å studere proteinuttrykk fra en celle og se på cellekulturer som modell. Dette for å forstå hvordan en celle er bygd opp og hvordan man kan utnytte disse egenskapene til videre forskning. Hvordan de ulike celletypene dannes, deler seg og til slutt dør er en del av det som kalles grunnforskning. Grunnforskning betyr å utvikle en metode som man kan bruke i medisin eller industri, hvor grensene ofte er flytende. Grunnforskning fører ofte til anvendt forskning.

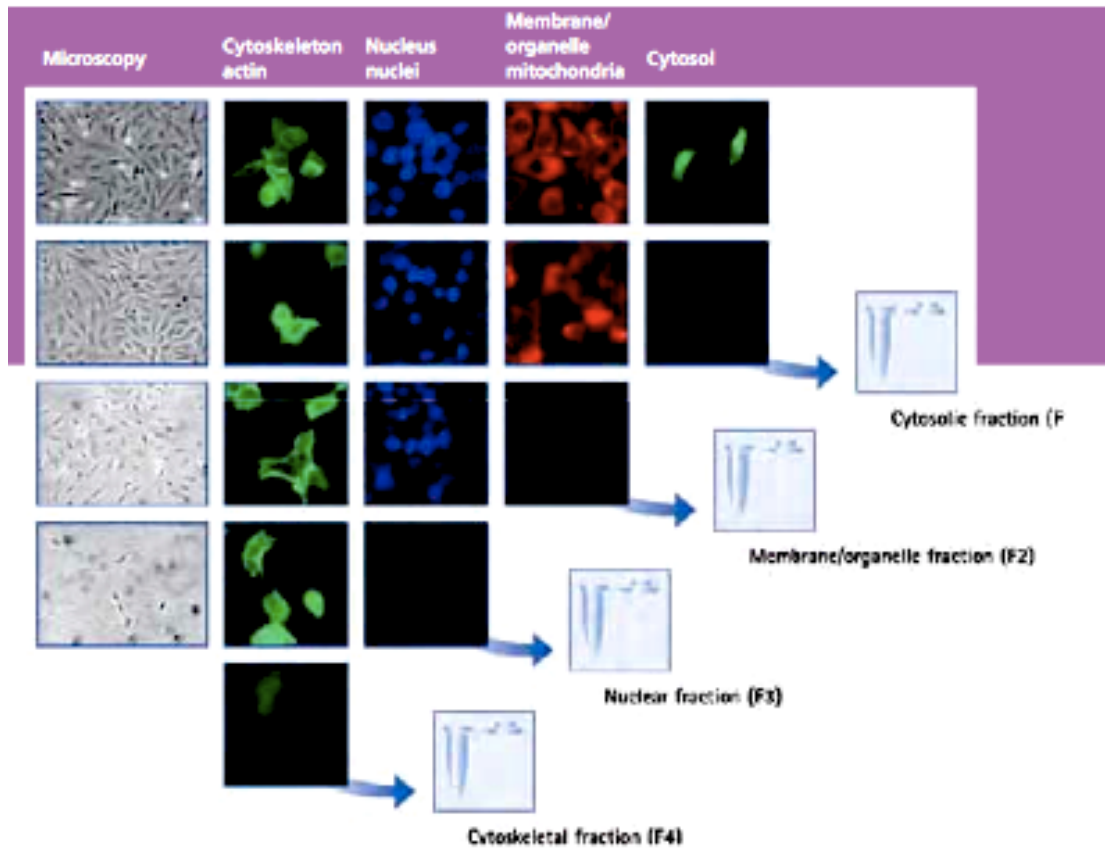
Kreft er en alvorlig sykdom som er forårsaket av unormal celleregulering. For å få til en behandlingsmetode er det nødvendig å drive med grunnforskning ved bruk av cellekulturer som modeller. Ofte i kreftforskning er stamceller brukt. Man må lære seg hvordan og hvorfor en celle deler seg og dør, både på normalt og unormalt vis. Det å bli kjent med mekanismen til en celler er viktig for å forstå hvorfor cellulære mekanismer blir aktivert og igjen forårsaker sykdommer.

Dette gjøres ved å se på proteinuttrykk fra cellene og ved å se på opp og nedregulering av proteinene.

Å se og forstå hvordan en celle er bygd opp er med på å hjelpe forskere til å finne nye metoder for å behandle sykdommer. Ved å fraksjonere en celle har man i dag mulighet til å studere proteinene i hver enkel fraksjon.

1.3 Subcellulær fraksjonering

Subcellulær fraksjonering av en celles proteom er viktig for å redusere kompleksiteten før denne analyseres kvalitativt og/eller kvantitativt. Dette er viktig fordi den dynamiske rekkevidden i proteomanalysestudier (proteomikk) ofte er en begrensende faktor. Subcellulær fraksjonering kombinert med proteomikk er ideelt for å studere proteiner i intracellulære organeller og komplekser bestående av mange forskjellige proteiner med lav konsentrasjon. Det er nødvendig å kunne fraksjonere proteinene slik at de lettere lar seg identifisere ved hjelp av for eksempel massespektrometri. Differensiell sentrifugering er et hovedprinsipp som er benyttet i subcellulær fraksjonering og ble utviklet av Albert Claude, Christian de Duve og deres kolleger i 1940 og 1950-årene. Deres metode går ut på å separerer cellekomponenter basert på størrelse og tetthet (Geoffrey M. Cooper c2009).



Figur 1.4: Skjematisk oversikt over ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction kitX

I denne oppgaven ble det brukt to forskjellige fraksjoneringsmetoder, ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit og manuell metode. Fraksjoneringskitet som ble benyttet som baserer seg på subcellulær inndeling av proteiner og blir forklart i avsnitt 3.6.2. Det finnes mange kommersielle kit som vi kan se i tabell 1. Her er det forskjell på hva de fraksjonerer og kostnadene for hvert kit. Den manuelle metoden som ble benyttet i oppgaven blir forklart i avsnitt 3.6.3 og er en metode som blir benyttet uten kit. Denne er relativt billigere enn hva et kit koster. Det er noe vanskelig å beregne ut akkurat hvilken pris man lander på for hver fraksjonering da alle bufferne blir laget i store kvanta. Men den ender uansett under hva det koster for å bruke et kit.

Tabell 1: Her er en oversikt over et utvalg av kommersielle kit samt manuell metode. Her ser vi hvilke fraksjoner hvert kit gjør, samt pris og hvor mange celler hvert kit trenger for å utføre fraksjoneringen.

Kit	ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit, Mini (calbiochem)	CNMCS Compartment Protein Isolation Kit (BioCat)	Mitochondria Isolation Kit for Tissue and Cells (BioCat)	Cell Fractionation and Separation Kits (promokine)	Manuell Metode	Cell Fractionation Kit – HT (mitoscience)
Fraksjoner	Cytosol, kjerne, membran and cytoskelett fraksjon	cytosol, kjerne, membran, og cytoskjelett fraksjon	mitokondrie, cytosol og kjerne fraksjon	mitokondrie, cytosol og kjerne fraksjon	Cytosol, kjerne, membran og mitokondrie fraksjon	cytosol, mitokondrie and kjerne fraksjon
Pris	1675,74	3118,96	2317,17	-	-	1147,22
Antall celler	3-5x10 ⁶	100 mill	1x10e10 – 5x10e10	2 x 10 ⁶	30x10 ⁶	3-5x10 ⁶

1.4 Seterettet mutagenese

En tradisjonell metode for å forstå biologisk funksjon er seterettet mutagenese på reagerende proteiner. Aminosyresekvensen for et spesifikt system isolert fra flere organismer sammenliknes for å identifisere konserverte motiver, hvilket antas å være svært viktig for aktiviteten til de studerte enzymer. I et seterettet mutagenese eksperiment blir en aminosyre i et konservert motiv enten byttet med en annen aminosyre, deletert eller en ekstra aminosyre blir addert. Et sett med samme type forsøk blir så utført på mutantentene samt villtype for å bestemme hva slags effekt mutasjonen har på proteinet. Et viktig trinn i en slik analyse er å kunne bekrefte at ønsket mutasjon faktisk har funnet sted i enzymet.

1.4.1 Kitinaser fra *Serratia marcescens*

Serratia marcescens er en av de mest studerte kitinolytiske (hydrolyse av biopolymeren kitin til kitobiose) bakteriene og tilhører familien *Enterobacteriaceae*. *S. marcescens* er en gram-negativ jordbakterie og kan produsere tre aktive kitinaser, et hjelpeenzym og en kitobiase med vekst på kitin og er en effektiv kitindegraderende bakterie (Fuchs, McPherson et al. 1986; Watanabe, Kimura et al. 1997) .

Kitinaser er delt inn i glykosyl hydrolase familiene 18 og 19. *S. marcescens* produserer de tre aktive kitinasene (ChiA, ChiB og ChiC) som tilhører familie 18 med en TIM-barrel fold som en viktig del av strukturen (figur 1.4) (Watanabe, Ito et al. 1994).

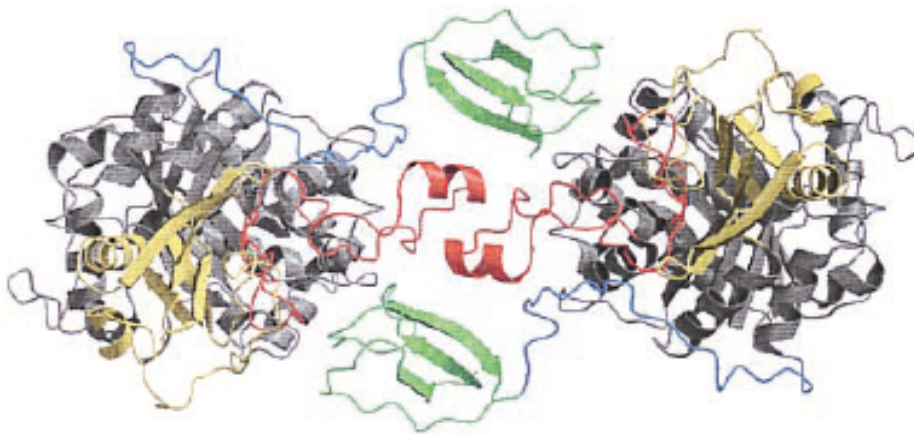
Det aktive sete er på toppen av det katalytiske domene av $(\alpha/\beta)_8$ -tønne.



Figur. 1.4: Figuren viser TIM-Barrel folden med innblikk inn i det aktive setet. Tønneformet sylinder bestående av åtte parallelle β -flak i midten (grønn) hvorav enden er C-terminal. Denne er Omringet av åtte α -helikser vist i rødt. Loopene i gult binder flakene og heliksene sammen (Wierenga 2001).

1.4.2 Kitinase B (ChiB)

ChiB er et ekso-enzym med tunnelliknende topologi, bestående av lang og dyp kløft i det aktive sete (van Aalten, Synstad et al. 2000). Kløften består av 55 Å med aromatiske residuer på overflaten fra det kitinbindende domene med Trp479 og Trp481 residuer til det aktive setet med katalytisk residu (Glu144). Det er en gjennomsnittslengde på 11 Å mellom hvert aromatisk residu. Dette tilsvarer lengden mellom ekvivalente atomer i den første og tredje *N*-acetylglukosamin (GlcNAc) i en trimer, (GlcNAc)₃. Lengden fra den katalytiske syren til Tyr481 tilsvarer en kitinlengde på 10 subsetter. Disse aromatiske residuene er foreslått å kunne bidra til en prosessiv hydrolyse av kitin (beskrevet mer i detalj senere). I kjernen til TIM-barrel er det konserverte aspartat og glutamat syrer (Asp 137, Asp 140, Asp 142 og Glu144). Disse residuene danner sekvensmotivet DxxDxDx, som er felles for familie 18 kitinaser (van Aalten, Synstad et al. 2000). Asp142 som deler hydrogenbinding med Asp 140 vil ved substratbinding rotere rundt og danne hydrogenbinding med Glu144, samt at Asp142 danner hydrogenbinding mot *N*-acetylgruppen (van Aalten, Komander et al. 2001).



Figur 1.5: Skjematisk bilde av regionene ChiB består av. Katalytisk domene som igjen består av en TIM-barrel fold (grå), et α/β -domene (gult) og en supportloop (rødt), deretter en linker (blå) og det kitinbindende domene (ChBD, grønt) (van Aalten, Synstad et al. 2000).

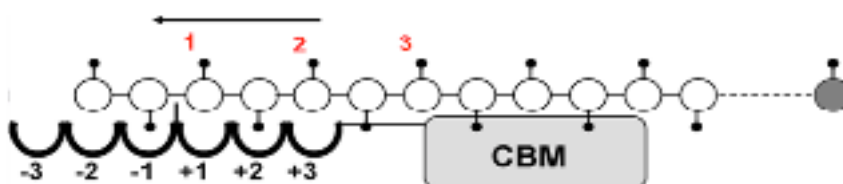
1.4.3 Prosessivitet hos ChiB

Prosessivitet betyr at enzymet forblir bundet til substratet under hydrolysen, og enkle karbohydratkjeder blir degradert til disakkarider i det katalytiske domenet. Uløselig kitin blir ikke reassosiert på grunn av sterk binding av substratet (Uchiyama, Katouno et al. 2001; Horn, Sikorski et al. 2006). Man antar at prosessiv degradering forbedrer katalytisk effektivitet på substratet fordi enkle polymerkjeder er forhindret fra å reassosiere med det uløselige materialet mellom katalytiske domener. Med dette reduseres antall ganger et enzym må utføre den ugunstige energiske prosessen for å få tilgang på en enkelt kjede (Rouvinen, Bergfors et al. 1990; Teeri 1997).

For at enzymer skal klassifiseres som prosessivt må enzymet være nært substratet mellom hydrolytiske reaksjoner (Davies and Henrissat 1995).

Å vite hvordan prosessivitet virker, er med på å utvikle mer effektive metoder for industriell enzymatisk nedbrytning av polysakkarider.

Det er tydelig at de aromatiske residuene på overflaten i kløfta i det aktive setet har en effekt på prosessiviteten til ChiB (Katouno, Taguchi et al. 2004; Horn, Sikorski et al. 2006), men man tror også at tunnel karakteren bidrar til prosessivitet. For ChiB, ble det observert en reduksjon i prosessivitet ved å mutere Trp97 i det aktive setet til en alanin (Horn, Sikorski et al. 2006). Sammenligner man med mutanten D316A ser man at dette ikke skjer. Prossisiv degradering gir disakkarider fordi hver av sukkerenhetene i kitin er rotert 180 ° i henhold til hverandre. Dette medfører at kun hvert andre sukkerenhet gi en produktiv binding i det aktive setet (figur 1.6).



Figur 1.6: Skjematisk bilde av ChiB i kompleks med en enkel kitinkjede. Her ser man hvordan prosessivitet vil danne partallsoligomerer når kjeden flyttes i pilens retning. CBM illustrerer det kitinbindende domenet (Horn, Sikorski et al. 2006).

1.5 Proteinanalyse ved MS

1.5.1 Proteomikk

Proteomikk er et relativt nytt begrep som først ble brukt i 1994 av Mark Wilkins (Wilkins 2009) og blir ofte definert som studien av alle proteiner som blir uttrykt fra genomet i en celle, et vev eller en organisme (Karp and Lilley 2007).

Proteomikk kan også bli definert som en kvantitativ og kvalitativ sammenligning av proteomer under forskjellige forhold (Hagenstein and Sewald 2006). Ett proteom blir definert som alle proteinene i en celle (Brändén and Tooze 1999).

Proteiner er byggesteiner i alle levende organismer og er involvert i nesten alle biologiske aktiviteter. Dette er avgjørende for struktur og funksjon hos alle levende celler og virus. Dette vil igjen medfører at proteomet til en celle er en rik kilde til biologisk informasjon.

Kvantitativ bestemmelse av proteinidentitet og kvantitativ måling av proteinuttrykk kan føre til gjennombrudd i blant annet kreftforskning, annen medisinsk forskning og diagnostisering av sykdommer (Bantscheff, Schirle et al. 2007).

Identifisering og kvantifisering av proteiner i et proteom skjer normalt ved at det foretas en kromatografisk separasjon (eksempler beskrives nedenfor) av proteiner før en kvalitativ og kvantitativ analyse utføres. I den kvalitative analysen benyttes det som oftest massespektrometri mens i den kvantitative analysen er det vanlig å bruke enten densimetri (bildeanalyse av to-dimensjonale geler) eller massespektrometri (beskrives nedenfor).

Det er generelt fire massespektrometriske kvantifiseringsmetoder som benytter seg av isotopmerking. Merkingen med stabile isotoper kan utføres på proteiner eller peptider og kan skje (1) metabolsk, (2) enzymatisk, (3) ved bruk av syntetiske peptidstandarder, eller (4) kjemisk (Bantscheff, Schirle et al. 2007)). Væskekromatografi (LC), massespektrometri (MS) blir omtalt senere i oppgaven sammen med SDS-PAGE.

For kvantifisering av proteiner finnes det i dag flere metoder, avhengig av hvilken organisme man bruker som modell og hva slags type proteiner man skal

studere. Stabil isotopisk merking av aminosyrer i cellekultur (SILAC) er en mye brukt metode for relativ kvantifisering. Relativ kvantifisering vil si at man ser på proteinuttrykket i en stimulert cellekultur i forhold til en ustimulert, uten at man har absolutte konsentrasjoner. AQUA (Absolutt kvantifisering av proteiner), i motsetning til SILAC, ICAT (Isotope coded affinity tag) og iTRAQ (Isobaric tag for relative and absolute quantifikation) ser på den absolutte mengden protein i en prøve. Absolutt kvantifisering kan utføres ved at det tilsettes en kjent mengde stabilt isotopmerket standardpeptid til trypsinbehandlede peptider for så å sammenligne MS-signal relativt til det endogene peptidet i prøven. Dette skjer kun for et utvalg av peptider (Bantscheff, Schirle et al. 2007).

En annen kvantitative metode for proteomikkstudie er densitometrisk sammenligning av 2 dimensjonale geler (2D-gel).

Massespektrometri er ett uvurderlig hjelpemiddel innen kvantitativ analyse av proteiner og peptider. Massespektrometri har vært revolusjonerende ved at det har muliggjort analyse av to eksperimentelt ulike tilstander.

1.5.2 Separasjonsmetoder

Når proteomikkmetode er valgt må behovet for fraksjonering av prøven vurderes. Om et protein har høyere konsentrasjon enn andre proteiner i prøven kan dette proteinet dominere og maskere peptider fra andre proteiner i massespektrumet. Dette kalles dynamisk rekkevidde. Det er derfor viktig å redusere prøvens kompleksitet ved å sørge for at god peptidseparasjon utføres ved hjelp av fraksjoneringsmetoder. Det er et stort utvalg av fraksjoneringsmetoder, alle med sine ulemper og fordeler. Når man skal velge den beste metoden må man se på den vitenskapelige problemstillingen, prøvemateriale og tilgjengelig utstyr, samt renheten, kompleksiteten og konsentrasjonen til analytten (Kolch, Mischak et al. 2005).

1.5.2.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

High Performance Liquid Chromatography, HPLC, er en teknikk innen analytisk kjemi som separerer ulike kjemiske analytter. Væskekromatografi koblet til massespektrometri (LC-MS) er et vanlig oppsett innen analyse og baserer seg på

separasjon av analytt. Separasjonen er avhengig av egenskaper som blant annet ladning, størrelse og affinitet. Mobilfasen som inneholder analytt beveger seg gjennom stasjonærfasen (Wibetoe 2010). Mobilfasen er enten en gass eller væske, mens stasjonærfasen ofte er en viskøs væske bundet til innsiden av et kapillarrør eller på overflaten i en pakket kolonne. Dersom analytten har en større affinitet for stasjonærfasen enn mobilfasen, vil den binde seg til stasjonærfasen og bevege seg saktere enn forbindelser som har høy affinitet til mobilfasen. Sterkt bundne forbindelser blir frigjort fra stasjonærfasen ved å endre fysiske og/eller kjemiske egenskaper ved mobilfasen. Kromatografi defineres som en fysisk separasjonsmetode der komponentene blir fordelt og separert mellom to faser (Ahuja 2003). Kromatografi blir delt inn i ulike kategorier basert på interaksjonene løsningen har med stasjonærfasen. I reversfase kromatografi blir det benyttet en kolonne med en stasjonærfase som er mindre polar enn mobilfasen. Mellom mobilfasen og løsningen skjer det uspesifikke hydrofobe interaksjonen som gjør at retensjonen av analytt finner sted (Ahuja 2003).

I HPLC-analyser er det vanlig med en pumpe, mens for nano HPLC er det essensielt med to pumper. Kapillærpumpen fører prøven inn i en oppkonsentreringskolonne, og deretter overføres den til reversfasekolonnen ved hjelp av nanopumpen. Prøvene blir ført gjennom en kolonne under høyt trykk ved hjelp av pumpen som er knyttet til systemet. Forskjellige komponenter vil bruke forskjellig tid gjennom kolonnen da de fleste organiske molekyler har hydrofobe deler. Dette betyr at disse vil effektivt kunne danne intraksjoner med stasjonærfasen og dermed få lengre retensjonstid. Når dette instrumentet kobles til MS med en inlet av for eksempel ESI, som gjør at væsken fra HPLC går over i gassfase, kan man analysere direkte på MS/MS (Hekmat, He et al. 2008). LC (kapillær) separerer de enkelte peptidene etter deres kjemiske egenskaper. Peptid fra tryptinhydrolyse av protein har Arg eller Lys C-terminalt og blir protonert, men et enkeltladet peptid gir ikke mye sekvensinformasjon selv om det fragmenteres i kollisjonscellen (Pratt, Simpson et al. 2006).

1.5.2.2 Ionebyttekromatografi

Ionebytterkromatografi er en instrumentell analysemetode for separasjon av anioner og kationer samt andre ioniserbare forbindelser (Wibetoe 2010). I ionebyttekromatografi er retensjonen basert på tiltrekning mellom analytt og ladede seter bundet til stasjonærfasen. Et kationebytter bytter ut positive ioner med negative ioner, og en anionebytter bytter ut negative ioner med positive ioner. Kationebytter har kovalent bundne, negativt ladede seter som tiltrekker seg kationer i løsning, mens en anionebytter har utbyttbare anioner og kan benyttes til å separere anioner (Wibetoe 2010).

1.5.2.3 Tekniske vurderinger og utfordringer med LC-ESI-MS/MS

LC-ESI-MS/MS er et komplekst og sensitivt system som lett klogger kolonnene om ikke analyttet blir rensert før bruk. For å hindre at systemet skal tette og at lekkasjer oppstår blir prøvene separert på SDS-PAGE før MS-analysen. For å forhindre at eventuelle gel rester skal komme inn i systemet brukes det i vår prosedyre gel loader tips med C-18 kolonnematriale for å avsalte prøvene (Conrotto and Hellman 2008). Spissen på en gel loader tip er smalere enn kapillærkolonnene og reduserer derfor sannsynligheten for at gelbiter er tilstede.

1.5.2.4 Identifisering av proteiner

Identifisering av et protein baserer seg på å sammenstille massene til peptidene eller peptidfragmentene med kjente fragmenteringsmønstre i en database. Gode databaser er en nødvendighet for å tolke slike MS-data. Kvaliteten på proteinidentifiseringen øker med nøyaktigheten til massemålingene og antallet detekterte peptider som tilhører samme protein (Siuzsak 2003).

For at proteiner skal kunne identifiseres må proteinene vanligvis behandles med et enzym for å fragmentere proteiner til peptider. Trypsin er det vanligste som anvendes og dette enzymet kutter C-terminalt for aminosyrene arginin og lysin (avsnitt 3.9).

Peptider plukker ofte opp et eller to protoner i kollisjonscella, disse kan plassere seg på ulike steder i peptidet. Hvor protonet plasserer seg, styrer

fragmenteringen. Resultatet blir at man får mange ulike fragment. Samlet kan dette gi nok informasjon til hel eller delvis sekvensering av peptidet (Pratt, Simpson et al. 2006). I tillegg er bioinformatikk og dataanalyse viktig, slik at man får enda sikrere proteindentifikasjoner.

For å kontrollere at syntesen av peptidene er riktig ser man etter posttranslasjonelle modifikasjoner (PTM) av peptidet og man kan identifisere protein ved at proteinet ekstraheres fra 2D-gel. Proteinene hydrolyseres ved hjelp av et "site spesifikk" enzym (ofte trypsin) og m/z verdien av de enkelte peptider måles ved hjelp av MS. Peptide Mass Fingerprinting (PMF) spekteret kan gi oss rett identifisering av proteinet (Lahm and Langen 2000).

1.5.3 Massespektrometri (MS)

Massespektrometer er et kjemisk analyseinstrument hvor molekyler blir gitt elektrisk ladning og brutt opp i fragmenter. De dannede ionene separeres så etter forskjellig m/z verdi og registreres i detektoren. Massespektrometer benyttes for å bestemme atomers og molekylers masse, strykturbestemme organismer og molekyler, identifisere kjemiske forbindelser samt å finne konsentrasjonen av grunnstoffer, isotoper og kjemiske forbindelser.

Massespektrometri er en teknikk som benyttes til mange ulike typer analyser som identifikasjon av oligonukleotider, sekvensering av peptider og analyser av komplekse sukkerforbindelser (Siuzdak 1994). Massespektrometere gjør det mulig å måle molekylvekten til en ladet forbindelse i komplekse blandinger, samt analysere forbindelser med lav konsentrasjon. Om man kobler massespektrometeret med væskekromatografi, kan man analysere forbindelser uten tidkrevende renseprosedyrer (Siuzsak 2003).

Et massespektrometer består av inlet, ionekilde, masseseparator og detektor. Det finnes forskjellige inlets i MS; gasskromatografi (GC), High Performance Liquid Chromatography (HPLC), direkte innføring og Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) plater. De mest brukte ionekildene er EI, MALDI, CI og Electro Spray Ionisering (ESI). Peptider og proteiner kan observeres på

attomol nivå etter at ioniseringen (analytten protoneres) har funnet sted (Siuzsak 2003).

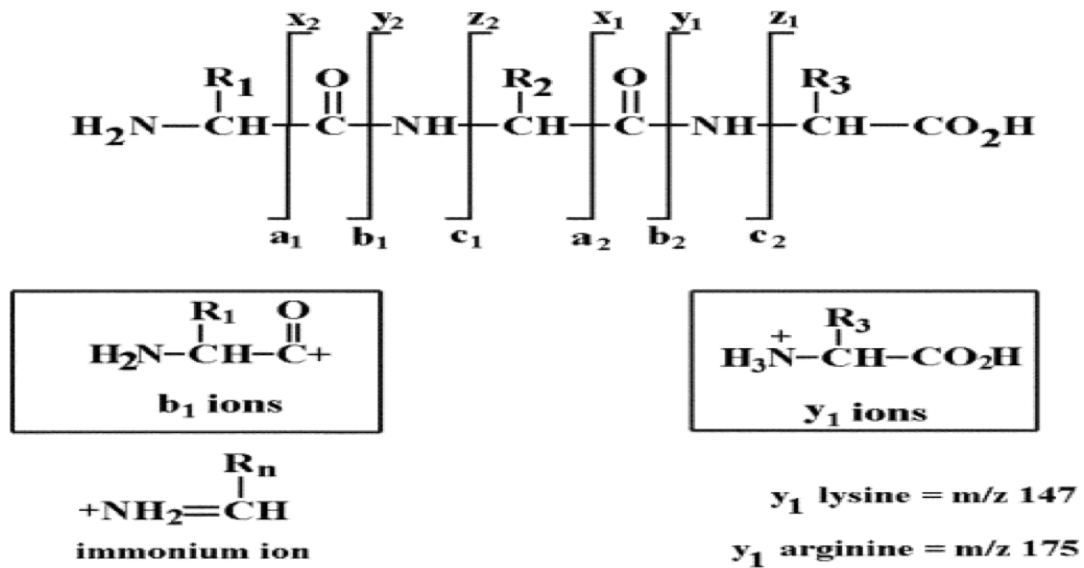
Ionene blir skilt på masse delt på ladning (m/z). Ionene kan bli separert i et magnetfelt, en quadropol, eller Time Of Flight (TOF)(avsnitt 1.5.4.3) (Want, Cravatt et al. 2005). Der hvor prøvene er veldig komplekse kan ytterligere fraksjonering være nødvendig før massespektrometri utføres. Her er det flere faktorer som spiller inn, blant annet hvilken ioniseringsteknikk som benyttes, kompleksiteten til prøven og sensitiviteten til instrumentet.

1.5.3.1 Tandem massespektrometri (MS/MS)

Tandem MS (MS/MS) består av flere massespektrometer etter hverandre. Mellom hver nye massespektrometer er det en eller annen form for fragmentering som skjer (Ashcroft 2003).

Tandem MS er en måte å få videre fraksjonering av peptidioner og dette kan skje for eksempel ved å bruke kollisjonsindusert dissosiasjon (CID). Dette er en prosess der foreldreionet blir videre fragmentert etter kollisjon med nøytrale atomer eller molekyler. Gassmolekyler som argon, helium eller nitrogen kolliderer med foreldreionene og danner datterioner som blir analysert i det siste massespektrometeret (Ashcroft 2003).

Fragmentering av peptidet gir opphav til peptidfragmenter (a, b og c) fra N-terminal og X, Y og Z ved fragmentering fra C-terminalen (figur 1.7). Det er bindingsbrudd som gir opphavet til X, Y og Z ionene (Ashcroft 2003).



Figur 1.7 Skjematisk framstilling av peptidfragmentering, hvor a, b og c har ladningen i N-terminal enden mens y, x, z fragmentene har bevart ladningen i C-terminal enden (Ashcroft 2003).

1.5.4 Ioniseringskilder

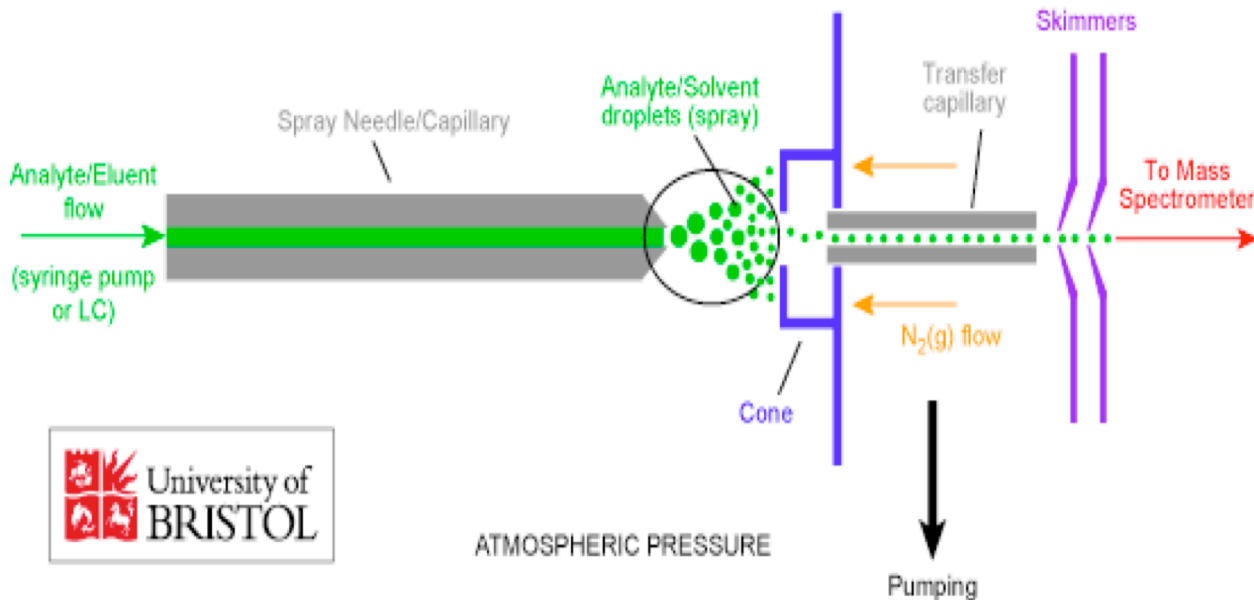
1.5.4.1 Elektrospray ionisering

Ioniseringsmetodene ESI og MALDI har gitt nye muligheter til å få kunnskap om peptider og proteiner ved å lage ioner. Begge metodene gir muligheten til å finne molekylvekt av intakte peptider, noe som tidligere har vært veldig vanskelig å få til. Dette vil si at man for eksempel kan kontrollere om vi har rett produkt ved syntese av peptider.

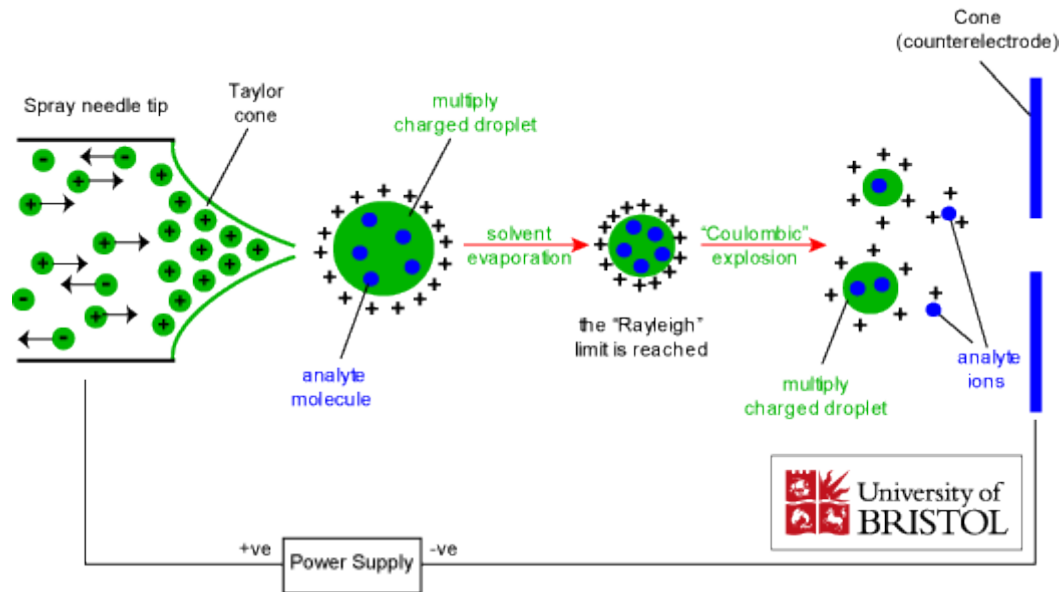
ESI er godt egnet til analyser av komplekse proteinblandinger (Siuzsak 2003). ESI produserer ioner i gassform fra en prøveløsning. Et elektrisk felt tilføres en emitter som sørger for en stråle med ladede dråper, og potensialet holdes mellom 700 V til 5000 V for å opprettholde en egnet stråle. Tørkegass og varme blir tilført dråpene ved atmosfærisk trykk, slik at løsningsmiddelet fordamper.

Elektrospray ionisering kan produsere peptider med enkle og multiple ladninger. Multiple ladninger gjør det mulig å observere store molekyler med masseanalytatorer som detekterer lavere m/z forhold som kvadrupol og

ionefelle (Ashcroft 2003). Den største ulempen med denne teknikken er at lite fragmentering skjer, men dette er også den største fordelen, ellers kunne man ikke analysert intakte proteiner/peptider (Gates 2005). På figur 1.8 og 1.9 ser man en framstilling av elektrospray ionisering.



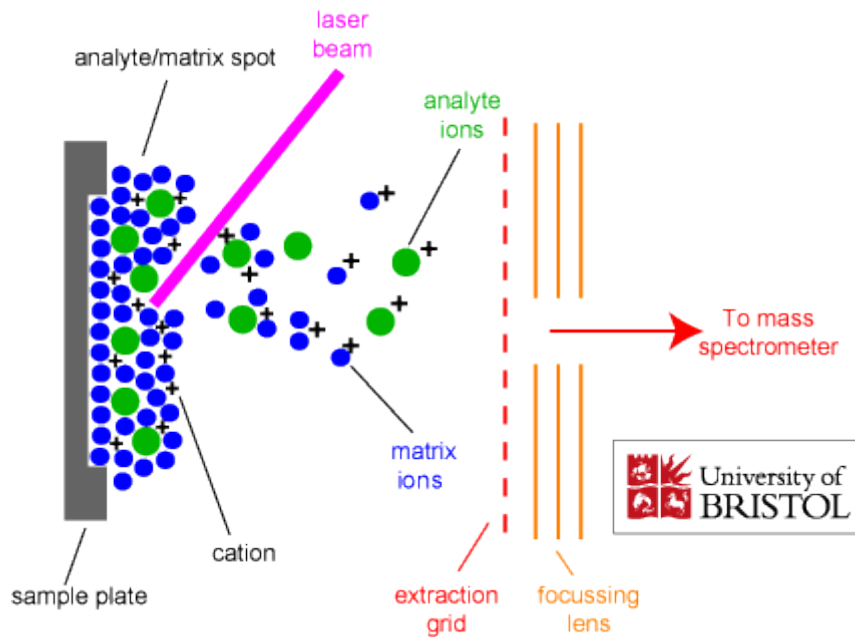
Figur 1.8 En prinsippskisse over elektrospray ionisering. Analytten blir introdusert ved hjelp av en pumpe eller ved innsprøyting fra for eksempel væskrokromatografi. Analytten passerer så gjennom elektrospraynålen (emitteren), der det legges en spenning over conen i ionekilden. Om det skjer en liten eller omfattende fragmentering av analytten mens den fremdeles er i ionekilden er avhengig av spenningen. Det er ingen standardverdi for hvor stor spenningen skal være, dette er fordi en gitt spenning kan gi mye fragmentering på en komponent og liten grad av fragmentering på den neste. Dråpene støtes fra nålen og mot "sampling cone" på den andre elektroden. Når dråpene kommer ut fra nålen blir de mindre, de fordampes (innringet på figuren). Dette sees bedre i figur 1.9 (Gates 2005).



Figur 1.9 skjematisk oversikt over mekanismen til en elektrospy ionisering. Når løsningen fordamper, krymper dråpen helt til den når en slik overflatespenning som ikke lenger klarer å holde dråpen. Den opprinnelige dråpen blir så delt opp i mindre dråper. Dette skjer helt til de blir til enkeltladede analytt ioner (Gates 2005).

1.5.4.2 Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)

Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) er en laserbasert "soft" ioniseringsmetode hvor man mikser analytten med matriks. Energien fra laseren absorberes slik at proteinene og peptidene i prøven ikke skal gå tapt. Matriksen hjelper analytten over i ionisk tilstand. En typisk matriks er en aromatisk syre med kromofor som har stor adsorpsjon av lys av den aktuelle bølgelengden fra laseren. MALDI gir generelt enkeltladede ioner for peptider (Lahm and Langen 2000). På figur 1.10 ser man en skjematisk oversikt over MALDI.



Figur 1.10 Skjematisk oversikt over mekanismen til MALDI. Laseren treffer overflaten til prøven, molekylene og ionene blir "slått" løs fra matriksen og energien blir gjort om til kinetisk energi, molekylene går vekk og ionene blir dradd mot massespektrometret på grunn av trykk forskjell og spenningsforskjell på platen som gjør at ionene blir "skutt" mot analysatoren. Analytten går over i ionisk tilstand (Gates 2005).

MALDI blir ofte brukt sammen med analysatoren Time Of Flight, (TOF).

1.5.4.3 Time Of Flight (TOF)

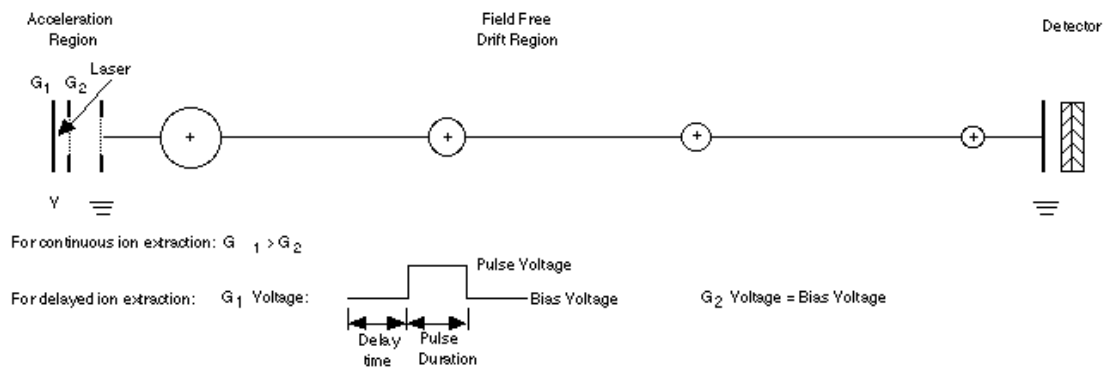
Prinsippet for Time Of Flight (TOF) er at ioner av ulik masse blir tilført samme kinetiske energi. Ionene akselerer ved hjelp av spenning inn i et "rør" uten noe elektrisk felt. Små molekyler vil "fly" hurtig, mens større molekyler vil "fly" langsommere. Ved å måle tid fra start til ionene når detektoren, kan m/z beregnes (Ashcroft 2003). TOF benyttes ofte i forbindelse med MALDI fordi det er en analysator som egner seg godt til pulsionisering (Ashcroft 2003).

Det er to ulike hovedtyper TOF, lineær TOF og reflektron TOF. Skjematisk framstilling av både reflektron TOF og lineær TOF vises i figur 1.11.

Et reflektron gir bedre oppløsning både på grunn av lengre flyvestrekning og at tyngre m/z trenger lengre ned i "speilet". Det er generelt god oppløsning på TOF,

og alt av ioner som produseres i ionekilden kommer fram til detektoren (med andre ord kommer alle ioner frem til detektor samtidig i motsetning til for eksempel ESI-trap), og det er et brukervennlig instrument (Ashcroft 2003).

Linear TOF mass spectrometer



Reflecting TOF mass spectrometer

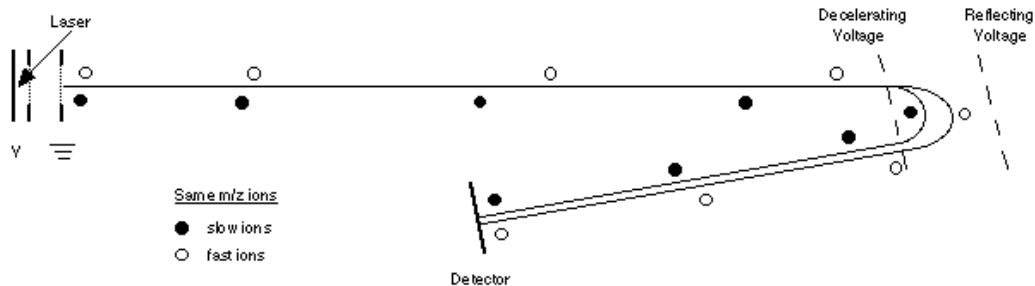


Figure 1. Basic components of a linear (upper) and reflecting (lower) TOF mass spectrometer.

Figur 1.11 Skjematisk fremstilling av mekanismen til en lineær TOF og en reflekton TOF (Lennon 1997). Ioner av ulik masse blir tilført samme kinetiske energi. Disse akselererer inn i et "rør" uten elektrisk felt, der de små molekylene flyr hurtig mens større molekyl flyr langsomt mot detektoren. Ved å måle tid fra start til de når detektoren kan man beregne m/z . En reflekton gir bedre oppløsning pga lengre flyvestrekning og at tyngre m/z trenger lengre ned i selve "speilet".

1.5.4.4 Kjemisk merking

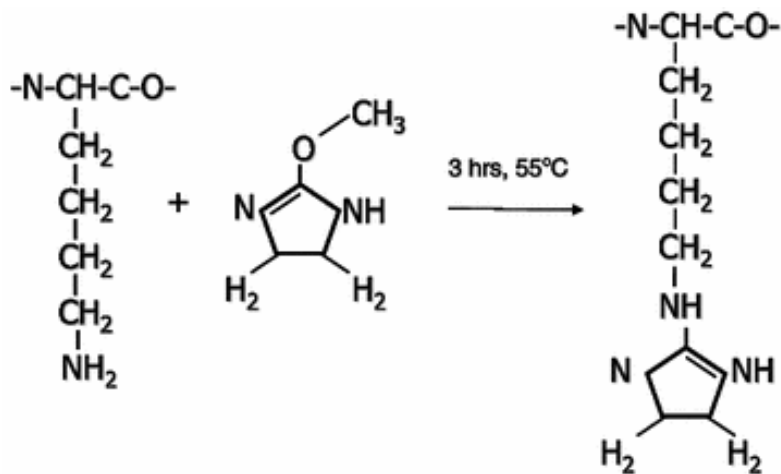
I denne oppgaven ble det brukt SPITC og Lys-Yag som kjemiske derivatiserings metoder for å identifisere proteiner.

På figur 1.12 og 1.13 ser vi ligningen til reaksjonene (Joss, Molloy et al. 2006). SPITC er en bedre derivatiserings metode da det blir identifisert flere proteiner enn ved bruk av Lys-Tag (Joss, Molloy et al. 2006). SPITC er en metode som har lav kostnad per eksperiment. SPITC reagerer både lysine og arginin bestemte peptider og dette resulterer i et enda mer forenklet MS/MS spekter i forhold til Lys-Tag.

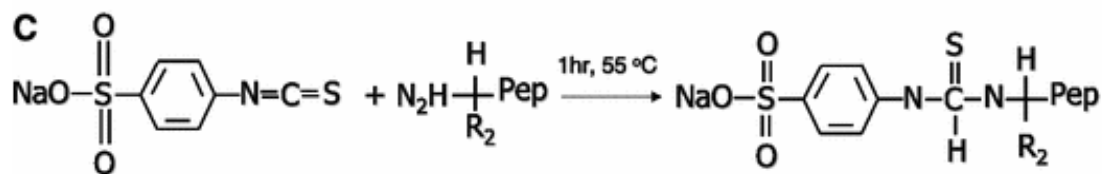
Kjemisk modifisering forbedrer signalene fra lysin-bestemte peptider og kan brukes som lysine-blokker i kombinasjon med andre derivatiseringsteknikker. Peptidfragmentering danner en serie med overveiende y-ioner. Dette gjør at bestemmelsen av umiskjennelige aminosyresekvenser er mulig (Conrotto and Hellman 2008).

Disse derivatiseringsteknikkene forbedrer ioniseringen av peptider som inneholder lysin og bedrer y-ion seieformasjonen. Om man skulle sammenligne med arginine bestemte peptider er lysin bestemte peptider typisk underrepresentert i masse spekter samlet fra proteinenzymatisk nedbryting med trypsin. Dette er noe som kjennetegner de mer stabile egenskapene til arginin side kjeden som er godt representert i et masse spekter (Joss, Molloy et al. 2006).

Lys Tag forbedrer MALDI signalenes intensitet av peptider som inneholder lysin. Imidazole reagent lokaliserer ladningen på C-terminale enden av det peptide som resulterer i en klar forbedring av y-serie ionene. Lys Tag reagerer ikke med arginin peptidene (Conrotto and Hellman 2008).



Figur 1.12 Ligning av Lys-Tag derivatisering. Der Lys-Tag 4H reaksjonen går ved å bruke 3-sulfo propionic acid anhydride, som gjør at peptidet får en høyere masse tilsvarende +68 Da (Joss, Molloy et al. 2006).



Figur 1.13 Ligning av sulfonation av N-terminale enden ved bruk av 4-sulfophenyl isothiocyabbate (SPITC) og den legger til en masse på + 215 Da (Joss, Molloy et al. 2006).

1.6 Mål med oppgaven

Målet med oppgaven er å teste ulike prosedyrer for fraksjonering av celler.

Ved å identifisere og kvantifisere proteinuttrykk ved hjelp av LC-MS som metode kan man bestemme fraksjoneringseffektiviteten av hver enkelt fraksjoneringsmetode.

En annen oppgave var å utvikle en metode for å kontrollere at seterettet mutagenese blir riktig utført. Ved hjelp av MS ble kontrollen om riktig utførelse gjort.

2. MATERIALER

2.1 Laborieutstyr og instrumenter

2.1.1 Laborieutstyr

Laborieutstyr	Leverandør
Automatpipetter, Finn pipetter	ThermoLabsystems
Eppendorfrør	Axygen
GELoader Tips	Eppendorf
Gelavbildingsutstyr	Bio-Rad
NuPAGE SDS geler+ buffer	Invitrogen
PCR Tubes	Axygen
pH-meter	Mettler toledo
pipettespisser	VWR
Eppendorfrør	Axygen
Sentrifugerør til Avanti (500 mL)	Nslgene
Sprøyte. Plastipak 1,5 og 50 mL	DB
Sterilfilter, -til sprøyte 0,22 µm	Millipore
Sterilfilter, -til vacuum 0,22 µm	Millipore

2.1.2 Instrumenter

Instrument	Leverandør
HPLC	Agilent
MALDI-TOF	Bruker Daltonics
MS	Bruker Daltonics
Speed – Vac (vakuum manifold)	Heto
Sentrifuge;tilhørende rotor JA10	Beckman
Sonikatorbad (Transonic 460/H)	Elma
Steilskap AV-100	Telstar

Vannbad	SWB
Vannbad	Stucla Scientific
Vekt	Sartorius
Vortex	Scientific industries
Xcell SureLock™ Mini-Cell: A. Strømforsyning B. Veggplate til indre bufferkammer - Beholder, ytre bufferkammer - Senterstykke med elektroder - Mini-Cell lokk - Gelkniv	Invitrogen

2.1.3 Programvare til dataanalyse

Programvare	Leverandør
Biotoools (versjon 3.2)	Bruker Daltonics
FlexAnalysis (versjon 3.3)	Bruker Daltonics
Mascot Server (versjon 2.2)	Bruker Daltonics
Esquire Control (versjon 5.3)	Bruker Daltonics
DataAnalysis (versjon 4.0)	Agilent

2.2 Kjemikalier

2.2.1 Kjemikalier

Kjemikalier	Leverandør
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonsyre (HEPES), C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	Sigma
β-Mercaptoethanol C ₂ H ₆ OS	Fluka Biochemica
BSA	Biolabs inc new england
Aceton, C ₃ H ₆ O	Merck
Acetonitril, CH ₃ CN	Merck
Ammonium Bikarbonat, CH ₅ NO ₃	Fluka Biochemica
Ampicillim, natriumsalt, C ₁₆ H ₁₈ N ₃ NaO ₄ S	Sigma
Bacto™ Yeast Extract	BD
Bact™ Tryptone	BD
Carbodihydrazide, H ₂ NNHCONHNH ₂	Aldrich
Coomassie Brilliant Blue R250	Bio Rad
Dithiothreitol (DTT)	Sigma

2. MATERIALER

Eddiksyre, C ₂ H ₄ O ₂	Merck
EGTA	Sigma
Etanol, C ₂ H ₅ OH	Riedel de Hæn
Etylendiamintetraeddiksyre, [CH ₂ N(CH ₂ CO ₂ H) ₂] ₂ (EDTA)	J.Baker
HEPES	Sigma
Glyserol, C ₃ H ₅ O ₃	Merck
Glycin, C ₂ H ₅ NO ₂	Merck
Imidazole, C ₃ H ₄ N ₂	Sigma
Iodoacetamid (IAA)	Riedel de Hæn
Isopropyl-1-thio-β-D-thiogalacopyranoside (IPTG), C ₉ H ₁₈ O ₅ S	Sigma
Kaliumhydrogenphosphat KH ₂ PO ₄	Applichem Biochemica
Kaliumklorid KCl	VWR
L-Cystein, C ₃ H ₇ N ₂ O ₂ S	Sigma
Magnesiumklorid, MgCl ₂	Sigma
Maursyre, HCOOH	Riedel de Hæn
Metanol, CH ₃ OH	Riedel de Hæn
Natriumacetat, CH ₂ CO ₂ Na	Sigma
Natriumfosfat, Na ₂ HPO ₄	Sigma
Natriumhydroksid, NaOH	Merck
Natriumklorid, NaCl	VWR
Pefabloc C ₂ H ₄ O ₂	Sigma
Phosphate buffered saline (PBS)	PAA; The cell culture company
Phenylmetylsulfonyl fluorid (PMSF)	Sigma
Saltsyre, HCl	Riedel-del-Haen
Sinapinic acid	Bruker Dattonics

2. MATERIALER

Sodium Chloride	vwr
Sodium dodecyl sulphate (SDS), C ₁₂ H ₂₅ O ₄ SNa	AppliChem
Sukrode, C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	VWR
Sukrose	Merck
TEMED	Bio Rad
Trifluoreddiksyre(TFA), C ₂ HF ₃ O ₂	Sigma
Trizma base, Tris (hydroxymethyl) C ₄ H ₁₁ NO ₃	Sigma
Tris	sigma
Tris-HCl, C ₄ H ₁₁ NO ₃ x HCl	Sigma

2.2.2 Proteinløsninger og enzymer

Proteinløsninger	Leverandør
Benchmark™ Protein Ladder	Invitrogen
Bovine Serum Albumin (BSA) purified 100x, 10 mg/mL	New England BioLabs. Inc

Enzymer	Leverandør
Trypsin, sequencing grade, #Lot252746	Promega

2.3 Medier

Medium	Innhold
LB-medium	18g Trypton 9g Gjærekstrakt 18g NaCl

2.4 Cellelinje

Cellelinje	Leverandør
Tert	Tor Lea

2.5 Kit

Kit	Innhold	Leverandør
ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction kit, Mini	Vaskebuffer Ekstraksjonsbuffer I Ekstraksjonsbuffer II Ekstraksjonsbuffer III Ekstraksjonsbuffer IV Proteasehemmer Benzonase® Nuklease	Calbiochem/ Novagen

2.6 Buffere og løsninger

Buffer/ løsning	Innhold
Avfargingsløsning for SDS-PAGE	10% (v/v) 31ethanol 10% (v/v) eddiksyre
Bindings buffer (natriumfosfat buffet)	Tot volum 500ml 193,73ml monobasisk 56,25 ml dibasisk 250ml dH ₂ O
Eluerings buffer	575 µl 100% eddiksyre 500ml dH ₂ O
Coomassie Brilliant Blue fargeløsning	0,1% Coomassie Brilliant Blue 10% (v/v) metanol 10% (v/v) eddiksyre
Ekstraksjons buffer	1:2 v/v 5% formic acid/ACN
MB-buffer	Per 100 ml dH ₂ O: 13,7g Sukrose 5ml Tris 400µl EGTA 40µl β-ME 2ml KH ₂ PO ₄ (7,6%) 0,2g BSA

2. MATERIALER

MSM-buffer	Per 100 ml dH ₂ O: 2ml KH ₂ PO ₄ (7,2%) 100µl Mannitol 0,1g BSA
NB-buffer	Per 100 ml dH ₂ O: 1ml HEPES 1ml KCl 0,2ml MgCl ₂ 100µl DTT 1ml Pefablock
SA-buffer	Per 100 ml dH ₂ O: 55,77g Sukrose 2ml KH ₂ PO ₄ (7,5%) 0,1g BSA
SB-buffer	Per 100 ml dH ₂ O: 41,1g Sukrose 2ml KH ₂ PO ₄ (7,5%) 0,1g BSA
Spheroplastbuffer	200 µl EDTA 20 ml Tris/HCl pH 8,0 34,2g sucrose 200µl PMSF 200ml dH ₂ O
Matrix til MALDI	Sinapinic acid mettet løsning i EtOH
Matrix til MALDI	Sinapinic acid mettet i TA30
TA30	30% ACN (100%) 70% TFA (0,1%)
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	90,75 g Tris-base Opp til 500 ml med dH ₂ O pH-justert med HCl
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	30 g Tris -base 500 ml dH ₂ O pH-justert med HCl

3. METODER

3.1 Dyrking av proteiner

Materialer:

Ampicillin 50 µg/mL

LB-medium, pH 7: 18 g Trypton
 9 g Gjærekstrakt
 18 g NaCl 1 L dH₂O

6 Erlenmeyer kolber (2000 ml)

Prosedyre:

Ampulle med bakteriesatamme som inneholder ChiB-konstrukt med mutasjon W220A, hentet fra frysestokk -80 °C ble sammen med 300µl ampicillin (50 µg/mL) inokulert på risteinkubator på 225 rpm ved 37°C over natt. Det var 300 ml LB-medium i hver erlenmeyerkolbe som var ferdig autoklavert. Det ble arbeidet i sterilskap, og benyttet autoklavert medium og utstyr.

3.2 Høsting av proteiner

ChiB transporteres til periplasmaet i bakteriecellene (Brurberg, Eijsink et al. 1995), området mellom plasmamembranene og den ytre celleveggen i gram negative bakterier. Proteiner i det periplasmatiske ekstrakt kan utvinnes fra cellen ved hjelp av osmotisk sjokk (Manoil and Beckwith 1986). Dette oppnås ved først å tilsette en løsning som øker gjennomtrengeligheten til cellene, deretter magnesiumklorid som fører til frigjøring av komponentene i det periplasmatiske rommet.

Materialer:

1 M MgCl₂

Spheroplastbuffer: 20 mL 1M Tris/HCl, pH 8,0

34,2 g Sucrose
200 μ L 0,5 M EDTA, pH 8,0
200 μ L PMFS
Fylles opp til 200 mL med dH₂O

Vekt

6 stk. 500 ml stentrifugerør m/kork

Isoporboks med is

Rotor JA-14

Prosedyre:

- Bakteriekulturen ble overført til sentrifugerørene med lokk. Cellene ble spunnet ned ved hjelp av sentrifuge på 8000rpm i 10 min i 4°C.
- Supernatantet ble tatt av og spheroplastbuffer tilsatt alle rør og pelleten ble oppløst.
- Rørene ble satt på is i 5 minutter. De resuspenderte pelletene ble overført til et rør for så å bli sentrifugert igjen.
- Supernatanten ble tatt vekk og pelleten ble spred utover bunnen av røret og satt i romtemperatur i 10 min for oppvarming.
- Pelleten ble resuspendert med 200 ml sterilt, iskaldt dH₂O
- 200 μ l 1M MgCl₂ ble applisert direkte i prøven som igjen ble sentrifugert
- Supernatanten ble så overført til et 0,22 μ M milipore filter for å filtrere supernatanten og få periplasmatiske ekstrakt.
- JA-14 rotoren ble brukt i hvert av sentrifuge trinnene.

3.3 Rensing og oppkonsentrering av ChiB mutanter

Det periplasmatiske ekstrakt ble rensed ved hjelp av "kitinkolonne" med kitinkuler som pakkemateriale. Ved eluering av protein benyttes en løsning med eddiksyre.

Materialer:

- Kitinkolonne
- Bindingsbuffer:
- Elueringsbuffer: 20mM eddiksyre
- 20 % Etanol
- Periplasmatisk ekstrakt med ChiB mutanter

Prosedyre:

- Det ble benyttet flow på 2,5 mL/min.
- Kolonnen ble pakkes med 3 x kolonnens volum 20% EtOH og 3 x kolonnens volum med bindingsbuffer.
- Bindingsbuffer ble tilført til stabil baselinje oppnås.
- Periplasmatisk ekstrakt ble satt på og bindingsbufferen ble igjen tilført for at stabil baselinje igjen skal oppnås.
- Elueringsbuffer ble så tilført, og ved økning i målt absorbans ble eluert materiale samlet opp.
- Ved eluering av proteinet ble det observert en skarp topp som tyder på at mutantene er til stede i prøven, kromatogrammet kan sees i figur 4.4.
- Etter bruk ble kolonnen vasket i ca 10 minutter med bindingsbuffer, deretter et par minutter med etanol.
- Det rensede produktet ble oppkonsentrert ved å benytte millipore rør på 8000 rpm, 4 °C, i 15 minutt.
- Renset protein ble oppbevart i kjøleskap, 4 °C, inntil videre bruk.

3.4 SDS-Polyakrylamid Gel Elektroferese (SDS-PAGE)

Sodium dodecylsulfat polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), er en teknikk som er mye brukt i biokjemi og molekylærbiologi for å separere proteiner med henhold til deres elektroforesisk mobilitet (funksjon av lengden av polypeptidkjede eller molekylær vekt). En løsning av proteiner som skal analyseres blir mikset med SDS, en anionisk detergent bestående av en hydrofob og en hydrofil del, som denaturere proteiner og legger til en negativ totalladning til hvert protein med henhold til dens masse.

SDS er med på å eliminere forskjellig form, slik at kjedens lengde, som reflekterer masse, er med på å bestemme vandringen av proteinene i SDS-polyakrylamid elektroferesen. Molekylvekten av et protein kan bestemmes ved sammenligning av protein standard eller molekylvekt ladder som kjøres på sammen gel. Ved å varme prøvene i 70 °C i 10 min hjelper SDS til å legge seg rundt proteinene og gir dermed en positiv ladning proporsjonalt med størrelsen (Shapiro, Vinuela et al. 1967; Weber and Osborn 2006). Etter denaturering blir proteinet applisert på gelen og det tilføres spenning som gjør at proteinene vandrer mot den negative elektroden, og vandringslengden blir da proporsjonal med positiv ladning og med det størrelse. For eksempel hvis to har samme masse og form, vil den med mest netto ladning vandre lengre mot elektroden. I en miks av proteiner vil det minste proteinet vandre raskere i gelen i motsetning til store proteiner som vandrer saktere, dette pga at polyakrylamidgelen består av et tunellignende nettverk som gjør det mulig å separere proteinene med hensyn på størrelse.

Materialer

- NuPAGE Novex Bis-Tris Mini Gels
- NuPAGE LDS Sample Buffer
- NuPAGE Sample Reducing Agent
- NuPAGE MOPS SDS Running Buffer
- dH₂O
- Bench Mark Ladder
- Renset proteinløsning

Fargeløsning 0,25 g Coomassie Brilliant Blue R250
 125 mL metanol

25 mL eddiksyre

100 mL dH₂O

Avfargingsløsning: 50 mL 10% metanol

50 mL 10% eddiksyre

400 mL dH₂O

Prosedyre:

- Elektroforesekammeret ble satt sammen og fylt med ny MOPS buffer i det innerste kammeret, og brukt MOPS buffer i det ytterste kammeret.
- Det ble benyttet ferdig tillagde geler.
- Prøver for applisering på gel ble tillagd ved å blande 10 µL proteinløsning, 5 µL sample buffer, 2 µL reduserende agent.
- Blandingen ble plassert i vannbad ved 70 °C i 10 minutt.
- Etter ferdig oppvarming ble prøvene applisert i brønnene sammen med protein molekylvekt standarden.
- Elektroforesen ble utført ved 200 Volt i 45 minutter.
- Gelen ble så satt dekt med fargeløsning og satt på risting i 30 minutter.
- Når fargingen hadde stått 30 minutter ble gelen satt til avfarging over natt på ristebord.

Proteinet etter rensing viste bare ett utslag, se figur 4.6 brønn 3, og indikerer vellykket rensing.

3.5 Celledyrking

Cellelinjen Tert dyrket i RPMI-1640 med 10% føtalt kalveserum. Cellene ble oppbevart kontinuerlig i en inkubator ved 37° C og 5% CO₂ atmosfære. Mediet besto av nødvendige næringsstoffer og vekstfaktorer som salt, glucose, aminosyrer, vitaminer og kalveserum. Cellelinjen Tert ble dyrket i 75 cm² flasker for å oppnå et egnet celleantall til senere massespektrometrisk analyse.

3.6 Metoder for cellelysering

Cellelysering er første trinn i cellefraksjonering og proteinrensing. Mange teknikker er tilgjengelige, inkludert fysisk cellelysering og detergent-baserte metoder. Uavhengig av hvilken cellelyseringsteknikk som benyttes bør teknikken være kompatibel med de analytiske metodene som benyttes senere, som for eksempel elektroforese, kromatografi og massespektrometri. Et annet vesentlig poeng er at proteinutbytte etter lysing må være tilstrekkelig til videre prosessering. Detergent-baserte lyseringsmetoder er blitt mer og mer populære fordi metodene er både billige og enkle i bruk. Effektive og vellykkede protokoller har også blitt utviklet (Canas, Pineiro et al. 2007). Detergenter gjør cellemembranen oppløselig og bryter lipid-protein interaksjoner. To forskjellige detergentbaserte teknikker ble benyttet i denne oppgaven.

3.6.2 ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit, Mini. (Calbiochem®)

ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit er et fraksjoneringskit som ble benyttet som baserer seg på subcellulær inndeling av proteiner. Protokollen for subcellulær fraksjonering av cellesuspensjon er tilpasset et celleantall på 3-5 x 10⁶ celler. Det ble her brukt 10 x 10⁶ celler.

Materialer:

- Vaskebuffer
- Ekstraksjonsbuffer I
- Ekstraksjonsbuffer II
- Ekstraksjonsbuffer III
- Ekstraksjonsbuffer IV
- Proteasehemmer

- Benzonase® Nuklease

Prosedyre:

- Ekstraksjonsbufferene ble blandet godt ved hjelp av en vortex-mikser før prosedyren ble startet. Under prosedyren ble buffer I- III og benzonase® nuklease oppbevart på is, og proteasehemmeren ble oppbevart ved romtemperatur. Bufferne ble tint opp før bruk.
- Cellesuspensjonen ble overført til et eppendorfrør og sentrifugert ned ved 100-300 x g i 10 min ved 4 °C, supernatanten ble fjernet.
- Pelleten ble vasket med 2 ml iskald vaskebuffer, resuspendert ved å forsiktig snu tuben opp og ned. Inkubasjon ble utført på risting i 10 min ved 4 °C.
- Supernatanten ble fjernet forsiktig, uten å forstyrre pelletten.
- Vasketrinnet ble gjentatt en gang.
- En blanding av 1 ml iskald ekstraksjonsbuffer I og 5 µl proteasehemmer ble laget, og løsningen ble raskt addert til cellepelletten. Cellepelletten ble resuspendert ved å snu røret opp og ned forsiktig. Prøvene ble satt til risting i 10 min ved 4°C.
- Sentrifugering ble utført ved 4 °C på 5000-6000 x g i 10 min.
- Supernatanten (fraksjon 1) ble pipettert til et rent eppendorfrør uten å forstyrre pelletten, deretter ble den satt på is.
- Cellepelletten ble vasket med 1 ml iskald ekstraksjonsbuffer II med tilsatt 5µl proteasehemmer. Blandingen ble tilført cellepelletten med en gang, deretter resuspendert ved å knipse på røret. Inkubering ble foretatt ved 4 °C i 30 min på ristemaskin.
- Sentrifugering ble utført ved 4 °C på 5000-6000 x g i 10 min.
- Supernatanten, som besto av fraksjon 2, ble overført til et eget eppendorfrør og oppbevart på is.
- Det ble laget en blanding av 500 µl ekstraksjonsbuffer III, 5 µl proteasehemmer og 1,5 µl benzonase® nuklease, blandingen ble overført til cellepelletten. Cellepelletten ble løst opp ved å pipettere opp og ned et par ganger. Inkubering ble gjort i 10 min ved 4 °C på ristemaskin.
- Sentrifugering ble utført på 4 °C og 6800 x g i 10 min.

- Supernatanten (fraksjon 3) ble overført til et nytt rør uten å forstyrre cellepelleten og oppbevart på is.
- En blanding av 500 µl romtemperert ekstraksjonsbuffer IV og 5 µl proteasehemmer ble laget. Blandingen ble med en gang overført til cellepelleten og løst opp ved å pipettere opp og ned et par ganger.
- Inkubering ble utført på is i 30 min.
- Lysatet ble sentrifugert ned ved 1300 rpm i 10 min ved 4 °C. Supernatanten (fraksjon 4) ble overført til et nytt eppendorfrør og fryst ned.

3.6.3 Manuel fraksjonerings metode

Manuell metode er en fraksjonerings metode som ble benyttet som baserer seg på subcellulær inndeling av proteiner. Protokollen for subcellulær fraksjonering av cellesuspensjon er tilpasset et celleantall på 100×10^6 celler. Det ble her brukt 35×10^6 celler.

Materialer:

- PBS
- MB-buffer (lyseringsbuffer)
- MSM-buffer (mitokondriebuffer)
- SA-buffer (cytosol- og membranbuffer)
- SB-buffer (cytosol- og membranbuffer)
- NB-buffer (kjernebuffer)

Prosedyre:

- Cellesuspensjonen ble vasket med PBS 2 ganger og sentrifugert på $1100 \times g$ i 10 min.
- Så ble cellene vasket med MB-buffer og sentrifugert på $1100 \times g$ i 10 min.
- Etter dette ble det jobbet bare på is.
- Pelleten ble resuspendert i MB-buffer og satt på is i 20 min.

- Når cellene hadde stått tiden på is ble cellene homogenisert med en homogenisator i 2×10 sekunder.
- Cellelysate ble så sentrifugert med vanlig bord sentrifuge i 10 min på $8365 \times g$.
- Da finner man mitokondrien i supernatanten og cellekjernen i pelleten.
 - Gikk først videre med supernatanten (satte pelleten på is) og sentrifugerte den i bordsentrifuge ved $20550 \times g$ i 10 min.
 - Da får man cytosol og membran i supernatanten og mitokondrien i pelleten.
 - Supernatanten fra dette trinnet ble sentrifugert i ultrasentrifugen i 20 min ved 4°C på $24000 \times \text{rpm}$. Da får man i supernatanten cytosol og i pelleten cellemembran. Disse ble fryst ned inntil videre arbeid.
 - Pelleten med mitokondrien ble så resuspendert med MSM-buffer og lagt på en sukrosegradient bestående av V/V SA-buffer og SB-buffer.
 - Den ble så sentrifugert i ultrasentrifugen i en time på 4°C ved $24000 \times \text{rpm}$.
 - I interfasen man får etter sentrifugeringen finner man mitokondrien, sugde denne av og blandet den med $4 \times$ volum av MSM-buffer.
 - Løsningen ble igjen sentrifugert på vanlig bordsentrifuge i 10 min ved $1500 \times g$.
 - Supernatanten ble fjernet og resuspenderte den med MSN-buffer og sentrifugerte igjen med vanlig bordsentrifuge på $6500 \times g$ i 10 min.
 - Supernatanten ble eluert ut og pelleten ble fryst med N_2 , og lagret i fryser inntil videre.
- Pelleten som inneholder cellekjernen har stått på is og blir igjen sentrifugert i 1 min ved $8265 \times g$.
 - Restene av supernatant ble fjernet og pelleten ble resuspendert med 5 ml PBS og sentrifugert i 1 min ved $8265 \times g$.

- Derretter ble pelleten resuspender i NB-buffer og satt på is i 90 min.
- Når prøven hadde stått i 90 min på is ble prøven homogenisert med en homogenisator 2 × 40 sekunder.
- Så ble prøven lagt i 30 % sukrose i NB-buffer for så å sentrifugere dette i 10 min på 690 × g.
- Supernatanten ble tatt vekk og pelleten ble vasket 2 × men NB-buffer
- Etter dette ble gjort ble pelleten igjen sentrifugert i vanlig bordsentrifuge 20000 × g i 10 min.
- Prøven ble fryst i N₂ og lagt i fryser inntil videre bruk.

3.7 Proteinpresipitering med aceton

Denne metoden ble kun brukt på ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit. Aceton kan benyttes for å felle ut proteiner. Metoden oppkonsentrerer proteinene og fjerner uønskede substanser, blant annet salter. En ulempe med proteinpresipitering er at proteinene kan denatureres som kan føre til problemer ved resuspendering av pelleten. Pelleten bør derfor tilsettes en passende buffer før videre analyse, i dette forsøket ble proteinene løst i 4 × fortynnet SDS buffer.

Materialer

- Kald (-20°C) aceton, i et volum som er 4 x prøvevolumet.
- Sentrifugerør
- Mikrosentrifuge

Prosedyre

- Iskald aceton, i et volum 4 x større enn proteinløsningene ble tilsatt proteinfraksjonene og satt på is i 15 minutter.
- Sentrifugering ble utført i 10 minutter på 12 rcf i en mikrosentrifuge ved 4 °C, supernatanten ble kastet og pelleten ble lufttørket.
- Pelleten ble resuspendert i 4 × fortynnet SDS buffer.

3.8 Prøveopparbeidelse; reduksjon og alkylering

I tråd med protokollen til Shevchenko et al., ble gelen skåret ut i noen fraksjoner per prøve (Shevchenko, Tomas et al. 2006). For å denaturere proteiner fullstendig er det nødvendig å bryte disulfidbindinger som kobler aminosyrene i proteinkomplekser sammen. Milde reduserende kjemikalier benyttes for å omdanne disulfidbindinger til tiol-grupper. Dithiothreitol benyttes for å redusere disulfidbindinger og bevare monothioler i en redusert tilstand. Videre benyttes iodoacetamid til alkylering av frie SH-grupper for å forhindre at disulfidbindingene blir gjendannet. Metoden er basert på protokollen til Hellman (Hellman, Wernstedt et al. 1995)

Materialer:

- 10 mM DTT i 100 mM Ambic
- 55 mM Iodoacetamid i 100 mM Ambic
- 50 mM Ambic
- 100 % ACN

Prosedyre:

- En glassplate ble vasket med EtOH og vann. Gelen ble forsiktig plassert på glassplaten og eventuelle bobler ble fjernet.
- Flekkene ble kuttet ut av gelen med en skalpell. Gelbitene ble overført til Eppendorf BioPure tuber (1,5 ml).
- Hvert rør ble vasket med 300 μ l Ambic
- Supernatanten ble kastet
- Det ble tilsatt 100 μ l DTT, deretter inkubering i 15 minutter ved 56° C i vannbad. Det er viktig at gelbitene er dekket med løsning.
- Sentrifugering ble utført og væsken ble avkjølt til romtemperatur før løsningen ble fjernet.
- Iodoacetamid i et volum på 100 μ l, ble addert og inkubering ble gjort ved romtemperatur i mørket i 30 minutter.
- Prøven ble sentrifugert ned og supernatanten ble fjernet forsiktig, mens gelen ble gjenværende i røret.

- Et vasketrinn ble utført med 300 µl av ACN og 50 mM AmBic, 1:1 løsning. Eppendorfrørene ble satt til resting ved romtemperatur og 300 rpm i 15 minutter.
- 100 % ACN ble tilsatt
- Trypsin opererer optimalt ved pH 8, og dette punktet i prosedyren er derfor kritisk for utfallet av proteolysen.
- Gelbitene ble tørket i en kjølesentrifuge i et par minutter. Gelbitene skal etter dette trinnet være fargeløse, men større gelbiter kan fortsatt vise blå farge.

3.9 Prøveopparbeidelse; trypsinproteolyse

Trypsin er en spesifikk serinprotease som kløyver peptidkjeder i C-terminal ende av aminosyrene lysin og arginin. Proteolysen kan gå sakte eller blokkeres av spesielt sure eller aromatiske residuer. Aminosyren prolin vil utgjøre et problem ettersom trypsin ikke kutter før prolinresiduer. Prolin blokkerer effektivt, og blokkeringen vil være avhengig av hvor prolin befinner seg i forhold til kløyvingssetet.

Trypsin benyttes i proteomikkekseperimenter til å kløyve proteiner til peptider. Før selve trypsinproteolysen utføres er det viktig at gelen er fullstendig tørket av ACN for at trypsin effektivt skal diffundere inn i gelen. Rehydreringen bør foretaes ved 4 °C for å sørge for at proteasen ikke er aktiv før den er blitt adsorbent tilstrekkelig i gelen. Mengde protein tilstede avgjør hvor mye trypsin som bør tilsettes. Inkubering med trypsin over natt vil gi tilstrekkelig tid for fullstendig proteolyse. Prosedyren som her ble benyttet er basert på protokollen til Shevchenko (Shevchenko, Tomas et al. 2006).

Materialer:

- 10 mM ammonium bikarbonat med 10 % (vol/vol) acetonitril.
- Trypsinløsning; Trypsin, 13 ng µl⁻¹ løst i 10 mM ammonium bikarbonat med 10% (vol/vol) acetonitril.

Prosedyre:

- En trypsinkonsentrasjon på $13 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ ble tilsatt til gelbitene var dekket.
- Prøvene ble satt i kjøleskap, etter 30 minutter ble det tilført mer trypsinløsning dersom det trengtes for å sørge for at gelbitene var dekket.
- Gelbitene ble inkubert i kjøleskap 90 ekstra minutter for å sørge for at gelbitene ble mettet med trypsin. Deretter ble det tilsatt 10 mM ammonium bikarbonat med 10% (vol/vol) acetonitril for å holde gelbitene hydrert under enzymkuttingen.
- Prøvene ble satt på risting i en risteinkubator ved $37 \text{ }^\circ\text{C}$ over natt.

3.10 Prøveopparbeidelse; Peptidekstrahering

Etter reduksjon, alkylering og trypsinproteolyse må peptidene ekstraheres ut av gelen. Gelbitene inkuberes i en ekstraksjonsløsning og supernatanten bevares. Metoden som er brukt i denne oppgaven tar utgangspunkt i protokollen til Shevchenko et al (2006), med enkelte modifiseringer.

Materialer :

- Ekstraksjonsbuffer, 1:2 (vol/vol) av 0,1 % TFA og acetonitril.
- 0,1 % TFA

Prosedyre:

- Det ble tilsatt $100 \mu\text{l}$ av ekstraksjonsbuffer til hvert rør.
- Forholdet i volum mellom ekstraksjonsbuffer og prøve skulle være 1:2, dette måtte tilpasses hver enkelt prøve.
- Inkubering ble foretatt ved $37 \text{ }^\circ\text{C}$ i en ristemaskin i 15 minutter.
- Supernatanten ble eluert ut og over i et nytt rør hvor prøvene ble frysetørket utført i vakuumsentrifuge til prøvene var tørre.
- Når prøvene var tørre ble de vætet igjen med $20 \mu\text{l}$ 0,1 % TFA til hvert rør, deretter ble rørene vortexet godt. Prøvene ble sonikert i 10 minutter og deretter sentrifugert i 15 minutter på $6,7 \times g$.
- Prøve som ikke ble analysert ble oppbevart i kjøleskap

3.11 Identifisering av proteiner ved MALDI-TOF massespektrometer

For å utføre en MALDI-TOF analyse må man sette target-plate inn på "probe exchange table". Den høye volten i maskinen slås på igjen når platen er i riktige posisjon inne i ionekilden, og trykket over ionekilden er rett. Man kan starte analyse av prøvene når spenningen har nådd sin rette verdi. MALDI-MS spektra ble ervervet ved bruk av Ultraflex II MALDI-TOF/TOF massespektrometer ved FlexControl etter kalibrering.

3.12 Prøveopparbeidelse, STAGE-TIP

For å avsalte og unngå rester av gel, elueres prøven gjennom en egenlaget C-18 kolonne.

Materialer:

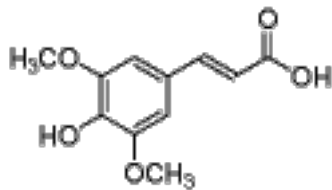
- 0,1 % TFA
- 60 % ACN
- Ferdig trypsinert prøveløsning
- Sprøyte
- 0,2 ml eppendorfrør
- GELoader Tips pakket med C-18 kolonnemateriale

Prosedyre:

- Først må kolonnen klargjøres ved at 5 µl 100 % ACN tilsettes. En sprøyte fylt med luft presser vesken igjennom kolonnen som er pakket med C-18 materiale.
- Når ACN er presset gjennom tilsettes så 10 µl med 0,1 % TFA og presses igjennom.
- Dette gjøres to ganger.
- Prøven som nå er på 20 µL tilsettes, og presses igjennom med sprøyten.
- Prøven blir vasket med 10µl 0,1 % TFA.
- Vasketrinnet blir gjort to ganger før prøven er klar til å elueres ut.
- Proteinene elueres ut med 1µl 60 % ACN i et 0,2 ml eppendorfrør.
- Rørene merkes godt og lagres til videre analyse.

3.13 Prøveopparbeidelse, MALDI- target plate

Som matriksen ble 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic (Sinapinic Acid) benyttet (figur 3.1). Matriksen er bra for mange proteiner og peptider. Og den absorberer laseren bra samtidig som den donerer protoner (H^+) til analytten. Det er den fenoliske gruppen som overfører proton fra matriks til prøvemolekylet og dermed gir effektiv ionisering (ProteoChem 2010).



Figur 3.1: kjemisk struktur av Sinapinic acid (3,5-dimethoxy-4-hydroxycin) (ProteoChem 2010).

Materialer:

- Prøven Matrix for MALDI

Prosedyre:

- 0,7 μ l av prøven blir mikset med 0,7 μ l av matriksen som er egnet for dette proteinet.
- Prøveløsningen blir overført til MALDI platen hvor dråpen tørkes helt før den kan settes inn i MS instrumentet.

3.14 Identifisering av proteiner ved LC/ESI-MS

Væskekromatografi koblet til massespektrometri er et vanlig oppsett for å proteinidentifisering.

Kromatografi baserer seg på separasjon av analytter avhengig av egenskaper som blant annet ladning, størrelse og affinitet. Mobilfasen, inneholdende analytten, beveger seg gjennom stasjonærfasen. Dersom analytten har større affinitet for stasjonærfasen enn mobilfasen, vil den binde seg til stasjonærfasen og bevege seg saktere enn forbindelser som har høy affinitet til mobilfasen.

Sterkt bundne forbindelser blir frigjort fra stasjonærfasen ved å endre fysiske og/eller kjemiske egenskaper ved mobilfasen (Ahuja 2003).

I dette studiet, ble reversfase (RP) væskechromatografi (HPLC) benyttet. Stasjonærfasen besto av en pakket kolonne med immobilisert C18. Prøvene ble ledet inn i en C18 Hotsep Kromasil kolonne (0,075 mm i.d. x 15 cm). Mobilfasen besto av en buffer A inneholdende H₂O (HPLC-grade), 100 % ACN og 0,1 % FA (v/v), samt en buffer B med Acetonitril og 0,1 % FA (v/v). Gradienten startet med en lav prosent med buffer B, med gradvis økning til 90% for å eluere ut de mest hydrofobe forbindelsene. Oppsett I ble en gradient på 90 minutter benyttet (tabell 2).

Materialer:

- Buffer A: 0,1 % FA, 2 % ACN og H₂O
- Buffer B: ACN, 0,1 % FA

Prosedyre

- Alle peptidprøvene ble fortynnet 1:1 i 0,1 % FA til et totalvolum på 15 µl.
- Mobilfasehastigheten på kapillærpumpen ble satt til 4 µl/min.
- Mobilfasehastigheten til nanopumpen ble satt til 0,4 µl/min.
- Injeksjonsvolumet ble satt til 5 µl.
- Mobilfasegradientene ble satt opp som indikert i tabellen under (tabell 2).

OPPSETT I

Tabell 2. Tabellen viser en oversikt over gradienten som ble satt opp med LC-ESI-MS/MS (Bruker 3D- ionefelle). Buffer B besto av ACN og 0,1 % FA.

Tid (minutter)	%B
0	0
3	0
5	10
80	50
85	90
90	0

3.15 Dataevaluering og validering med Biotoools

Ved bruk av Biotoools fra Bruker Daltonics ble dataene validert. Spektrene man fikk fra MS/MS ble åpnet i programvaren DataAnalysis som benyttes for å prosessere rådata og dekonvolusjon, slik at sortering av ulike ladningsversjoner kan skje. Når spektrene er store må de komprimeres. For å kunne utføre et MASCOT databasesøk må man generere en "compound list". Søkerinnstillingene settes i Biotoools mens selve databasesøkes utføres i MASCOT.

Følgende intillinger ble satt i Biotoools:

- Taxonomi: *Homo Sapiens*
- Trypsinkuttede peptider ble godkjent med ett tapt kuttsete (missed cleavage) (Viktig å ta hensyn til ettersom ufullstendig trypsinering kan oppstå).
- variable post-translasjonelle modifiseringer; metioninoksidasjon,
- Fiksert modifisering; carbamidometylering.

3. METODER

- Peptidtoleranse; 0,50 Da for Agilent 3D-ionefelle/ Bruker HCT-ionefelle og 4 ppm for LTQ Orbitrap XL.
- Masse-verdier; MH

4 Resultater

Etter å ha dyrket Tert celler er det interessant å fraksjonere proteinuttrykket for å redusere kompleksiteten før videre analyse. To forskjellige fraksjoneringsmetoder har blitt studert for å finne et alternativ til ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit, fra Calbiochem. Dette ble gjort ved at vi brukte en manuell metode og sammenlignet disse to (avsnitt 4.1).

Videre er det utviklet metoder for å kontrollere om en mutasjon har blitt riktig inkorporert i et uttrykt protein. Kitinase B (ChiB) og utvalgte mutanter ble benyttet som modellenzymmer. Det var nødvendig å rense mutanten ChiB-W220A til denne oppgaven, for å ha forskjellige batcher å sammenligne med ved seterettet mutagenese. Rensingen ble vellykket som vist i figur 4.5 og 4.6 (avsnitt 4.2).

4.1 Resultatet av fraksjonering

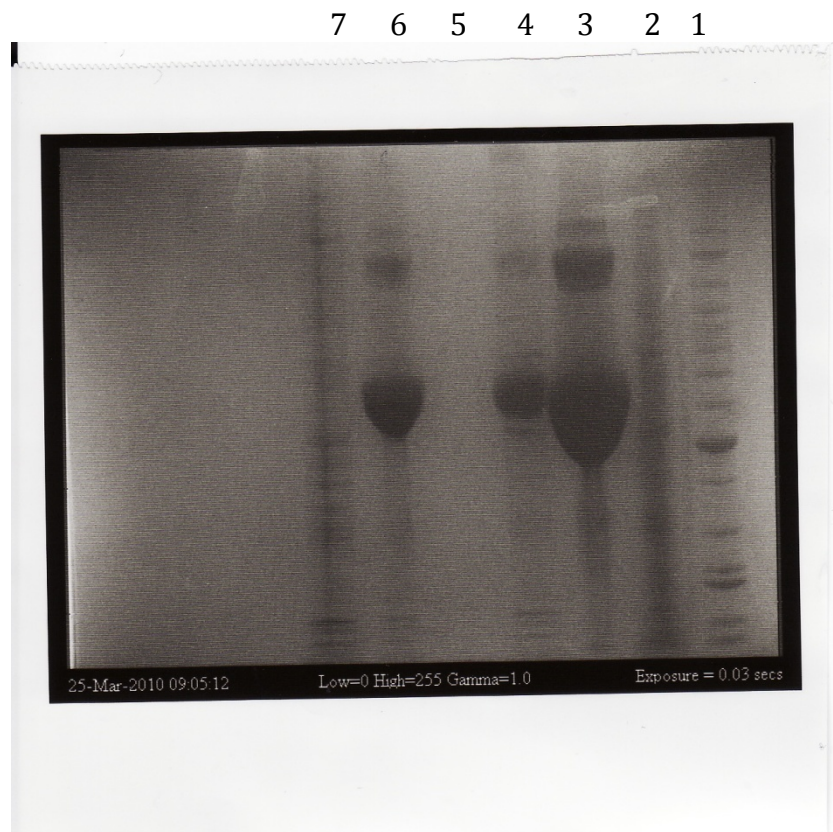
Subcellulær fraksjonering ble brukt for å redusere kompleksiteten før MS-analysen. I dette studiet ble en Tert cellekultur benyttet som modellsystem. Tert celler er interessant å bruke fordi de er lette å dyrke og er gode modell celler. Et kjennetegn ved Tert celler er at de er veldig små. Konsekvens av dette er at det kreves flere millioner celler for å oppnå et egnet proteinutbytte til massespektrometri. 5 millioner celler ga et alt for lite proteinutbytte og celleantallet ble derfor økt til 30 millioner celler.

Tert cellene ble høstet for deretter å bli lysert og fraksjonert i fire ulike fraksjoner, bestående av cytosolproteiner, membranproteiner, kjerneproteiner og cytoskjelettproteiner (avsnitt 3.6.2) ved hjelp av ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit, fra Calbiochem. Den manuelle metoden ble benyttet til å fraksjonere proteinuttrykket i cytosolproteiner, membranproteiner, kjerneproteiner og mitokondrieproteiner (avsnitt 3.6.3).

Etter fraksjonering ble 20 µl protein av hver enkel fraksjon applisert på gel for å separere proteinene på grunnlag av størrelse. Etter gelelektroferese ble gelene kuttet i 10 biter per fraksjon (cytosol, cytoskjelett/mitokondrie, kjerne og membran). Utkutting ble foretatt på øyemål. Videre ble gelbitene redusert, alkylert og trypsinprotolysert som forklart i avsnitt 3.8 og 3.9.

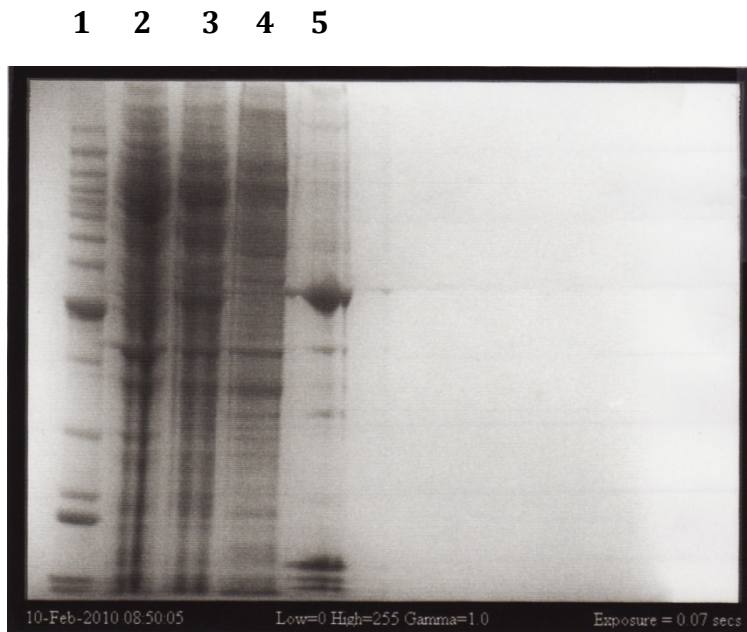
Ved bruk av ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit ble proteinene utfelt ved hjelp av aceton og de utfelte proteinene ble løst i 4 × fortynnet SDS buffer (avsnitt 3.7). Proteinene ble også redusert og alkylert før man satte proteinene på gel. For manuell metode ble proteinene løst i 4 × fortynnet SDS buffer og proteinene ble redusert og alkylert etter gelelektroferesen.

Figur 4.1 viser SDS-PAGE analysen av Tert celler etter anvendelse av manuell fraksjonerings metode og på figur 4.2 ser man fraksjoneringskitet ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit.



Figur 4.1. SDS-PAGE analyse av Tert celler med manuell metode for fraksjonering. 1) Benchmark™ protein standard, 2) mitokondrieproteiner, 3) cytosolproteiner, 4) membranproteiner, 5) kjerneproteiner, 6) supernatant fra membran proteiner, 7) mitokondrieproteiner.

Gelbilde 4.1 viser en dårlig separasjon av proteiner i de ulike fraksjonene, hvilket tyder på at fraksjoneringen ikke har vært vellykket. Brønn 2-7 ble skåret ut i noe mindre enn 10 biter per brønn og analysert med MS (figur 4.4)



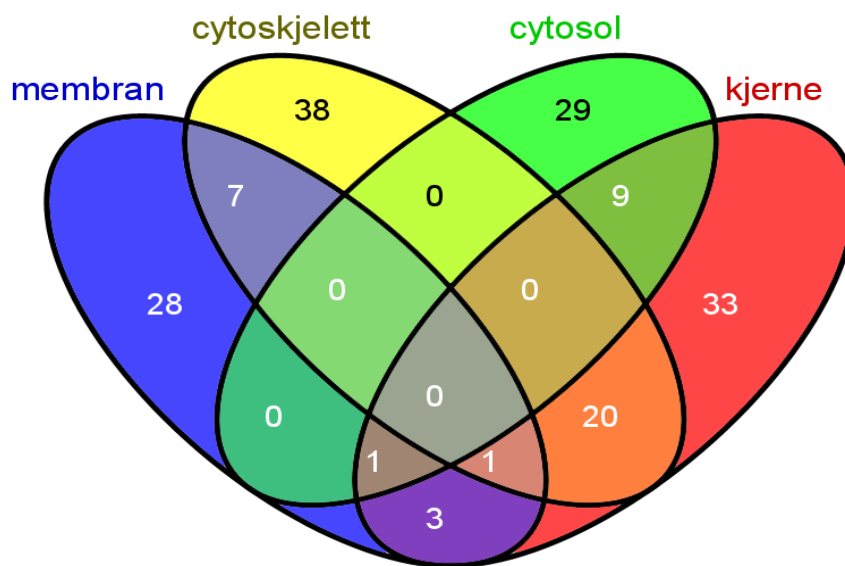
Figur 4.2. SDS-PAGE analyse av Tert celler fraksjonert med ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit, fra Calbiochem. 1) Benchmark™ protein ladder, 2) Cytosolproteiner, 3) membranproteiner, 4) Kjerneproteiner, 5) cytoskjelettproteiner.

Subcellulær lokalisering av proteiner er viktig med tanke på proteinfunksjon siden funksjonen til et protein er avhengig av hvor proteinet befinner seg i cellen. En måte å bestemme hvor effektive de subcellulære fraksjoneringsmetodene har vært, ville være å bestemme plasseringen til de identifiserte proteinene og finne ut om for eksempel membranfraksjonen totalt sett inneholder flest membranproteiner. En slik tilnærming har vært problematisk ettersom vi ikke fant en automatisk metode for å analysere og bestemme subcellulær lokalisering av proteiner ut fra store datasett. Proteinsøkene er nødt til å utføres manuelt med hvert enkelt protein for å bestemme lokalisering.

Databasesøkene ble utført ved å lage en liste over navnet på proteinene, videre ble denne listen benyttet til å søke i proteindatabasen og finne subcellulær lokalisering til de aktuelle proteinene. Ved bruk av kitet, ble det totale antallet proteiner på 361. Av disse ble det funnet subcellulær lokalisering til 206 av proteinene, hvorav 39 proteiner hadde opphav fra cytosol, 40 proteiner ble lokalisert som membranproteiner, 66 proteiner som cytoskjelettproteiner og 67 proteiner ble funnet som kjerneproteiner.

41 proteiner hadde mer enn en lokalisering og 17 proteiner hadde ukjent subcellulær lokalisering (se figur 4.3). Tabell 11 i appendiks gir en oversikt over subcellulær lokalisering til hvert protein.

Dette fraksjoneringskittet ga bedre separasjon enn manuell metode grunnet overlapping av proteinene ved bruk av manuell metode.



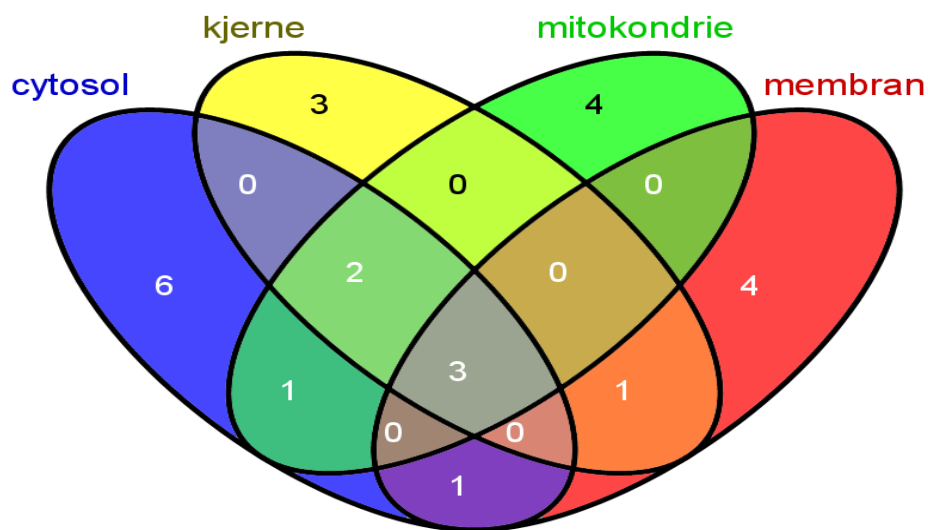
Figur 4.3 Oversikt over subcellulær lokalisering og overlapping ved bruk av kitt. Vi kan se ut i fra figuren at det er ingen proteiner som finnes i alle fraksjonene og at det er mest overlapping mellom cytoskjelett og kjerne. Totalt er det 361 proteiner. For å finne den subcellulære lokaliseringen ble nettstedet <http://www.uniprot.org/> benyttet og figuren ble laget ved hjelp av programmet venny (<http://bioinfo.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>).

I figur 4.4 får vi en oversikt over subcellulær lokalisering og overlapping ved bruk av manuell metode.

Her kan vi se at det totale antallet proteiner er mye lavere. Det totale antall

proteiner funnet var 41. Av disse ble det funnet subcellulær lokalisering til 41 av proteinene, hvorav 13 proteiner hadde opphav fra cytosol, 9 proteiner ble lokalisert som membranproteiner, 10 proteiner som mitokondrieproteiner og 9 proteiner ble funnet som kjerneproteiner.

24 proteiner hadde mer enn en lokalisering og vi kan se at 3 proteiner fantes i alle fraksjonene (se figur 4.4). Tabell 12 i appendiks gir en oversikt over subcellulær lokalisering til hvert protein.



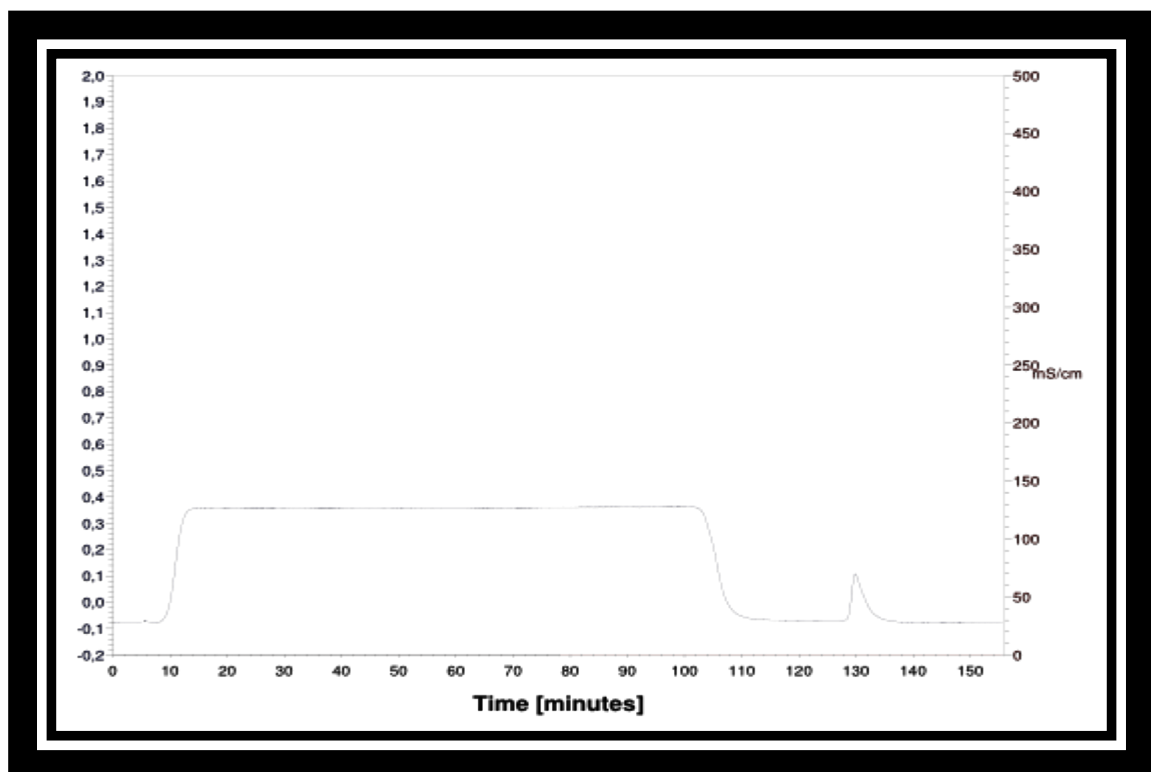
Figur 4.4 Skjematisk oversikt av subcellulær lokalisering av proteiner, fraksjonert med manuell metode. Vi kan se ut i fra figuren at det er 3 proteiner som finnes i alle fraksjonene og at det er 41 proteiner totalt. For å finne den subcellulære lokaliseringen ble nettstedet <http://www.uniprot.org/> benyttet og figuren ble laget ved hjelp av programmet venny (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>).

4.2 Rensing av ChiB-W220A

ChiB og mutanter av denne, transporteres til periplasmaet i bakteriecellene, området mellom plasmamembranene og den ytre celleveggen i gram negative bakterier (Brurberg, Eijsink et al. 1995). Proteiner i det periplasmatiske ekstrakt

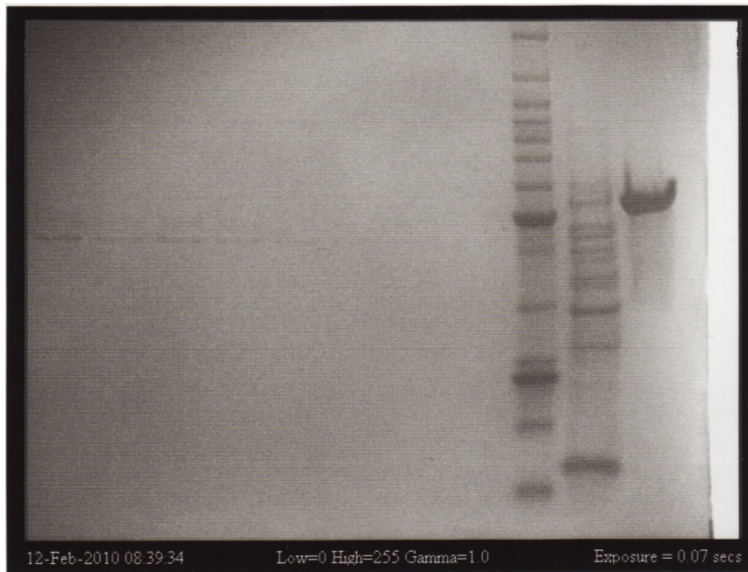
kan utvinnes fra cellen ved hjelp av osmotisk sjokk (Manoil and Beckwith 1986). Dette oppnås ved først å tilsette en løsning som øker gjennomtrengeligheten til cellene, deretter magnesiumklorid som fører til frigjøring av komponentene i det periplasmatiske rommet.

Det periplasmatiske ekstraktet ble renset ved hjelp av kitinkolonne med kitinkuler som pakkemateriale. For å eluere ut proteinene ble det benyttet en løsning med eddiksyre. I figur 4.5 ser man kromatogrammet etter at proteinet er ferdig renset. Toppen som eluerer etter 130 min er proteinet som man er ute etter. Dette ble samlet opp og analysert ved SDS-PAGE (figur 4.6).



Figur 4.5 Kromatogram fra rensing av ChiB-W220A periplasmatiske ekstrakt. Renset på kitinkolonne og eluert ut med eddiksyre løsning. Ved økning i målt absorbans ble det eluerte materiale samlet opp. Toppen til høyre viser det eluerte proteinet.

1 2 3



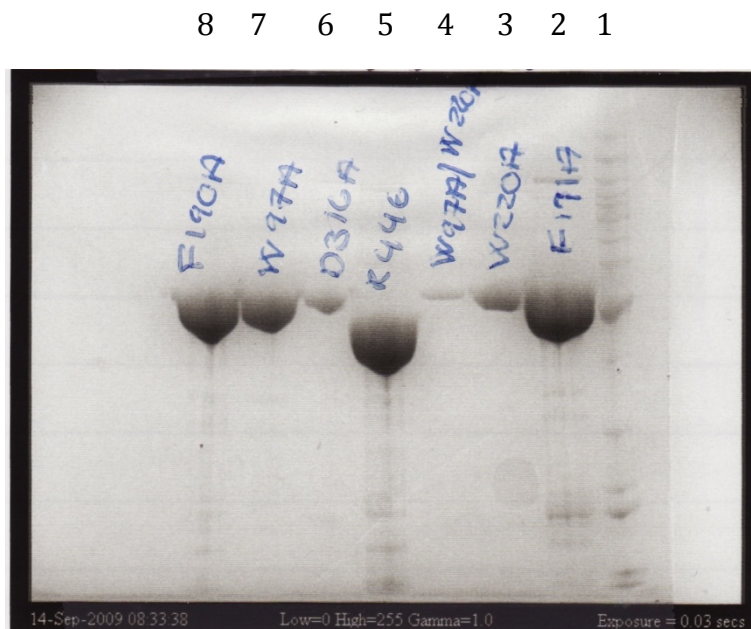
Figur 4.6 SDS-PAGE analyse av periplasmatisk ekstrakt fra mutanten W220A og rensset periplasmatisk ekstrakt fra W220A. 1) Benchmark™ protein ladder, 2) Periplasmatisk ekstrakt fra W220A, 2) Rensset periplasmatisk ekstrakt fra W220A med molekylvekt 55,3 kDa.

I brønn 1 ser man Benchmark™ protein ladder, i brønn 2 periplasmatisk ekstrakt og i brønn 3 rensset protein. Her kan man tydelig se at rensingen var vellykket. Båndet faller mellom proteinstandard båndene med molekylvekt 50 og 60 kDa, som stemmer med kjent størrelse på ChiB mutanten med molekylvekt 55,4 kDa. Når rensingen var vellykket kan man gå videre med det ferdig rensede proteinet til å se på seterettet mutagenese. Dette ble gjort for alle mutantene som ble benyttet i denne oppgaven.

4.3 Resultater av seterettet mutagenese

Mutantene som ble benyttet i oppgaven har alle enten deletert et domene eller byttet ut en aminosyre som er antatt viktig for at ChiB har en prosessiv mekanisme. De som ble studert var ChiB-F190A, ChiB-W97A, ChiB-D316A, ChiB-R446, ChiB-W97A/W220A, ChiB-W220A og ChiB-F191A. I figur 4.7 vises SDS-PAGE analysen av benyttede enzymer.

I figur 4.7 ser man alle mutantene brukt i oppgaven. Målet med eksperimentet var å kontrollere at seterettet mutagenese ble riktig utført. Dette ble gjort ved bruk av ulike metoder som kjemisk merking på proteinene som ble analysert ved hjelp av MALDI, mutantene ble kjørt i sin helhet på HPLC og MALDI uten kjemisk merking ble også testet ut.



Figur 4.7 Mutantene vist på gelelektroferese. 1) Benchmark™ protein ladder, 2) Mutanten ChiB-F191A, 3) Mutanten ChiB-W220A, 3) Dobbelmутanten ChiB-W97A/W220A, 4) Mutanten ChiB-R446, 5) Mutanten ChiB-D316A, 6) Mutanten ChiB-W97A, 7) Mutanten ChiB-F190A.

4.3.1 Mutantene analysert ved hjelp av MALDI TOF/TOF-MS/MS.

Mutantene i form av hele proteiner ble blandet i to ulike matrikser (sinapinic acid mettet med EtOH og Spinapinic acid mettet med bufferen Ta30 (30% ACN og 70% av 0,1% TFA)), applisert på en MALDI plate og analysert ved MALDI TOF/TOF-MS/MS.

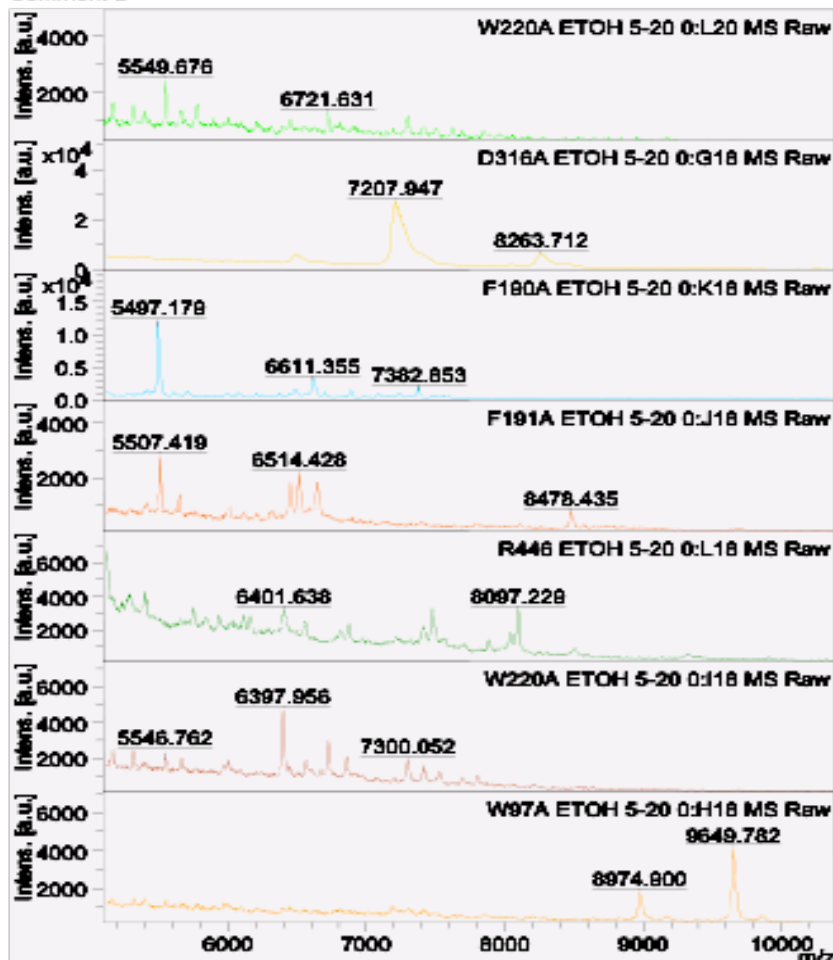
I figur 4.8 ser man sammenligning av mutantene i masseområde 5-20 m/z med sinapinic acid mettet med ETOH. Her ser vi at dobbelmutanten ikke vises i det lave masseområdet, mens man kan se den i det høyere masseområdet i figur 4.9. I det lavere masseområdet kan man se ChiB-R446A, mens i det høyere masseområdet ser vi at den forsvinner.

Vi kan se forskjell på de forskjellige mutantene i det høye masseområdet. Man ser at det er en topp som går igjen i ChiB-W97A, ChiB-W220A og i dobbelmutanten ChiB-W220A/W97A (55 m/z), mens man ikke ser den for ChiB-F910A, ChiB-F191A, ChiB-D316A og ChiB-R446.

G:\sigrid marie\10.02.10\F191A ETOH 5-20\0_J18\1\SLin

Comment 1

Comment 2

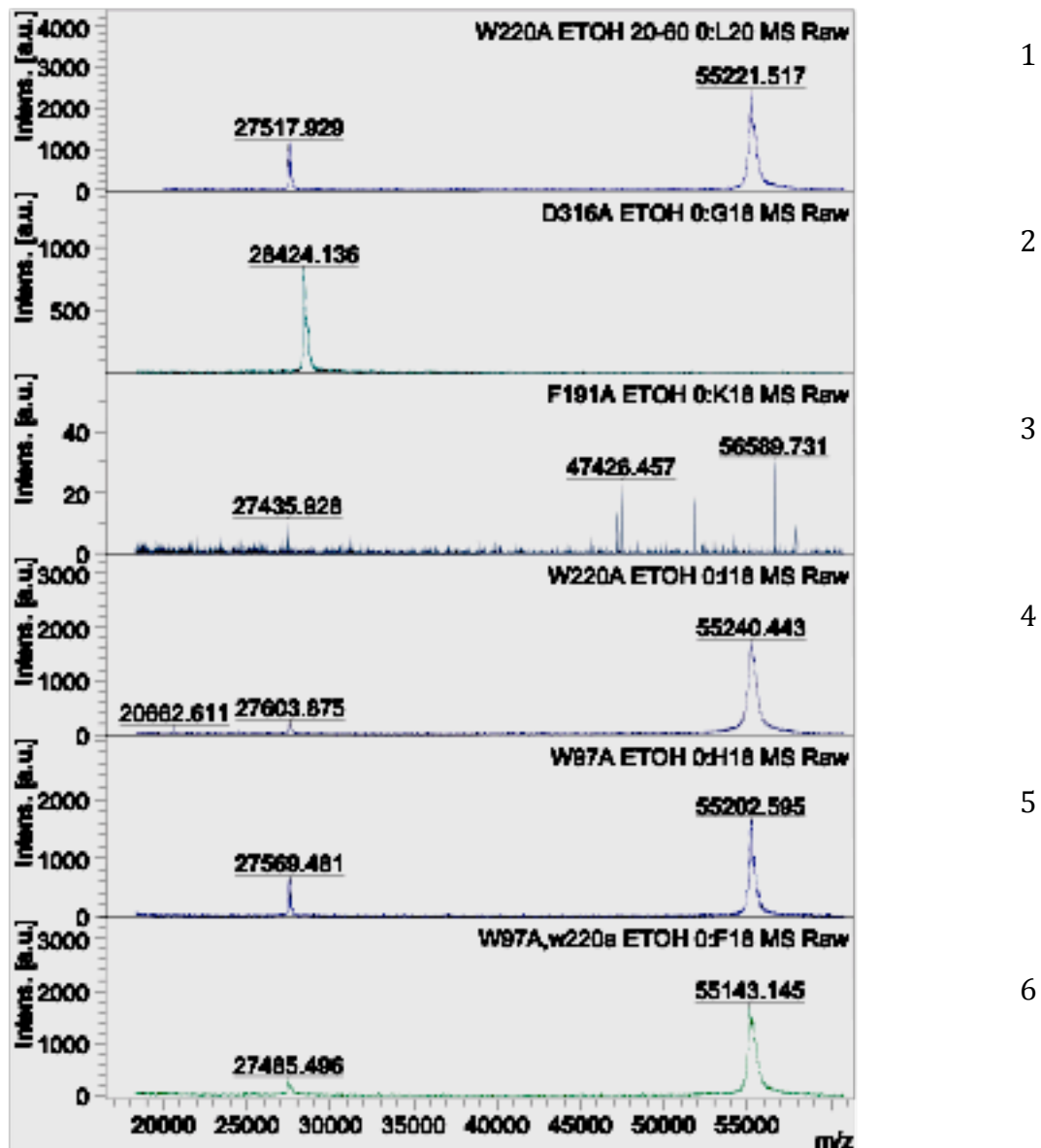


Figur 4.8 Sammenligning av mutantene i området 5-20 m/z med ETOH som matriks. 1) Mutant ChiB-W220A, 2) Mutant ChiB-D316A, 3) Mutant ChiB-F190A, 4) Mutant ChiB-F191A, 5) Mutant ChiB-R446, 6) Mutant ChiB-W220A, 7) Mutant ChiB-W97A.

G:\sigrid marie\10.02.10\W97A,w220a ETOH\0_F18\1\1SLin

Comment 1

Comment 2



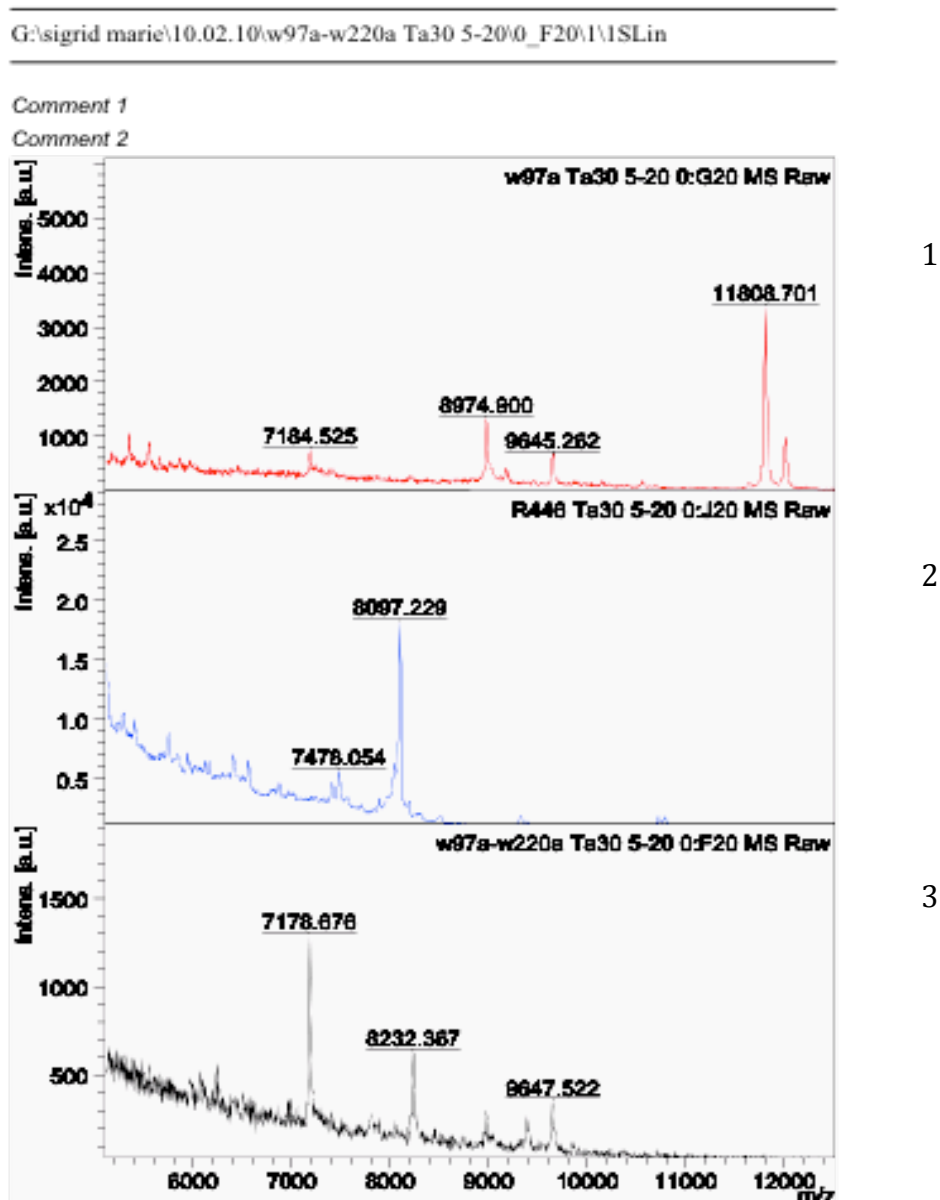
Figur 4.9 Sammenligning av mutantene i masseområde 20-60 m/z , med ETOH som matriks. 1) Mutanten ChiB-W220A, 2) Mutanten ChiB-D316A, 3) Mutanten ChiB-F191A, 4) mutanten ChiB-W220A, 5) Mutanten ChiB-W97A, 6) Dobbeltmutanten ChiB-W97A/W220A.

Sinapinic acid mettet med bufferen Ta30 var i dette tilfellet en bedre matriks en sinapinic acid mettet med ETOH. Dette er pga at toppene kom lettere fram med Ta30.

I figur 4.10 og 4.11 ser vi mutantene i masseområdet 5-20 m/z . Her ser vi at det er forskjell på mutantene i det lave masseområdet. Selv om det er likheter mellom spekterne er ingen helt identiske

I det høye masseområdet ser vi igjen at toppen på 55 m/z går igjen for ChiB-W97A, ChiB-W220A og dobbelmutanten ChiB-W220A/W97A.

Metoden var reproduserbar som vist i figurene 4.13 – 4.17.

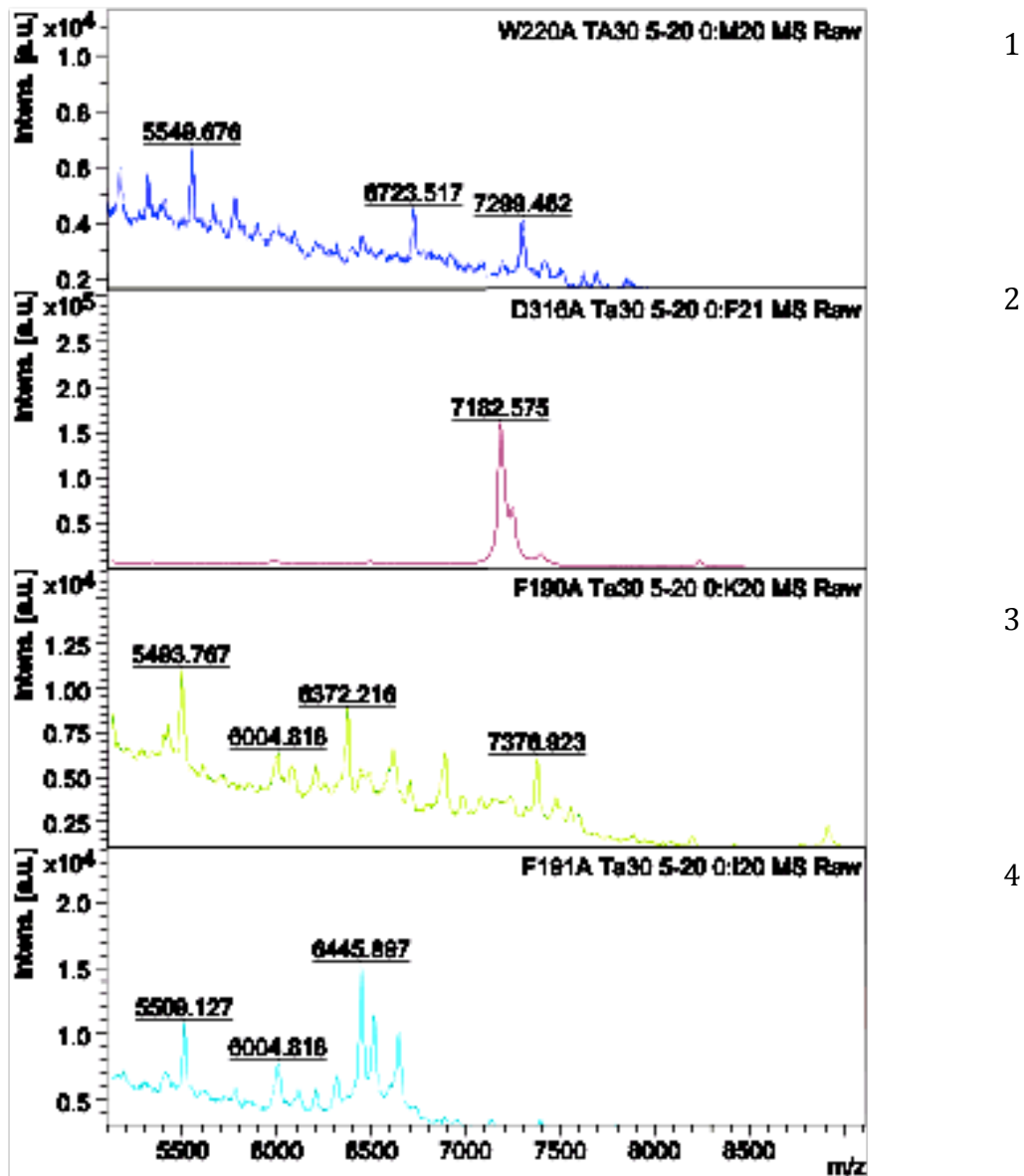


Figur 4.10 Sammenligning av mutantene i området 5-20 m/z med Ta30 som matriks. 1) Mutanten ChiB-W97A, 2) Mutanten ChiB-R446, 3) Dobbelmotanten ChiB-W97A/W220A.

G:\sigrid marie\10.02.10\F190A Ta30 5-20\0_K20\1\1SLin

Comment 1

Comment 2

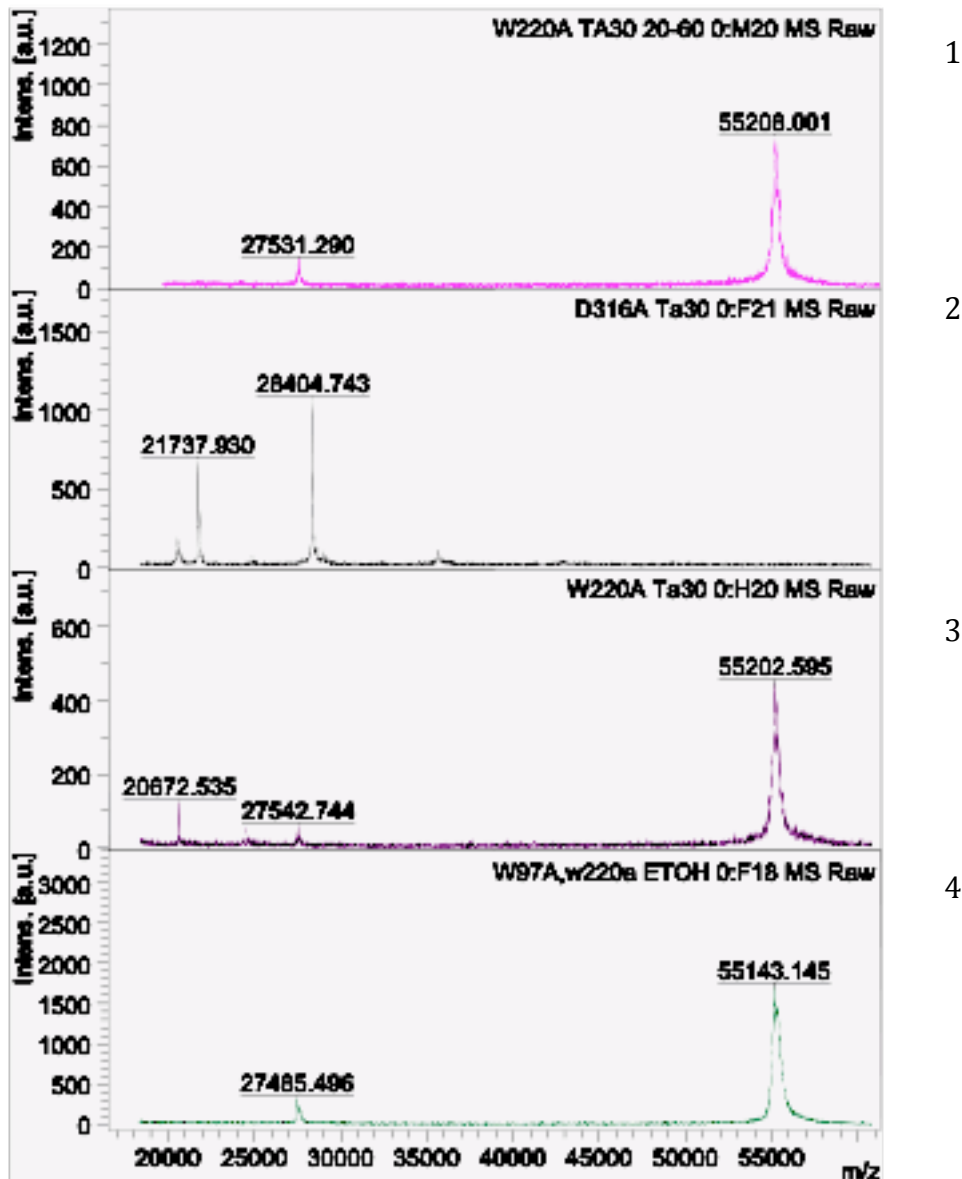


Figur 4.11 Sammenligning av mutantene fra masseområde 5-20 m/z med Ta30 som matriks. 1) Mutanten ChiB-W220A, 2) Mutanten ChiB-D316A, 3) Mutanten ChiB-F190A, 4) Mutanten ChiB-F191A.

G:\sigrid marie\10.02.10\W97A,w220a ETOH\0_F18\1\1SLin

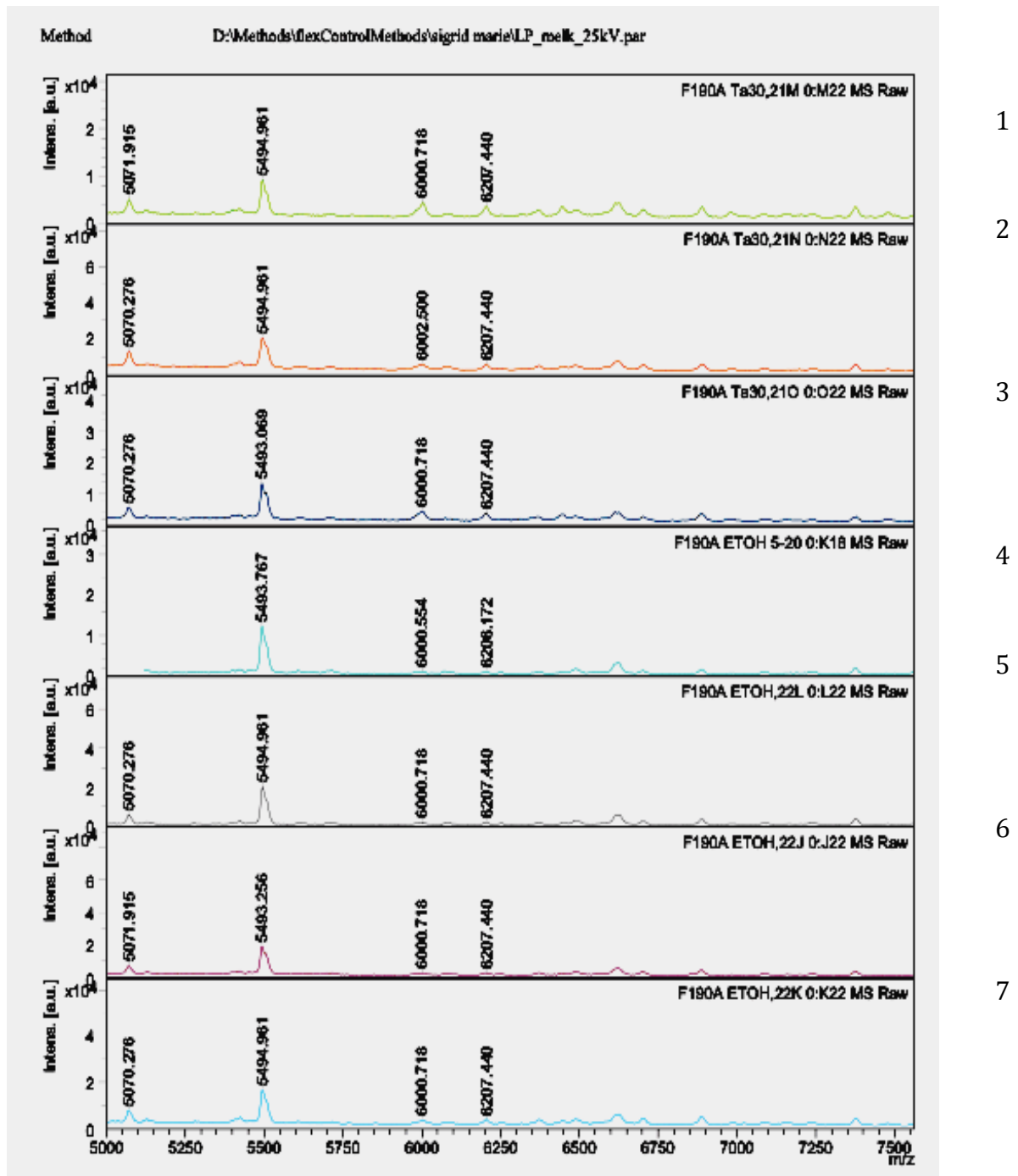
Comment 1

Comment 2



Figur 4.12 Sammenligning av mutantene i masseområde 20-60 m/z med Ta30 som matriks. 1) Mutanten ChiB-W220A, 2) Mutanten ChiB-D316A, 3) Mutanten ChiB-W220A, 4) Dobbelmutanten ChiB-W91A/W220A.

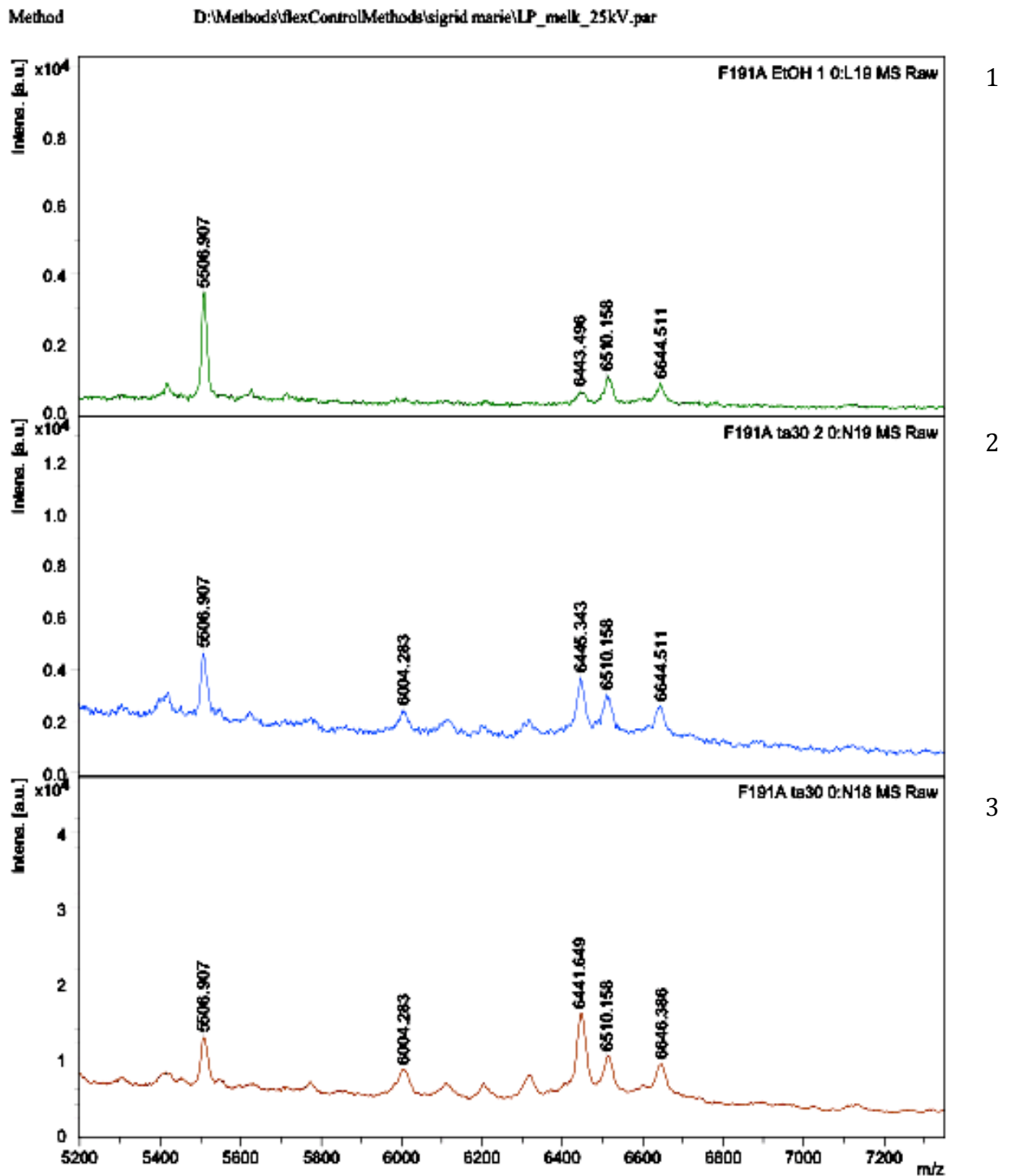
I figur 4.13 ser vi på F190A med både ETOH og Ta30 som matriks og i masseområdet 5-20 m/z . Det er meget små variasjoner i reproduserbarheten om man brukte Ta30 eller ETOH som matriks. Den eneste som skiller seg noe ut er 18 K (4). Den mangler en topp på 5070 m/z .



Figur 4.13 Sammenligning av ChiB-F190A med ETOH og Ta30 som matriks. Der vi ser at 4 skiller seg ut fra resten. 1) Mutant ChiB-F190A med Ta30, 2) Mutant ChiB-F190A med Ta30, 3) Mutant ChiB-F190A med Ta30, 4) Mutant ChiB-F190A med ETOH, 5) Mutant ChiB-F190A med ETOH, 6) Mutant ChiB-F190A med ETOH, 7) Mutant ChiB-F190A med ETOH.

I figur 4.14 er massespekteret til ChiB-F191A i masseområdet 5-20 m/z med ETOH og Ta30 som matriks.

Ved bruk av Ta30 (2 og 3) får vi en ekstra topp på 6004 m/z som ikke observeres ved bruk av ETOH (1) som matriks.

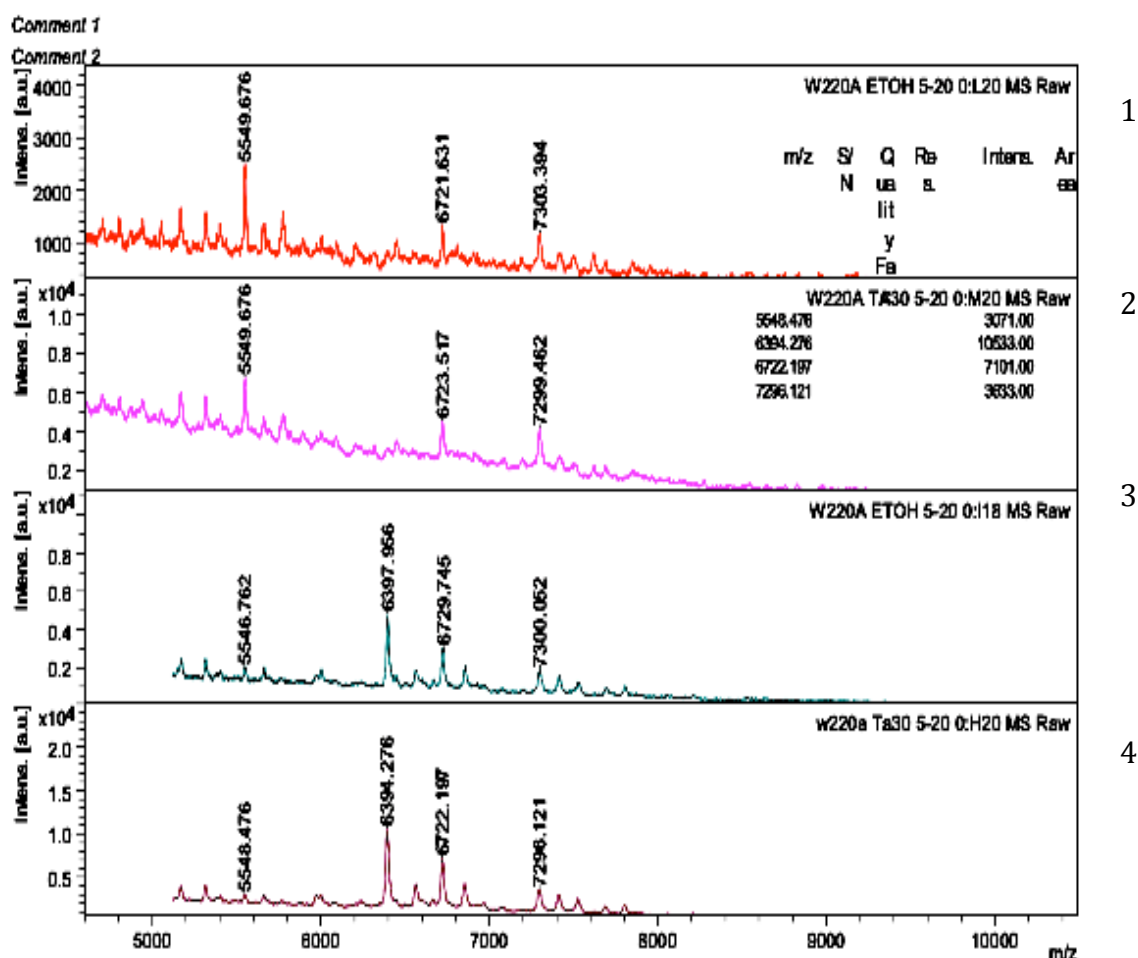


Figur 4.14 Sammenligning av ChiB-F191A med ETOH og Ta30 som matriks. Der vi ser at 1 skiller seg ut fra de andre. 1) Mutant ChiB-F191A med ETOH, 2) Mutant ChiB-F191A med Ta30, 3) Mutant ChiB-F191A med Ta30.

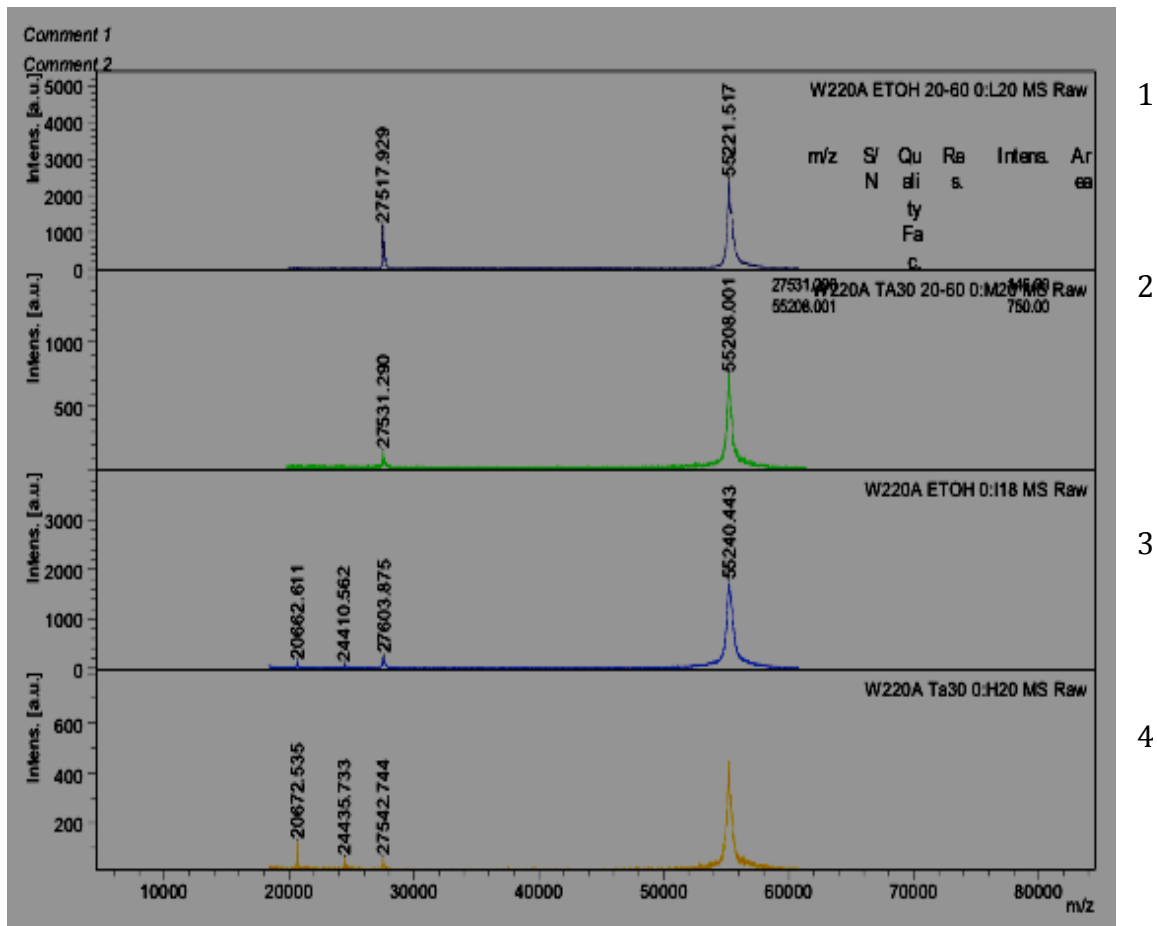
Massespektraene til ChiB-W220A er vist i figur 4.15 (masseområde 5-20 m/z) og 4.16 (masseområde 20-60 m/z).

Det ble sammenliknet med to forskjellige batcher, hvorav ene ble dyrket og rensset i forbindelse med denne oppgaven (batch 1) (1 og 2) mens den andre var rensset av Sønderland og Rønneberg (batch 2) (3 og 4).

Det viser seg at det er en topp i det lave masseområdet (6307 m/z) og at det er to topper i det høye masseområdet (20672 m/z og 24435 m/z) som ikke kommer opp i den batch 1.

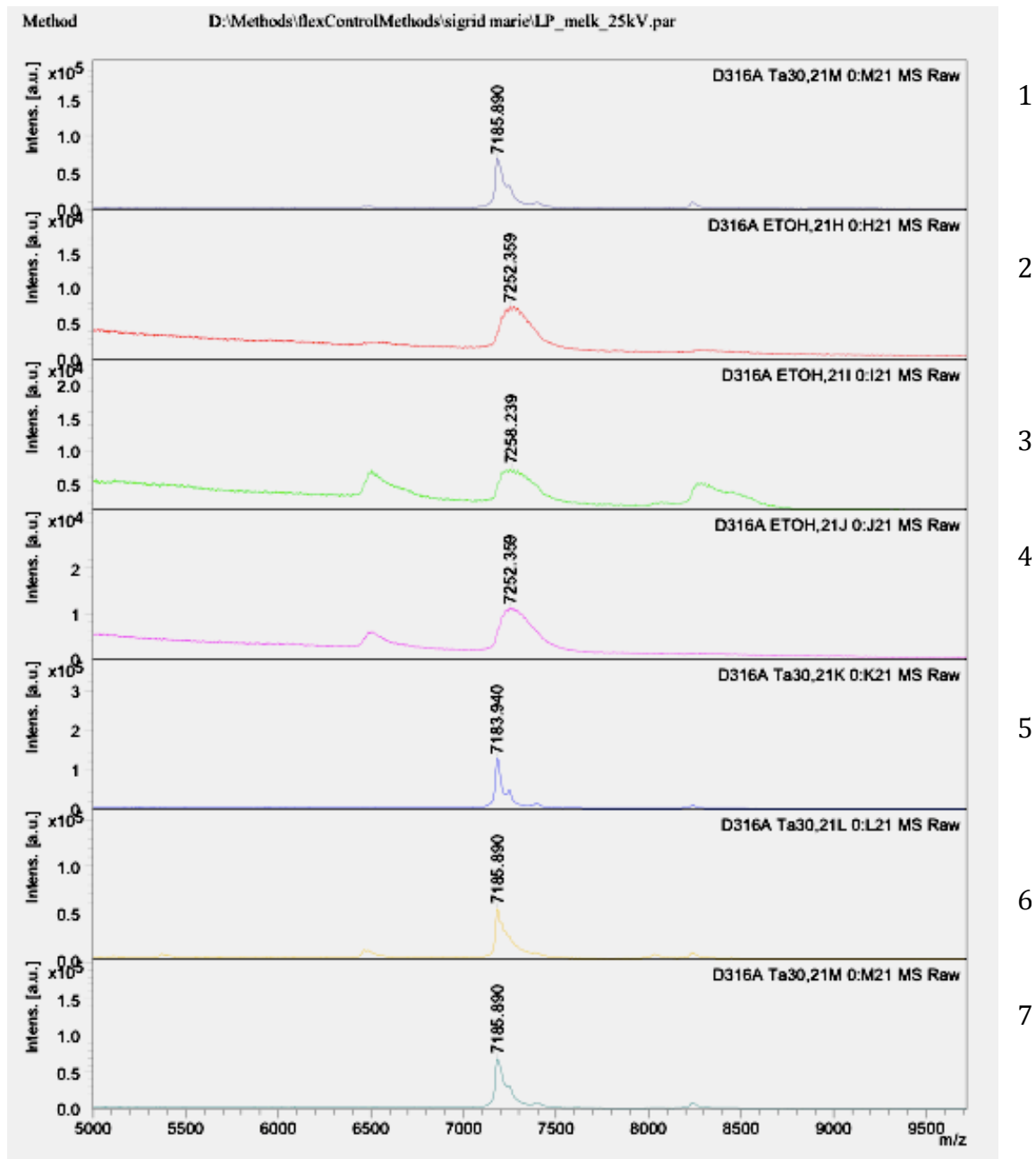


Figur 4.15 Sammenligning med ChiB-W220A i masseområdet 5000 til 20000 m/z . 1) og 2) Mutanten ChiB-W220A rensset til oppgaven (batch 1), 3) og 4) Mutanten ChiB-W220A rensset av Sønderland og Rønneberg (batch 2).



Figur 4.16 Sammenligning av ChiB-W220A med ETOH og Ta30 som matriks i masseområdet 20-60 m/z . 1) og 2) Mutanten ChiB-W220A fra batch 1, 3) og 4) Mutanten ChiB-W220A fra batch 2.

I figur 4.17 vises massespektre til ChiB-D316A i to forskjellige matrikser. Her ser vi klart forskjell mellom effekten matriksene har på opptak på spektre. Matriks inneholdende Ta30 (1, 5, 6 og 7) gir en skarpere topp (7185 m/z) i forhold til matriks inneholdende ETOH (2, 3 og 4) som gir en rundere topp samt at det kommer opp en topp før og etter hovedtoppen (7252 m/z). Intensiteten er også større for matriks inneholdende Ta30.



Figur 4.17 Sammenligning av ChiB-D316A med ETOH og Ta30 som matriks. 1) Mutant ChiB-D316A med Ta30, 2) Mutant ChiB-D316A med ETOH, 3) Mutant ChiB-D316A med ETOH, 4) Mutant ChiB-D316A med ETOH, 5) Mutant ChiB-D316A med Ta30, 6) Mutant ChiB-D316A med Ta30, 7) Mutant ChiB-D316A med Ta30.

4.3.2 Mutantene analysert ved hjelp av LC-MS

Væskekromatografi koblet til massespektrometri (LC-MS) er et vanlig oppsett innen massespektrometri.

Hver av de syv trypsinerte proteinene ble analysert ved hjelp av LC-MS, og sekvensene for hver mutant ble satt inn i tabell 3-9. Vi har i våre innstillinger godtatt 1 feilkløyving (missed cleavage). Feilkløyving innebærer at trypsin, som er en spesifikk serinprotease, ikke kløyver ved alle R eller K i peptidet slik den skal, men "hopper" over en aminosyre. Dette fører til flere mulige treff når man søker i databasen, og er årsaken til at tabellen inneholder mer enn en sekvens for hvert muterte peptid. Dette er en viktig innstilling da man ofte ser at trypsin ikke er 100 % effektiv.

I tabell 9 ser vi dobbelmutanten ChiB-W220A/W97A hvor det er to sekvenser per kjøring.

Tabell 3 Mutanten ChiB-W97A der 2 av sekvensene er feilkløyvet og en uten feilkjøyving. Vi ser her masse på ladning (m/z), hvilket område mutant er i (Sekvensområde) og hvor mange feilkløyvinger (feilkløyving) det er i mutant.

m/z	Sekvens område	Feil kløyving	Sekvens	Mutant
3565.7644	83-115	1	AHNPSLRIMFSIGGAYYSN D LGVSHANYVNAVK	W97A
3286.6313	90-120	1	IMFSIGGAYYSNDLGVSHA N YVNAVKTPAAR	W97A
2790.3555	90-115	0	IMFSIGGAYYSNDLGVSHA N YVNAVK	W97A

Tabell 4 Mutanten ChiB-W220A der 2 av sekvensene er feilkløyvet og en uten feilkjøyving. Vi ser her masse på ladning (m/z), hvilket område mutanten er i (Sekvensområde) og hvor mange feilkløyvinger (feilkløyving) det er i mutanten.

m/z	Sekvens område	Feil kløyving	Sekvens	Mutant
4948.5341	199-244	1	LAQIVAPLDYINLMTYDLAG PAEKITNHQAALFGDAAGPT FYNALR	W220A
3160.6274	195-222	1	YYSKLAQIVAPLDYINLMTY DLAGPAEK	W220A
2619.3738	199-222	0	LAQIVAPLDYINLMTYDLAG PAEK	W220A

Tabell 5 Mutanten ChiB-F191A der 2 av sekvensene er feilkløyvet og en uten feilkjøyving. Vi ser her masse på ladning (m/z), hvilket område mutanten er i (Sekvensområde) og hvor mange feilkløyvinger (feilkløyving) det er i mutanten.

m/z	Sekvens område	Feil kløyving	Sekvens	Mutant
3315.7807	163-194	1	TLLNQQTADGRQALPYQ LT IAGAGGAFALSR	F191A
2546.3401	175-198	1	QALPYQLTIAGAGGAFALS R YYSK	F191A
2005.0865	175-194	0	QALPYQLTIAGAGGAFALS R	F191A

Tabell 6 Mutanten ChiB-F190A der 2 av sekvensene er feilkløyvet og en uten feilkjøyving. Vi ser her masse på ladning (m/z), hvilket område mutanten er i (Sekvensområde) og hvor mange feilkløyvinger (feilkløyving) det er i mutanten.

m/z	Sekvens område	Feil kløyving	Sekvens	Mutant
3315.7807	163-194	1	TLLNQQTADGRQALPYQLT IAGAGGAAFLSR	F190A
2546.3401	175-198	1	QALPYQLTIAGAGGAAFLSR YYSK	F190A
2005.0865	175-194	0	QALPYQLTIAGAGGAAFLSR	F190A

Tabell 7 Mutanten ChiB-D316A der 2 av sekvensene er feilkløyvet og en uten feilkjøyving. Vi ser her masse på ladning (m/z), hvilket område mutanten er i (Sekvensområde) og hvor mange feilkløyvinger (feilkløyving) det er i mutanten.

m/z	Sekvens område	Feil kløyving	Sekvens	Mutant
4075.7973	295-333	1	AFKGVSGGNGGQYSSHSTPG EAPYPNADYWLVCDECVR	D316A
3972.7187	298-335	1	GVSGGNGGQYSSHSTPGEAP YPNADYWLVCDECVRDK	D316A
729.5968	298-333	0	GVSGGNGGQYSSHSTPGEAP YPNADYWLVCDECVR	D316A

Tabell 8 Mutanten ChiB-R446 der 2 av sekvensene er feilkløyvet og en uten feilkjøyving. Vi ser her masse på ladning (m/z), hvilket område mutanten er i (Sekvensområde) og hvor mange feilkløyvinger (feilkløyving) det er i mutanten.

m/z	Sekvens område	Feil kløyving	Sekvens	Mutant
749.3940	440-446	0	YTGVGPR	R446
4276.1535	440-479	1	YTGVGPRGNLPIMTAPAYVP GTTYAQGALVSYQGYVWQT K	R446
2882.3049	421-446	1	YFNAADYDDSQLDMGTGLR Y TGVGPR	R446

Tabell 9 Dobbelmутanten ChiB-W220A/W97A. Vi ser her masse på ladning (m/z), hvilket område mutanten er i (Sekvensområde) og hvor mange feilkløyvinger det er i hver mutant (feilkløyving).

m/z	Sekvens område	Feil kløyving	Sekvens	Mutant
4948.5341	199-244	1	LAQIVAPLDYINLMTYDLAG PAEKITNHQAALFGDAAGPT FYNALR	W220A/W 97A
3565.7644	83-115	1	AHNPSLRIMFSIGGAYYSND LGVSHANYVNAVK	W220A/W 97A
3160.6274	195-222	1	YYSKLAQIVAPLDYINLMTY DLAGPAEK	W220A/W 97A
3286.6313	90-120	1	IMFSIGGAYYSNDLGVSHAN YVNAVKTPAAR	W220A/W 97A
2619.3738	199-222	0	LAQIVAPLDYINLMTYDLAG PAEK	W220A/W 97A
2790.3555	90-115	0	IMFSIGGAYYSNDLGVSHAN YVNAVK	W220A/W 97A

Ut i fra dataene kan vi se at mutasjonen er på riktig plass i sekvensen både for alle enkeltmutanter og dobbelmутanten. For dobbelmутanten kan det sees at to W er byttet ut med to A. Ut i fra Mutantene ChiB-F190A og ChiB-F191A kan vi si at massene til analyserte fragmenter er i overensstemmelse med at en F er blitt byttet ut med en A. Teoretisk masse for ChiB er på 55,464 kDa og har en sekvens lengde på 499 aminosyrer.

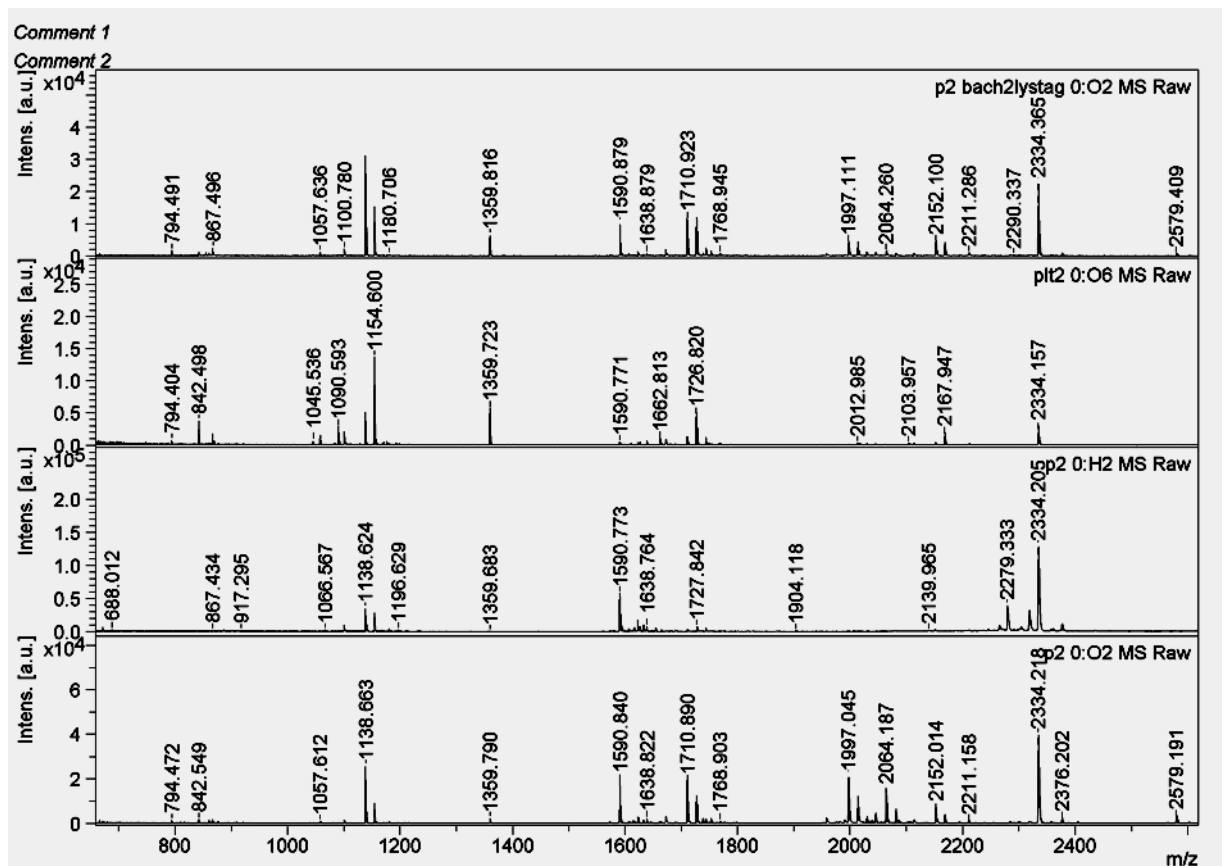
4.3.3 Kjemisk merking av mutantene

I denne oppgaven ble det brukt to kjemiske derivatiseringsmetoder av peptider produsert ved trypsinering av proteiner. For å kunne identifisere primærsekvenser av peptider ble det brukt en MALDI-TOF/TOF-MS/MS analyse. Disse metodene var henholdsvis SPITC og Lys-Tag.

Lys-Tag metoden utnytter at den reaktive imidazolekomponenten kan reagere med ϵ -amino gruppen på lysin, og omdanner denne til en imidazolering og med

det legger til 68,037 Da) (Lys Tag figur 1.12) (Conrotto and Hellman 2008). Når man tagger ϵ -amino gruppen av lysin med en imidazolering, skjer en proton deling slik at bare y-fragmentene blir ladd. SPITC derimot er en N-terminal derivatiseringsmetode og som legger til +215 Da (SPITC figur 1.13).

På figur 4.18 vises massespektre til trypsinert ChiB-W220A som er forsøkt merket med SPITC (3), Lys-Tag (1), med både SPITC og Lys-Tag (2) og ubehandlet (4). Spektrene viser ingen store forskjeller på de ulike fraksjonene. Det er vis masseforskyvning, men ingen er så store som +68 Da (Lys-Tag) eller +215 Da (SPITC). For å teste at det ikke var noe feil med Lys-Tagreagenset ble dette reagert med bovint serumalbumin (BSA) og undersøkt med MALDI-TOF/TOF-MS (figur 4.20).



Figur 4.18 Oversikt over hele spektret av mutanten ChiB-W220A både med Lys-Tag, SPITC og uten noen kjemisk merking. 1) Mutanten ChiB-W220A med Lys-Tag, 2) Mutanten ChiB-W220A med både Lys-Tag og SPITC, 3) Mutanten ChiB-W220A med bare SPITC og 4) Mutanten ChiB-W220A er uten kjemisk merking.

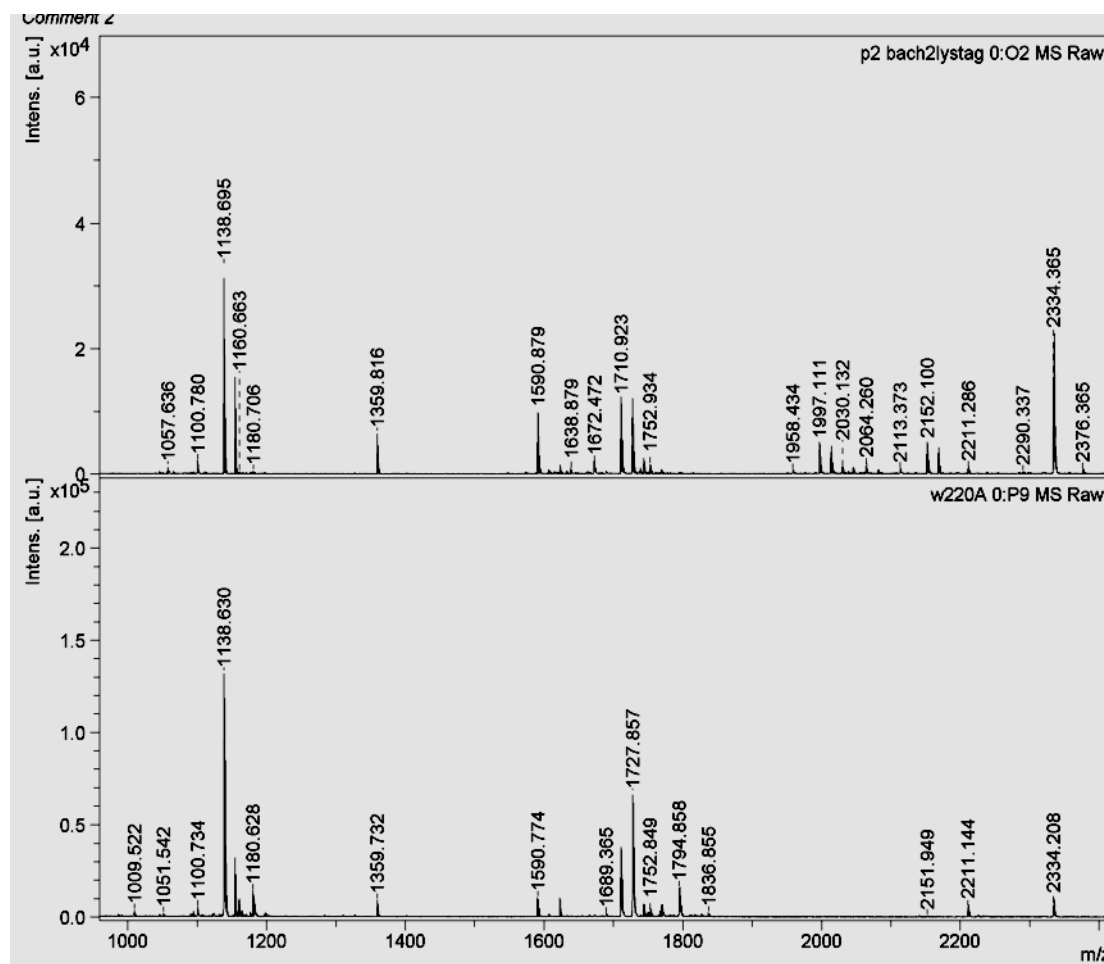
4. RESULTAT

På figur 4.19 ser vi ChiB-W220A med Lys-Tag (1) og uten kjemisk merking (2).

2

Vi ser her at det er lite forskjell i de to. Det er noen flere topper i den som er behandlet med kjemisk merking (1), men ingen +68 Da forskyvning. Vi kan med dette si at Lys-Tag ikke fungerte på mutantene.

3



1

4

2

Figur 4.19 Her ser vi hele spektret av ChiB-W220A med og uten kjemisk merking. 1) Mutanten ChiB-W220A med Lys-Tag, 2) Mutanten ChiB-W220A uten Lys-Tag.

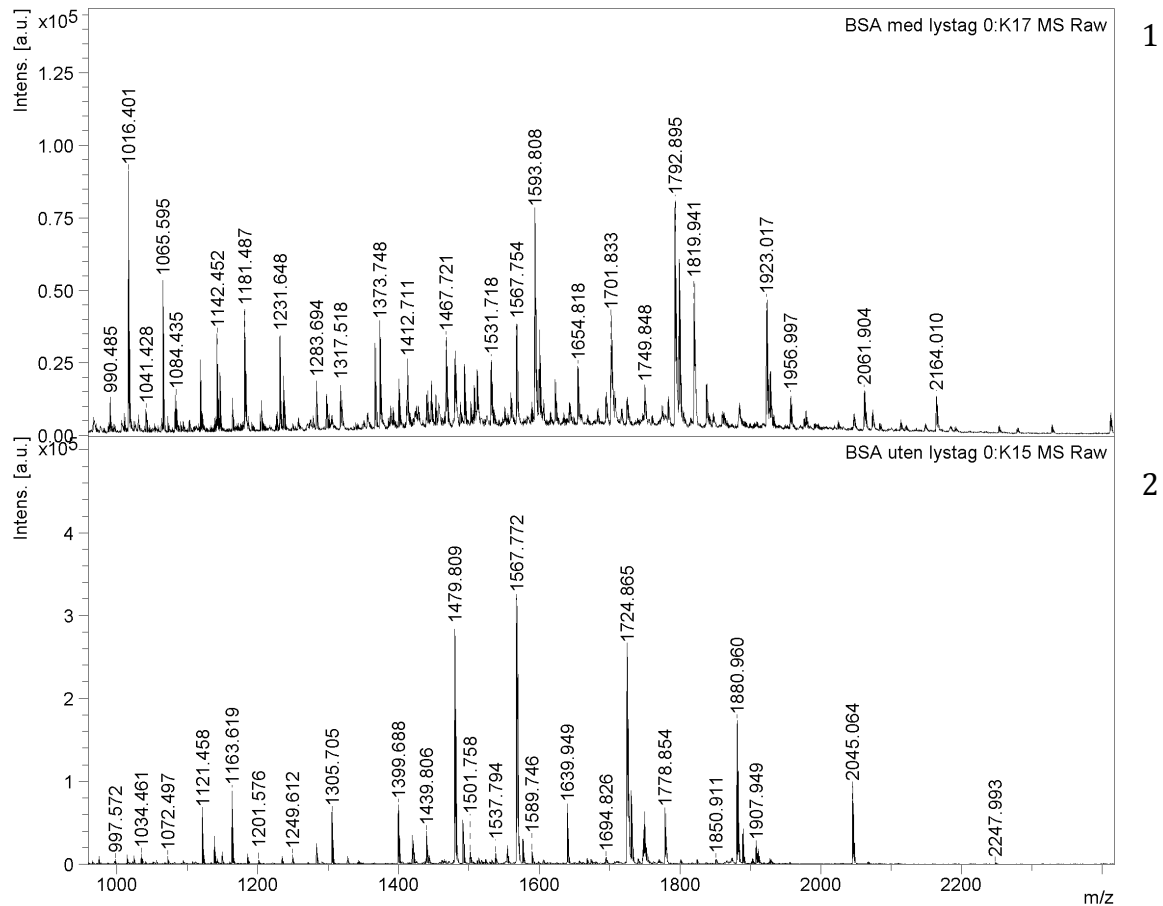
I figur 4.20 har vi testet Lys-Tag for å se om det var noe galt med den. Vi testet den på BSA og her kan vi se den forskyvningen på +68 Da som vi er ute etter.

Lysin-bestemte peptider (2) i figur 4.20 ser vi toppene

997,5/1163,6/1249,6/1399,6/1724,6 reagerer helt med Lys-Tag (1) og gir en forskyvning på 68 Da (korresponderende topper:

1065,5/1231,6/1317,6/1467,6/1792,6).

Lys-Taggen forbedrer MALDI signalenes intensitet av peptider som inneholder lysin. Vi vet med dette at Lys-Taggen fungerer på BSA, men ikke på våre mutanter. Dette kan ha noe med for lite lysin i peptidene til å se de korresponderende toppene. I Chi B er det 20 lysin aminosyrer, mens i BSA er det 50 lysin.



Figur 4.20 Hele spektret av BSA med og uten Lys-Tag. 1) Modifisert BSA, 2) Umodifisert BSA. Lysin-bestemte peptider (2: toppene 997,5/1163,6/1249,6/1399,6/1724,6/) reagerer helt med Lys-Tag (1) og gir en forskyvning på 68 Da (korresponderende topper: 1065,5/1231,6/1317,6/1467,6/1792,6).

5 Diskusjon

5.1 Fraksjonering

Målet med oppgaven var å teste ut ulike prosedyrer for fraksjonering av celler. Ved å identifisere og kvantifisere proteinuttrykk ved hjelp av LC-MS som metode, kan man bestemme fraksjonerings effektiviteten av hver enkelt fraksjoneringsmetode.

De to fraksjoneringsmetodene som ble brukt sørget begge for subcellulær fraksjonering og inndeling av proteinene i membranproteiner, cytosolproteiner, cytoskjelett/mitokondrieproteiner og kjerneproteiner.

Bruk av manuell metode indikerte en dårlig fraksjonering av proteinene generelt. Båndene viste stor forskjell i fordelingen av proteiner i begge fraksjonene. Fraksjoneringskitet ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction kit fra Calbiochem (figur 4.2) ga best resultat. Gelen viste bedre båndseparasjon i de ulike fraksjonene, sammenlignet med resultatet fra manuell metode (figur 4.1).

Kitet var mye lettere å jobbe med, da det trengtes mindre buffer og inneholdt færre steg i prosedyren for å separere proteinene og var mer tidsbesparende enn manuell metode. Det kreves også mindre celler enn med manuell metode (hhv. 5 og 30 millioner). Ulempen er at kostnadene er høyere enn for bruk av manuell metode.

De to fraksjoneringsmetodene har også forskjellige anvendelsesområder. Den manuelle metoden gir for eksempel tilgang til mitokondrieproteinene mens det kommersielle kitet tillater isolering av cytoskjelettproteiner. I enkelte tilfeller vil det være interessant å se på cytoskjelettproteiner for å studere transporten av proteiner i en celle, hvordan organellene holdes på plass i cellen eller hvordan cytoskjelettproteiner deltar i celledelingen. Dersom det er interessant å studere cellens aerobe energiproduksjon er uttrykk av mitokondrieproteiner mest relevant.

Det ble brukt LC-ESI-MS/MS for å analysere fraksjonene. Oppsettet er vist i tabell 2

Proteintreffet var noe lavt. Den største årsaken til at man ikke finner nok proteiner ved hjelp av MS, eller at man ikke ser spesifikke proteinbånd på gelen som burde være tilstede kan være forurensing. Det er ofte de proteinene det finnes lite av som er av stor betydning og interesse, mens de proteinene det finnes mye av vil kunne maskere proteiner av større biologisk betydning. Vi har derfor interesse av å utføre en bedre separasjon slik at de ikke eluerer samtidig ved separasjonsmetoder basert på egenskapene til proteinet.

Affinitetskromatografi for spesifikke proteiner det finnes mye av kan hindre maskering av proteiner (Canas, Pineiro et al. 2007).

Ved affinitetskromatografi kan man eliminere "forurensende" proteiner i blodplasma, som albumin fra serum (Darde, Barderas et al. 2007).

5.2 Kontroll av seterettet mutagenese

5.2.1 Mutantene analysert ved hjelp av MALDI TOF-TOF MS/MS

Oppgaven var å utvikle en metode for å kontrollere om ønsket endring i et protein hadde funnet sted. Ved å bruke MALDI-TOF-MS på hele proteiner kan man raskt finne ut om det er en forskjell i reell masse til proteiner sammenliknet med teoretisk masse (tabell 10). Når vi regnet ut forskjellen i teoretisk masse mot reel masse kunne vi se at dette stemte med de mutasjonene som ble gjort. Tabell 13 i appendiksen ser vi en oversikt over aminosyrene brukt i mutasjonene. Vi kunne ut i fra denne metode se at mutasjonen hadde funnet sted og metoden fungerte.

Tabell 10 Her ser vi mutantene som er brukt, teoretisk masse for ChiB samt den reelle massen for hver mutant. Ble også regnet ut forskjellen i massene.

Mutant	Teoretisk masse (mW)	Reel masse (mW)	Forskjell i mW
ChiB-W97A	55464.38	55349.25	115.13
ChiB-W220A	55464.38	55349.25	115.13
ChiB-F190A	55464.38	55388.29	76.09
ChiB-F191A	55464.38	55388.29	76.09
ChiB-D316A	55464.38	55420.37	44.01
ChiB-R446	55464.38	55308.20	156.18
ChiB-W97A/W220A	55464.38	55234.12	230.26

Når mutantene ble kjørt på MALDI ble det brukt 2 forskjellige matriks-løsninger for å se om dette hadde en innvirkning på ioniseringen av disse mutantene. Effekten av matrikskomposisjon er her et poeng, og man kunne se en liten forskjell i de forskjellige matriksene.

Vi kan se at det er en topp på 55220 m/z som går igjen for mutantene ChiB-W220A, ChiB-W97A og dobbelmutanten ChiB-W97A/W220A, denne toppen tilsvarende størrelsen på mutanten. Denne kommer ikke fram for de andre mutantene. Så da vet vi at om den toppen kommer opp er det en av de 3 mutantene (ChiB-W220A, ChiB-W97A eller ChiB-W220A/W97A).

Når vi så at denne metoden fungerte, testet vi ut reproduserbarheten for ChiB-F190A, ChiB-F191A, ChiB-W220a og ChiB-D316A. Ut i fra reproduserbarheten kan vi se at alle ga positivt svar og metoden var god.

I denne oppgaven ble det også testet flere batcher, hvorav ene ble dyrket og rensset i forbindelse med denne oppgaven (batch 1) mens den andre var rensset av Sønderland og Rønneberg (batch 2). Resultatet ser vi i figur 4.15 og 4.16, der vi kan se at det er små variasjoner fra batch 1 (1 og 2) i forhold til batch 2 (3 og 4). Dette kan ha noe med proteinaktiviteten og konsentrasjonen til proteinet å gjøre. Om aktiviteten er lav får man ikke utslag på massespektrometret. Dette er

en enkel metode som lett skiller mutantene fra hverandre og vi klarte her å oppnå det vi ville med oppgaven.

5.2.2 Mutantene analysert ved hjelp av LC-MS/MS

Ved å analysere peptider fra uderivatiserte trypsindegraderte proteiner ved bruk av LC-MS kan man kontrollere på en mindre del av proteinet om riktig utskifting av aminosyre har blitt foretatt.

Hver av de syv trypsinerte proteinene ble analysert og sekvensene for hver mutant ble satt inn i tabell 3-9. Vi har i våre innstillinger godtatt 1 feilkløyving (missed cleavage). Feilkløyving innebærer at trypsin, som er en spesifikk serinprotease, ikke kløyver ved alle R eller K i peptidet slik den skal, men "hopper" over en aminosyre. Dette fører til flere mulige treff når man søker i databasen, og er årsaken til at tabellen inneholder mer enn en sekvens for hvert muterte peptid. Dette er en viktig innstilling da man ofte ser at trypsin ikke er 100 % effektiv.

Massene til peptidene ble bestemt og sammenliknet med teoretisk masse (tabell 10).

Ut i fra dataene kan vi se at mutasjonen er på riktig plass i sekvensen både for alle enkeltmutanter og dobbelmutanten. For dobbelmutanten kan det sees at to W er byttet ut med to A. Ut i fra Mutantene ChiB-F190A og ChiB-F191A kan vi si at massene til analyserte fragmenter er i overensstemmelse med at en F er blitt byttet ut med en A. Ut i fra dette kan vi si at metoden fungerte og vi kunne ut fra dataene se at massen forandret seg ved bytte av en W til en A og en F bytte til en A.

5.2.3 Kjemisk merking

Ved å analysere derivatiserte peptider fra trypsindegraderte proteiner ved bruk av MS/MS kan man bestemme sekvensen på peptidene og om muteringen forekommer der den skal i primærsekvensen. I denne oppgaven ble det brukt to kjemisk derivatiseringsmetoder (SPITC og Lys-Tag) for proteinidentifisering ved hjelp av MALDI-TOF massespektrometri. Tys-Tag legger til en endring i massen

på +68 Da i ϵ -amino gruppen av lysin, og omdanner denne til imidazolering.

SPITC har en større forskyvning på +215 Da.

Derivatisering ble utført på ChiB-W220A (figur 4.18 og 4.19), men resultatet var ikke vellykket. Årsaken til dette kan være flere ting, men den vanligste feilen er ofte at det er for lite lysin i peptidene til å kunne se de korresponderende toppene. SPITC ble varmet opp for at den skulle fungere, men heller ikke denne derivatiseringen fungerte. Dette kan ha noe med at batchen med SPITC var for gammel eller at prøvene sto for lang tid i 55 °C.

Vi derivatiserte peptider fra trypsindeggradert BSA med Lys-Tag for å se om det var noe galt med reagenset. Her kunne vi klart se en forskyvning på +68 Da som antyder at Lys-Taggen fungerer slik den skal (figur 4.20). Vi ser også at de toppene uten kjemisk merking (997,5/1163,6/1249,6/1399,6/1724,6) reagerer helt med Lys-Tag og gir en forskyvning på +68 da. De korresponderende toppene er 997,5/1163,6/1249,6/1399,6/1724,6 .

Lys-Tag fungerte på BSA muligens fordi det var nok lysin i peptidene til at de reagerte helt med Lys-Taggen, noe vi ikke kunne se for ChiB-W220A. Det er i BSA 50 lysin aminosyrer mens for ChiB-W220A er det bare 20 lysin aminosyrer. Prøveopparbeidelsen spiller også en viktig rolle for hvor bra derivatiseringen vil fungere.

5.3 Videre arbeid og oppsummering

Fraksjoneringsmetodene som ble undersøkt trenger videre optimalisering. Den dynamiske rekkevidden må økes, sammen med antall proteintreff slik at man klarer å identifisere flere interessante proteiner. Det er ønskelig å se mer på kit som gir andre fraksjoner enn de som hittil er testet i dette arbeidet, da dette kan gi svar på andre, komplementære problemstillinger. Mye av eksterne stimuli blir først tatt opp transmembrant, og man ser gjerne endringene der først. Derfor ønsker vi videre å se på ett transmembrant fraksjoneringskit fra Calbiochem & Novagen (ProteoExtract® Transmembrane Protein Extraction Kit). Dette settet baserer seg på å isolere transmembrane proteiner fra mammalske celler.

Det ble i dette studiet benyttet stamceller til fraksjonering og ved videre arbeid vil forskningen basere seg på forskjellige typer stamcellestimuleringer.

Det ble i denne oppgaven lagt vekt på seterettet mutagenese og fraksjonering ved hjelp av kit samt manuell metode.

Ved bruk av MALDI TOF-TOF MS/MS, LC-MS/MS og Kjemisk merking kunne vi se at mutasjonene hadde skjedd på riktig plass i sekvensen.

Manuell fraksjoneringsmetode viste i denne oppgaven mye dårligere separering av proteinene i hver fraksjon enn ved bruk av det kommersielle fraksjoneringskitet ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction kit fra Calbiochem. Med dette har vi bevist at det er lettere å bruke et kommersielt kit enn en manuell metode.

6. Referanser

- Ahuja, S. (2003). Chromatography and separation science. Amsterdam ; Boston, Academic Press.
- Ashcroft, A. E. (2003). "Protein and peptide identification: the role of mass spectrometry in proteomics." Nat Prod Rep **20**(2): 202-15.
- Bantscheff, M., M. Schirle, et al. (2007). "Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review." Anal Bioanal Chem **389**(4): 1017-31.
- Bioteknologinemnda (09.04.2008). "Stamceller." from <http://www.bion.no/tema/stamceller.shtml>.
- Brighton, C. T. a. R. M. H. (1991). "Early histologic and ultrastructural changes in medullary fracture callus." Journal of Bone and Joint Surgery **73-A** (6): 832-847.
- Brurberg, M. B., V. G. Eijsink, et al. (1995). "Chitinase B from *Serratia marcescens* BJL200 is exported to the periplasm without processing." Microbiology **141** (Pt 1): 123-31.
- Canas, B., C. Pineiro, et al. (2007). "Trends in sample preparation for classical and second generation proteomics." J Chromatogr A **1153**(1-2): 235-58.
- Conrotto, P. and U. Hellman (2008). "Lys Tag: an easy and robust chemical modification for improved de novo sequencing with a matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometer." Rapid Commun Mass Spectrom **22**(12): 1823-33.
- Darde, V. M., M. G. Barderas, et al. (2007). "Depletion of high-abundance proteins in plasma by immunoaffinity subtraction for two-dimensional difference gel electrophoresis analysis." Methods Mol Biol **357**: 351-64.
- Davies, G. and B. Henrissat (1995). "Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases." Structure **3**(9): 853-9.
- Fuchs, R. L., S. A. McPherson, et al. (1986). "Cloning of a *Serratia marcescens* Gene Encoding Chitinase." Appl Environ Microbiol **51**(3): 504-509.
- Gates, D. P. (2005). "High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry (HPLC/MS)." Retrieved 29.01, 2010, from <http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/hplcms.html>.
- Geoffrey M. Cooper, R. E. H. (c2009). The cell : a molecular approach Washington, ASM Press/Sinauer Associates.
- Hagenstein, M. C. and N. Sewald (2006). "Chemical tools for activity-based proteomics." J Biotechnol **124**(1): 56-73.

Hekmat, O., S. He, et al. (2008). "A mechanism-based ICAT strategy for comparing relative expression and activity levels of glycosidases in biological systems." *J Proteome Res* **7**(8): 3282-92.

Hellman, U., C. Wernstedt, et al. (1995). "Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing." *Anal Biochem* **224**(1): 451-5.

Horn, S. J., P. Sikorski, et al. (2006). "Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(48): 18089-94.

Joss, J. L., M. P. Molloy, et al. (2006). "Evaluation of chemical derivatisation methods for protein identification using MALDI MS/MS." *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* **12**(3): 225-235.

Karp, N. A. and K. S. Lilley (2007). "Design and analysis issues in quantitative proteomics studies." *Proteomics* **7 Suppl 1**: 42-50.

Katouno, F., M. Taguchi, et al. (2004). "Importance of exposed aromatic residues in chitinase B from *Serratia marcescens* 2170 for crystalline chitin hydrolysis." *J Biochem* **136**(2): 163-8.

Kolch, W., H. Mischak, et al. (2005). "The molecular make-up of a tumour: proteomics in cancer research." *Clin Sci (Lond)* **108**(5): 369-83.

lab, B. a. M. (2007). "The Effect of mechanical stimulation on osteogenic differentiation of Bone marrow mesenchymal cells." Retrieved 24.02, 2010, from http://hms.kaist.ac.kr/hom03/hom03_01.php.

Lahm, H. W. and H. Langen (2000). "Mass spectrometry: a tool for the identification of proteins separated by gels." *Electrophoresis* **21**(11): 2105-14.

Lennon, J. J. (1997). "Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, Time-Of-Flight Mass Spectrometry." Retrieved 17.02, 2010, from <http://www.abrf.org/ABRFNews/1997/June1997/jun97lennon.html>.

Manoil, C. and J. Beckwith (1986). "A genetic approach to analyzing membrane protein topology." *Science* **233**(4771): 1403-8.

Pratt, J. M., D. M. Simpson, et al. (2006). "Multiplexed absolute quantification for proteomics using concatenated signature peptides encoded by QconCAT genes." *Nature Protocols* **1**(2): 1029-1043.

ProteoChem (2010). "Sinapinic Acid 25 mg." Retrieved 24.02, 2010, from <http://www.proteochem.com/sinapinicacid25mg-p-81.html>.

Rouvinen, J., T. Bergfors, et al. (1990). "Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*." *Science* **249**(4967): 380-6.

- Rowland, T. (2009). "Mesenchymal Stem Cells: A Diverse Family, Large and Still Growing." Retrieved 24.02, 2010, from <http://www.allthingsstemcell.com/2009/03/mesenchymal-stem-cells/>.
- Shapiro, A. L., E. Vinuela, et al. (1967). "Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels." Biochem Biophys Res Commun **28**(5): 815-20.
- Shevchenko, A., H. Tomas, et al. (2006). "In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes." Nat Protoc **1**(6): 2856-60.
- Siuzdak, G. (1994). "The emergence of mass spectrometry in biochemical research." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(24): 11290-7.
- Siuzsak, G. (2003). "The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology." American Society for Mass Spectrometry: 276.
- Teeri, T. T. (1997). "Crystalline cellulose degradation: New insight into the function of cellobiohydrolases." Trends in Biotechnology **15**(5): 160-167.
- Tuch, B. E. (2006). "Stem cells--a clinical update." Aust Fam Physician **35**(9): 719-21.
- Uchiyama, T., F. Katouno, et al. (2001). "Roles of the exposed aromatic residues in crystalline chitin hydrolysis by chitinase A from *Serratia marcescens* 2170." J Biol Chem **276**(44): 41343-9.
- van Aalten, D. M. F., D. Komander, et al. (2001). "Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(16): 8979-8984.
- van Aalten, D. M. F., B. Synstad, et al. (2000). "Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1.9-angstrom resolution." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(11): 5842-5847.
- Want, E. J., B. F. Cravatt, et al. (2005). "The expanding role of mass spectrometry in metabolite profiling and characterization." Chembiochem **6**(11): 1941-51.
- Watanabe, T., Y. Ito, et al. (1994). "The roles of the C-terminal domain and type III domains of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 in chitin degradation." J Bacteriol **176**(15): 4465-72.
- Watanabe, T., K. Kimura, et al. (1997). "Genetic analysis of the chitinase system of *Serratia marcescens* 2170." J Bacteriol **179**(22): 7111-7.
- Weber, K. and M. Osborn (2006). "SDS-PAGE to determine the molecular weight of proteins: The work of Klaus Weber and Mary Osborn - The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (reprinted from *J.Biol. Chem.* vol. 244, pg. 4406-4412, 1969)." Journal of Biological Chemistry **281**(24): -.

Wibetoe, G. (2010). "Kromatografi." Retrieved 17.03, 2010, from <http://www.snl.no/kromatografi>.

Wierenga, R. K. (2001). "The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes." *FEBS Lett* **492**(3): 193-8.

Wilkins, P. M. (2009). "school og Biotechnology and biomolecular science." Retrieved 28.01, 2010.

Wu, W. W., G. Wang, et al. (2006). "Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D gel- or LC-MALDI TOF/TOF." *J Proteome Res* **5**(3): 651-8.

7.APPENDIKS

7.1 Proteinlister

7.1.2 Subcellulær lokalisering av proteiner

Tabell 11 Tabellen viser en oversikt over proteiner (223) som ble funnet under studiene og deres subcellulære lokalisering ved bruk av fraksjoneringskitet ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction kit fra Calbiochem. Vi kan også se at det er flere proteiner som har samme subcellulære lokalisering samt noen med ukjent lokalisering.

Protein Nr.	Regulerte protein	Subcellulær lokalisering
1	cDNA FLJ56092, highly similar to Pentatricopeptide repeat protein 1	ukjent
2	cDNA FLJ55574, highly similar to Calnexin	ukjent
3	cDNA FLJ55936, highly similar to Polypyrimidine tract-binding protein 2	ukjent
4	cDNA FLJ59211	ukjent
5	Enhancer of rudimentary homolog	ukjent
6	Galectin-1	ukjent
7	hypothetical LOC100131655	ukjent
8	LOC100131655	ukjent
9	LOC100134751;LOC100129737 Isoform 1 of Leucine-rich repeat and death domain-containing protein LOC401387	ukjent
10	mCG19129	ukjent
11	Putative uncharacterized protein PSME2	ukjent
12	soform 1 of Polypyrimidine tract-binding protein 1	ukjent
13	soform 2 of Tropomyosin alpha-3 chain	ukjent
14	Translocon-associated protein subunit delta precursor	ukjent

15	UPF0527 transmembrane protein	ukjent
16	dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase precursor	ukjent
17	Isoform 1 of ANKRD26-like family C member 1A	ukjent
18	ADP/ATP translocase 1	mitokondrion,membran
19	ADP/ATP translocase 2	mitokondrie
20	ATP synthase subunit beta	mitokondrie
21	ATP synthase subunit delta	mitokondrie
22	Cytochrome b-c1 complex subunit 1	mitokondrie
23	Cytochrome b-c1 complex subunit 2	mitokondrie
24	fission 1 protein	mitokondrie
25	import receptor subunit TOM20 homolog	mitokondrie
26	iron sulfur domain-containing protein 2	mitokondrie
27	Microsomal glutathione S-transferase 1	mitokondrie
28	Trifunctional enzyme subunit beta	mitokondrie
28	10 kDa heat shock protein	mitokondrie
29	39S ribosomal protein L49, mitochondrial	mitokondrie
29	acyl-Coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial isoform b	mitokondrie
30	ATP synthase subunit alpha	mitokondrie
30	ATP synthase-coupling factor 6	mitokondrie
31	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1	mitokondrie
31	Cytochrome c oxidase subunit 5A	mitokondrie
32	Cytochrome c oxidase subunit VIb isoform 1	mitokondrie
32	Dihydrolipoyl dehydrogenase	mitokondrie
33	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	mitokondrie
33	Glutamate dehydrogenase 1	mitokondrie

34	import inner membrane translocase subunit Tim13	mitokondrie
34	import inner membrane translocase subunit Tim8 A	mitokondrie
35	Isoform Mitochondrial of Peroxiredoxin-5	mitokondrie
35	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4	mitokondrie
36	Putative uncharacterized protein DKFZp781K1356	mitokondrie
36	Ribosomal protein S27	mitokondrie
37	Serine hydroxymethyltransferase	mitokondrie
37	Single-stranded DNA-binding protein	mitokondrie
38	Thioredoxin-dependent peroxide reductase	mitokondrie
39	Tu translation elongation facto	mitokondrie
40	Ribosomal protein S27	mitokondrie
41	Isoform 1 of Adenylate kinase isoenzyme 2	mitokondrie
42	TUBA1C protein	microtube
43	Isoform 4 of Dystrophin	membran
44	Isoform A of Potassium channel subfamily K member 10	membran
45	Junctophilin-1	membran
46	Adipocyte plasma membrane-associated protein	membran
47	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	membran
48	Cytochrome c oxidase polypeptide VIc	membran
49	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12	membran
50	HSPA5 protein	membran
51	Interferon-induced transmembrane protein 2	membran
52	isoform 1 of Collagen alpha-3(VI) chain	membran

53	Isoform 1 of Filamin-B	membran
54	Isoform 1 of Filamin-C	membran
55	Isoform 1 of Gamma-glutamyltranspeptidase 1	membran
56	Isoform 1 of Neurexin-2-alpha	membran
57	Isoform 1 of Phosphatidylcholine:ceramide cholinephosphotransferase 1	membran
58	Isoform SERCA2A of Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	membran
59	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	membran
60	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	membran
61	Protein transport protein Sec61 subunit beta	membran
62	Proteolipid protein 2	membran
63	Ras-related protein Rab-10	membran
64	Ras-related protein Rab-11B	membran
65	Rho-related GTP-binding protein RhoC	membran
66	Thioredoxin domain-containing protein 5	membran
67	UPF0404 protein C11orf59	membran
68	Vesicle-associated membrane protein 3	membran
69	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1S	membran
70	IgG receptor FcRn large subunit p51 (Fragment)	membran
71	Isoform 1 of Collagen alpha-3(VI) chain	membran
72	Isoform 1 of Myosin-XVIIIb	kjerne,cytoplasma
73	Chloride intracellular channel protein 1	kjerne, membran
74	Poly(rC)-binding protein 1	kjerne, membran
75	Protein S100-A6	kjerne, membran
76	Histone H2A type 1-B/E	kjerne

77	Isoform 1 of Chromobox protein homolog 2	kjerne
78	Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	kjerne
79	KRR1 small subunit processome component homolog	kjerne
80	Proliferating cell nuclear antigen	kjerne
81	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	kjerne
82	Splicing factor, arginine/serine-rich 3	kjerne
83	30 kDa protein	kjerne
84	40S ribosomal protein S19	kjerne
85	cDNA FLJ45706 fis, clone FEBRA2028457,highly similar to Nucleolin SUM	kjerne
86	domain containing 4B	kjerne
87	FACT complex subunit SSRP1	kjerne
88	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 1	kjerne
89	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G	kjerne
90	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	kjerne
91	Histone H2B type 1-A	kjerne
92	Histone H2B type 1-L	kjerne
93	Histone H4	kjerne
94	Interleukin enhancer-binding factor 2	kjerne
95	Isoform 1 of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	kjerne
96	Isoform 2 of Nucleophosmin	kjerne
97	Isoform C1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	kjerne
98	NHP2-like protein 1	kjerne
99	Nucleoporin NUP53	kjerne
100	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	kjerne

101	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16	kjerne
102	Serine/threonine-protein phosphatase 1 regulatory subunit 10	kjerne
103	Histone H3.2	kjerne
104	Histone H2B type 1-L	kjerne
105	Histone H2A type 1-H	kjerne
106	Histone H2A type 1-B/E	kjerne
107	H2A histone family, member Y isoform 2	kjerne
108	EBNA1 binding protein 2	kjerne
109	A-kinase anchor protein 6	kjerne
110	Putative uncharacterized protein	kjerne
111	Isoform 1 of OCIA domain-containing protein 2	endosome
112	Protein disulfide-isomerase	endoplastisk reticulum, membran
113	Isoform 2 of Protein disulfide-isomerase A6	endoplastisk reticulum
114	Isoform 2 of Protein disulfide-isomerase A6	endoplastisk reticulum
115	Protein disulfide-isomerase A3	endoplastisk reticulum
116	Serpin H1	endoplastisk reticulum
117	Serpin H1	endoplastisk reticulum
118	Annexin A6	cytosol, membran
119	39S ribosomal protein L27, mitochondrial	cytosol, kjerne
120	40S ribosomal protein S7	cytosol, kjerne
121	60S ribosomal protein L10a	cytosol, kjerne
122	60S ribosomal protein L13	cytosol, kjerne
123	60S ribosomal protein L8	cytosol, kjerne
124	60S ribosomal protein L9	cytosol, kjerne

125	Heat shock 70 kDa protein 1-like	cytosol, kjerne
126	Isoform 1 of 60S ribosomal protein L11	cytosol, kjerne
127	Isoform 1 of Myosin-9	cytosol, kjerne
128	40S ribosomal protein S16	cytosol
129	60S ribosomal protein L13a	cytosol
130	60S ribosomal protein L4	cytosol
131	Heat shock protein HSP 90-beta	cytosol
132	Similar to Heat shock protein HSP 90-beta	cytosol
133	Tubulin beta-2C chain	cytosol
134	40S ribosomal protein S4	cytosol
135	40S ribosomal protein S6	cytosol
136	60S acidic ribosomal protein P2	cytosol
137	60S ribosomal protein L13a	cytosol
138	60S ribosomal protein L17	cytosol
139	60S ribosomal protein L18	cytosol
140	60S ribosomal protein L18a	cytosol
141	60S ribosomal protein L19	cytosol
142	60S ribosomal protein L23	cytosol
143	Elongation factor 1-alpha 1	cytosol
144	Elongation factor 1-beta	cytosol
145	Endoplasmin	cytosol
146	heat shock protein 90kDa alpha	cytosol
147	Heat shock protein beta-1	cytosol
148	Isoform 1 of Triosephosphate isomerase	cytosol
149	Isoform 1 of X-linked retinitis pigmentosa GTPase regulator	cytosol
150	Keratin, type I cytoskeletal 9	cytosol
151	Keratin, type II cytoskeletal 4	cytosol
152	ubiquitin and ribosomal protein S27a precursor	cytosol

153	Vimentin	cytosol
	Isoform 7 of Inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol-pentakisphosphate	
154	kinase 1	cytosol
155	Keratin, type II cytoskeletal 4	cytosol
	Isoform 1 of Protein bicaudal D homolog	
156	1	cytoskjelett
157	plectin 1 isoform 2	cytoskjelett
	Isoform 1 of Centrosome-associated protein CEP250	
158		cytoskjelet
159	soform 2 of Filamin-A	cytoskjelet
		cytoskeleton,membra,cytoplasma
160	Moesin	
	Isoform 1 of Dynein heavy chain 10, axonemal	
161		cytoskeleton,cytoplasma
		cytoplasma,membran
162	Isoform 1 of Filamin-C	
		cytoplasma,membran
163	Calpain small subunit 1	
	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	
163		cytoplasma,membran
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	
164		cytoplasma,membran
	Isoform B1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	
165		cytoplasma,kjerne
	Isoform Short of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	
166		cytoplasma,kjerne
167	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1	cytoplasma,kjerne
168	Eukaryotic translation initiation factor 6	cytoplasma,kjerne
169	GTP-binding nuclear protein Ran	cytoplasma,kjerne
170	Isoform 1 of 14-3-3 protein sigma	cytoplasma,kjerne
	Isoform 1 of Proteasome subunit alpha type-7	
171		cytoplasma,kjerne
	Isoform 2 of Proteasome subunit alpha type-3	
172		cytoplasma,kjerne

173	Isoform Short of Proteasome subunit alpha type-1	cytoplasma,kjerne
174	KH-type splicing regulatory protein	cytoplasma,kjerne
175	Proteasome activator complex subunit 1	cytoplasma,kjerne
176	Proteasome subunit alpha type-2	cytoplasma,kjerne
177	Proteasome subunit alpha type-4	cytoplasma,kjerne
178	Proteasome subunit alpha type-5	cytoplasma,kjerne
179	Proteasome subunit alpha type-6	cytoplasma,kjerne
180	UBC ubiquitin and ribosomal protein S27a precursor	cytoplasma,kjerne
181	Eukaryotic initiation factor 4A-III	cytoplasma,kjerne
182	Protein	cytoplasma,kjerne
183	Isoform 1 of RAS guanyl-releasing protein 1	cytoplasma,cytosol, membran
184	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	cytoplasma,cytosol, kjerne
185	Isoform 1 of Filamin-B	cytoplasma, cytoskeleton
186	Isoform 1 of Plectin-1	cytoplasma, cytoskeleton
187	Isoform 1 of Tropomyosin alpha-4 chain	cytoplasma, cytoskeleton
188	Isoform 3 of Plectin-1	cytoplasma, cytoskeleton
189	Radixin, isoform CRA_a	cytoplasma, cytoskeleton
190	tropomyosin 1 alpha chain isoform 7	cytoplasma, cytoskeleton
191	Tropomyosin 3 pseudogene	cytoplasma, cytoskeleton
192	Actin, cytoplasmic 2	cytoplasma, cytoskeleton
193	Beta-actin-like protein 2	cytoplasma, cytoskeleton
194	60S acidic ribosomal protein P0	cytoplasma

	highly similar to <i>Mus musculus</i>	
195	thioredoxin reductase 3 (Txnrd3), mRNA	cytoplasm
196	Isoform 3 of Plectin-1	cytoplasm
197	Isoform alpha-enolase of Alpha-enolase	cytoplasm
198	Myosin light chain 6B	cytoplasm
199	Myosin-2	cytoplasm
200	Peroxiredoxin-6	cytoplasm
201	Profilin-1	cytoplasm
202	14-3-3 protein epsilon	cytoplasm
203	14-3-3 protein eta	cytoplasm
204	14-3-3 protein gamma	cytoplasm
205	14-3-3 protein theta	cytoplasm
206	14-3-3 protein zeta/delta	cytoplasm
207	40S ribosomal protein S3	cytoplasm
208	40S ribosomal protein S8	cytoplasm
209	40S ribosomal protein S9	cytoplasm
210	Carbonyl reductase [NADPH] 1	cytoplasm
211	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	cytoplasm
212	Elongation factor 2	cytoplasm
213	Glutathione S-transferase P	cytoplasm
214	Isoform 1 of Golgin subfamily A member 4	cytoplasm
215	Isoform 1 of Obscurin	cytoplasm
216	Isoform 2 of Filamin-A	cytoplasm
217	Isoform Long of 14-3-3 protein beta/alpha	cytoplasm
218	Putative heat shock protein HSP 90-alpha A5	cytoplasm
219	Isoform 1 of Heat shock cognate 71 kDa protein	cytoplasm
220	Elongation factor 1-alpha	cytoplasm
221	18 kDa protein	cytoplasm

222 Actin

cytoplasma

223 Ezrin

ctyoskeleton,
membran

Tabell 12. Tabellen viser en oversikt over proteiner (26) som ble funnet under studiene av manuell metode og deres subcellulære lokalisering. Vi kan også se at det er flere proteiner som har samme subcellulære lokalisering.

Protein Nr.	Regulerte protein	Subcellulær lokalisering
1	60S ribosomal protein L17	cytosol,mitokondrie
2	60S ribosomal protein L18	cytosol
3	60S ribosomal protein L18a	cytosol,kjerne,mitokondrie
4	60S ribosomal protein L19	cytosol
5	Moesin	cytoskeleton,membra,cytosol,kjerne
6	GTP-binding protein 5	mitokondrie
7	fission 1 protein	mitokondrie
8	import receptor subunit TOM20 homolog	mitokondrie
9	iron sulfur domain-containing protein 2	mitokondrie,cytosol,kjerne,membran
10	Microsomal glutathione S-transferase 1	mitokondrie
11	Trifunctional enzyme subunit beta	mitokondrie, kjerne,cytosol,membran
12	39S ribosomal protein L49	mitokondrie
13	acyl-Coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial isoform b	mitokondrie
14	ATP synthase subunit alpha	mitokondrie,cytosol,kjerne
15	TUBA1C protein	microtube
16	Isoform 4 of Dystrophin	membran,cytosol
17	Isoform A of Potassium channel subfamily K member 10	membran
18	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	membran
19	IgG receptor FcRn large subunit p51 (Fragment)	membran,kjerne

20	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	membran
21	HSPA5 protein	membran
22	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	kjerne
23	domain containing 4B	kjerne
24	Histone H2B type 1-A	kjerne
25	Histone H2B type 1-L	kjerne
26	Isoform 2 of Nucleophosmin	kjerne,cytosol,mitokondrie

Tabell 13 Tabellen viser en oversikt av aminosyrene som ble brukt i mutasjonene til oppgaven. Her ser vi hvilken aminosyre det er, forkortelse for den, bokstav brukt i en sekvens og vekten på den aminosyren. De er her i alfabetisk rekkefølge.

Aminosyre	Forkortelse	Bokstav	Masse
Alanin	Ala	A	89
Arginine	Arg	R	174
Aspartic acid	Asp	D	133
Phenylalanine	Phe	F	165
Tryptophan	Trp	W	204