

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet  
Fakultet for veterinærmedisin og biovitenskap  
Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Masteroppgave 2015  
60 stp

## Human CaMKII $\delta$ mutanter – proteinekspressjon, rensing, krystallisering og analyse av SN-peptid binding

Human CaMKII $\delta$  mutants  
-protein expression, purification, crystallization and  
analysis of SN-peptide binding

Mari Therese Grønland



## Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Oslo Universitetssykehus, Rikshospitalet, avdeling for medisinsk mikrobiologi, og avslutter en 2-årig master i biokjemi ved Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Studiet var en del av et større prosjekt på SN-peptid og hjertesvikt ved Institutt for eksperimentell medisinsk forskning.

Det er mange jeg vil takke for hjelp underveis i oppgaven. Først og fremst vil jeg takke min veileder Bjørn Dalhus, gruppeleder Magnar Bjørås, Cathrine Carlson og min interne veileder Vincent Eijsink som har gjort dette prosjektet mulig.

Spesiell takk til Bjørn som har vært til god hjelp med det praktiske arbeidet, for alltid å ta seg tid til å diskutere resultater og for god hjelp under skriveprosessen. Jeg vil også takke alle som har vært på labben for godt selskap og gode samtaler, og ikke minst for all hjelp og støtte underveis i oppgaven. Jeg vil også takke Cathrine Carlson og hennes gruppe for at de har vært gode støttespillere og til god hjelp med forståelse av teorien. Til slutt vil jeg takke min kjære ektemann Henning som har vært min største støttespiller og oppmuntrer og som alltid har et godt excel-triks i på lur, sistnevnte ble til og med, inkludert i en sang i anledning vårt bryllup.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Oslo, 13.03.15

---

Mari Therese Grønland

## Innholdsfortegnelse

Forord.....	iii
Innholdsfortegnelse.....	iv
Sammendrag .....	viii
Abstract.....	x
Forkortelser.....	xii
Benevninger .....	xiv
1. Introduksjon .....	1
1.1 Signalering i og utenfor celler.....	1
1.2 Kinaser .....	3
1.3 Mekanismen for fosforylering av serin/treonin kinaser .....	3
1.4 Kalsium og ryanodin-reseptor/kalsium kanalen.....	4
1.5 Calmodulin .....	5
1.6 Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin avhengige kinaser.....	5
1.7 CaMKII .....	6
1.8 Sekretoneurin (SN).....	8
1.9 CaMKII $\delta$ .....	9
1.9.1 Aktiveringssetet i CaMKII $\delta$ .....	11
1.10 Proteinstruktur bestemmelse .....	14
1.10.1 Krystallisering og bestemmelse av struktur til proteiner ved hjelp av røntgen diffraksjonsmønstre fra proteinkrystaller .....	14
1.10.2 Homologi-modellering og peptid-docking av SN-peptidet til CaMKII $\delta$ .....	16
1.10.3 Modellering av templatstruktur valg av bindingsområde og modell av peptidstruktur .....	17
1.10.4 Bearbeiding og forfining av CaMKII $\delta$ bundet til SN-peptidet ved FlexPepDock .....	17
1.11 Mål med oppgaven .....	18
2. Materialer.....	19
3. Metoder .....	27
3.1. Tillaging av mutanter .....	27
3.1.1. Preparering av elektrokompetente <i>E.coli</i> ER2566 celler .....	27
Materialer.....	27
3.1.2 Transformerings av ER2566 celler vha elektroporering.....	28

## Forord

Materialer .....	28
Metode .....	29
3.1.3 Miniprep av plasmid DNA .....	29
Materialer .....	29
Metode .....	30
3.1.4 Primerdesign.....	30
3.1.5 Seterettet mutagenese (QuikChange PCR) .....	32
Materialer .....	32
Metode .....	33
3.1.6 Måling av DNA konsentrasjon.....	34
Metode .....	34
3.1.7 Sekvensering .....	35
Materialer .....	35
Metode .....	35
3.1.8 Transformering inn i BL21 CodonPlus (DE3) RIPL celler .....	36
Materialer .....	36
Metode .....	36
3.1.9 Tillaging av frysestock .....	37
Materialer .....	37
Metode .....	37
3.2 Ekspresjon av protein .....	37
Materialer .....	38
Metode .....	38
3.3 Rensing av protein.....	39
3.3.1 Sonikering og rensing av protein med 6xHis-tag.....	39
Metode .....	40
3.3.2 Regenerering av Ni-NTA agarosemateriale .....	41
Materiale .....	41
Metode .....	41
3.3.3 Prøveforberedelse av pelleter og proteinløsninger til SDS-PAGE .....	42
Materialer .....	42
Metode .....	42
3.3.4 Natriumdodecylsulfat polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE) .....	43

Materialer.....	43
Metode .....	44
3.3.5 Dialyse.....	44
Materialer.....	44
Metode .....	44
3.3.6 Rensing av protein på Fast Protein Liquid Chromatography .....	45
Materialer.....	46
Metode .....	46
3.3.7 TEV kutting.....	47
Materialer.....	47
Metode .....	47
3.3.8 Massespektrometri .....	48
Materialer.....	48
Metode .....	48
3.3.9 Konsentrasjonsbestemmelse ved Bradford-metoden og oppkonsentrering .....	48
Materialer.....	48
Prosedyre.....	49
3.4 Måling av interaksjoner mellom CaMKII $\delta$ 335 og SN-peptid ved MST.....	49
Materialer.....	50
Metode .....	50
3.5 Dynamisk lysspredning (DLS).....	51
Materialer.....	51
Metode .....	51
3.6 Krystallscreening ved sitting drop.....	52
Metode .....	53
3.7 Homologimodellering .....	54
Materiale .....	54
Metode .....	54
4. Resultat .....	55
4.1 Sekvensering .....	56
4.2 Ekspresjon av de ulike mutantene .....	56
4.3 Rensing av CaMKII $\delta$ 1/2SN, CaMKII $\delta$ SN, CaMKII $\delta$ 335, og CaM .....	61
4.3.1 Rensing av CaMKII $\delta$ 1/2SN .....	61

## Forord

4.3.2 Rensing av CaMKII $\delta$ SN .....	63
4.3.3 Rensing av CaMKII $\delta$ 335.....	64
4.3.4 Rensing av Calmodulin .....	67
4.4 Mikroskalatermoforese (MST) og dynamisk lysspredning (DLS) .....	69
4.4.1 Mikroskalatermoforese av CaMKII $\delta$ og SN-peptidet i biacorebuffer .....	69
4.4.2 Dynamisk lysspredning (DLS) av CaMKII $\delta$ 335 i ulike buffere .....	71
4.4.3 Mikroskala termoforese i MST-Standard buffer .....	72
4.5 Krystallisering .....	74
4.6 Homologimodellering og peptiddocking .....	76
5. Diskusjon og konklusjon.....	78
6. Oppsummering og videre arbeid.....	84
Referanser .....	85
7. Vedlegg.....	90
Vedlegg A Nukleotid og aminosyre sekvens for CaMKII $\delta$ 335 .....	90
Vedlegg B Plasmider benyttet.....	91
Vedlegg C Molekylvektsmarkør .....	92
Vedlegg D, Sekvenseringsdata fra QuikChange mutagenese .....	93
Vedlegg E Ekspresjon og løselighetstester .....	96
Vedlegg F Massespektrometridata .....	102

## Sammendrag

I denne oppgaven var målet å løse den 3-dimensjonale strukturen av komplekset mellom et peptid fra Sekretoneurin (SN) og Calmodulin (CaM) avhengig kinase II $\delta$  (CaMKII $\delta$ ). Det ble derfor laget flere ulike mutanter av CaMKII $\delta$ , til uttrykking, rensing, bindingsanalyse mellom CaMKII $\delta$  og SN-peptidet. Under normale forhold vil CaMKII $\delta$  binde seg til Calmodulin og bli aktivert ved fosforylering av treonin 287 i det autoregulatoriske domenet, som er lokalisert fra aminosyre 281-316. Det er vist at hjertesvikt gir en økning av SN-nivået, SN binder til CaMKII $\delta$  og hemmer aktiviteten til kinasen som er assosiert med hjertesvikt.

Det er derfor av stor interesse å studere i detalj strukturen av komplekset mellom SN-peptidet og kinasen CaMKII $\delta$ , også med henblikk på design av nye forbindelser som kan binde til og regulere aktiviteten til kinasen. For å se på proteinstrukturen til komplekset mellom SN-peptidet og CaMKII $\delta$  valgte vi å følge 3 ulike strategier; design av trunkerte former av CaMKII $\delta$ , design av aktivert CaMKII $\delta$  ved hjelp av fosforyleringsmimikk, og design av mutanter av CaMKII $\delta$  med SN-peptid motivet inkludert i det autoregulatoriske domenet.

Det ble laget flere trunkerte mutanter av CaMKII $\delta$  uten det autoregulatoriske domenet som kan forhindre binding av SN-peptidet; CaMKII $\delta$ 264 og CaMKII $\delta$ 275, hvor sekvensen stopper ved henholdsvis aminosyre 264 og 275. Forsøkene viste at disse mutantene ikke ble uttrykt fra plasmidet pNIC28-Bsa4, i motsetning til den noe lengre formen som stopper ved aminosyre 335, CaMKII $\delta$ 335. Det ble videre laget to konstrukt for mutanter av en annen trunkert form av CaMKII $\delta$ , denne gang med stopp ved residue 280. Kinasen ble fusjonert med NusA, et protein som kan gi økt løselighet. Av de to konstruktene, NusA-CaMKII $\delta$ 280 og NusA-extended-CaMKII $\delta$ 280, var det ene ikke uttrykt mens det andre ga god ekspresjon, men ikke noe løselig protein. Det ble laget en siste trunkert mutant, CaMKII $\delta$ 291, hvor sekvensen stoppet midt i det autoregulatoriske domenet. Denne formen var uttrykt og løselig, men det var ikke tid til å utvikle en renseprotokoll.

Det ble videre laget en mutant som skulle mimikere den aktive CaMKII $\delta$ , hvor treonin er fosforylert, ved å erstatte treonin 287 med aspartat. Denne mutanten av CaMKII $\delta$ , også i plasmidet pNIC28-Bsa4, hadde god ekspresjon, men var ikke løselig.



## Sammendrag

Strukturen av CaMKII $\delta$ 335 bundet til CaM er tidligere publisert, og basert på en analyse av dette komplekset ble det besluttet å sette inn SN-peptidsekvensen i det autoregulatoriske domenet til proteinet. Dette er basert på en sekvenssammenstilling av SN-peptidet og nevnte domene i CaMKII $\delta$ . Blant de konserverte residuene finner vi blant annet fosforyleringssetet treonin 287. Innsettingen ble gjort i to steg ved setedirigert mutagenese. Det ble dermed laget to mutanter med henholdsvis halve og hele SN-peptidet satt inn; CaMKII $\delta$ 1/2SN og CaMKII $\delta$ SN. Disse mutantene var godt uttrykt, men ved MS analyse viste det seg at CaMKII $\delta$ SN fragmenterte og aggregerte under rensing.

Da ingen av de 3 strategiene ga rent løselig protein med høyt utbytte for krystallisering, gikk vi tilbake til den lengre formen CaMKII $\delta$ 335. Det ble etablert en rensemetode for CaMKII $\delta$ 335 som ga rent protein. Renset CaMKII $\delta$ 335 ble benyttet til bindingsanalyser ved hjelp av mikroskalatermoforese, men ingen binding mellom CaMKII $\delta$ 335 og SN-peptidet ble påvist under de gitte betingelser. Det ble i tillegg utført screening med over 800 krystalliseringsbetingelser av proteinkomplekset mellom CaMKII $\delta$  og SN-peptid og proteinkomplekset CaMKII $\delta$ , SN-peptidet og CaM. Det ble funnet 5 krystalliseringsbetingelser som må studeres nærmere og evt optimaliseres.

Etttersom de ulike CaMKII $\delta$  mutantene var vanskelig å fremstille og rense, og i mangel på en eksperimentell struktur av komplekset mellom CaMKII $\delta$  og SN-peptidet ble det laget flere peptid-dockingmodeller av komplekset mellom SN-peptidet og CaMKII $\delta$  som viser mulige strukturer av komplekset.

## Abstract

This master thesis aims to determine the three-dimensional structure of the complex between Secretoneurin and Calmodulin (CaM) dependent kinase II  $\delta$  (CaMKII $\delta$ ). To determine this structure several different mutants of CaMKII $\delta$  were constructed for expression, purification and binding analysis between CaMKII $\delta$  and the SN-peptide. Under normal circumstances CaMKII $\delta$  will bind to Calmodulin and become activated by phosphorylation of threonine 287 in the autoregulative domain, which is located from aminoacid 281-316. It has been shown that heart failure increases the level of SN. SN binds to CaMKII $\delta$  and inhibits the activity of the protein associated with heart failure.

It was therefore of great interest to find a detailed structure of the complex between SN-peptide and CaMKII $\delta$ , also considering future design of drugs that can bind and regulate the activity of the kinase. To be able to look at the protein structure of the complex between the SN-peptide and CaMKII $\delta$ , the following three strategies were chosen; design of different truncations of CaMKII $\delta$ , design of an activated CaMKII $\delta$  by mimicking phosphorylation, and design of mutants of CaMKII $\delta$  with the SN-peptides included in the autoregulatory domain. A number of truncated mutants of CaMKII $\delta$  were constructed without the autoregulatory domain that can inhibit binding of the SN-peptide; CaMKII $\delta$ 264, CaMKII $\delta$ 275, where the sequence stops at aminoacid 264 and 275, respectively. These mutants were not expressed in the pNiC28-Bsa4 plasmid, contrary to the longer version that stops at aminoacid 335, CaMKII $\delta$ 335.

Two more constructs for mutants were also made with a different truncation of CaMKII $\delta$ , these stopped at residue 280. The kinase had a fusion with NusA, a protein that can give increase solubility. Of the two constructs, NusA-CaMKII $\delta$ 280 and NusA-extended-CaMKII $\delta$ 280, one was not expressed, while the other gave good expression but was not soluble. A final truncated mutant was constructed, CaMKII $\delta$ 291, where the sequence stopped in the middle of the autoregulatory domain. This variant was expressed and soluble, but there was no time to develop a purification protocol.

In addition, a mutant that mimicked the active CaMKII $\delta$  was made, in where threonine is phosphorylated, by replacing threonine 287 with aspartate. This mutant of CaMKII $\delta$ , was also expressed in the pNiC28-Bsa4 plasmid, which had good expression, but was not soluble. The structure of CaMKII $\delta$ 335 bound to CaM was previously published, and

## Abstract

based on an analysis of this complex it was determined to place the SN-peptide into the autoregulative domain of the protein. This was based on a sequence alignment of the SN-peptide and the mentioned domain in CaMKII $\delta$ . Among the conserved residues we can find the phosphorylation site threonine 287. Insertion was made in two steps by site-directed mutagenesis. It was therefore made two mutant with respectively the half and the entire SN-peptide inserted, respectively: CaMKII $\delta$ 1/2SN and CaMKII $\delta$ SN. These mutants were expressed well, but the MS analysis showed that the CaMKII $\delta$ SN aggregated and fragmented during purification.

As none of the three strategies gave a pure protein with high concentration for crystallization, our focus shifted to the longer variant CaMKII $\delta$ 335. A purification method that gave pure protein was established. The purified CaMKII $\delta$ 335 was used for binding analysis with microscale thermophoresis, but it was shown that there was no binding between CaMKII $\delta$ 335 and SN-peptide under the conditions given. Crystallization screening was also carried out for over 800 crystallization conditions of the protein complex between CaM and the SN-peptide, and the protein complex of CaMKII $\delta$ , the SN-peptide and CaM. Five crystallization conditions were found and these have to be studied in more detail and possibly optimized.

Since the different CaMKII $\delta$  mutants were difficult to produce and purify, and in lack of experimentally structure between CaMKII $\delta$  and SN-peptide, multiple peptid-docking models were made of the complex between the SN-peptide and CaMKII $\delta$  that show the possible structure of the complex.

## Forkortelser

---

3D	Tredimensjonal
A	Adenin
Ala (A)	Alanin
Arg (R)	Arginin
Asp (N)	Asparagin
ATP	Adenosintrifosfat
C	Cytosin
Ca <sup>2+</sup>	Kalsium
Calmodulin (CaM)	Kalsium-modulerende protein
CaMKII $\delta$	Ca <sup>2+</sup> / Calmodulin avhengig Kinase II $\delta$
Co	Kobolt
Cryo-EM	Cryo-Elektronmikroskop
CV	Kolonnevolum
Cys (C)	Cystein
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
dNTP	Deoksiribosenukleotidtrifosfat
DpnI	Restriksjonsendonuklease
<i>E.Coli</i>	<i>Esheria Coli</i>
FPLC	Fast protein liquid chromatography
FT	Flowthrough
G	Guanin
Gln (Q)	Glutamin
Glu (E)	Glutaminsyre
Gly (G)	Glysin
HDAC	klasse II histone deacetylas
HEPES	N-2-hydroksyetylpipezazin-N-2-etansulfonisk syre
His (H)	Histidin
Ile (I)	Isoleucin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-tiogalaktopyranosid
IR	Ionisert Stråling
K	Kalium
Kd	Dissosiasjonskonstant
LB	Lubia-Bertani
Leu (L)	Leucin
Lys (K)	Lysin
MEF2	myocyt-forsterkende-faktor 2
MES	2-(N-monofolino)etansulfat
Met (M)	Metionin
Mg	Magnesium
MilliQ	Millique

## Forkortelser

MOPS	3-(N-morforlin) propansvovelsyre (MOPS) SDS-buffer (20x)
MS	Massespektrometri
MST	Mikro skala termoforese
MWCO	Molekylærvekt cut-off
Na	Natrium
Ni	Nikkel
NLS	Kjernelokaliseringssignal
NMR	Nukleær magnetisk resonans
NTA	Nitriloeddiksyre agarose
OD	Optisk tetthet
PCR	Polymerase kjedereaksjon
Phe (F)	Fenylalanin
PO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (P)	Fosfat
Pro (P)	Prolin
Rpm	Rotasjon per min
Rx	Reaksjon
RyR2	ryanodin-reseptor/ Ca <sup>2+</sup> kanalen
S/T-kinaser	serin/treonin kinaser
SDS	Natriumdodekylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodekylsulfat polyakrylamid gelelektroforese
Ser (S)	Serin
SN	Sekretoneurin
SO <sub>4</sub>	Sulfat
SOC	Superoptimal broth
SRF	serum respons faktor
T	Tymin
TEV	Tobacco Etch Virus
Thr (T)	Treonin
Tris	Tris (hydroksymetyl) aminometan
Trp (W)	Tryptofan
Tyr (Y)	Tyrosin
U	Enhet
UV	Ultraviolet
Val (V)	Valin

## Benevninger

---

Ng	nanogram ( $10^{-9}$ g)	kDa	kiloDalton ( $10^3$ b)
$\mu$ g	mikrogram ( $10^{-6}$ g)	V	Volt
Mg	milligram ( $10^{-3}$ g)	$^{\circ}$ C	Grader Celsius
G	gram		
nm	nanometer ( $10^{-9}$ m)		
mm	millimeter ( $10^{-3}$ m)		
nM	nanomolar ( $10^{-9}$ M)		
$\mu$ M	mikromolar ( $10^{-6}$ M)		
mM	millimolar ( $10^{-3}$ M)		
M	molar		
$\mu$ L	mikroliter ( $10^{-6}$ L)		
mL	milliliter ( $10^{-3}$ L)		
L	Liter		

## 1. Introduksjon

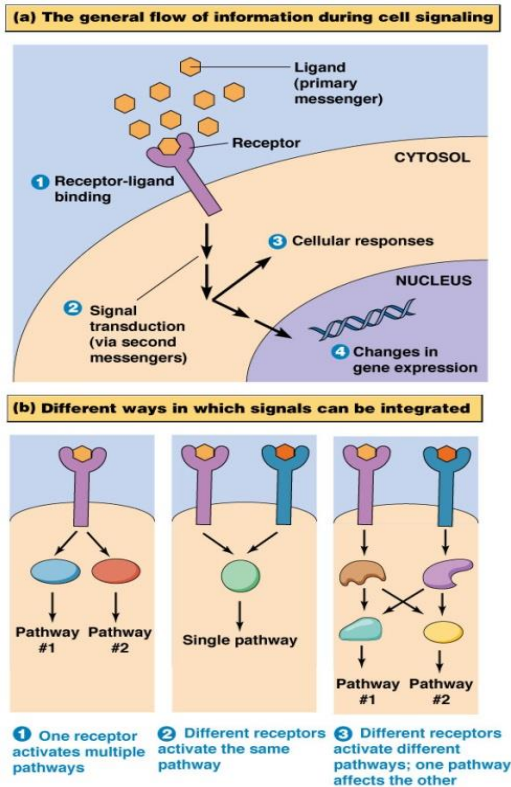
Hjerte-hypertropi er en tilstand hvor kardiomyocytene øker i størrelse, proteinsyntesen i cellene øker og sarkomerene forandrer struktur (Frey and Olson 2003). Dette kan føre til hjertesvikt. Hjertesvikt er en tilstand hvor hjertet er svekket og ikke klarer å pumpe blod rundt i kroppen kraftig nok og kan forekomme kronisk eller akutt (Martin and Press 2010). Ved akutt hjertesvikt ser man en økning av Sekretoneurin (SN) som er et funksjonelt fragment på 33 aminosyrer av proteinet sekretogranin II (Wiedermann 2000). SN hemmer  $\text{Ca}^{2+}$ / Calmodulin avhengig Kinase II $\delta$  (CaMKII $\delta$ ) og hjelper kardiocyttene med å kontrollere kalsiumnivået ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Ottesen, Carlson et al. 2015). I denne oppgaven har vi designet ulike varianter av CaMKII $\delta$  for å studere binding mellom CaMKII $\delta$  og SN peptidet på molekylært nivå, gjennom å forsøke å krystallisere et kompleks mellom CaMKII $\delta$  og SN-peptidet.

### 1.1 Signalering i og utenfor celler

For at en multicellulær organisme skal fungere, må cellene kommunisere med hverandre og prosessere signalene som kommer inn (Lewin 2007). Cellene kan kommunisere på ulike måter, enten ved endokrine, parakrine, autokrine, neurokrine eller intrakrine signaler. Endokrine signaler går mellom celler som er lokalisert langt fra hverandre, mens parakrine er mellom nærliggende celler. Neurokrine signaler går/overføres mellom nerver og celler langt unna, mens autokrine signaler oppstår når signalmolekyler utskilles fra cellen og tas opp av den samme cellen. Intrakrine signaler er signaler som produseres internt i cellen og påvirker prosesser inni cellen (Nussey and Whitehead 2013).

Reseptorer kan vha stimuli utenfra starte intracellulære prosesser, og en sekvens av handlinger som involverer intermediære proteiner og små molekyler. I figur 1.1 vises hva som skjer når en ligand binder seg til reseptoren og intracellulære prosesser starter.

# 1. Introduksjon



Figur 1.1 Ligandbinding til reseptor. Når liganden binder seg til reseptoren (a1) vil det føre til at intracellulære prosesser starter. En av prosessene som starter kan være signal transduksjon ved hjelp av sekundær budbringer som  $\text{Ca}^{2+}$  (a2) eller andre cellulære responser (a3). Signalet fra reseptoren kan føre til forandringer i genekspressjon (a4) gjennom sekundær budbringer eller fra et protein som blir aktivert av reseptoren etter ligand binding. Reseptoren kan etter ligandbinding aktivere flere biokjemiske spor (b1), flere reseptorer kan aktivere et biokjemisk spor (b2), eller det kan være ulike reseptorer som starter ulike biokjemiske spor som påvirker hverandre (b3) (Hardin, Bertoni et al. 2012).

Fordelen med et slikt komplisert system er at signalet fra et signalmolekyl som binder seg til en reseptor kan amplifiseres, tilpasses signalkinetikken, ha kontrollpunkter, flere signaler og spesifikke effektorer (Lewin 2007).



## 1. Introduksjon

### 1.2 Kinaser

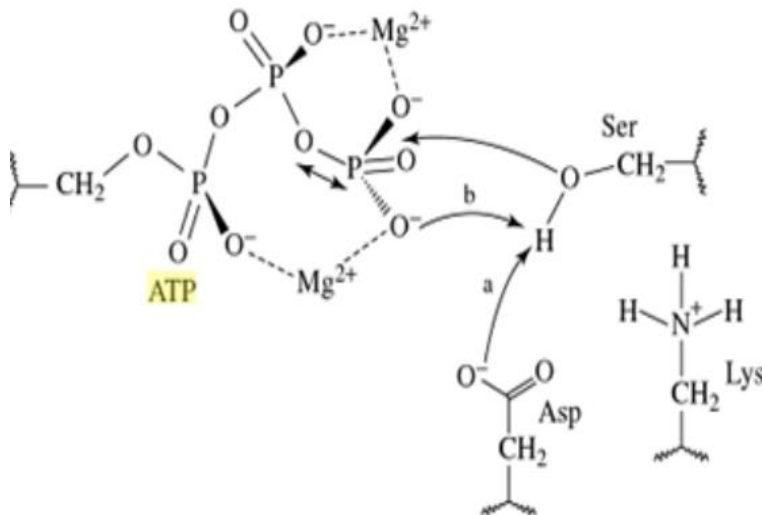
Kinaser er enzymer som overfører en terminal fosfatgruppe fra en energirik donor som ATP til en hydroksylgruppe på en serin, treonin eller tyrosin sidekjede i et protein. Denne prosessen kalles fosforylering (Alberts 2004). Fosforylering er kritisk i mange prosesser i cellen og regulerer ulike prosesser gjennom signaloverføring. Det finnes over 500 kinaser i det menneskelige proteomet (Ghosh and Gemma 2014). Substratene som kan binde seg til kinaser og dermed regulere aktiviteten til alt fra store proteiner til små peptider, eller lipider, karbohydrater eller nukleotider (Minor 2006).  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin Kinaser (CaMK'er) er serin/treonin (S/T) kinaser. Den reversible proteinfosforyleringen på serin, treonin eller tyrosin er en av de mest velstuderte post-translasjonelle modifikasjonene.

### 1.3 Mekanismen for fosforylering av serin/treonin kinaser

Fosforylering skjer på sidekjeden av tre aminosyrer; serin, treonin og tyrosine i eukaryote celler. Disse aminosyrene har en nukleofilgruppe (-OH) som angriper den terminale fosfatgruppen ( $\gamma\text{-PO}_3^{2-}$ ) på den universelle fosfatdonoren ATP, og resulterer i overføring av fosfatgruppen til aminosyregruppen (Knipe and Watts 2004).

De fleste kinasene katalyseres av magnesium eller kalsium som binder både  $\gamma$  og  $\beta$  fosfatgruppene på ATP-molekylet som en chelator og dermed senker energien for hydrolyse til et lavere nivå slik at fosfatoverføringen til OH gruppen kan skje, og ATP blir omdannet til ADP (O'Dell and Sunde 1997). I figur 1.3.1 ser vi hvordan fosforyleringen skjer på S/T-kinaser ved hjelp av ATP og magnesium (Knipe and Watts 2004).

## 1. Introduksjon



Figur 1.3 Den generelle mekanismen for fosforylering av serin/treonin kinase (Knipe and Watts 2004).

Den reversible reaksjonen, defosforyleringen, skjer ved hjelp av en fosfatase.

### 1.4 Kalsium og ryanodin-reseptor/kalsium kanalen

$\text{Ca}^{2+}$  er et viktig sekundært signal som regulerer celledeling, vekst og celledød i hjertemuskelen (Marín-García 2011).  $\text{Ca}^{2+}$  - konsentrasjonen er vanligvis på et lavt nivå i cellen, men øker ved hjelp av spesifikke stimuli (Hudmon 2002). Ulike signaler kan øke  $\text{Ca}^{2+}$  konsentrasjonen og kilden for  $\text{Ca}^{2+}$  avhenger av stimulus (Hook 2001).

Intracellulært  $\text{Ca}^{2+}$  er ansvarlig for sammentrekning og relaksjon av kardiomyocytter. Konsentrasjonen av  $\text{Ca}^{2+}$  reguleres av en rekke proteinsystemer i sarcolemma (Marín-García 2011) og er 20 000 ganger lavere enn den ekstracellulære konsentrasjonen. Det er streng regulering i cellen av  $\text{Ca}^{2+}$  nivået som utføres av ATP  $\text{Ca}^{2+}$  avhengige pumper som pumper  $\text{Ca}^{2+}$  til ekstracellulær matriks og endoplasmatisk retikulum (Hook 2001).

I hjertet reagerer ryanodin-reseptor/  $\text{Ca}^{2+}$  kanalen (RyR2) på forandringer i aksjonspotensialet på overflatemembranen eller som respons på forandring i konsentrasjonen av et sekundær signalmolekyl (Hook 2001). For å øke aksjonspotensialet fra 100 nM til 10  $\mu\text{M}$  blir  $\text{Ca}^{2+}$  sluppet ut av sarkoplasmisk retikulum via RyR2. Dette skjer som følge av det økte nivået av  $\text{Ca}^{2+}$  utenfor cellen (Marín-García 2011).

## 1. Introduksjon

### 1.5 Calmodulin

Calmodulin (Kalsium-modulerende protein: CaM) binder seg til  $\text{Ca}^{2+}$ , og regulerer en rekke enzymer (Zang T. 2004). CaM er et protein bestående av 149 aminosyrer med fire heliks-loop-heliks motiver kalt EF-hånden. To av heliksene er i N-terminal enden, mens de to andre er i den C-terminale enden. Hver av disse fire bindingsmotivene binder et kalsiumion, og konformasjonen til proteinet forandres slik at den hydrofobe lommen blir eksponert og kan binde seg til andre proteiner (Hook 2001). En viktig gruppe enzymer som binder seg til den hydrofobe lommen er  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM avhengige kinaser.

### 1.6 $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin avhengige kinaser

Calmodulin (CaM) aktiverer  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin avhengige kinaser (CaMK) som er S/T protein kinaser. CaMKs er en familie som består av fosforylase kinase, myosin light chain kinase (MLCK), CaMKI, CaMKII, CaMKIII (EF-2) og CaMKIV.

CaMKI, II og IV er multifunksjonelle enzymer, mens de andre er dedikert til et substrat (Hook 2001). CaMK-klassen utgjør til sammen 81 ulike proteiner (Rellos, Pike et al. 2010). De har alle lignende domenestruktur hvor den C-terminale delen består av et C-terminalt domene, fulgt av autoregulatorisk domene og CaM bindingsdomene (Hook 2001). CaMK`er aktiveres ved at  $\text{Ca}^{2+}$  bundet CaM binder seg til enzymene og opphever hemmingen via det autoregulatoriske domenet (Hook 2001).

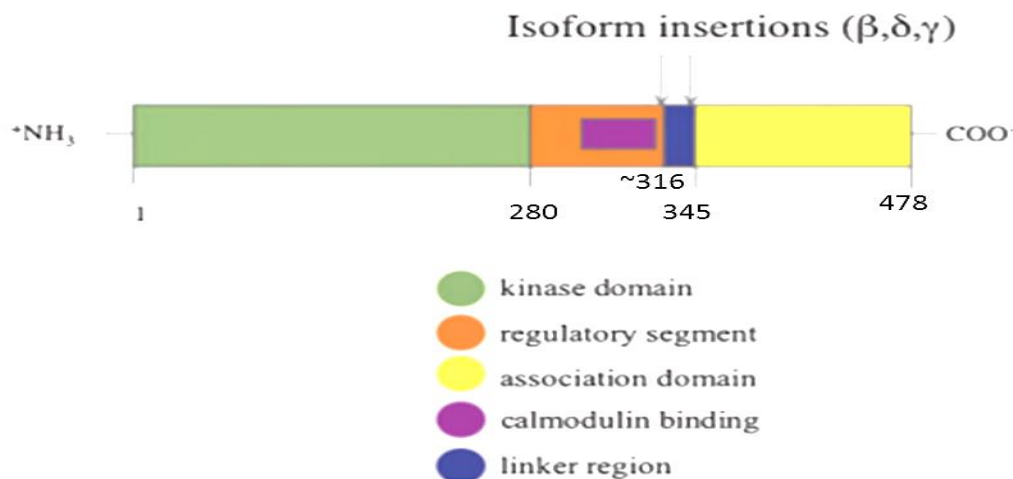
CaMKII har i likhet med CaMKI og CamKIV et autoregulatorisk domene som hemmer aktiviteten når CaM og  $\text{Ca}^{2+}$  ikke er tilstede. CaMKII kan oppnå maksimal aktivitet kun ved hjelp av  $\text{Ca}^{2+}$  og CaM, mens CaMKI og CaMKIV er avhengige av en oppstrøms CaMK for å oppnå dette (Hudmon 2002).

## 1. Introduksjon

### 1.7 CaMKII

CaMKII lager holoenzymer, som er dodecamerisk (12 proteiner bundet sammen), eller tetradecamerisk (14 proteiner bundet sammen) (Couchonnal and Anderson 2008). CaMKII er en viktig del av  $\text{Ca}^{2+}$ -regulert signalering, fosforylerer en rekke substrater og koordinerer en rekke av de  $\text{Ca}^{2+}$  regulerte forandringene i cellene. CaMKII kan aktiveres som følge av en økning i  $\text{Ca}^{2+}$  -mengden i frekvensavhengig måte (Hudmon 2002). Ved aktivering av korte pulser på 80 ms kreves 10 Hz for å oppnå autonom aktivitet av CaMKII, mens lengre  $\text{Ca}^{2+}$  puls på 1000 ms krever lavere stimulering på 0,8 Hz for å oppnå samme CaM-autonom aktivering (De Koninck and Schulman 1998). Etter aktivering blir CaMKII uavhengig av CaM ved at CaMKII omgjøres til stabil form pga konformasjonsforandringer (Hudmon 2002).

CaMKII blir dannet fra fire forskjellige homologe gener, med over 30 spleising-varianter (Hudmon 2002). Alle CaMKII isofromene inneholder kinasedomenet i området rundt aminosyre 1-280, fulgt av et autoregulatorisk domene rundt aminosyre 281-316, et linker område, etterfulgt av et C-terminalt assosieringssegment rundt aminosyre 345-478 (Rosenberg, Deindl et al. 2006), som vist i figur 1.7.1.

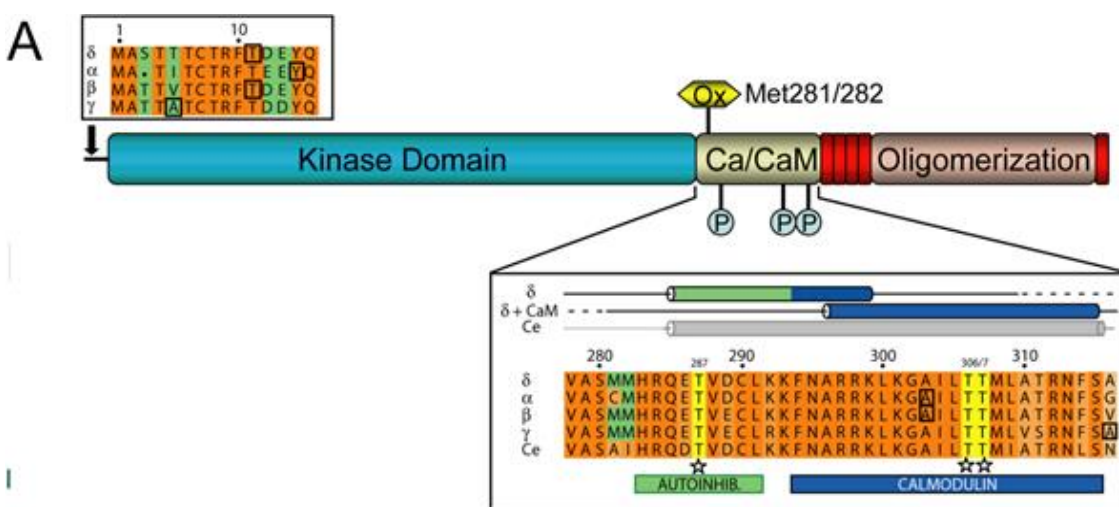


Figur 1.7.1 Domenestrukturen til CaMKII-isofromene, som alle har samme arkitektur, med noen ulikheter i linkerområdet (Rosenberg, Deindl et al. 2006).

## 1. Introduksjon

CaMKII kan forekomme som en homo- eller hetromer bestående av subenhetene  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  og  $\delta$ , kodet av hvert sitt gen.  $\alpha$  og  $\beta$  subenhetene finnes hovedsakelig i nerve-vev (Zang T. 2004) og hjernen, og representerer 2 % av proteininnholdet i hippocampus. (Rellos, Pike et al. 2010).

CaMKII $\delta$  og CaMKII $\gamma$  finnes i nesten alle vev. CaMKII $\delta$  er overrepresentert i hjertet, og økning er observert i strukturelle og frekvensrelaterte hjertefeil. De ulike subenhetene har ulike alternative-spleisingsvarianter. Det er vist at CaMKII  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  og  $\delta$  har konserverte sekvens i området som binder CaM. I figur 1.7.2 vises det autoregulatoriske domenet og CaM bindingsområdet for disse subtypeene (Rellos, Pike et al. 2010).



Figur 1.7.2 Sekvenslikhet i det autoinhibitoriske domenet og calmodulin bindingsdomene hos de ulike CaMKII subtypeene (Rellos, Pike et al. 2010).

Vi ser store likhetstrekk i det autoregulatoriske området i den C-terminale enden, og dette er noe grunnen til de svært like kjemiske egenskapene til gruppen CaMKII, med hensyn på regulering og aktivering.

## 1. Introduksjon

### 1.8 Sekretoneurin (SN)

Sekretoneurin er et neuropeptid som finnes i neuroendokriniske lagringsvesikler og er et medlem av chromogranin/sekretogranin familien (Wiedermann 2000). Hypoksia i hjernen (dvs lavt oksygen nivå) fører til sterk oppregulering av sekretoneurin produksjonen i nerveceller, og migrering av endotheliske celler (Martí, Ferrer et al. 2001). Det er vist at sekretoneurin påvirker angiogeniske egenskaper (Kirchmair, Gander et al. 2004), og det er sett en sammenheng mellom økt mengde sekretoneurin og dødlighet ved hjertefeil.

Ved hjelp av overflate plasmon resonanse analyser utført ved bruk av biacore med pH 5,0 er det vist at SN binder seg til CaMKII $\delta$  (mutant med aminosyre nr. 69-282) og reduserer aktiviteten av proteinet, med en dissosiasjonskonstant ( $K_d$ ) på  $8 \pm 3 \times 10^{-8}$  M (Ottesen, Louch et al. 2015). Denne interaksjonen var ikke tilstede når  $Ca^{2+}$  ikke var tilstede i løsningen (Ottesen, Louch et al. 2015).

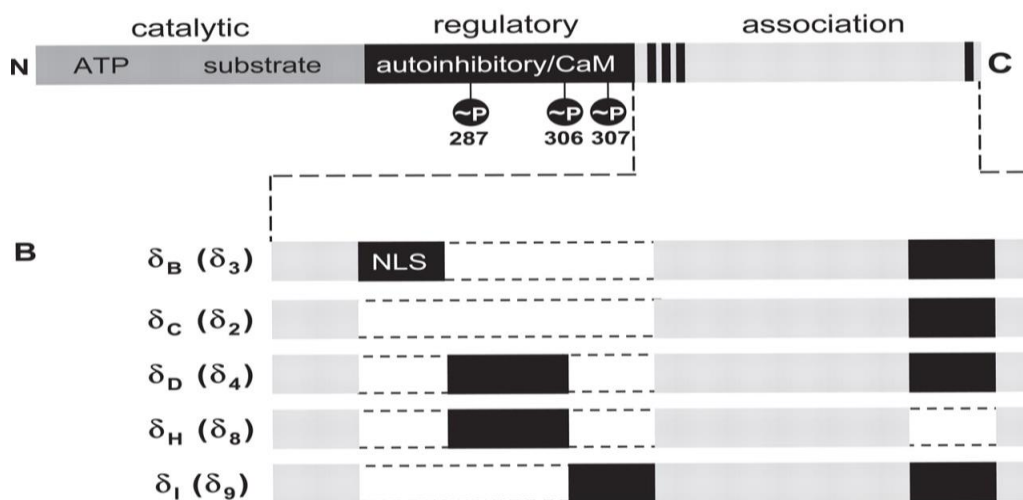
Da det ble tilført SN direkte til hjertet ble det observert en økning i mykardionivået, og en økning i intracellulært SN. SN reduserte aktiviteten til CaMKII $\delta$  vha av SN-CaM og SN-CaMKII binding og førte til en reduksjon av den CaMKII $\delta$  avhengige fosforyleringen av ryanodine reseptoren (Ottesen, Louch et al. 2015). Bindingsområde i sekretoneurin sekvensen er funnet ved hjelp av bioinformatiske metoder (Ottesen, Louch et al. 2015) og i denne oppgaven er det fokusert på 11-mer av sekretoneurin proteinet med aminosyrene IVEEQYTPQS, som trolig er den delen av SN-peptidet som binder CaMKII $\delta$ , som er rett før bindingsområdet i CaMKII $\delta$  for Calmodulin (Ottesen, Louch et al. 2015).

## 1. Introduksjon

### 1.9 CaMKII $\delta$

CaMKII $\delta$  er den dominerende isoformen i hjertemuskulaturen og det finnes to dominerende spleise-varianter av CaMKII $\delta$ ,  $\delta_B$  og  $\delta_C$ , i myocardium. De andre spleise-variantene er blant annet fosfolamban-kinase,  $\delta_D$ ,  $\delta_H$  og  $\delta_I$  (Zang T. 2004).

Forskjellene mellom de to dominerende formene CaMKII $\delta_B$  og CaMKII $\delta_C$ , har svært lik sekvens, som vist i figur 1.9.1.



Figur 1.9.1 En skjematisk oversikt over de ulike spleisevariantene i hjertet. Som man ser er det ulikheter i assosieringssete, men de regulatoriske og katalytiske domenene er konserverte (Zang T. 2004).

De to isoformene som er mest representert har en hovedforskjell ved at CaMKII $\delta_B$  har et kjernelokaliseringssignal (NLS), som ikke er i CaMKII $\delta_C$ . De ulike isoformene påvirker hjerte-hypertropi (Zang T. 2004). Hjerte-hypertropi er en fortykkelse av hjertemuskulaturen pga høyere belastning over tid, eller genetiske mutasjoner hos ulike proteiner som er en del av kaskaden for kontraksjon av hjertemuskulaturen (Ganong 2005). *In vitro* forsøk har vist at de ulike variantene kan ha ulike funksjoner i hjerte-hypertropi og det er postulert at CaMKII $\delta_B$  initierer den hypertrofiske genekspressjonen, mens CaMKII $\delta_C$  forbedrer Ca<sup>2+</sup> reguleringen (Zang T. 2004).

Den nukleære CaMKII $\delta_B$  spiller en viktig rolle i hypertrofisk genekspressjon, mens den cytoplasmiske isoformen CaMKII $\delta_C$  påvirker eksitasjon-kontraksjon koblingen ved fosforylering av Ca<sup>2+</sup> regulerte proteiner og kan ved signaltransduksjon føre til apoptose.

## 1. Introduksjon

Responserne til isoformene på økt trykk i hjertet er ulike (Zang T. 2004). I figur 1.9.2 vises de potensielle mekanismene som ved økt CaMKII $\delta$  vil bidra til kardiohypertrofi og hjertefeil. Dette er mekanismer som mest sannsynlig blir hemmet av SN-peptidet.

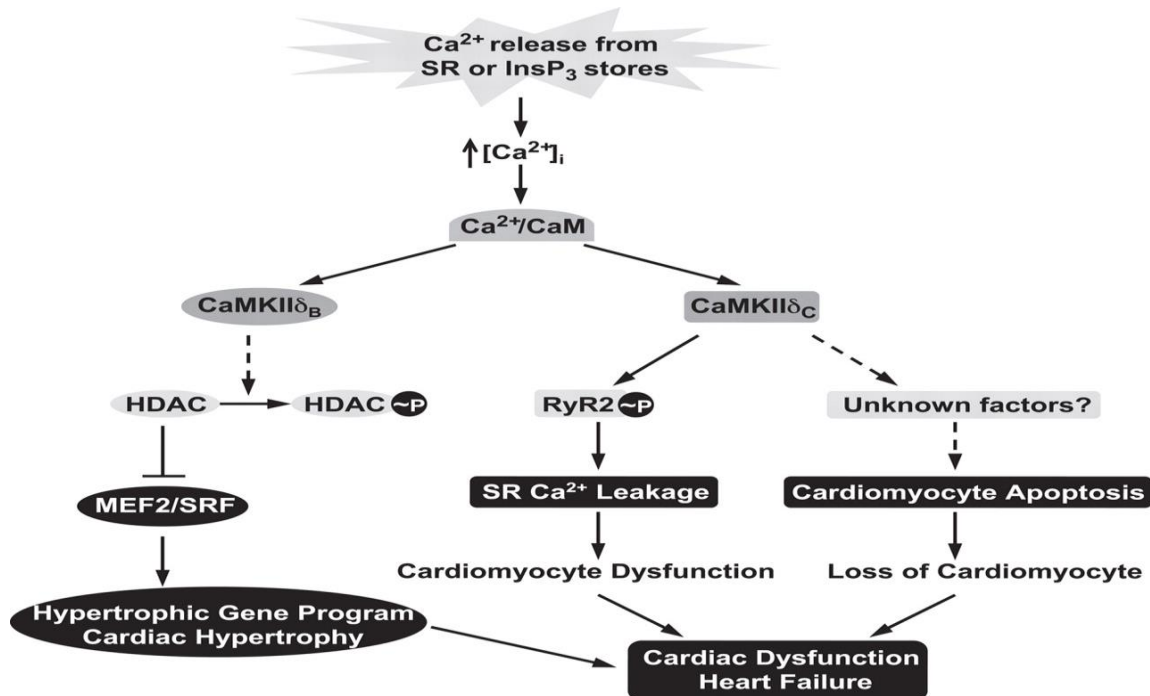


Fig 1.9.2 Ulike kaskader som CaMKII $\delta$  påvirker som fører til hjertefeil og kardiohypertrofi (Zang T. 2004).

CaMKII $\delta$ <sub>B</sub> binder seg trolig til klasse II histone deacetylase (HDAC) som fører til at den fjernes fra transkripsjonssetet, slik at myocyt-forsterkende-faktor 2 (MEF2) og serum respons faktor (SRF) kan transkriberes. Transkripsjon av MEF2 og SRF vil da resultere i hypertrofisk genekspressjon (Zang T. 2004). Men det er enda ikke ordentlig utforsket om det er CaMKII $\delta$ <sub>B</sub> som er årsaken til uttrykk av SRF og MEF2 transkripsjon, men det er vist at subtypene CaMKI og CaMKIV kan binde HDAC og føre til transkripsjon på lignende måte (Zang T. 2004).

MEF2 er en transkripsjonfaktor kodet av fire uavhengige gener, som er på et basalt nivå hos voksne, men som kan økes ved stimulering (Naya, Wu et al. 1999). I tillegg er transkripsjonfaktoren assosiert med regulering og differensiering av muskelceller ved at MEF2 binder seg til genregulatoriske områder (Olson, Perry et al. 1995). SRF er med på å regulere gener som er viktige for foster-genekspressionsprofilen som er assosiert med hjerte-hypertrofi. Dette inkluderer gener som regulerer og utfører kontraksjon av hjertet, og disregulering av SRF kan være årsaken til disregulering som skjer under hjerte-hypertrofi (Nelson, Balza Jr et al. 2005).

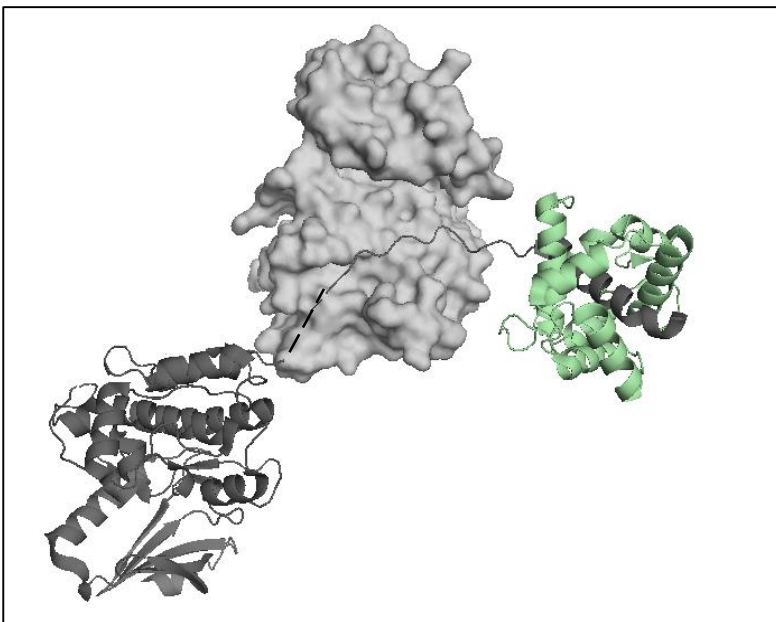


## 1. Introduksjon

CaMKII ser ut til å ha stor effekt på  $\text{Ca}^{2+}$  reguleringen og ekistasjon-kontraksjon koblingen i kardiomyocytter og trolig er det subtypen CaMKII $\delta_C$  som regulerer dette via fosforylering av RyR2, fosfolamban og en rekke andre proteiner (Zang T. 2004). Fosforylering av RyR2 fører til at  $\text{Ca}^{2+}$  kommer ut av sarcolemma, og ved store mengder CaMKII vil frekvensen av  $\text{Ca}^{2+}$ -pulsene øke, men ved inhibering av CaMKII vil frekvensen normalisere seg (Zang T. 2004). Dette tyder på at dersom SN-peptidet hemmer CaMKII $\delta$  vil hjertefrekvensen gå ned og det antas at grunnen til økt hjertefrekvens skyldes CaMKII $\delta$ .

### 1.9.1 Aktiveringssetet i CaMKII $\delta$

Alle CaMKII isoformene lager oligomere strukturer, ved at CaMKII bindes sammen ved hjelp av et assosieringsdomene (se figur 1.7.1) i det C-terminale området på ca. 140 aminosyrer (Rosenberg, Deindl et al. 2006). I våre forsøk i likhet med forsøket til Rellos, Pike et al., inneholder CaMKII $\delta$ 335 varianten aminosyrene 11-335, kinasedomenet og calmodulin bindingsdomenet, men mangler assosieringsdomenet og deler av linker området. CaMKII $\delta$ 335 har en størrelse på 35 kDa. I figur 1.9.3 vises strukturen til CaMKII $\delta$ 335 bundet til CaM.



Figur 1.9.3 Binding mellom Calmodulin (grønn) og CaMKII $\delta$  (svart) skjer via en utstrakt peptidkjede som igjen er bundet til det aktive setet til et annet CaMKII $\delta$  molekyl i krystallen (grå overflate) (Rellos, Pike et al. 2010).

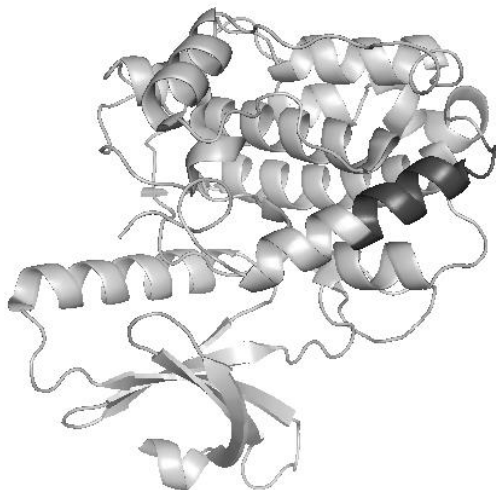
## 1. Introduksjon

Det autoregulatoriske domenet utgjøres av aminosyre 282-310 i CaMKII $\delta$  (Rellos, Pike et al. 2010). Det aktive enzymet utfører autoregulatoriske egenskaper i det inhibitoriske domenet. I dette setet er det antatt at Thr287 er ideell for fosforylering av CaMKII $\delta$ . Det er antatt at fosforylering av treonin i posisjon 287 forhindrer binding av det inhiberende autoregulatoriske domenet og dermed fører til autoaktivering. Mutasjon av Thr287 i  $\alpha$ -CaMKII i mus førte til at musene hadde manglende læringsegenskaper (Elgersma, Sweatt et al. 2004).

Et annet aktiveringsområde som kan føre til aktivering av proteinet er Met281. Denne aminosyren aktiveres av Angiotensin-II induisert oksidasjon som fører til at CaMKII forblir aktivert og induserer apoptose i kardiomyocytter (Erickson, Joiner et al. 2008).

Thr306 er et inhibitorisk autofosforylering sete, hvor fosforylering av denne forhindrer CaM binding. Ved å forhindre binding blir aktiviteten til CaMKII $\delta$  inhibert og havner i en autoinhibert tilstand (Couchonnal and Anderson 2008).

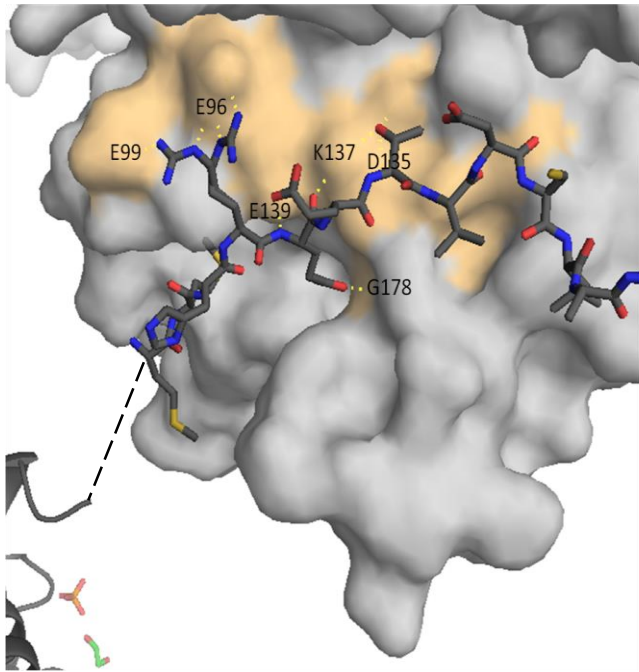
I autoinhibert tilstand kan ikke ATP eller substratet binde seg til CaMKII $\delta$ , før etter at CaM har vært bundet til proteinet (Lou, Lloyd et al. 1986). I figur 1.9.4 vises strukturen til CaMKII $\delta$  før Calmodulin har aktivert proteinet.



Figur 1.9.4 CaMKII $\delta$  før aktivering ved hjelp av CaM, hvor det autoregulatoriske domenet (Svart), er bundet en del av CaMKII $\delta$  og ikke er strukket ut av CaM, som vist i figur 1.9.3 (Rellos, Pike et al. 2010).

## 1. Introduksjon

CaMKII $\delta$  som har vært bundet til CaM og blitt fosforylert vil være aktivt selv etter at CaM har dissosiert fra proteinet (Schworer, Colbran et al. 1986).



Figur 1.9.4 Det autoinhibitoriske setet i CaMKII $\delta$  (lysoransj), bundet til det autoregulatoriske domenet (svart). Nummeringen viser til aminosyrene på overflateten i det autoregulatoriske setet (Rellos, Pike et al. 2010).

I figur 1.9.4 vises hvordan CaMKII $\delta$  binder til seg selv, eller eventuelt en CaMKII $\delta$  like ved. Arg279 i den C-terminale delen binder seg både til Glu99 og Glu96. Glu96 er et mulig område som må gjennomgå konformasjonsforandringer for at ATP kan binde seg (Rosenberg, Deindl et al. 2005). Thr287 binder seg til både Asp135 og Lys137, og er sett på som en essensiell aminosyre for CaMKII $\delta$  aktivitet (Ottesen, Carlson et al. 2015), og det er antatt at treoninen i SN-peptidet binder seg på samme sted.

## 1. Introduksjon

### 1.10 Proteinstruktur bestemmelse

For å forstå funksjonen til ulike proteiner, må man vite detaljer i interaksjonene mellom proteiner og andre proteiner, metabolitter, peptider og/eller nukleinsyrer (Russo Krauss, Merlino et al. 2013). For å finne proteinstrukturen kan man bruke både eksperimentelle og datasimuleringsmetoder. Den mest presise eksperimentelle metoden som er brukt siden 1950 for å finne tredimensjonale proteinstrukturer er røntgenkrystallografi (Lesk 2010). For å bestemme røntgenstrukturen til proteiner, må man først isolere, rense og krystallisere proteinet.

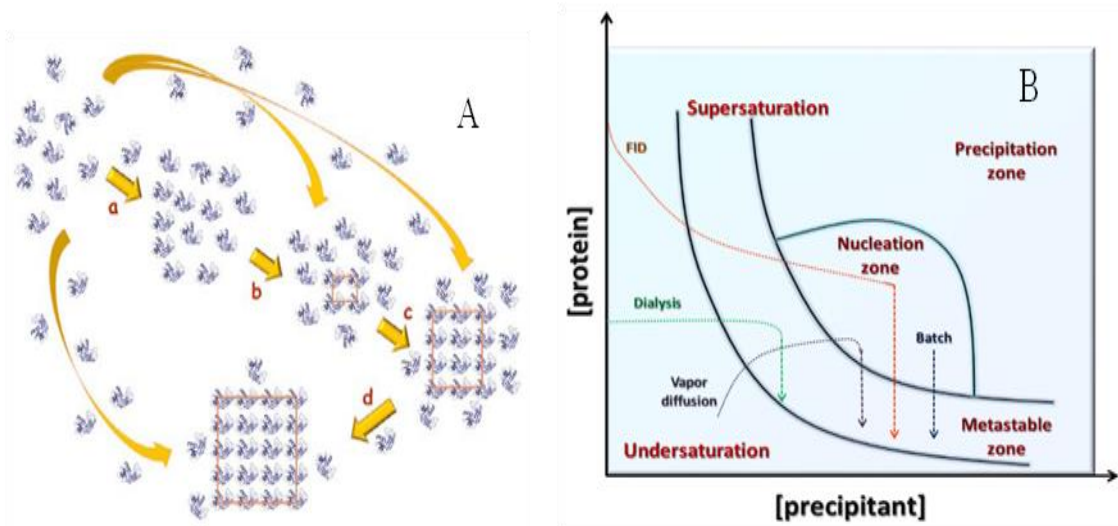
NMR kan også brukes for å finne proteinstruktur, men denne metoden er svært avansert og krever mange beregninger som gir begrensninger ved bruk på store proteiner. For store strukturer er cryo-EM brukt, og dette kombinert med røntgenkrystallografi kan gi svært nøyaktig struktur. Datasimuleringsmetoder som kan benyttes er homologimodellering og a priori prediksjon (Lesk 2010).

#### 1.10.1 Krystallisering og bestemmelse av struktur til proteiner ved hjelp av røntgen diffraksjonsmønstre fra proteinkrystaller

For å krystallisere er det nødvendig med store mengder rent protein, og derfor uttrykkes ofte proteinet i *E.coli* celler for å få høy produksjon av proteinet (Lesk 2010). Det er viktig at proteinet er homogent og fri for urenheter, løselig, uten aggregering, stabilt, overmettet i krystalliseringsløsningen, binder seg til hverandre uten presipitering eller fase-separasjon og har egenskaper som gjør det mulig å binde seg strukturert til like proteiner i løsning (Bergfors 2009).

Krystallisering utføres ved en rekke ulike metoder som dialyse, batch-metode og FID (fritt grensesnitt diffusjon). Den mest vanlige krystalliseringsmetoden er væske-damp diffusjon (fordampningsmetoden). Det finnes ulike oppsett: sittende dråpe, hengende dråpe, sandwich dråpe og kapillær dråpe. Dråpen er i et forseglet område med et reservoar med løsningen. Væske vil fordampe fra dråpen og etter alt fra en time til flere uker vil det danne seg en fordampningslikevekt mellom reservoaret og dråpen. Denne fordampningsprosessen vil ideelt sett drive proteinet mot en overmettet tilstand som kan føre til dannelse av krystaller (Bergfors 2009). Proteinene vil danne et nuklerings-område med ikke-kovalente bindinger til like proteiner, som flere proteiner vil legge seg på en organisert måte rundt, slik at krystallen kan vokse (Lesk 2010), se figur 1.10.1

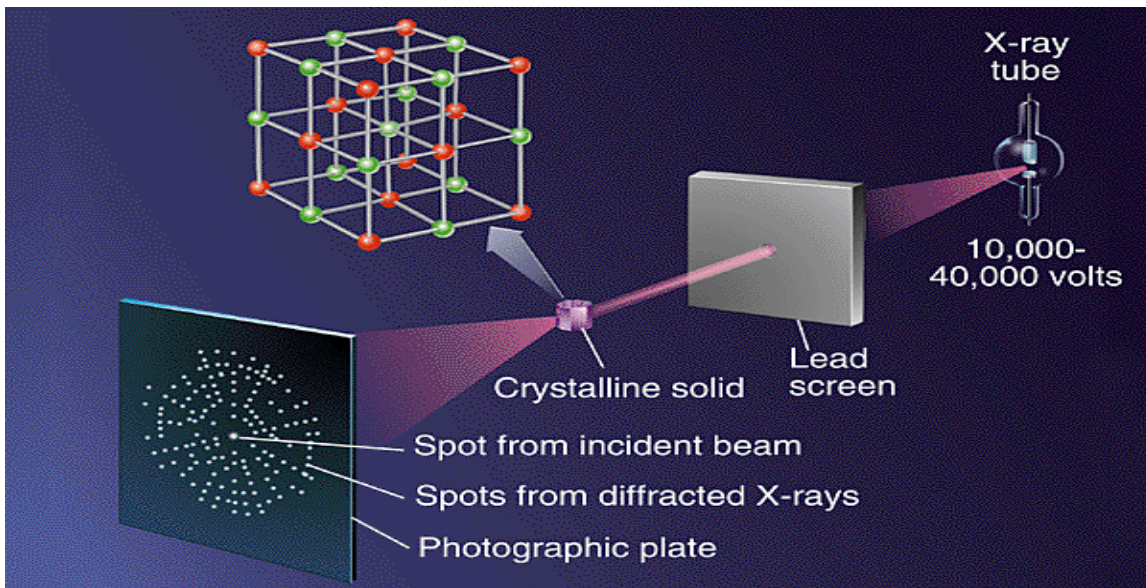
## 1. Introduksjon



Figur 1.10.1 Dannelse av krystaller ved nuklering i nukleringsonen. A: Væske aggregeringsmodellen, økende konsentrasjon mot overmettet av løsning fører til at proteinet organiserer seg i løsningen, i store aggregater. Molekylene i kjernen omorganiserer seg til å danne en mer fast struktur (a) og interaksjonene stabiliseres i kjernen (b). Proteinene vil danne en sann krystall (c), og frie proteiner, vil bli adsorbent på krystallen på en organisert måte, som vil føre til at krystallen vokser. B: Et forenklet fasediagram, som viser hvordan de ulike metodene bringer proteinene inn i nukleringssonene pga økt konsentrasjon av protein i løsning. (Russo Krauss, Merlino et al. 2013).

Små variabler kan påvirke krystallisering av proteinet. Forandringer i temperatur under krystallisering, proteinkonsentrasjon og størrelsen på dråpen kan påvirke krystalliseringsegenskapen, og føre til store forskjeller i krystalldannelsen. Under screening før optimalisering, kan krystallene være små, men kan videre optimaliseres ved å variere temperatur og stoffene som er i løsningen (Bergfors 2009). Proteinkrystaller som er store nok og av høy intern orden, kan røntgenbestråles i en synkrotron, og dersom dataene er gode nok kan strukturen løses (Lesk 2010). I figur 1.10.2 er en forenklet modell av røntgenbestrålingen vist.

## 1. Introduksjon



Figur 1.10.2 Røntgenbestråling av proteinkrystall. Røntgenstrålen blir konsentrert gjennom en liten åpning, og spres i krystallen. Spredningen blir detektert og basert på analyse av diffraksjonsmønsteret kan proteinstrukturen bestemmes (Zumdahl and Zumdahl 2013).

Når røntgenstrålen treffer krystallen vil differaksjonen oppstå. Diffraksjonen er en avbøyning av strålen og forsterkning av signalet i bestemte retninger som skyldes interferens mellom røntgenbølger som spres fra krystallen.

### 1.10.2 Homologi-modellering og peptid-docking av SN-peptidet til CaMKII $\delta$

Interaksjon mellom peptid og protein kan påvirke cellulære prosesser, signal transduksjon, transkripsjon, lokalisering, protein degradering og immunrespons (Raveh, London et al. 2010) og det kan derfor være nyttig å lage en homologimodell for å forutsi strukturen til komplekset. Homologimodelleringen består av flere ulike trinn, sammenstilling av aminosyresekvensene, bestemmelse av området hvor aminosyresekvensen skal forandres, erstatte sidekjedene, loop-modellering og bearbeiding av strukturen ved energi minimerisering (Lesk 2010). Det er vist at proteinstrukturen er mer konservert enn sekvensidentiteten (Chothia and Lesk 1986). Kvaliteten til homologimodellene øker med sekvenslikheten, så i loop-områdene er det større fare for feil i modelleringen fordi det ofte er forskjeller i sekvens i disse områdene.

I vår homologimodellering er CaMKII $\delta$ 335 strukturen brukt som templat hvor det autoregulatoriske C-terminale domenet er omgjort til SN-peptidet.

## 1. Introduksjon

### **1.10.3 Modellering av templatstruktur valg av bindingsområde og modell av peptidstruktur**

Det ble laget homologimodell med en kjent struktur, som har høyest sekvenslikhet med det proteinet vi vil finne strukturen på. Når man skal se på peptidbinding til protein blir det laget en grov modell av komplekset, før den sendes til bearbeiding i FlexPepDock (Raveh, London et al. 2010). Når man sekvenssammenstiller proteiner ser man etter relaterte strukturer, med relaterte sekvenser for å forutsi sekundærstrukturen, ser på konserverte atomer i templatet for å kalkulere koordinatene til atomene, eller bruke avstandsgeometri/optimaliseringsteknikker. Modellen i dette prosjektet blir laget ved å erstatte det C-terminale autoregulatoriske domenet med SN-peptid aminosekvensen uten å bearbeide sekundærstrukturen. Grunnen til dette er at det forutsettes at det ikke skjer store forandringer i sekundærstruktur ved binding av SN-peptid. Denne strukturen ble bearbeidet i FlexPepDock for optimalisering.

### **1.10.4 Bearbeiding og forfining av CaMKII $\delta$ bundet til SN-peptidet ved FlexPepDock**

Nøyaktig bearbeiding av strukturen er viktig når man vil undersøke egenskapene til peptidbaserte medisiner. Strukturen til peptider kan variere mer enn små molekyler, ettersom det er flere bindinger hvor rotasjon kan forekomme (Sousa, Fernandes et al. 2006), små forandringer i sekvensen kan føre til forandringer i strukturen til hovedkjeden (Raveh, London et al. 2010), og proteinet kan ha ulik struktur i bundet, ubundet, eller homologe strukturer. Men i tidligere forsøk er det vist at denne typen docking er suksessfull for korte peptider, med få roterbare bindinger (Raveh, London et al. 2010).

Det blir ikke gjort noen forandringer i protein-templatet før det sendes til optimalisering, når det er bundet til et lignende peptid. I vår homologistruktur er det fokus på hvordan SN-peptidet binder seg, og tatt utgangspunkt i at CaMKII $\delta$  forandrer seg lite.

Peptidets struktur optimeres først ved peptid-hovedkjeden, ved bruk av monte-carlo energi minimerisering. Optimeringsprogrammet flexpep lager 200 uavhengige simuleringer som i forhold til Rosetta generisk full-atom energi score.

## 1. Introduksjon

### 1.11 Mål med oppgaven

CaMKII $\delta$  er viktig i regulering av hjertehypertropi, og blir aktivert av Ca<sup>2+</sup>/CaM. CaMKII $\delta$  blir aktivert ved fosforylering og påvirker kardiomyocyt apoptose, uttrykking av hypertrofiske gener og RyR2-reseptorerene som regulerer Ca<sup>2+</sup> nivået i cellen. Sekretoneurin-peptidet (SN-peptidet) har vist seg å inhibere CaMKII $\delta$  og dermed disse prosessene.

Hovedfokuset i denne masteroppgaven er å finne strukturen til komplekset mellom SN-peptidet og CaMKII $\delta$ . Struktur av komplekset kan gi verdifull innsikt i hvordan binding av SN-peptidet regulerer aktiviteten til kinasen. Videre kan en struktur også gi grunnlag for design av andre peptidsekvenser eller peptidanaloger med økt binding til kinasen. Slike peptider, eller peptidanaloger, kan tenkes å ha kliniske anvendelser for behandling av hjertelidelser.

Dette ble gjort ved å lage CaMKII $\delta$  mutanter etter tre ulike strategier for å se på binding mellom disse mutantene og SN-peptidet. Mutantene ble designet i den hensikt å kunne utføre krystallisering av komplekset mellom CaMKII $\delta$  og SN-peptidet. For å kunne identifisere krystalliseringsbetingelser for komplekset kreves det rent protein i relativt store mengder, så identifisering av konstrukter som gir god ekspresjon og påfølgende utvikling av renseprosedyrer for mutantene er delmål i prosjektet.



## 2.Materialer

2.1.1 Laboratorieutstyr		
Utstyr	Spesifikasjon	Leverandør
Analysevekt	AG245	METTLER TOLEDO
Avtrekkskap		SYSTEM PEGASUS
Bordsentrifuge	Galaxy Mini	VWR
Cryorør	Thermo Scientific Nunc CryoTube Vials	Thermo Scientific
Dialysemembraner	Spectra/Por Dialysis membrane	Spectrumlabs
	MWCO : 6-8000	
	MWCO : 12-14 000	
Dynamisk lysspredningsapparat	ZETASIZER Nano S	Malvern
Elektroforeseutstyr		
• Gelspenningskilde	Power Ease 500	Invitrogen
• Gelkjøringskammer	Novex® Mini Cell	Invitrogen
• Polyakrylamidgel	Novex® protein analysis solution, 10-20 % Tricine Gel	Invitrogen
Elektroporeringskyvetter	Electroporation Cuvettes Plus	Sarstedt
Elektroporator	Electro Square Porator	BTX HARVARD
Eppendorfrør		Starstedt
FPLC Instrument	Amersham Biosciences	Akta Purifier
• Konsentrasjonsmåler	pH-C-900	Akta Purifier
• UV- måler	UV-900	Akta Purifier
• Pumpe	P-900	Akta Purifier
• Fraksjonssamler	Frac-950	Akta Purifier
• Loop 50 mL		GE Healthcare
• Loop 1 mL		GE Healthcare
Fryser (-20)	TEMPALERT	Electrolux
Fryser (-80)	ThermoScientific Ultradypfryser	Houm
Gram-vekt	CFC2025	Clas Ohlson
Inkubator til Eppendorf-rør	Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf
Inkubator til små cellekulturer	3031	GFL
Inkubator til store cellekulturer	innOva 4230, Refrigerated Incubator	NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC
Inkuberingskap		BINDER
Isbitmaskin	HOSHIZAKI ICE MAKER	Hoshizaki
Krystallforseglingstape	Crystal Clear Sealing Tape	Hampton
Krystalliseringsplater	Triple Sitting drop 96-well plate	TTP LABTECH

## 2.Materialer

2.1.2 Laboratorieutstyr		
Utstyr	Spesifikasjon	Leverandør
Kyvette	Polystyrol/Polystyrene 10x4x45 mm	Starstedt
Magnetør		Fibikon
Mikrobølgeovn		DAEWOO
MST-instrument	Monolith NT. Labelfree MST	NanoTemper technologies
Oppkonsenteringsrør		
• Små inntil 1 mL	Amicon Ultra 0.5 mL MWCO: 10 000	MilliPore
• Mellomstore inntil 4 mL	Amicon ® Ultra -4 Ultracel® MWCO: 10 000	MilliPore
• Store 15 mL	Amicon ® Ultra 15 Ultracel® MWCO: 10 000	MilliPore
Parafilm		Bemis
PCR-instrument	Peltier Thermal Cycler PTC-200 MJ Research	Eppendorf
PCR-rør		BioPlastic
Petrisåler		HEBER as
pH-meter	pHenomenal	VWR
Pipetter	1-10 µL, 2-20µL, 10-100 µL, og 100-1000 µL	Thermo Electron Coporation
Pipettespisser		Mettler-Toledo
Plate til å bestemme DNA-konsentrasjon	Take3 Multi-volum plate	Epoch Biotek
Plateleser til DNA-konsentrasjonsmåling	Monokromator UV-Vs mikroplatelese	Epoch Biotek
Sentrifugering til oppkonsentrering av protein	Sentrifuge: Centriuge 5702 R Rotor: A-4-38	Eppendorf
Sentrifuge for store rør	Sentrifuge: SORVALL LYNX 6000 Rotor: F9-6x1000 LEX	Thermo Scientific
Sentrifuge for mellomstore rør	Sentrifuge: SORVALL LYNX 6000 Rotor..F10-4x-1000 LEX	Thermo Scientific
Sentrifuge for små rør	Sentrifuge: SORVALL LYNX 6000 Rotor: F14-6x-250y	Thermo Scientific
Sentrifuge for Eppendorf-rør	Sentrifuge: Biofuge fresco Rotor: 3328	Heraus
Sonikator til små cellepelletter	SONIFIER B-12	BRANSON SONIC POWER COMPANY
Sonikator til store cellepelletter	Vibra cells	Sonics & Materials Inc.
Spektrofotometer	BioPhotometer	Eppendorf
Sprøyter		
Sterilskap	Lamin Air Model 1.2	Holten

## 2.Materialer

2.1.3 Laborietstyr		
Varmebad	Grant	VWR
Whirlmixer	VV3	VWR

2.2 Kjemikalier	
Kjemikalie	Leverandør
2-(N-Morpholino)ethanesulfonic syre	Sigma Aldrich
3-(N-morforlin) propansvovelsyre (MOPS) SDS-buffer (20x)	Sigma Aldrich
Agar, Bacto-agar	Merck
BioRad Protein Assay Fargereagens	Bio-Rad
Co-CMA	ClonTech
Comassie® Brilliant Blue R-250	Bio-Rad
Destillert vann (MilliQ kvalitet)	MilliPore
Dimetyl hydrogen fosfat (DMSO)	Sigma Aldrich
dNTP miks	Fermentas
Etanol 20 %	Sigma Aldrich
Glycerol (60%)	Merck
GuHCl	Merck
Hepes pH 7,5	Sigma Aldrich
Hepes pH 8,0	Sigma Aldrich
Hydrogen Klorid (HCl)	VWR
Imidazole C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub>	Merck
Isopropyl-β-D-tiogalaktopyranosid (IPTG)	Sigma Aldrich
Kalsiumklorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck
Kanamycin	Sigma Aldrich
LB-Broth, Miller (Luria-Bertania)	Difco
Magnesium sulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Sigma Aldrich
MilliQ-filtret vann	MilliQ
Natriumhydroksid (NaOH)	Sigma Aldrich
Natriumklorid (NaCl)	Prolabo
Ni-NTA	QiaGen
NiSO <sub>4</sub>	Sigma Aldrich
Pfu reaksjonsbuffer	Stratagene
Sorbitol	Sigma Aldrich
β-merkptoetanol	Sigma Aldrich

## 2.Materialer

2.3 Bufferløsninger brukt til Ni-NTA og Co-CMA	
Buffernavn	Innhold
Sonikeringsbuffer og lavsaltbuffer til Ni-NTA m/Tris pH 8,0	300 mM NaCl
	50 mM Tris pH 8,0
	10 mM $\beta$ -merkaptoetanol
	10 mM imidazole
Høysaltvaskebuffer til Ni-NTA med Tris pH 8,0	1 M NaCl
	50 mM Tris pH 8,0
	10 mM $\beta$ -merkaptoetanol
	10 mM imidazole
Elueringsbuffer m/Tris pH 8,0	300 mM NaCl
	50 mM Tris pH 8,0
	10 mM $\beta$ -merkaptoetanol
	300 mM Imidazole
Sonikeringsbuffer og lavsaltbuffer til Ni-NTA med Hepes pH 8,0	300 mM NaCl
	50 mM Hepes pH 8,0
	10 mM $\beta$ -merkaptoetanol
	10 mM imidazole
Høysaltvaskebuffer til Ni-NTA med Hepes pH 8,0	1 M NaCl
	50 mM Hepes pH 8,0
	10 mM $\beta$ -merkaptoetanol
	10 mM imidazole
Elueringsbuffer m/Hepes pH 8,0	300 mM NaCl
	50 mM Hepes pH 8,0
	10 mM $\beta$ -merkaptoetanol
	300 mM Imidazole
Sonikeringsbuffer og lavsaltbuffer til Ni-NTA med Hepes pH 7,5	300 mM NaCl
	50 mM Hepes pH 7,5
	10 mM $\beta$ -merkaptoetanol
	10 mM imidazole
Høysaltvaskebuffer til Ni-NTA med Hepes pH 7,5	1 M NaCl
	50 mM Hepes pH 7,5
	10 mM $\beta$ -merkaptoetanol
	10 mM imidazole
Elueringsbuffer m/Hepes pH 7,5	300 mM NaCl
	50 mM Hepes pH 7,5
	10 mM $\beta$ -merkaptoetanol
	300 mM Imidazole

## 2.Materialer

2.4 Bufferløsninger til bruk på ulike kolonner på FPLC	
Buffer	Innhold
HiTrapQ-lavsaltbuffer og dialyse buffer med Tris pH 8,0	50 mM Tris pH 8,0
	100 mM NaCl
	10 mM $\beta$ -merkaptoetanol
HiTrapQ-høysaltbuffer med Tris pH 8,0	50 mM Tris pH 8,0
	1000 mM NaCl
	10 mM $\beta$ -merkaptoetanol
ResourceS-lavsaltbuffer og dialyse buffer med Mes pH 6,0	50 mM Mes pH 6,0
	100 mM NaCl
	10 mM $\beta$ -merkaptoetanol
ResourceS-høysaltbuffer med Mes pH 6,0	50 mM med Mes pH 6,0
	1000 mM NaCl
	10 mM $\beta$ -merkaptoetanol
Superdex75-buffer	50 mM Hepes pH 7,5
	300 mM NaCl
	10 mM $\beta$ -merkaptoetanol

Tabell 2.5 Kolonner brukt til FPLC	
HighTrapQ 6 mL kolonne	GE Healthcare
Materiale	Produsent
Resource S 6 mL kolonne	GE Healthcare
Superdex75 størrelse eksklusjonskolonne	GE Healthcare

Tabell 2.6 Løsninger brukt til SDS-PAGE	
Løsning	Innhold
10x MOPS buffer	0,2 M MOPS
	50 mM natriumacetat
	5 mM EDTA
SDS-fargeløsning	40 % metanol
	10 % eddiksyre
	0,1 % Comassie Brilliant Blue
SDS-avfargingsbuffer	40 % metanol
	10 % eddiksyre
	4 % glyserol
4x NuPAGE ® LDS samplebuffer	life technologies
Protein cracking buffer	2 % SDS
	5% $\beta$ -merkaptoetanol
	10 % Glycerol
	60 mM Tris pH 8,0
	1,4 mg/mL bromfenolblå

## 2.Materialer

2.7 Andre løsninger brukt	
Bruksområde	Innhold
5x BioRad protein acid fargereagens	2 mL BioRad løsning
	8 mL MilliQ
7 M GuHCl	66,87 g
	fortynnet i MilliQ til total volum på 100 mL
2 % SDS	10 mL 20 % SDS løsning
	fortynnet i MilliQ til total volum på 100 mL
0,1 M EDTA pH 8,0	100 mL (0,5 M)
	fortynnet i MilliQ til total volum på 500 mL
0,1 M NiSO <sub>4</sub>	2,62 g NiSO <sub>4</sub>
	fortynnes til et slutt volum på 100 mL
Pfu Buffer til QuikChange	2 mL 1 M Tris-HCl pH 8,8
	300 µL 3 M KCl
	500 µL 20 % Triton X-100
	1 mL 100 M BSA
	200 µL MgSO <sub>4</sub>
	fortynnet til et sluttvolum på 10 mL med MilliQ
Protein cracking buffer	2 % SDS
	5% β-merkaptoetanol
	10 % Glycerol
	60 mM Tris pH 8,0
	1,4 mg/mL BPB
Biacore buffer	50 mM NaAcetat
	150 mM NaCl
	2 mM CaCl <sub>2</sub>
MST-Standardbuffer	50 mM Tris-HCl
	150 mM NaCl
	10 mM MgCl <sub>2</sub>
	0,05 % Tween-20

## 2.Materialer

Tabell 2.8 Innhold i Miniprep kit fra Machery Nagel
NucleoSpin®Plasmid kolonne
A1- resuspensjonsbuffer
A2-lyseringsbuffer
A3-nøytraliseringsbuffer
AW-vaskebuffer
A4-elueringsbuffer

Tabell 2.9. Spesifikke enzymer og proteiner benyttet i prosjektet		
Protein/Enzym/Substrat	Spesifikasjoner	Leverandør
Nupage protein molekylvektsmarkør	Spesifikke proteiner med kjent masse	Invitrogen
Pfu Polymerase	Enzym	Fermentas
DpnI	Enzym	New England BioLabs
CaMKII $\delta$ 335	Kinase	Rellos Pike et al.
CaMKII $\delta$ 291	Kinase	Selvlaget
CaMKII $\delta$ 275	Kinase	Selvlaget
CaMKII $\delta$ 264	Kinase	Selvlaget
CaMKII $\delta$ 1/2SN	Kinase	Selvlaget
CaMKII $\delta$ SN	Kinase	Selvlaget
CaM	Protein	Rellos Pike et al.
TEV-Protease	Enzym	Fermentas
SN-peptid	Peptid	

Tabell 2.10. Bakteriestammer benyttet for mutagenese og ekspresjon av mutantene		
Bakterietype	Spesifikasjon	Bruksområde
<i>Escheria Coli</i> ( <i>E.coli</i> )	ER2566	Transformasjon
<i>Escheria Coli</i> ( <i>E.coli</i> )	BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL strain	Ekspresjon
<i>Escheria Coli</i> ( <i>E.coli</i> )	Rosetta <sup>TM2</sup> (DE3) kompetente celler	Ekspresjon

Tabell 2.11. Programvarer benyttet		
Bruksområde	Programvare	Leverandør
Homologimodellering	Pymol	Schrodinger
Bearbeiding av homologi modellering	FlexPepDock	Furman lab
FPLC kromatografi system	UNICORN 5.11	GE Healthcare
Krystallisering på robot	Mosquito®Crystal	TTPLabtech

## 2.Materialer

Tabell 2.12. Medier	
Mediumer	Innhold
LB-plater	25 gram LB-Broth
	15 gram Bacto-agar
	50 mg kanamycin
	til sluttvolum på 1 L MilliQ-filtet vanninkub
SOC-medium	20 g Bacto Tryptone
	5 g Bacto gjærekstrakt
	2 mL NaCl
	2,5 mL KCl
	10 mL MgSO <sub>4</sub>
	10 mL MgCl <sub>2</sub>
	20 mL Glukose (1M)
	til slutt på 1 L i MilliQ-filtet vann
LB-medium	25 gram LB-Broth
	fortynnet i 1 L MilliQ-filtet vann



## 3. Metoder

### 3.1. Tillaging av mutanter

For å se på den molekylære strukturen til SN-peptidet bundet til CaMKII $\delta$  ble fem infallsvinkler benyttet. I de tre første ble det lagd mutanter for å se på strukturen. Den første framgangsmåten var å fjerne den selv-inhiberende delen i den C-terminale enden av kinasen, den andre var å endre treonin 287 til aspartat for å etterligne fosforyleringen som aktiverer CaMKII $\delta$  mens den tredje var å erstatte den kompetitive delen med SN-peptidets sekvens. Disse mutantene ble laget ved QuikChange setedirigert mutagenese (Stratagen) hvor trunkert villtype CaMKII $\delta$  for aminosyre 11-335 ble brukt som templat. For å kunne utføre QuikChange mutasjoner måtte først *E.coli* transformert med CaMKII $\delta$ 335-plasmidet dyrkes for å kunne rense og få større mengder DNA-templat. Hele aminosyre- og nukleotidsekvensen til CaMKII $\delta$ 335 er vist i vedlegg A. I de to siste fremgangsmåtene ble det ikke utført mutagenese, men derimot sett på CaMKII $\delta$ 335 med og uten CaM, sammen med SN-peptidet.

#### 3.1.1. Preparering av elektrokompetente *E.coli* ER2566 celler

For at cellene skal være elektrokompetente må de behandles slik at eksogent DNA lett kan transformeres inn i cellen. Vi har to typer kompetente celler, kjemisk kompetente og elektrokompetente (Lorsch 2013). Kjemisk kompetente celler brukes ved varmesjokk-transformasjon, mens de elektrokompetente cellene brukes i elektroporering. Elektrokompetent transformasjon krever at cellene er i høy tetthet i en ikke-ionisk buffer. Cellene blir derfor preparert for å øke tettheten og lagret ved  $-70^{\circ}\text{C}$  i rent vann for å bevare effektiviteten (SIGMA 2006).

#### Materialer

- Inkubator til små cellekulturer
- Inkubator til store cellekulturer
- Sentrifuge til mellomstore rør
- MilliQ-filtrert vann
- 10 % glycerol løsning
- *E.coli* ER2566
- LB-medium
- Spektrofotometer

### 3. Metoder

#### **Metode**

En koloni *E.coli* ER2566 ble inokulert i 10 mL LB-medium og inkubert ved 37 °C 225 rpm overnatt. Neste dag (etter 15-18 timer) ble 10 mL overnattskultur overført til 500 mL LB-medium og inkubert ved 37 °C og 225 rpm til OD600 var mellom 0,5-1,0. Cellekulturen ble satt på is i 15 min og sentrifugert ved 5 000 rpm, 4°C i 10 min. Supernatanten ble fjernet og pelleten ble resuspendert i 200 mL kaldt MilliQ-filtrert vann. Løsningen ble sentrifugert ved 5 000 rpm og supernatanten fjernet og pelleten løst opp i 100 mL kaldt MilliQ-filtrert vann. Løsningen ble sentrifugert ved 5 000 rpm, 4 °C i 10 min. Supernatanten ble fjernet og pelleten ble løst i 10 mL 10 % glycerol, og sentrifugert ved 5 000 rpm, 4°C i 10 min. Supernatanten ble fjernet og cellepelletten løst opp i 800 µL 10 % glycerol. 50 µL av løsningen med ER2566 celler fordelt i Eppendorfrør. Eppendorfrørene ble fryst øyeblikkelig ved -80 °C.

#### **3.1.2 Transformering av ER2566 celler vha elektroporering**

Transformasjon av DNA inn i ER2566 *E.coli* blir utført ved elektroporering slik at plasmid DNA kommer inn i cellen, og det er viktig at cellene er lagret på is for å unngå å miste effektiviteten for transformasjonen. Transformasjonen skjer ved at cellene blir utsatt for et kort og intenst elektrisk felt med styrke på 20 kV per cm, som oppnås ved 2,0 kV og 0,1 cm kyvette (SIGMA 2006). Det elektriske feltet fører til at cellemembranen får små permeable områder slik at plasmidet kan trenge inn i cellen, ved elektroosmose eller diffusjon (Mitra 2004).

#### **Materialer**

- Elektrokompente ER2566 celler
- SOC-medium
- Isolert plasmid med kons 50-150 ng/µL
- Elektroporeringskyvetter
- Elektroporator
- Inkubator til Eppendorf-rør og til små cellekulturer
- Inkuberingsskap
- LB-plater med kanamycin 1 µg/mL
- LB-medium med kanamycin 1 µg/mL

### 3. Metoder

#### **Metode**

50  $\mu\text{L}$  ER2566 celler ble tint på is, tilsatt 1  $\mu\text{L}$  plasmid (kons 50-150  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ), og blandet forsiktig ved å knipse på røret. Cellene ble overført til en kald elektroporeringskyvette og kyvetten ble dunket forsiktig mot underlaget for å fjerne luftbobler. Suspensjonen ble elektroporert ved 2 kV, 10 pulser a 90  $\mu\text{s}$ . 950  $\mu\text{L}$  SOC-medium ble tilsatt og suspensjonen ble overført til et sterilt Eppendorfrør og inkubert ved 37°C og 550 rpm i 1 time. Fortynningsserier ble lagd ved å pipettere ut 1  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  og 100  $\mu\text{L}$  av cellesuspensjonen og fortynnet til et sluttvolum på 200  $\mu\text{L}$  med SOC-medium som ble platet ut på LB-plater tilsatt kanamycin.

LB-platene ble satt i inkuberingskap ved 37°C i 1-2 dager. En koloni ble overført til 5-50 mL LB-medium med kanamycin. Volumet av overnattekkulturen var avhengig av hvilken metode som skulle brukes videre.

#### **3.1.3 Miniprep av plasmid DNA**

For å kunne utføre QuikChange setedirigert mutagenese må man opparbeide større mengder av plasmid. Dette gjøres ved å dyrke opp ER2566-celler med templatplasmid, og rense plasmid ved miniprep. Prosedyren består av følgende hovedsteg: preparering, fjerning av lysat, DNA adsorpsjon, vask og eluering fra NucleoSpin® Plasmidfilteret. For å undersøke om mutagenesen er vellykket benyttes miniprep også etter utført QuikChange setedirigert mutagenese for å lage til prøver som skal sekvenseres.

#### **Materialer**

- Overnattekkultur: 5-10mL
- Sentrifuge for Eppendorf-rør

Kit fra Macherey-Nagel Plasmid DNA purification:

- Buffere
  - A1-resuspensjonsbuffer
  - A2-lyseringsbuffer
  - A3-nøytraliseringsbuffer
  - AW-vaskebuffer
  - A4-vaskebuffer
  - AE-elueringsbuffer
- Membran:
  - NucleoSpin®Plasmid kolonne
- MilliQ-filtrert vann

### 3. Metoder

#### **Metode**

10 mL *E.coli* cellekultur ble sentrifugert ved 3 500 rpm i 1-10 min. Supernatanten ble fjernet og pelleten oppløst i 250 µL A1-buffer, og overført til et sterilt Eppendorfrør. Cellesuspensjonen ble blandet med 250 µL A2-lyseringsbuffer ved å snu røret opp ned 6-8 ganger. Etter at cellesuspensjonen med lyserte celler hadde stått i 5 min i romtemperatur ble 300 µL A3-nøytraliseringsbuffer tilsatt og blandet, ved å snu røret opp ned 6-8 ganger. Løsningen ble sentrifugert ved 11 000 rpm og supernatant med DNA ble overført til NucleoSpin®Plasmidfilteret som ble plassert i et rent Eppendorfrør. Silicamembranen med bundet DNA ble vasket først ved å tilsette 500 µL AW-buffer, etterfulgt av 600 µL A4-buffer. Silicamembranen ble sentrifugert tørr i to min ved 11 000 rpm. Eluering av DNA ble gjort ved tilsetning av 50 µL AE-buffer eller MilliQ-filtrert vann, og sentrifugering ved 11 000 rpm i to minutter.

#### **3.1.4 Primerdesign**

For å kunne lage mutasjoner i CaMKIIδ335 ble det benyttet primere. Primerne må være forward og revers og være komplementære til hverandre, og inneholde ønsket sekvens for mutasjonen. Primere bør være mellom 25 og 45 basepar lange og smeltetemperaturen skal helst være over 78 °C i saltholdig løsning. Mutasjonen bør helst være mellom 10-15 basepar fra hver ende av primeren og primeren bør minimum ha 40 % GC, og avsluttes av G/C på hver ende (Stratagen). Primersekvensen ble bestilt fra Eurofins Genomics, og er vist i tabell 3.1.

### 3. Metoder

Tabell 3.1 Revers og forward primere brukt til QuikChange setedirigertmutagenese for å lage ulike mutanter			
Mutant	Aminosyresekvens med mutasjon markert med fet skrift	Retning	Primersekvens
CaMKII $\delta$ 1/2SN	275RSTVAS <b>IV</b> EEQETVDC290	Forward	CGTTCTACTGTTGCTTCCAT CGTGGAGGAACAGGAGACT GTAGACTGC
		Revers	GCAGTCTACAGTCTCCTGTT CCTCCACGATGGAAGCAAC AGTAGAACG
CaMKII $\delta$ SN	281 <b>IV</b> EEQYTPQSLKKN295	Forward	CCATCGTGGAGGAACAGTA CACTCCACAGTCCTTGAAG AAATTTAATGC
		Revers	GCATTAATTTCTTCAAGG ACTGTGGAGTGTACTGTTCC TCCACGATGG
CaMKII $\delta$ 264	259KRITAS <b>Stop</b> EALKH269	Forward	CCAAACGCATCACAGCCTA AGAGGCACTGAAGCACCC
		Revers	GGGTGCTTCAGTGCCTCTTA GGCTGTGATGCGTTTGG
CaMKII $\delta$ 291	286ETVDCL <b>Stop</b> KFNAR297	Forward	CTTCTAGCATTAAATTTCTA CAAGCAGTCTACAGTCTCC
		Revers	GGAGACTGTAGACTGC TTG TAG AAA TTT AAT GCT AGAAG
CaMKII $\delta$ T287D	281MMHRQ <b>ED</b> VDCLK292	Forward	CATGATGCACAGACAGGAG GATGTAGACTGCTTGAAG
		Revers	CTTCAAGCAGTCTACATCCT CCTGTCTGTGCATCATG
CaMKII $\delta$ 275	270PWICQR <b>Stop</b> TVASMM282	Forward	CCATGGATCTGTCAACGTT AAACTGTTGCTTCCATGATG C
		Revers	GCATCATGGAAGCAACAGT TTAACGTTGACAGATCCAT GG

### 3. Metoder

#### 3.1.5 Seterettet mutagenese (QuikChange PCR)

Seterettet mutagenese er svært viktig for funksjonsstudier, genetisk engineering, biokjemi og protein-engineering (Zheng, Baumann et al. 2004). Seterettet mutagenese er en metode for å lage mutasjoner in vitro. Mutasjonene blir laget ved å bruke komplementære primere med mutasjon designet for QuikChange og PCR. DNA blir amplifisert ved hjelp av Pfu Polymerase og PCR-temperatursykluser (Stratagen).

Det muterte DNA produktet vil få et nick. Det metylerte parentale DNA-et vil bli fragmentert ved å bruke restriksjonsenzymet DpnI. Nicket i PCR-produktet blir ligert sammen i *E.coli* cellene ved hjelp av DNA ligase og andre reparasjonsenzymmer (Stratagen).

PCR-amplifisering består av tre trinn, denaturering, hybridisering og forlengelse, som vil føre til splitting av de to DNA trådene, binding av primerne og forlengelse av primerne, henholdsvis. Hybridiseringstemperaturen er ofte den mest kritiske parameteren som varieres for å optimalisere spesifikk binding og forhindre uspesifikk binding av primer til plasmidet (van Pelt-Verkuil, van Belkum et al. 2008).

#### Materialer

- Forward primer med ønsket mutasjon (punkt 3.1.4)
- Revers primer med ønsket mutasjon (punkt 3.1.4)
- dNTP miks
- DMSO
- Templat DNA
- MgSO<sub>4</sub>
- 10x Pfu buffer
- PfuTurbo Polymerase
- MilliQ-filtrert vann
- PCR-instrument
- DpnI
- Varmebad

### 3. Metoder

#### Metode

Reaksjonsblandingen for den setedirigerte mutagenesen ble forberedt ved å tilsette løsningsene som vist i tabell 3.2, hvor Pfu enzymet ble tilsatt tilslutt.

Tabell 3.2 Tillaging av reaksjoner for sete dirigert mutagense ved hjelp av QuikChange.		
Reagens	Konsentrasjon	Volum $\mu\text{L}$
Forward primer	5pM	5 $\mu\text{L}$
Revers primer	5pM	5 $\mu\text{L}$
dNTP-mix	10mM	2 $\mu\text{L}$
DMSO	100 %	2 $\mu\text{L}$
Templat	50 ng	
MgSO <sub>4</sub>		0,5 $\mu\text{L}$
10x Pfu buffer		2,5 $\mu\text{L}$
Pfu Polymerase		1 $\mu\text{L}$
MilliQ-filtrert vann		Til sluttvolum 25 $\mu\text{L}$

QuikChange ble først utført med temperaturprogram som vist i tabell 3.3.

Tabell 3.3. Temperaturprogram for QuikChange PCR			
Segment	Antall sykluser	Temperatur ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tid (min)
Oppvarming	1	95	3
Denaturering	20 sykluser	95	0,5
Hybridisering		55-60	0,5
Forlengelse		68-72	12
Nedkjøling	1	4	

PCR-røret med amplifisert DNA ble tilført 1  $\mu\text{L}$  DpnI og lagt i varmebad ved 37  $^{\circ}\text{C}$  i 1 time.

### 3. Metoder

#### 3.1.6 Måling av DNA konsentrasjon

Spektrofotometrisk absorpsjon og fluorescense er standardmetoder for kvantifisering av DNA. Den mest vanlige metoden er absorpsjonsspektroskopi fordi DNA har høy absorpsjon ved 260 nm. I den vanligste fremgangsmåten blir DNA plassert i en kyvette, og satt i spektrofotometeret. Prøven blir utsatt for lys ved en forhåndsbestemt bølgelengde og intensitet. Absorpsjonen blir målt etter hvor mye lys som går igjennom prøven. Epoch Spektrofotometer systemet for multi-volum analyser krever mikrovolum for å kvantifisere nukleinsyrer, og tillater opptil 16 prøver å bli analysert på samme tid (BioTek 2009).

#### Materiale

- Renset plasmid
- Plate og plateleser for bestemmelse av DNA-konsentrasjon
- MilliQ-filtrert vann

#### Metode

1  $\mu\text{L}$  av rensed plasmid og 1  $\mu\text{L}$  MilliQ-filtrert vann ble plassert i to paralleller på platen. Dråpene uten DNA ble registrert som blanke i programvaren og parallellene ble registrert som prøver. Platen med prøvene ble plassert i kammeret og programmet for måling ble startet. DNA konsentrasjonene ble registrert.



### 3. Metoder

#### 3.1.7 Sekvensering

For å undersøke om de setediregerte mutasjonene utført på pNic28-Bsa4 konstruktene var vellykket, ble plasmidet rensset og sendt til sekvensering. Hvis mutasjonen var vellykket har aminosyresekvens fra tabell 3.4 kommet inn i plasmidet. Ved QuikChange ble det lagd følgende mutanter CaMKII $\delta$ 1/2SN, CaMKII $\delta$ SN, CaMKII $\delta$ 264, CaMKII $\delta$ 291, CaMKII $\delta$ T287D og CaMKII $\delta$ 276. Sekvenseringsprimerne vil binde seg i T7 promotor området i pNic28-Bsa4 konstruktet (vedlegg B) og i tabellen 3.4 nedenfor er sekvenseringsprimerne brukt til sekvensering av pNic28-Bsa4 vist.

Tabell 3.4. Primere brukt for sekvensering av PCR produkt fra miniprep av pNIC28-Bsa4 plasmider	
Primersekvens	Retning
TAATACGACTCACTATAGGG	Forward
GCTCGAGTGCGGCCGCAAGC	Revers

#### Materialer

- Primere (forward og revers)
- Plasmid (fra 3.1.5)

#### Metode

50 ng plasmid ble tilsatt 5  $\mu$ L 5 pmol/ $\mu$ L primer og fortynnet til et sluttvolum på 10  $\mu$ L. Fem ulike plasmider med både forward og revers primer ble undersøkt for hvert setediregert mutagense forsøk. Prøvene ble merket og sendt til sekvensering hos GATC Biotech.

### 3. Metoder

#### 3.1.8 Transformering inn i BL21 CodonPlus (DE3) RIPL celler

BL21 CodonPlus (DE3) RIPL celler (BL21-celler) er en *E.coli* stamme som ofte brukes til å uttrykke proteiner. Stammene i CodonPlus Serien inneholder ekstra kopier av genene som koder for argU, ileY, proL, og leuW, tRNAer som kan være begrensede faktorer under høy ekspresjon (Agilent 2015). BL21 cellene er kjemisk kompetente celler som er behandlet med en buffer som inneholder CaCl<sub>2</sub> og andre salter. Denne behandlingen, sammen med en kort oppvarming, gir en ustabil cellemembran som gjør at plasmidet kan trenge inn (SIGMA 2006).

Plasmidet tilsettes i små volum og det er viktig at cellene står på is i 30 min etter tilsetning av DNA, reduksjon av denne tiden kan føre til redusert transformasjonseffektivitet. Når cellene blir varmet vil transformasjonen skje vha en kort varmpuls som fører til at plasmidet kommer inn i cellene. Etter transformasjonen vil cellene bli fortynnet, slik at de kan vokse og membranen kan stabilisere seg (SIGMA 2006).

#### Materialer

- BL21 CodonPlus (DE3) RIPL-celler
- Varmebad
- Plasmid med konstrukt for CaMKII $\delta$ 335, CaMKII $\delta$ 1/2SN, CaMKII $\delta$ SN, CaMKII $\delta$ 264, CaMKII $\delta$ 291, CaMKII $\delta$ T287D eller CaMKII $\delta$ 275
- SOC-medium
- Inkubator for Eppendorf-rør
- LB-plater med kanamycin 1  $\mu$ g/mL
- LB-medium med kanamycin 1  $\mu$ g/mL

#### Metode

25  $\mu$ L kompetente BL21 celler ble tint på is. Cellene ble tilsatt 1-50 ng plasmid og blandet ved pipettering, og inkubert på is i 30 min. 1 mL SOC medium ble varmet opp ved 42°C, og varmpulsering av BL21 cellene i 18 sekunder ved 42°C ble utført. Cellene ble inkubert på is i to min og deretter tilsatt 1 mL SOC-medium og varmet på 37 °C i 1 time ved risting på 300 rpm. Cellekulturene ble fortynnet ved å pipettere 1  $\mu$ L og 10  $\mu$ L cellekultur i 200  $\mu$ L SOC, deretter fordelt på to LB-plater.

### 3. Metoder

#### 3.1.9 Tillaging av frysestock

For å kunne lagre BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL-celler transformert med plasmid ble de tilsatt glycerol før de ble lagret ved  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Glycerolen fører til mer stabil lagring av bakteriene slik at cellekulturen kan lagres og brukes flere ganger til å starte nye kulturer (Basu and Johnson 2009).

#### Materialer

- LB-medium med kanamycin  $1\text{ }\mu\text{g/mL}$
- *E.coli* cellekolonier fra punkt 3.1.7
- Inkubator for små cellekulturer
- 60% glycerol
- 

#### Metode

10-100 mL LB-medium med kanamycin ble inokulert med 1 *E.coli* cellekoloni, og bakteriene ble dyrket overnatt ved  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  i ca 15 timer. Det ble tatt ut 1 mL overnattekultur og tilsatt 0,5 mL 60 % glycerol og lagret ved  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.2 Ekspresjon av protein

Proteinet blir uttrykt i et bakteriecellesystem, hvor plasmidekspresjonsvektoren er transformert inn i *E.coli* cellen, og overekspresjon skjer ved hjelp av Lac-operon. Ekspresjonen skjer ved at det først blir laget en forkultur som står overnatt. Denne blir brukt for å inokulere til et større volum vekstmedium. Genet for CaMKII $\delta$  mutanten er klonet inn i plasmidet etter en Lac-promotor. I vedlegg B vises pNiC28-Bsa4 og pETM60 vektorene, hvor man ser Lac-operonet plassert inn i plasmidet. Promotoren blir induert ved å tilsette isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG). LacI binder IPTG og trigger transkripsjon av operonet (Casali and Preston 2003). IPTG tilsettes når cellene har kommet til eksponentiell vekstfase. Produksjonen av protein skjer typisk ved  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  2-6 timer eller 18  $-25^{\circ}\text{C}$  overnatt.

### 3. Metoder

#### Materialer

- LB-medium med kanamycin 1 µg/L
- Frysestock med CaMKII $\delta$ 335, CaMKII $\delta$ 1/2SN, CaMKII $\delta$ SN, CaMKII $\delta$ 264, CaMKII $\delta$ 291, CaMKII $\delta$ T287D eller CaMKII $\delta$ 275
- IPTG 0,25 mM, 0,5 mM eller 1,0 mM
- Inkubator for store cellekulturer
- Spektrofotometer

#### Metode

Det ble lagd overnattskultur ved å inokulere 100-300 mL LB med kanamycin med celler fra frysestock. 10 mL overnattskultur fra 3.1.8 ble tilsatt til hver liter LB-medium m/kanamycin og cellekulturene ble satt i en riseinkubator 180 rpm ved 37 °C. OD600 ble målt etter ca. 3 timer, og deretter jevnlig inntil en absorbans på 0,55-0,65 var oppnådd. For kulturer hvor ekspresjon ble utført overnatt ble temperaturen satt ned til 18°C og etter en time indusert med 0,25 mM IPTG. Det ble i noen forsøk prøvd å indusere med 0,25, 0,50 eller 1,0 mM IPTG. Cellekulturen ble sentrifugert neste dag ved 5 500 rpm i 30 min og pelleten ble bevart. For ekspresjon ved 37 °C ble kulturen tilsatt IPTG ved oppnådd OD600 på 0,6. Kulturen ble dyrket i 6 timer og sentrifugert ved 5 500 rpm i 30 min og pelleten ble bevart.

Det ble tatt ut 1 mL cellekultur til et Eppendorfrør for ekspresjonstest før IPTG ble tilsatt og 1 mL dagen etter ved dyrkning overnatt. Ved dyrkning på 37 °C ble det tatt ut 1 mL cellekultur før IPTG ble tilsatt og etter 1, 2, 4 og 6 timer etter induksjon. Eppendorfrørene ble sentrifugert og cellepelleten bevart for videre analyse på SDS gel.

### 3. Metoder

#### 3.3 Rensing av protein

For krystallisering og bindingsanalyse må man ha rent protein, med høy konsentrasjon. Cellepelletter fra ekspresjon i 2-12 L LB-medium med sorbitol ble derfor først rensset ved sonikering, Ni-NTA/Co-CMA, deretter på ionebytter-kolonne eller superdex75 kolonne.

##### 3.3.1 Sonikering og rensing av protein med 6xHis-tag

Rensing av proteinet gjøres ved at cellene først blir lysert ved sonikering, som skaper gasslommer ved hjelp av høy energi (Zourob, Elwary et al. 2008). Når cellene er lysert blir de sentrifugert for å fjerne cellematerialet og hydrofobe molekyler fra løselig protein og DNA. CaM og de ulike variantene/mutantene av CaMKII $\delta$  inneholder alle en 6xHis-tag, som gjør det mulig å rense disse ved hjelp av immobilisert-metal affinitets kromatografi (IMAC) (Gaberc-Porekar and Menart 2001).

Denne metoden ble først brukt til å rense proteiner med naturlig histidin på overflaten, ved hjelp av metallioner. For å kunne rense proteiner ved binding til metalioner, ble proteiner derfor tilført histidin til N eller C-terminale enden av proteinet og dette gjorde det mulig for proteinet å bli bundet til agarose-matriksen (Hefti, Van Vugt-Van der Toorn et al. 2001).

I dag brukes immobilisert nikkell, kobber eller kobolt som transisjonsmetalioner som binder hovedsakelig histidin (Gaberc-Porekar and Menart 2001) og aminosyrer med aromatiske nitrogengrupper (Ueda, Gout et al. 2003). I våre forsøk ble to typer agarosemateriale brukt i immobilisert metallkromatografi (IMAC); Co-CMA (agarose med karboksylaspartat for kobolt) og Ni-NTA (agarose med nitriloeddiksyre). Begge kolonnematerialene ble behandlet på samme måte, med hensyn til preparering, rensing på kolonnen, og ettervask.

Hovedforskjellene mellom Co-CMA og Ni-NTA er at nikkelmaterialet kan regenereres, mens koboltmaterialet i Co-CMA ikke kan regenereres. I tillegg har Co-CMA lavere retensjonstyrke (Hefti, Van Vugt-Van der Toorn et al. 2001), mindre uspesifikk binding, lavere affinitet for histidintag, som resulterer i at det blir mer rent produkt ved rensing på Co-CMA i forhold til Ni-NTA (Bornhorst and Falke 2000).

### 3. Metoder

For å rense proteinet på IMAC materialet tilsettes først lysatet som er et cellefritt ekstrakt, deretter vaskes materialet, og proteinet elueres ved hjelp av en imidazolbuffer som har høyere affinitet til materialet enn histidin. Selektiviteten til IMAC er avhengig av mobilfasen. Ved å øke den ioniske styrken kan det føre til at sekundære og elektrostatiske interaksjoner blir hemmet, og binding av proteinet kan bli forsterket. Vanligvis brukes natriumklorid konsentrasjoner 0,1-1 M for å vaske materialet, og pH mellom 7-8 for å sørge for negativ ladning på histidiningruppene før eluering (Ueda, Gout et al. 2003). I våre forsøk er det brukt flere ulike buffere for å få proteinet rent.

#### **Materialer**

- Cellepellet fra punkt 3.2
- Sonikering, lav og høysaltvaskebuffer og elueringsbuffer (med enten Hepes pH 7,5, Tris pH 8,0, eller Hepes pH 8,0 som pH-buffer)
- Sonikator til store cellepelleter
- MilliQ-filtrert vann
- Ni-NTA eller Co-CMA
- Sentrifuge til små rør

#### **Metode**

I dette forsøket ble ulike pH-verdier på bufferene brukt, ved at bufferene var tilsatt enten Hepes pH 8,0, Tris pH 8,0 eller Hepes pH 7,5. Cellepelletene ble tilsatt 15 mL sonikeringsbuffer per liter LB-medium, og resuspendert i løsningen. Cellesuspensjonen ble overført til et kaldt begerglass. Sonikering ble utført i 30 sekunder, med amplitude på 60, og med 30 sekunders pause tre runder, mens begerglasset stod på is. Cellesuspensjonen ble overført til kalde sentrifugerør og sentrifugert ved 15 500 rpm i 45 min, ved 4 °C. I noen tilfeller ble det tatt en spatelspiss av pelletten etter sonikering og 1 mL av lysatet for å sjekke løselighet til proteinet.

I disse forsøkene ble det brukt Co-CMA eller Ni-NTA som agarosemateriale. Det ble overført 6 mL agarosemateriale til en glasskolonne, kolonnematerialet ble vasket med 100-150 mL MilliQ-filtrert vann, og deretter ekvilibrert med sonikeringsbufferen.

### 3. Metoder

Kolonnematerialet ble tilsatt cellelysate fra sentrifugeringen til kolonnematerialet, og lysate sto i ca. 45 min. Flowthrough ble samlet. Hvis det kun ble benyttet to vaskebuffere ble høysaltvaskebuffer tilsatt først, deretter stod løsningen i ca. 10 min før flowthrough ble samlet. Lavsaltvaskebufferen ble tilsatt og stod i 10 min, og flowthrough ble samlet. Hvis det kun ble benyttet en vaskebuffer, ble kun lavsaltvaskebufferen tilsatt. Proteinet ble eluert med 15 mL elueringsbuffer, og samlet i 3x5 mL fraksjoner.

#### 3.3.2 Regenerering av Ni-NTA agarosemateriale

Nikkelioner kan løsne fra Ni-NTA-agarosen etter flere gangers bruk og dette materialet er svært dyrt. Det er mulig å regenerere materialet med nye metallioner for å forlenge levetiden og øke utbyttet.

#### Materiale

- Brukt Ni-NTA
- 7 M GuHCl
- MilliQ-filtrert vann
- 2 % SDS
- 0,1 M EDTA pH 8
- 0,1 M NiSO<sub>4</sub>
- 20 % etanol

#### Metode

Metoden er her beskrevet for regenerering av 1 mL resin som utgangspunkt. Ved regenerering av større volum med resin må tilsetningsvolumene økes tilsvarende økningen i resin. Nikkelmaterialet ble vasket med 2 mL 7 M GuHCl, og rester av GuHCl ble fjernet med 5 mL MilliQ-filtrert vann. Videre ble materialet vasket med 2 % SDS og rester av SDS ble fjernet med 5 mL MilliQ-filtrert vann. Materialet ble tilsatt 100 mM EDTA (pH 8,0) og eluert ut. 5 mL 100 mM NiSO<sub>4</sub> og overskudd eluert ut, og vasket bort med 10 mL MilliQ-filtrert vann og lagret i 20 % etanol.

### 3. Metoder

#### 3.3.3 Prøveforberedelse av pelleter og proteinløsninger til SDS-PAGE

SDS (Natriumdodekylsulfat) er en sterk anionisk detergent, og åpner hydrogenbindingene i den sekundære og tertiære strukturen som fører til at proteinet denaturerer. SDS har også en egenskap som gjør at proteinet binder fargen bedre, øker deteksjonen på gelen og gir den negative ladningen som driver proteinet gjennom gelen (Janson 2012). Ved hjelp av varmebehandling og sonikering blir proteinet frigjort fra cellene og ved hjelp av sentrifugering blir hydrofobt, uløselig cellematerialet og DNA separert til bunnfallet (McNally, McNally et al. 2007).

#### Materialer

- Proteineluat
- Pellet
- Whirlmikser
- 4xNuPage®LDS Sample Buffer
- Proteincrackingbuffer
- Inkubator for Eppendorf-rør
- Sentrifuge for Eppendorf-rør

#### Metode

##### *Pelleter:*

100µL proteincrackingbuffer ble tilsatt til hver pellet og satt i 95 °C i 10 min. Løsningen ble blandet godt ved vortexing, og sentrifugert ned i romtemperatur. Hver av pelletene ble sonikert i 10 sekunder, og spunnet ned før det ble tilsatt 5 µL på SDS-gel for analyse ved SDS-PAGE.

##### *Lysater el. proteinløsninger:*

15 µL lysat/proteinløsning ble tilsatt 5 µL Nupage, og varmet i 70 °C i 10 min. Det ble påsatt 8-10 µL proteinløsning på SDS-gel, for analyse ved SDS-PAGE.



### 3. Metoder

#### 3.3.4 Natriumdodecylsulfat polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE)

En viktig måte for å separere proteiner er ved bruk av elektroforese, hvor det ladede proteinet migrerer i et elektrisk felt. Denne metoden brukes hovedsakelig til å se på hvor mange ulike proteiner det er i løsningen og renheten og størrelse til proteinene. Gelen som brukes er en polyakrylamid gel, som demper farten under migreringen proporsjonalt med masseladningsforholdet. Migreringen gjennom gelen blir påvirket av formen på proteinet (Lehninger, Nelson et al. 2005).

For at formen på proteinene skal være mest mulig lik er de varmet opp i SDS. SDS fører til at proteinene blir negativt ladede på overflaten slik at de kun separeres kun ved størrelse, og ikke form (McNally, McNally et al. 2007). Proteinene har en negativ ladning og vil derfor under gelelektroforesen vandre mot den positive polen. Ved bruk av molekylvektsmarkør kan man identifisere størrelse på proteinet og dermed se tilstedeværelse av proteinet, få et inntrykk av konsentrasjon av proteinet, og renheten til proteinet i løsning. For å visualisere båndene blir gelen tilsatt fargeløsning og deretter blir den avfarget (Lehninger, Nelson et al. 2005).

#### Materialer

- Proteinfraksjoner/pelleter behandlet etter punkt 3.3.3
- 1xMOPS SDS-buffert
- NuPAGE prøvebuffer (4x)
- Protein molekylvektsmarkør (Vedlegg C)
- Polyakrylamidgel
- SDS-fargeløsning for protein gel
- SDS-avfargingsbuffer
- Elektroforeseutstyr
  - Gelspenningskilde
  - Gelkjøringskammer
  - Polyakrylamidgel
- Inkubator for Eppendorf-rør

### 3. Metoder

#### **Metode**

Kammen i Polyakrylamidgelen ble fjernet og elektroforeseapparatet satt sammen. Hele innerkammeret og halve ytterkammeret ble tilsatt MOPS buffer. 10  $\mu\text{L}$  molekylvektsmarkør ble tilsatt i første brønn, og 5-10  $\mu\text{L}$  prøveløsning ble tilsatt til hver av brønnene. Elektroforesen ble utført ved 200 V i 35 min. Gelen ble tilsatt fargeløsning overnatt. Neste dag ble gelen avfarget ved avfargingsbuffer i flere runder og skannet inn på PC.

#### **3.3.5 Dialyse**

Dialyse involverer osmotiske krefter over en membran laget av polyethylenglycol eller modifisert cellulose (Scopes 1994). Osmose er bevegelse av vann eller små molekyler igjennom en semipermeabel membran fra et område med lavt osmotisk trykk til et område med høyt osmotisk trykk. Vanligvis fører dette til strøm inn i proteinløsningen, og dette fører til økt volum i dialysestrømpen. Det er derfor viktig å ikke fylle dialysestrømpen helt (Dennison 2003). Membranene som brukes her er en regenerert cellulosemembran som egner seg godt til separering på basis av ulik molekylmasse, for å fjerne salter, endre buffer, forandre pH og rense proteinet for urenheter (SPECTRUMLABS.COM 1999-2015).

#### **Materialer**

- Dialysemembran med MWCO 6-8 000 og 12-14 000
- Dialysebuffer (ResS lavsaltbuffer/HiTrapQ lavsaltbuffer/Superdexbuffer)
- Proteineluat

#### **Metode**

Proteineluat med ble overført til dialysestrømpen som var lukket i den ene enden og deretter ble tettet med klemmer i begge ender. Strømpen ble lagt i dialysebufferen og satt på 4 °C i 30 min til en 1 time, bufferen ble byttet med ny dialysebuffer og lagt 4 timer til 2 dager i den nye bufferen.

### 3. Metoder

#### 3.3.6 Rensing av protein på Fast Protein Liquid Chromatography

FPLC er en form for væskechromatografi som ved hjelp av ulike kolonner kan benyttes for å rense proteiner. Proteinene separeres fra hverandre med hensyn til størrelse, ladning, affinitet eller hydrofobisitet ved hjelp av ulike kolonner (GE 2008). FPLC-kolonnene som ble benyttet til å rense CaMKII $\delta$ /2SN, CaMKII $\delta$ SN, CaMKII $\delta$ 335 og CaM. er vist i tabell 3.5

Tabell 3.5 Kolonner benyttet til rensing ved CaMKII $\delta$ 1/2SN, CaMKII $\delta$ SN, CaMKII $\delta$ 335 og CaM	
Protein	Kolonne
CaMKII $\delta$ 1/2SN	HiTrapQ, Superdex75
CaMKII $\delta$ SN	HiTrapQ, ResS, Superdex75
CaMKII $\delta$ 335	HiTrapQ, ResS, Superdex75
CaM	HiTrapQ, Superdex75

CaMKII $\delta$ -mutantene og CaM som har en del urenheter etter Ni-NTA ble rensed ved ionebytterchromatografi, som kan separere proteiner som bare har en liten forskjell i ladning, ved at proteinet binder seg til kolonnemediet (GE 2008). Elueringen skjer ved å øke saltkonsentrasjonen slik at proteinets binding til mediet blir redusert. Det ble brukt to ulike sterke ionebytterkolonner i rensing av urene CaMKII $\delta$ -mutanter: ResS og HiTrapQ.

HiTrapQ kolonnen er en sterk anionbytter, hvor buffer med pH 8,0 med lavsalt benyttes. CaMKII $\delta$ -mutanten vil ha en negativ ladning, og dermed binde seg til den kvartære amingruppen i kolonnen. ResourceS kolonne er en sterk kationbytter, hvor det benyttes en lavsaltbuffer med pH 6,0. CaMKII $\delta$ -mutanten vil binde seg til polystyrene/divinylbenzen gruppen i kolonnematriksen i kolonnen. Ved bruk av Resource S eller HiTrapQ skjer eluering ved gradient eluering med NaCl fra konsentrasjon på 100 mM til 1000 mM, i en buffer med pH 6 eller 8 avhengig av kolonnen (GE 2008).

De rene fraksjonene fra Ni-NTA eller fra rensing på ionebytterene ble videre rensed på Superdex75, som separerer proteiner kun etter størrelse. Superdex 75 er en pakket kolonne for gelfiltrering av proteiner som har en molekylvekt mellom 3-75 kDa (Biosciences 1999), som passer godt for CaM på 17 kDa og CaMKII $\delta$ -mutantene på 30-35 kDa.

### 3. Metoder

#### **Materialer**

- FPLC-instrument
- Loop 50 mL
- Loop 1 mL
- Kolonner: ResS, HiTrapQ/ Superdex75
- ResS lav og høysaltbuffere (pH 6,0)
- HiTrapQ lavsalt og høysaltbuffere (pH 8,0)
- Superdex75-buffer (pH 7,5)
- Proteineluat

#### **Metode**

Kolonnene ble først vasket med 5-6 kolonnevolum MilliQ-filtrert vann, for å fjerne rester av urenheter og etanol i kolonnen.

#### ***Ionebytterkromatografi:***

Det ble brukt samme metode for ResS og HiTrapQ, men bufferne som ble brukt hadde ulik pH ettersom proteinet må ha riktig ladning for å binde seg til kolonnen. Kolonnene ble ekvilibrert med lavsaltbufferen til betingelsene var stabile (5-6 kolonnevolum). Loopen ble godt vasket med lavsaltbufferen. Proteinene fra Ni-elueringsbuffer ble dialysert til lavsaltbufferen vha punkt 3.3.5, ble påsatt loopen som ble koblet på FPLC systemet. Proteinene ble overført til kolonnen (ResS/HiTrapQ) ved å tilføre 6 kolonnevolum lavkonsentrert saltbuffer igjennom loopen, og flowthrough ble samlet. Kolonnen ble vasket med 6 kolonnevolum av lavsaltbufferen, og flowthrough ble samlet i en fraksjon. Proteinene ble eluert ved å øke saltkonsentrasjonen fra 100 mM til 1000 mM NaCl, ved å tilsette gradvis høysaltbufferen, og eluatet ble samlet i 0,5-1,5 mL fraksjoner. Fraksjonene med høyest absorbans ble undersøkt ved SDS-PAGE (punkt 3.3.3 og 3.3.4).

#### ***Superdex 75***

Proteinene ble oppkonsentrert til et volum på 1 mL, mens superdexkolonnen ble ekvilibrert med superdexbufferen til betingelsene var stabile. Loopen ble vasket godt med superdexbufferen og proteinene ble tilført loopen. Loopen ble påsatt FPLC-systemet og påført superdexkolonnen vha superdexbufferen. Eluatet ble samlet i 0,5 mL fraksjoner og fraksjonene som ga høyest absorbans ble undersøkt på SDS-PAGE (3.3.3 og 3.3.4). De reneste fraksjonene ble slått sammen og oppkonsentrert til videre undersøkelse på mikroskala termoforese eller krystallisering.

### 3. Metoder

#### 3.3.7 TEV kutting

Tobacco Etch Virus (TEV) er et protein 27 kDa som kan fjerne 6xHis-Tag, ved å gjenkjenne den spesifikke sekvensen E-X-X-Y-X-Q-G(S), hvor kuttingen skjer ved Q-G eller Q-S. Proteinene kan være fusjonert med et protein som øker løsligheten som for eksempel N-utilizing-substans A (Nus-A) eller maltosebindende protein (MBP), som kan fjernes ved hjelp av TEV (Rupp 2009).

Ekspresjon ved hjelp av *E.coli* gir ofte store mengder protein, men noen ganger får man lave mengder proteiner pga lav eller ingen el. lite ekspresjon, eller at proteinet er ustabil og presipiterer med en gang det blir uttrykt. I forsøkene har vi brukt løselighetstaggen NusA på 54 kDa, som er vist i andre tilfeller å føre til økt løselighet i større grad enn GST (De Marco, Stier et al. 2004). Det ble sett på tre versjoner av CaMKII $\delta$  med NusA-løselighetstag; NusA-CaMKII $\delta$ SN, NusA-CaMKII $\delta$ 280 og NusA-extended-CaMKII $\delta$ 280

#### Materialer

- TEV-protease
- Proteineluat

#### Metode

Det ble tilsatt TEV i et 1:100 forhold til protein i milligram, og løsningen stod 1-2 dager ved 4 °C for kutting. Metoden kan utføres samtidig som dialyse (punkt 3.3.5).

### 3. Metoder

#### 3.3.8 Massespektrometri

Ukjente proteiner på SDS-PAGE kan identifiseres ved massespektrometri. Dette gjøres ved i våre forsøk ved å se på 3 ulike proteiner på SDS-PAGE fra rensing på ResS kolonne. Proteiner kan identifiseres ved å først nedbryte proteinet til peptidfragmenter, som undersøkes på massespektrometri. Peptidfragmentene vil bli separert ved væskrokromatografi eller gaskromatografi. Peptidfragmenten blir omgjort til små fragmenter ved kollisjon med en inert gass i massespektrometeret. Massene til de små fragmentene fra ukjente proteiner blir målt, og sammenlignet med en database for identifikasjon av proteinet (Rappsilber and Mann 2002).

#### Materialer

- Skalpell
- SDS-PAGE gel med ukjente proteinbånd med kjent proteinmasse

#### Metode

De ukjente proteinenbåndene med kjent størrelse fra SDS-PAGE gel ble kuttet ut av SDS-PAGE gelen, og overført til ulike Eppendorf-rør. Eppendorf-rørene ble merket godt og sent til massespektrometrianalyse.

#### 3.3.9 Konsentrasjonsbestemmelse ved Bradford-metoden og oppkonsentrering

I Bradfordmetoden binder proteinet seg til Coomassie Brilliant Blue G-250. Når proteinet binder seg til fargeløsningen vil det føre til et skifte i absorpsjonsmaksimum til løsningen fra 465 til 595 nm. Ved å måle økningen i absorpsjonen ved 595 nm kan konsentrasjonen i  $\mu\text{g/mL}$  bestemmes (Bradford 1976).

#### Materialer

- 5x BioRad protein acid fargereagens
- MilliQ-filtrert vann
- Proteineluat
- Sentrifuge til Eppendorf-rør
- Sentrifuge til oppkonsentrering av protein
- Oppkonsentreringsrør
- Spektrofotometer

### 3. Metoder

#### **Prosedyre**

BioRadløsning ble lagd ved å blande 5x BioRad løsning med MilliQ-filtrert vann i et 1:4 forhold. 1 mL av den fortynnede bioradløsningen ble overført til en kyvette og ble brukt som blank til spektrofotometeret. 1 mL fortynnet bioradløsning ble tilsatt 1  $\mu$ L proteinløsning og blandet godt ved pipettering. Konsentrasjon av prøven ble målt på spektrofotometeret. For å oppnå ønsket konsentrasjon eller volum av proteinløsningen ble sentrifugering i oppkonsentreringsrør med egnet filter utført.

#### **3.4 Måling av interaksjoner mellom CaMKII $\delta$ 335 og SN-peptid ved MST**

Mikroskalatermoforse (MST) er en terminologi som refererer til bevegelsen av molekyler i en mikroskopisk temperaturgradient (Jerabek-Willemsen, Wienken et al. 2011), og er en fluorescens basert metode. En temperaturgradient induserer en strøm av molekyler (Jerabek-Willemsen, Wienken et al. 2011), som skyldes at proteinet diffunderer ut av det oppvarmede området. MST måler diffusjons hastigheten, som vil være ulik for et protein alene og et protein bundet til en ligand (Jerabek-Willemsen, Wienken et al. 2011). Ved å bruke en fortynningsrekke av liganden kan man bestemme affinitetskonstanten til interaksjon i et bindingsekvilibrium. MST kan utføres med proteinet i løsning, uansett størrelse på proteinet.

Rørene utsettes for stråling fra en infrarød laser som fører til lokal oppvarming i et område på noen få hundre mikrometer. Når den infrarøde strålen er tilført, blir energien absorbert og likevektstemperaturen øker med 1-10 K. Etter denne raske økningen i temperatur, vil termoforese forekomme, som er bevegelse av molekyler fra det oppvarmede temperaturfeltet som er avhengig av størrelse, ladning og løselighet (Jerabek-Willemsen, Wienken et al. 2011). Når røret oppvarmes vil det være stor diffusjon ut av det oppvarmede området, til en likevekt oppnås. Etter at den infrarøde laseren er slått av vil området bli nedkjølt og proteinet vil strømme inn i området igjen. Ved å se på forandringen av proteinkonsentrasjonen i det oppvarmede feltet ved hjelp av fluorescensforandring induert av termoforetisk bevegelse, kan man finne bindingskoeffisienten (Jerabek-Willemsen, Wienken et al. 2011). Det er tidligere gjort pull-down eksperimenter med SN og CaMKII $\delta$ 335 (Ottesen, Louch et al. 2015). Disse forsøkene virket best ved biacorebuffer med pH 5,0. Det ble derfor besluttet å kjøre MST med både MST-standardbufferen og bufferen basert på biacore-analysen (biacorebufferen).

### 3. Metoder

#### **Materialer**

- Biacorebuffer
- MST standardbuffer
- SN peptid (5 mM)
- CaMKII $\delta$  1-4 mg/mL
- Instrument for MST-analyse

#### **Metode**

##### ***MST i biacorebufferen***

Det ble først utført en forundersøkelse med 6 glasskapillær rør som inneholdt hhv MilliQ-filtrert-vann, biacorebufferen, 50  $\mu$ M SN-peptid fortynnet i biacorebufferen og 0,14  $\mu$ M, 0,070 og 0,035  $\mu$ M CaMKII $\delta$ 335 fortynnet i biacorebufferen. Dette var for å bestemme optimal konsentrasjon av protein for titrering og samtidig sjekke at peptidet ikke bidrar til fluorescenssignalet.

Det ble deretter lagd en fortynningsrekke i et 1:1 forhold fra 20  $\mu$ L 100  $\mu$ M SN-peptid, ved ta ut 10  $\mu$ L SN-peptidløsning og fortynne med 10  $\mu$ L biacorebuffer i en fortynningsrekke på 16 fortynninger. Til de 10  $\mu$ L SN-peptid i ulike konsentrasjoner, ble hvert rør tilsatt 10  $\mu$ L 0,28  $\mu$ M CaMKII $\delta$ 335. De 16 løsningene med CaMKII $\delta$ 335 og SN-peptid ble overført til kapillærer, fluorescens ble målt og det ble kjørt termoforese.

##### ***MST i MST-Standardbufferen***

Det ble utført en forundersøkelse som inneholdt hhv, MilliQ-filtrert vann, MST-standard bufferen, 25  $\mu$ M SN-peptid fortynnet i MST-Standard buffer, og 1,2  $\mu$ M, 0,6  $\mu$ M, og 0,3  $\mu$ M CaMKII $\delta$ 335. Det ble lagd en fortynningsrekke i et 1:1 forhold fra 20  $\mu$ L 50  $\mu$ M SN-peptid, ved ta ut 10  $\mu$ L SN-peptidløsning og fortynne med 10  $\mu$ L MST-Standardbuffer i en fortynningsrekke på 16 fortynninger. Til de 10  $\mu$ L SN-peptid i ulike konsentrasjoner, ble hvert rør tilsatt 10  $\mu$ L 2,4  $\mu$ M CaMKII $\delta$ 335. De 16 løsningene med CaMKII $\delta$ 335 og SN-peptid ble overført til kapillærer, fluorescens ble målt og det ble kjørt termoforese.

Dataene ble analysert og prøvene med høyest proteinkonsentrasjon ble kontrollert for aggregering på DLS.



### 3. Metoder

#### 3.5 Dynamisk lysspredning (DLS)

Dynamisk lysspredning (DLS) er en metode for å undersøke tilstedeværelse av molekylaggregater og nanopartikler i en væske. Den hydrodynamiske størrelsen blir bestemt ved hjelp av translasjonsdiffusjonskoeffisienten som bestemmes ved å se på variasjonene i intensitetspredningen. Intensitetspredning av strålen er et resultat av Brownske bevegelser, som er de tilfeldige bevegelsene til partiklene påvirket av løsemiddelet rundt dem. Brownske bevegelse korrelerer med diffusjonskoeffesienten og størrelsen, og ved hjelp av intensitetspredning blir diffusjonskoeffisienten bestemt, som igjen fører til bestemmelse av størrelsene på partiklene i løsningen (Malvern).

#### Materialer

- CaMKII $\delta$ 335 (1-4 mg/mL) i superdexbuffer
- CaMKII $\delta$ 335 (0,14  $\mu$ M) i biacorebuffer
- CaMKII $\delta$ 335 (1,2  $\mu$ M) i MST standard buffer
- Dynamisk lysspredningsapparat

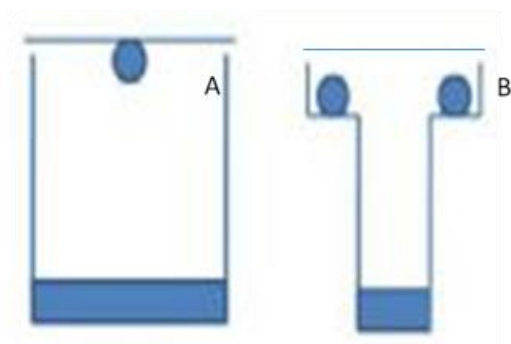
#### Metode

Løsningen med protein i buffer ble overført til kyvetten og program for DLS ved 25 °C ble startet. Volumkurvene ble undersøkt for å se om løsningen var monodispers eller polydispers.

### 3. Metoder

#### 3.6 Krystallscreening ved sitting drop

For å få proteinkrystaller må det utføres krystallisering med et stort antall ulike betingelser ved krystallscreening. Krystalliseringen ble utført ved væskedampdiffusjonsmetoden. Væskedampdiffusjon kan gjennomføres ved forskjellige oppsett som sittende dråpe eller hengende dråpe metoden, hvor dråpen hhv sitter eller henger over reservoaret i et lukket system med reservoarløsning. I figur 3.1 er det vist hvordan dråpen er plassert i forhold til reservoaret.



Figur 3.10.1 Hengende dråpe og sittende dråpe i et lukket system med reservoarløsning.

Når man finner proteinkrystaller optimaliseres det rundt betingelsen, for å få større og bedre krystaller til røntgenkrystallografi. I våre forsøk ble det brukt sittingdrop ved hjelp av en automatisert robot, og screenene som ble brukt er vist i tabell 3.10.

Tabell 3.10 Krystalliseringscreen brukt til krystallisering og proteinkonsentrasjon av CaMKII $\delta$ 335 (i mM) benyttet i krystallisering.			
	Krystalliseringskit	Produsent	Proteinkonsentrasjon av CaMKII $\delta$ 335 (mM) før tilsetning av SN-peptid og CaM
A	Wizard 1+2	Emerald BioScience	0,26 og 0,21
B	MIDAS	Molecular Dimensions	0,26, 0,22 og 0,21
C	Morpheus HT-96	Molecular Dimensions	0,26 og 0,21
D	MeMGold	Molecular Dimensions	0,24
E	Sigma basic kit	Sigma aldrich	0,26 og 0,21
F	Sigma extension kit	Sigma aldrich	0,26 og 0,21
G	Index	Hampton research	0,22 og 0,21
H	PEG/Ion Screen	Hampton research	0,21
I	JCSG Plus	Hampton research	0,26 og 0,22
J	Natrix 1+2	Hampton research	0,26 og 0,24
K	PGA Screen	Molecular Dimensions	0,26 og 0,21

### 3. Metoder

#### Materialer

- CaMKII $\delta$ 335 (0,26, 0,24 og 0,21 mM)
- CaM (1,5 mM)
- SN-peptid (5 mM)
- CaCl<sub>2</sub> (0,1M)
- Krystalliseringskit (se tabell 3.10)
- Crystal Clear Sealing Tape®
- Instrument for automatisert protein krystallisering

#### Metode

CaM ble tilsatt CaCl<sub>2</sub> i et 1:4 forhold. CaMKII $\delta$ 335 ble fordelt i to PCR-rør, og CaM med CaCl<sub>2</sub> ble tilsatt det ene PCR-røret. SN-peptidet ble tilsatt til begge PCR-rørene i et 1:1 molforhold, og løsningen ble satt på is. Det ble forberedt krystalliseringsplater ved å tilføre 30  $\mu$ L av krystalliseringsløsningen til hver sin brønn, og brettet ble plassert i roboten for krystallisering.

Det ble pipettert ut 2  $\mu$ L for hver rad som skulle krystalliseres på roboten, fra CaMKII $\delta$ 335 med CaM og SN-peptidet, og for CaMKII $\delta$ 335 med SN-peptidet. I roboten ble det blandet 150 nL protein med 150 nL krystalliseringsløsning, og plassert som sittende dråpe på krystalliseringsplaten. Etter at alle de 96 betingelsene var blandet i 96 dråper med CaMKII $\delta$ 335 på krystalliseringsplaten ble platen forsegleet med Crystal clear sealing tape®, og lagret ved 4 °C. Dråpene ble jevnlig undersøkt ved lysmikroskopi.

### 3. Metoder

#### 3.7 Homologimodellering

For å se på peptid-protein interaksjonen mellom CaMKII $\delta$ 335 og SN-peptidet, ble homologimodellering benyttet. Homologimodellering av protein-peptidstruktur består av følgende trinn: valg av reseptor struktur (CaMKII $\delta$ 335), valg av potensielt bindingsområde (aminosyre 281-291 i CaMKII $\delta$ 335), modell av SN-peptidets hovedkjede, peptid docking og energiminimering av peptid-protein komplekset (Raveh, London et al. 2010). Strukturen vist i figur 1.9.3 registrert i Protein Data Bank (PDB) med referanse 2WEL viser proteinet autoinhibert ved binding av det autoregulatoriske domenet i C-terminal ende, og det er antatt at SN-peptidet binder seg på lik måte som det autoregulatoriske domenet. Derfor kan vi trolig benytte homologimodellering for å få rimelig utgangsmoell for binding av SN-peptidet til CaMKII $\delta$  for videre docking. For å få bedre forståelse av bindingsområde kan APBS benyttes, som er et elektrostatiske kalkuleringsprogram. Dette programmet vil gi informasjon om ladningen på overflaten av molekylet, hvor hvit farge viser upolare områder, blå positiv ladning og rød negativ ladning (PDB2PQR).

#### Materiale

- PyMol
- FlexPepDock

#### Metode

For å kunne utføre homologimodellering ble strukturen 2WEL brukt som templat. Treonin 287 er en svært konservert aminosyre og plasseringen av denne i peptidsekvensen ble beholdt, og 281MMHRQETVD289 ble mutert til 281IVEEQYTPQ289, som tilsvarer sekvensen til SN-peptidet. Resten av sekvensen av halen på proteinet ble slettet, og bare hoveddelen av proteinet ble beholdt. CaMKII $\delta$  kjernestrukturen med peptidet ble sendt inn til docking ved å bruke Rosetta FlexPepDock serveren. Det ble kjørt APBS program (via PyMol) på de topp 6 beste løsningene fra FlexPepDock.

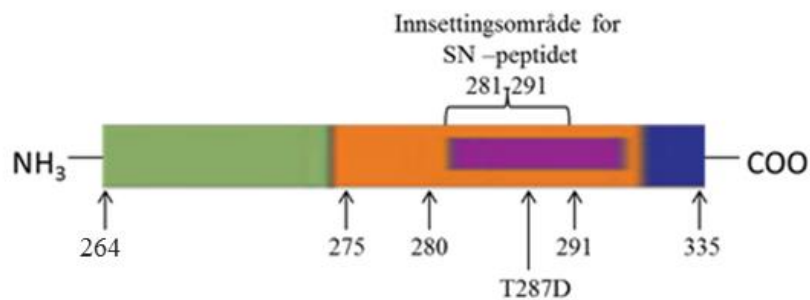
### 4. Resultat

Oppgavens formål var å krystallisere CaMKII $\delta$  med SN-peptidet for å finne strukturen for bindingen mellom CaMKII $\delta$  og SN-peptidet. Dette ble gjort ved å designe ulike former av CaMKII $\delta$ , undersøke ekspresjonen av disse og utvikle en god renseprotokoll for de løselige og uttrykte formene. CaMKII $\delta$  har et autoregulatorisk sete som binder den C-terminale-enden av CaMKII $\delta$ , som kan forhindre binding av SN-peptidet. Det ble benyttet fem ulike fremgangsmetoder for å gjøre det autoregulatoriske setet tilgjengelig for SN-peptidbinding.

Metode I er å fjerne deler eller hele den C-terminale delen, som autoinhiberer CaMKII $\delta$ , slik at SN-peptidet kan binde seg direkte. For dette formål ble det designet mutanter, CaMKII $\delta$ 264, CaMKII $\delta$ 275 og CaMKII $\delta$ 291, ved QuikChange. Det ble i tillegg bestilt CaMKII $\delta$ 280 og CaMKII $\delta$ 280-extended bundet til NusA løselighetstag. Metode II er å omgjøre treonin 287 til aspartat, som vil føre til en etterligning av fosforyleringen som aktiverer CaMKII $\delta$ , ved å lage mutanten CaMKII $\delta$ T287D. Metode III er å sette inn SN-peptidsekvensen i det C-terminale autoregulatoriske domenet i CaMKII $\delta$ . To mutanter ble laget. Den ene mutanten CaMKII $\delta$ 1/2SN har halve SN-peptidet i sekvensen og den andre CaMKII $\delta$ SN har hele SN-peptidet satt inn. Metode IV er å krystallisere CaMKII $\delta$ 335 med CaM som kanskje kan føre til at den C-terminale delen går ut av det autoregulatoriske setet, og da eventuelt gjør at setet er tilgjengelig for SN-peptidet. Metode V er å se på binding mellom SN-peptidet og CaMKII $\delta$ 335 uten CaM tilstede for å se om det regulatoriske setet likevel kan være tilgjengelig for binding selv uten CaM tilstede.

## 4. Resultat

I figur 4.1 er de ulike variantene av CaMKII $\delta$  designet og analysert i dette masterprosjektet vist.



Figur 4.1 Oversikt over mutasjonsområdene for tillaging av de ulike CaMKII $\delta$  mutantene, designet og analysert i masterprosjektet.

Det ble sett på bindingsanalyser ved mikroskalatermoforse (MST) for CaMKII $\delta$ 335 bundet til SN-peptidet. Tilslutt ble det lagd en homologimodell ved hjelp av FlexPepDock for å se på binding mellom SN-peptidet og CaMKII $\delta$ 335.

### 4.1 Sekvensering

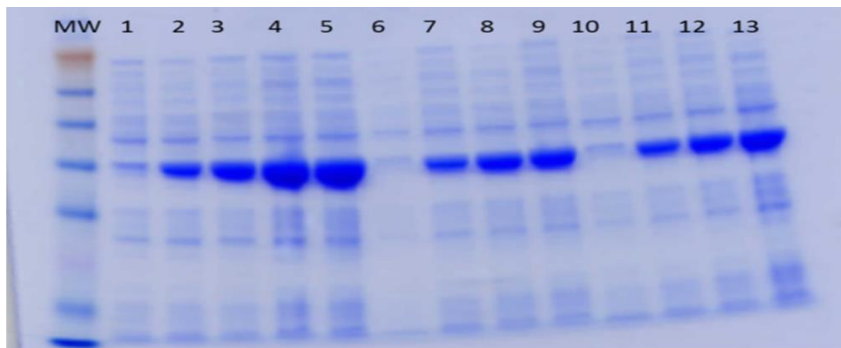
Det ble lagd 5 mutanter, CaMKII $\delta$ 264, CaMKII $\delta$ 275, CaMKII $\delta$ 291, CaMKII $\delta$ 1/2SN og CaMKII $\delta$ SN ved hjelp av primere med ønsket mutasjon og QuikChange (som beskrevet i punkt 3.1.5). CaMKII $\delta$ 264, CaMKII $\delta$ 275 og CaMKII $\delta$ 291 mangler den C-terminale autoregulatoriske delen som kan hindre binding av SN-peptidet. CaMKII $\delta$ 1/2SN og CaMKII $\delta$ SN har hhv halve og hele SN-peptidet satt inn i sekvensen. Disse ble sendt til sekvensering som beskrevet i punkt 3.1.7. I vedlegg D er kromatogrammene fra sekvenseringen vist.

### 4.2 Ekspresjon av de ulike mutantene

Det ble gjennomført ekspresjonstest og løselighetstest av hhv CaMKII $\delta$ 335, CaMKII $\delta$ 1/2SN, CaMKII $\delta$ SN, CaMKII $\delta$ 264, CaMKII $\delta$ 275, CaMKII $\delta$ 291, NusA-CaMKII $\delta$ SN, NusA-CaMKII $\delta$ 280, NusA-extended-CaMKII $\delta$ 280, og CaMKII $\delta$ T287D, transformert inn i BL-21 celler (beskrevet i punkt 3.2 og 3.3.1).

#### 4. Resultat

Ekspresjonstesten ble gjort ved å analysere cellepelleten fra 1 mL cellekultur som beskrevet i punkt 3.2 og 3.3.1 for å se hvor godt proteinene ble uttrykt. I figur 4.2.1 vises ekspresjonstest CaMKII $\delta$ 335, CaMKII $\delta$ SN og CaMKII $\delta$ 1/2SN ved 37°C.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
CaMKII $\delta$ 335	+	+	+	+	+								
CaMKII $\delta$ SN						+	+	+	+				
CaMKII $\delta$ 1/2SN										+	+	+	+
IPTG	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
°C	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37
Timer	-	1	2	3	6	-	1	2	4	-	1	2	4

Figur 4.2.1 Ekspresjonstest av CaMKII $\delta$ 335, CaMKII $\delta$ SN og CaMKII $\delta$ 1/2SN ved 37 °C

CaMKII $\delta$ 335 ble uttrykt bedre enn både CaMKII $\delta$ SN og CaMKII $\delta$ 1/2SN. Det ble kjørt ekspresjonstest på overnattekultur med ekspresjon ved 18 °C (beskrevet i punkt 3.2) av CaMKII $\delta$ 335, og CaMKII $\delta$ SN (vedlegg E, figur E.1) og vist god ekspresjon av disse mutantene ved ekspresjon 18 °C overnatt. I tillegg ble det kjørt ekspresjonstest ved 37 °C og 18 °C av CaMKII $\delta$ 264. CaMKII $\delta$ 264 viste god ekspresjon, men var ikke løselig (vedlegg E, figur E.2.)

CaMKII $\delta$ 275 viste seg å være lite uttrykt (vedlegg E, figur E.3), og det ble besluttet å lage et par nye mutanter av CaMKII $\delta$  uten autoregulatorisk domene, med N-terminal NusA-løselighetstag. Mutantene som ble laget i håp om bedre ekspresjon og økt løselighet var NusA-CaMKII $\delta$ 280, NusA-extended-CaMKII $\delta$ 280 og NusA-CaMKII $\delta$ SN. NusA-extended varianten har en litt lenger link-region mellom NusA og kinasen. NusA har en molekylvekt på 54 kDa, mens CaMKII $\delta$ 280 og CaMKII $\delta$ SN har molekylvekt på hhv 35 kDa og 32 kDa.

#### 4. Resultat

Ekspresjon av NusA-extended-CaMKII $\delta$ 280 ble utført og viste god ekspresjon, men var ikke løselig (vedlegg E, figur E.4 og E.5). I figur 4.2.2 er ekspresjonstest for NusA-CaMKII $\delta$ 280 og NusA- CaMKII $\delta$ SN vist.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Nus-CaMKII<math>\delta</math>280</b>	+	+	+	+	+	+						
<b>NusA-CaMKII<math>\delta</math>SN</b>							+	+	+	+	+	+
<b>IPTG</b>	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
<b>°C</b>	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37
<b>Timer</b>	-	1	2	4	6	6	-	1	2	4	6	6

Figur 4.2.2 Ekspresjonstest av NusA-CaMKII $\delta$ 280, og NusA-CaMKII $\delta$ SN ved 37 °C

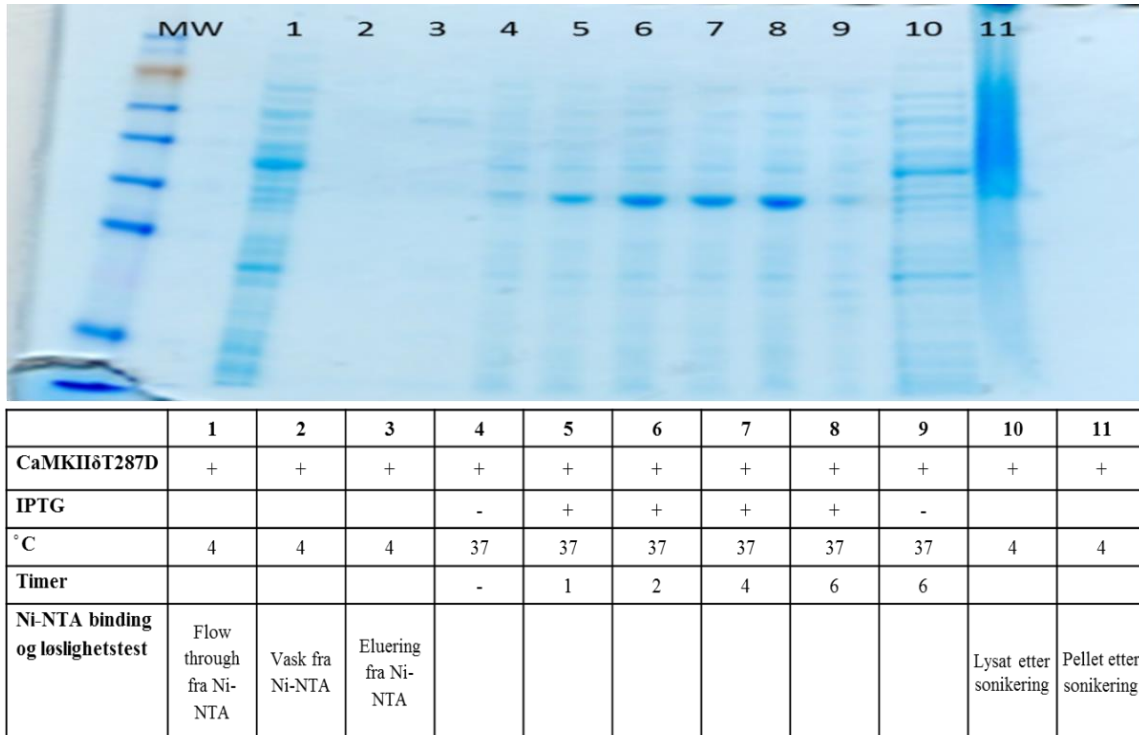
Det var god ekspresjon av NusA-CaMKII $\delta$ SN (bånd ved ca 89 kDa), men ingen ekspresjon av NusA-CaMKII $\delta$ 280.

NusA- CaMKII $\delta$ SN ble rensset på Ni-NTA og deretter kuttet ved hjelp av TEV-protease i ResS lavsaltbuffer med pH 6, for å sjekke løseligheten til proteinet etter TEV-protease aktivitet. Det ble observert en uløselig pellet etter at NusA ble fjernet. Lysatet og pelleten ble undersøkt på gel (vedlegg E, figur E.6). Det ble observert at CaMKII $\delta$ SN var kun i pelleten. Det ble utført en ny kutting av ny NusA-CaMKII $\delta$ SN ved pH 8,0, og det ble observert aggregering i løsning etter TEV-proteaseaktivitet.



#### 4. Resultat

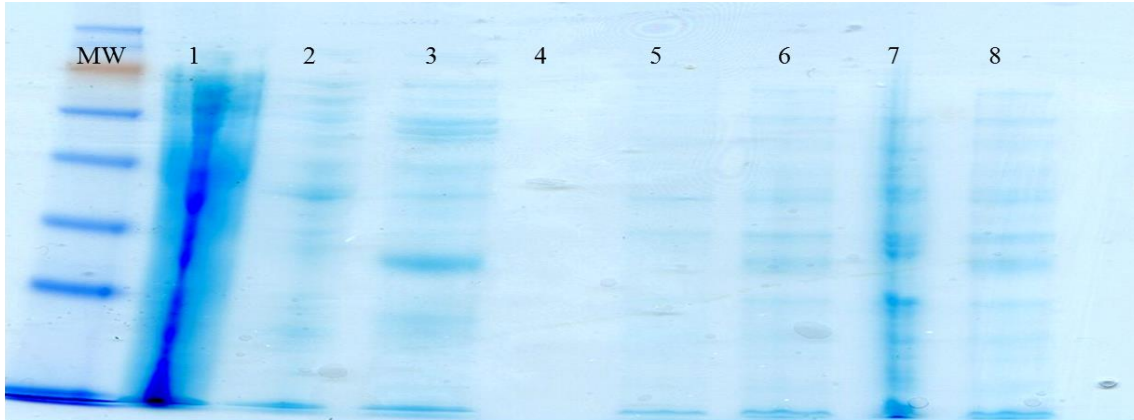
Det ble kjørt ekspresjonstest av CaMKII $\delta$ T287D, som har fått omgjort den essensielle aminosyren treonin 287 til aspartat, for å mimikere fosforylering. Det ble samtidig kjørt en løselighetstest for å undersøke om proteinet var i pelleten eller i lysatet, i tillegg til en bindingstest for å se hvor godt den bandt seg til Ni-NTA. Resultatet er vist i figur 4.2.3



Figur 4.2.3 Ekspresjonstest ved 37°C, løselighetstest og bindingstest av CaMKII $\delta$ T287D

Det var god ekspresjon av CaMKII $\delta$ T287D, men proteinet viste seg å ikke være løselig. CaMKII $\delta$ T287D ble ikke observert i lysatet ved forventet størrelse på 35 kDa og det var dermed ikke noe protein som kunne binde seg til Ni-NTA. Ekspresjon og løselighetstest av CaMKII $\delta$ 291 ble utført og i figur 4.2.4 er resultatet vist.

#### 4. Resultat



	1	2	3	4	5	6	7	8
CaMKIIδ291	+	+	+	+	+	+	+	+
IPTG					-	+	-	+
° C					18	18	18	18
Timer etter tilsatt IPTG					0	15	15	15
Ni-NTA løselighetstest	Flowthrough fra Ni-NTA	Vask fra Ni-NTA	Eluering fra Ni-NTA	Tom fraksjon				

Figur 4.2.4 Ekspresjonstest ved 37 °C, løselighetstest og bindingstest av CaMKIIδ291

Mange av CaMKIIδ-mutantene ga lite ekspresjon eller var uløselig. I tabell 4.1 er det vist en oversikt over resultatet fra ekspresjonstestene, for alle de undersøkte formene i denne oppgaven.

Tabell 4.1 Oversikt over de ulike mutantenes ekspresjon og løselighet		
Protein	Ekspresjon	Løselighet
CaMKIIδ264	-	-
CaMKIIδ275	-	-
NusA-CaMKIIδ280	-	-
NusA-CaMKIIδSN	+	-
NusA-extended-CaMKIIδ280	+	-
CaMKIIδT287D	+	-
CaMKIIδ1/2SN	+	+
CaMKIIδSN	+	+
CaMKIIδ335	++	++
CaMKIIδ291	+	+

## 4. Resultat

Det ble besluttet å ikke gå videre med mutantene CaMKII $\delta$ 264, CaMKII $\delta$ 275, NusA-CaMKII $\delta$ 280, NusA-extended-CaMKII $\delta$ 280, NusA-CaMKII $\delta$ SN og CaMKII $\delta$ T287D, pga ingen ekspresjon eller lav løselighet. Av alle mutantene uten autoregulatoriske domenet i C-terminal ende, var det kun CaMKII $\delta$ 291 som var løselig, men grunnet begrenset tid ble det ikke utført videre rensing av denne mutanten.

For å teste ekspresjonsnivå og evt løselighet i en annen *E.coli* stamme ble konstruktene for CaM, CaMKII $\delta$ 275, CaMKII $\delta$ 1/2SN og CaMKII $\delta$ SN transformert inn i Rosetta kompetente celler (beskrevet i punkt 3.1.8) men det ble observert lavere effekt av induksjon av disse mutantene i Rosettacellene (vedlegg E, figur E.7).

Det var god ekspresjon av CaMKII $\delta$ 1/2SN, CaMKII $\delta$ SN, og CaMKII $\delta$ 335 i BL-21 celler. Stor-skala cellekulturer av disse variantene ble laget for videre rensing på Ni-NTA/Co-CMA, HiTrapQ/ResS og Superdex 75.

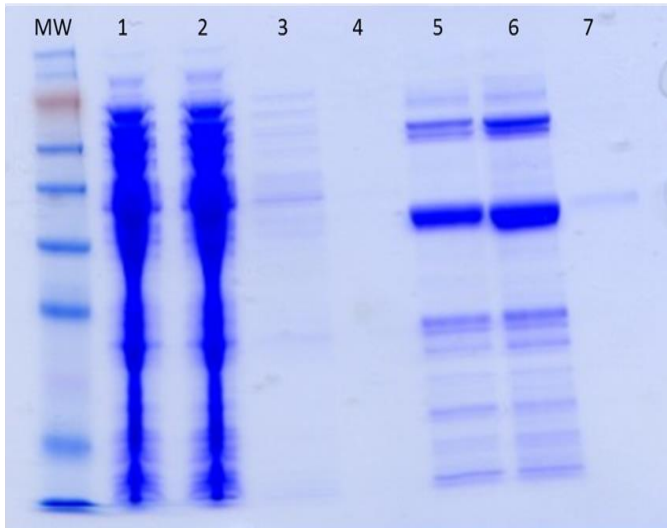
### 4.3 Rensing av CaMKII $\delta$ 1/2SN, CaMKII $\delta$ SN, CaMKII $\delta$ 335, og CaM

CaMKII $\delta$ 1/2SN, CaMKII $\delta$ SN, CaMKII $\delta$ 335 og CaM ble først rensert på Ni-NTA. I tilfeller hvor proteinet ikke var rent etter Ni-NTA ble ResS, HiTrapQ eller Superdex 75 benyttet for videre rensing. Metodene som ble benyttet til videre rensing var avhengig av hvor ren elueringsfraksjonen var fra rensing på Ni-NTA.

#### 4.3.1 Rensing av CaMKII $\delta$ 1/2SN

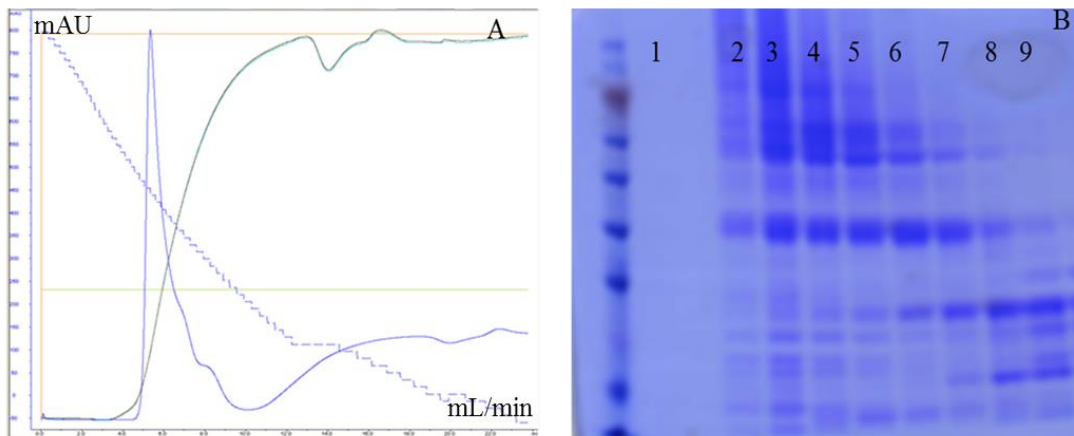
Pellet fra 6 L LB m/sorbitol, med ekspresjon av CaMKII $\delta$ 1/2SN overnatt ble løst opp i 90 mL sonikeringsbuffer med Tris pH 8,0. Etter sonikering og sentrifugering ble lysatet med CaMKII $\delta$ 1/2SN tilsatt til 6 mL Ni-NTA resin, og latt stå en stund før flowthrough ble samlet. Kolonnematerialet ble vasket med høysaltvaskebuffer og lavsaltvaskebuffer som inneholdt Tris pH 8,0, og eluert fra Ni-materialet med elueringsbuffer som inneholdt Tris pH 8,0 (beskrevet i punkt 3.3.1) og resultatet er vist i figur 4.3.1

#### 4. Resultat



Figur 4.3.1 Rensing av CaMKII $\delta$ 1/2SN på Ni-NTA, ved bruk Tris pH 8,0 buffer. I brønnene er det hhv, flowthrough 1 og 2, vask høysaltbuffer, lavsaltvaskebuffer og eluering 1, 2 og 3.

I figur 4.3.1 ser man at det er en del urenheter, og CaMKII $\delta$ 1/2SN ble videre rensset på HiTrapQ ved pH 8,0 (se vedlegg E, figur E.8) og de reneste fraksjonene ble rensset på Superdex 75. I figur 4.3.2 er gelen fra Superdex 75 vist.

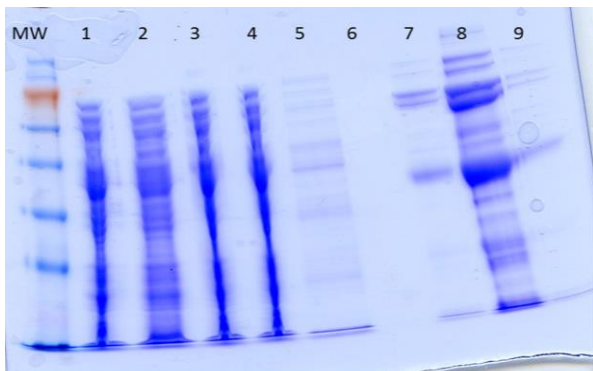


Figur 4.3.2 Rensing av CaMKII $\delta$ 1/2SN på Superdex 75. A: Kromatogram fra eluering på Superdex 75 B: SDS-PAGE gel med fraksjoner fra Superdex 75 hvor brønnene inneholder hhv fraksjon 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 og 20.

## 4. Resultat

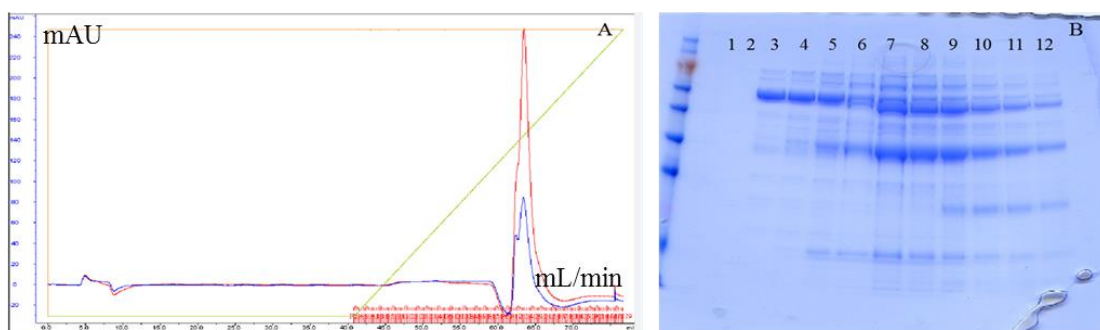
### 4.3.2 Rensing av CaMKII $\delta$ SN

Pellet fra 12 L LB m/sorbitol med ekspresjon av CaMKII $\delta$ SN ble løst opp i 180 mL sonikeringsbuffer som inneholdt Hepes pH 8,0. Sonikering og sentrifugering av CaMKII $\delta$ SN-cellepelletten ble utført og lysatet ble tilsatt Ni-NTA og ble vasket med høysaltvaskebuffer og lavsaltbuffer (med Hepes pH 8,0) og eluert fra Ni-NTA med 3x5 mL elueringsbuffer (med Hepes pH 8,0). Resultatet er vist i figur 4.3.3.



Figur 4.3.3 Rensing av CaMKII $\delta$ SN på Ni-NTA, ved bruk Hepes pH 8,0 buffer. I brønnene er det hhv, flowthrough 1, 2, 3, og 4 vask høysaltbuffer, lavsaltvaskebuffer og eluering 1,2 og 3

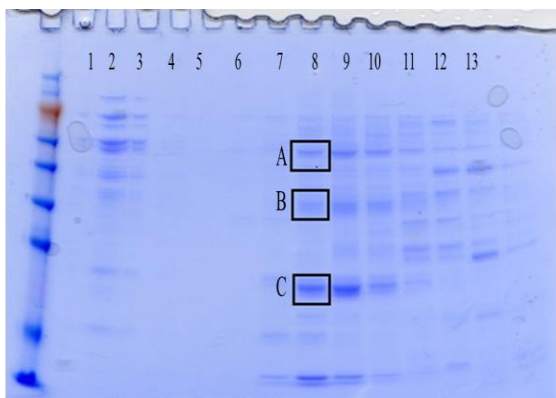
Rensing av CaMKII $\delta$ SN på Ni-NTA gir en del urenheter, og elueringsfraksjon 1 og 2 ble dialysert til HiTrapQ lavsaltbuffer pH 8,0, og videre renses på anionbytter HiTrapQ. Resultatet er vist i figur 4.3.4



Figur 4.3.4 Rensing av CaMKII $\delta$ SN på HiTrapQ. A Kromatogram fra eluering på HiTrapQ B, SDS-PAGE gel med fraksjonene fra eluering fra HiTrapQ, hvor brønnen inneholder hhv Flowthrough, vask, F10, F11, F12, F13, F14, G1. G3, G5 og G7

De samme proteinbåndene som kom ut med CaMKII $\delta$ SN som ble observert ved rensing av CaMKII $\delta$ 1/2SN ved HiTrapQ, ble sett ved rensing av CaMKII $\delta$ SN på samme kolonne. Det ble forsøkt å renses CaMKII $\delta$ SN ved ResS, men proteinene kom ut i samme fraksjon som CaMKII $\delta$ SN. Resultatet er vist i figur 4.3.5

## 4. Resultat



Figur 4.3.5 Rensing av CaMKII $\delta$ SN etter ResS rensing på FPLC. I brønnen er det hhv flowthrough, vask, C9, C11, C13, C15, D2, D4, D6, D8, D10, og D12 fraksjonene fra kromatogrammet. Boksene A, B og C indikerer båndene som ble sendt til massespektrometri.

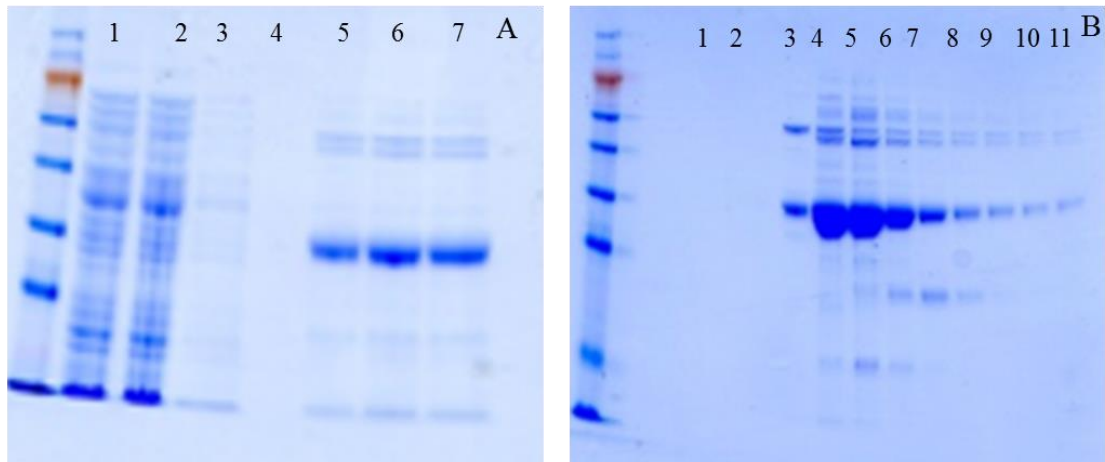
Det ble besluttet å undersøke hva de sterkeste båndene var ved massespektrometri (MS). De tre markerte båndene ble sent til MS, og resultatet viste at disse båndene mest sannsynlig også er CaMKII $\delta$ SN (se vedlegg F for detaljer).

For å øke CaMKII $\delta$ SN utbyttet ble følgende konsentrasjoner tilsatt; 0,25 mM, 0,50 mM og 1 mM IPTG per liter ved OD600 på 0,6 for å se om dette økte produksjonen av CaMKII $\delta$ SN, men dette hadde ingen effekt på mengde CaMKII $\delta$ SN produsert (vedlegg E, figur E.9)

### 4.3.3 Rensing av CaMKII $\delta$ 335

CaMKII $\delta$ 335 ble uttrykt vha IPTG i 6 -12 L LB m/sorbitol i flere runder og pelleten ble bevart for rensing. CaMKII $\delta$ 335 ble rensert på Ni-NTA fra lysat etter sentrifugering av sonikert 12 L cellepellet i sonikeringsbuffer med med Tris pH 8,0. Kolonnen ble vasket med høysalt og lavsaltbuffer som inneholdt HEPES pH 8,0, og eluert ut med 3x5 mL elueringsbuffer med Tris pH 8,0. Eluering 1 og 2 ble valgt ut, dialysert med HiTrapQ-lavsaltbuffer med Tris pH 8,0. De dialyserte fraksjonene ble rensert på HiTrapQ-kolonnen. I figur 4.3.6 er resultatet fra rensing på Ni-NTA og HiTrapQ vist.

#### 4. Resultat



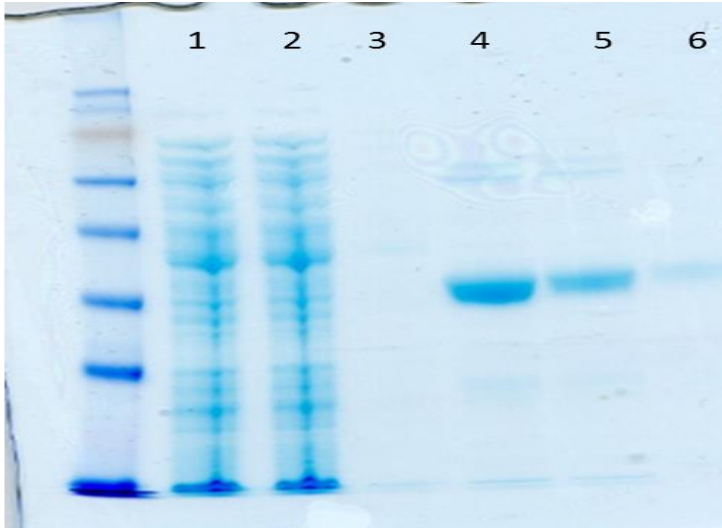
Figur 4.3.6. Rensing av CaMKII $\delta$ 335 ved Ni-NTA (pH 8,0) og HiTrapQ i lavsaltbuffer og høysaltbuffer (pH 8,0). A: Fra Ni-NTA hvor fraksjonene er hhv flowthrough 1 og 2, vask 1 og 2, Eluering 1,2 og 3. B: Fra HiTrapQ hhv fraksjon 30,31,32,33,34,35,36,37,38,39 og 40

Fraksjonen 35-37 ble oppkonsentrert til 1 mL og ble renset på Superdex 75 (Vedlegg E, figur E.10), og de reneste fraksjonene A7-A10 fra Superdex 75 ble oppkonsentrert til en konsentrasjon på 0,22 mM til videre krystalliseringsforsøk.

Det ble utført rensing på Co-CMA materialet, hvor 10 L ble sonikert i sonikeringsbuffer med Hepes pH 8,0. Kolonne-materialet ble vasket med lavsalt og høysaltbuffer med Hepes pH 8,0, og eluert ut med 15 mL elueringsbuffer med Hepes pH 8,0 i 3x 5mL fraksjoner. I elueringsfraksjonene var det lite CaMKII $\delta$ 335 (vedlegg E, figur E.11) i det første forsøket og i de neste forsøkene på Co-CMA bandt ikke CaMKII $\delta$ 335 seg til Co-CMA-kolonnematerialet.

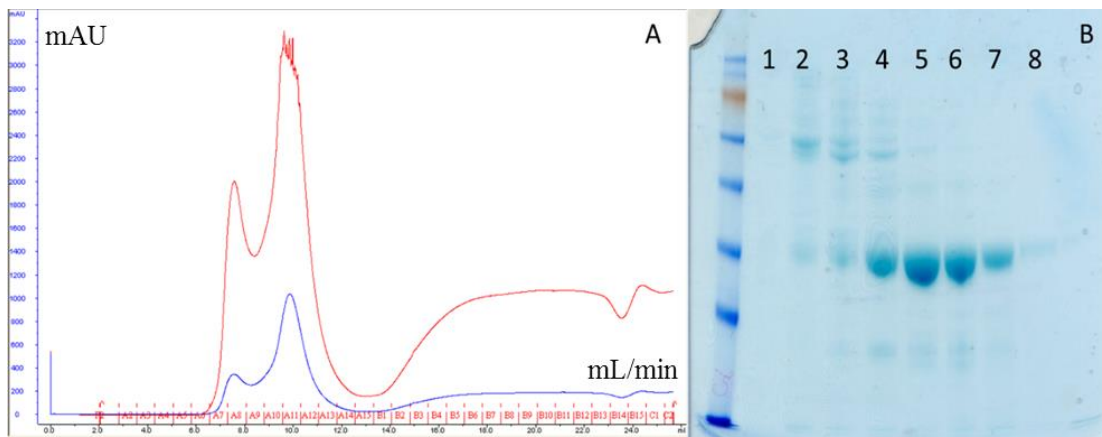
En siste metode som ble gjort for å rense CaMKII $\delta$ 335 var bruk av sonikeringsbuffer, lavsaltvaskebuffer og elueringsbuffer som inneholdt Hepes pH 7,5. Denne sammensetningen ga nesten helt rent protein og elueringene fra rensing på Ni-NTA på 3 x 5 mL kunne renses direkte videre på Superdex 75. Denne metoden ga gode repeterbare resultater, som vist i figur 4.3.7

#### 4. Resultat



Figur 4.3.7 Rensing av CaMKII $\delta$ 335 ved Ni-NTA, brønnene viser hhv, flowthrough 1, flowthrough 2, lavsaltvask og eluering 1, 2, og 3, hvor bufferene alle inneholdt Hepes pH 7,5.

Rensing ved å bruke Hepes pH 7,5 ga veldig rent protein og kunne renses videre ved Superdex 75. CaMKII $\delta$ 335 fra rensing med Hepes pH 7,5 ved vask av Ni-NTA med lavsaltvaskebufferen ble proteinet direkte rensert på Superdex 75. Protein-eluatet fra elueringsfraksjon 1 og 2 ble oppkonsentrert til 1 mL og deretter kjørt på Superdex 75. I figur 4.3.8 er kromatogrammet og fraksjonene fra Superdex 75 vist.



Figur 4.3.8 Rensing av CaMKII $\delta$ SN på Superdex 75. A Kromatogram fra eluering på Superdex 75 B, SDS gel med på FPLC, hvor brønnen inneholder hhv, fraksjon A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, A14 og A15.

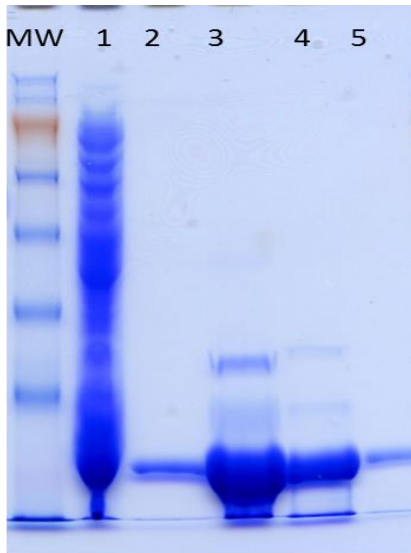
Til videre forsøk på DLS og MST, ble det tatt ut 200  $\mu$ L fra fraksjon A11, som var den reneste fraksjonen. Fraksjon A10-A13 ble slått sammen for oppkonsentrering til oppnådd konsentrasjon på 8  $\mu$ g/ $\mu$ L og krystallisering med sittende dråpe ved bruk av en krystalliseringsrobot.



## 4. Resultat

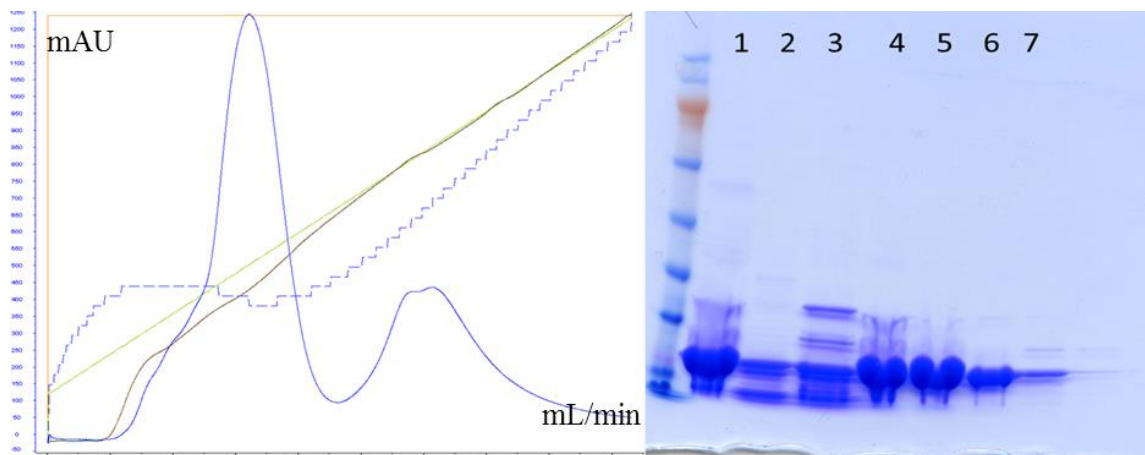
### 4.3.4 Rensing av Calmodulin

Pellet fra 6 L LB m/sorbitol med ekspresjon av CaM ble renset på Ni-NTA (beskrevet i punkt 3.3.1). Pellet fra ekspresjon i 6L ble løst opp i 90 mL sonikeringsbuffer med Tris pH 8,0. Ni-NTA materialet ble vasket med lavsaltvaskebuffer med Tris pH 8,0, og eluert med 15 mL elueringsbuffer i 3x5 mL fraksjoner. Resultatet er vist i figur 4.3.9



Figur 4.3.9 Rensing av CaM ved Ni-NTA, brønnene viser hhv, flowthrough, vask, eluering 1, 2, og 3, som alle inneholdt Tris pH 8,0.

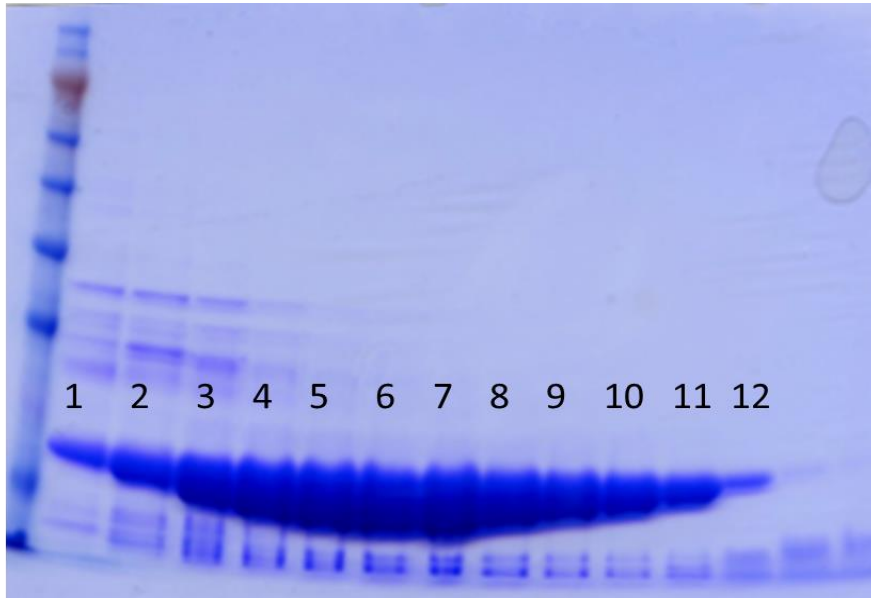
CaM ble rent, uttrykt i store mengder og bandt seg godt til Ni-NTA. Elueringsfraksjon 1-3 ble dialysert som beskrevet i punkt 3.3.5, i HiTrapQ-lavsaltbuffer med Tris pH 8,0. Videre rensing ble utført ved kationbytter HiTrapQ på FPLC, og resultatet er vist i figur 4.3.10



Figur 4.3.10 Rensing av CaM på HiTrapQ. A: Kromatogram fra eluering fra HiTrapQ B: SDS gel fra eluering fra HiTrapQ, hvor brønnen inneholder hhv, dialysert protein til HiTrapQ buffer, fraksjon 6, 8, 10, 12, 14 og 16

#### 4. Resultat

Fraksjon 9-14 ble valgt til TEV-protease kutting og dialyse (beskrevet i punkt 3.3.5 og 3.3.7), og deretter oppkonsentrert til et volum på 300  $\mu\text{L}$  og rensset på Superdex 75. I figur 4.3.11 vises SDS-PAGE-gel med rent CaM med svært høy konsentrasjon.



Figur 4.3.11 Rensing av CaM etter Superdex 75 rensing på FPLC. I brønnen er det hhv fraksjon 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34,36, 38, 40 og 42

Fraksjon 18-32 ble slått sammen og oppkonsentrert til en konsentrasjon på 25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , til videre krystallisering. CaM og CaMKII $\delta$ 335 ble brukt til krystallisering. CaM hadde en konsentrasjon på 25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (0,15 mM) og CaMKII $\delta$ 335 fra to ulike rensemetoder med en konsentrasjon på 8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (0,03mM).

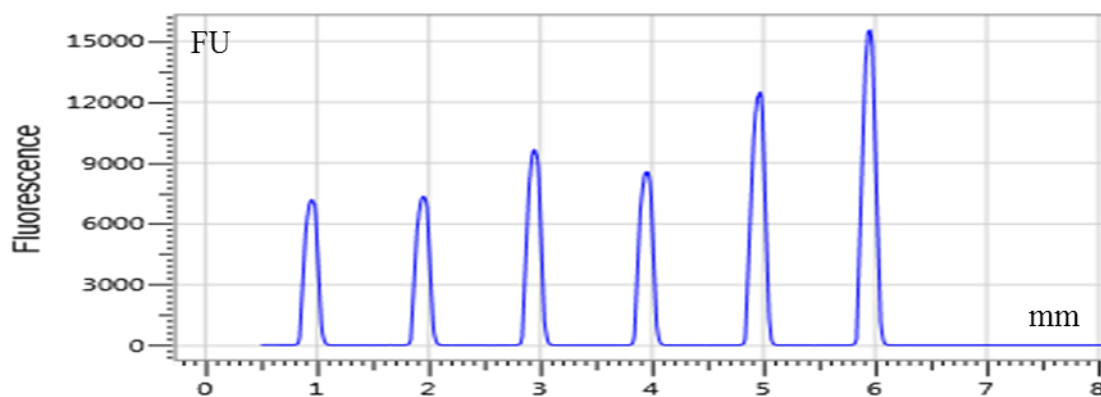
## 4. Resultat

### 4.4 Mikroskalatermoforese (MST) og dynamisk lysspredning (DLS)

Det ble utført mikroskalatermoforese for en blanding av CaMKII $\delta$  og SN-peptidet i biacorebuffer og MST-Standardbuffer som beskrevet i punkt 3.4. Det ble i tillegg sett på løselighet til CaMKII $\delta$ 335 i Superdex75-buffer, biacorebuffer og MST-Standardbuffer, for å se om proteinet aggregerer i disse løsningene.

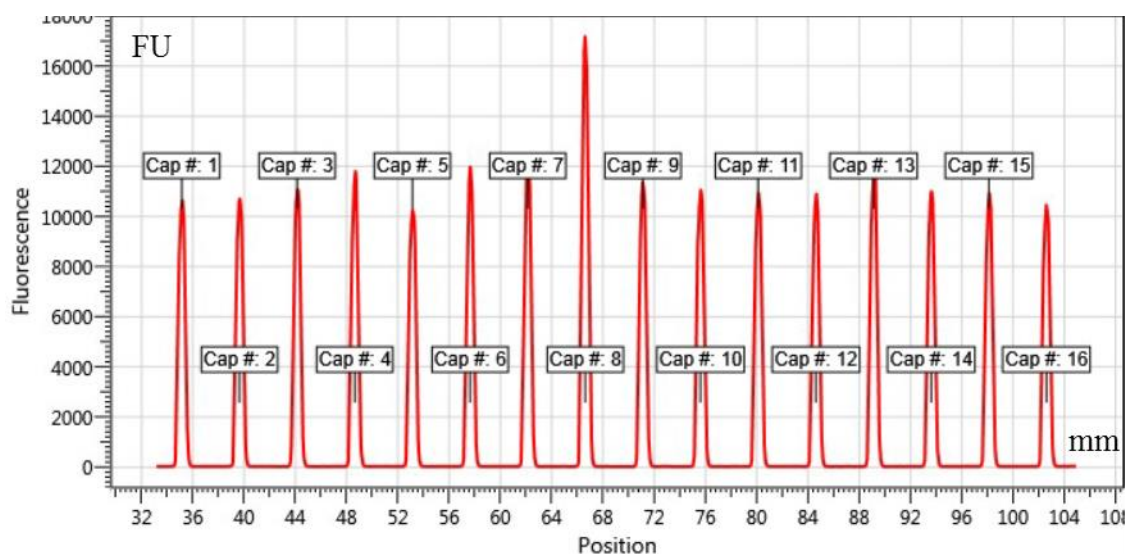
#### 4.4.1 Mikroskalatermoforese av CaMKII $\delta$ og SN-peptidet i biacorebuffer

Det ble utført pre-kapillærscan av MilliQ-filtret vann, biacorebuffer, SN-peptidet løst i biacore-bufferen og tre ulike konsentrasjoner av CaMKII $\delta$ 335. Figur 4.4.1 viser resultatet.



Figur 4.4.1. Fluoresecenstoppene til MilliQ-filtret vann, biacorebuffer, 50  $\mu$ M SN-peptid i biacorebuffer, og CaMKII $\delta$ 335 fortynnet til 0,14  $\mu$ M, 0,070, og 0,035  $\mu$ M.

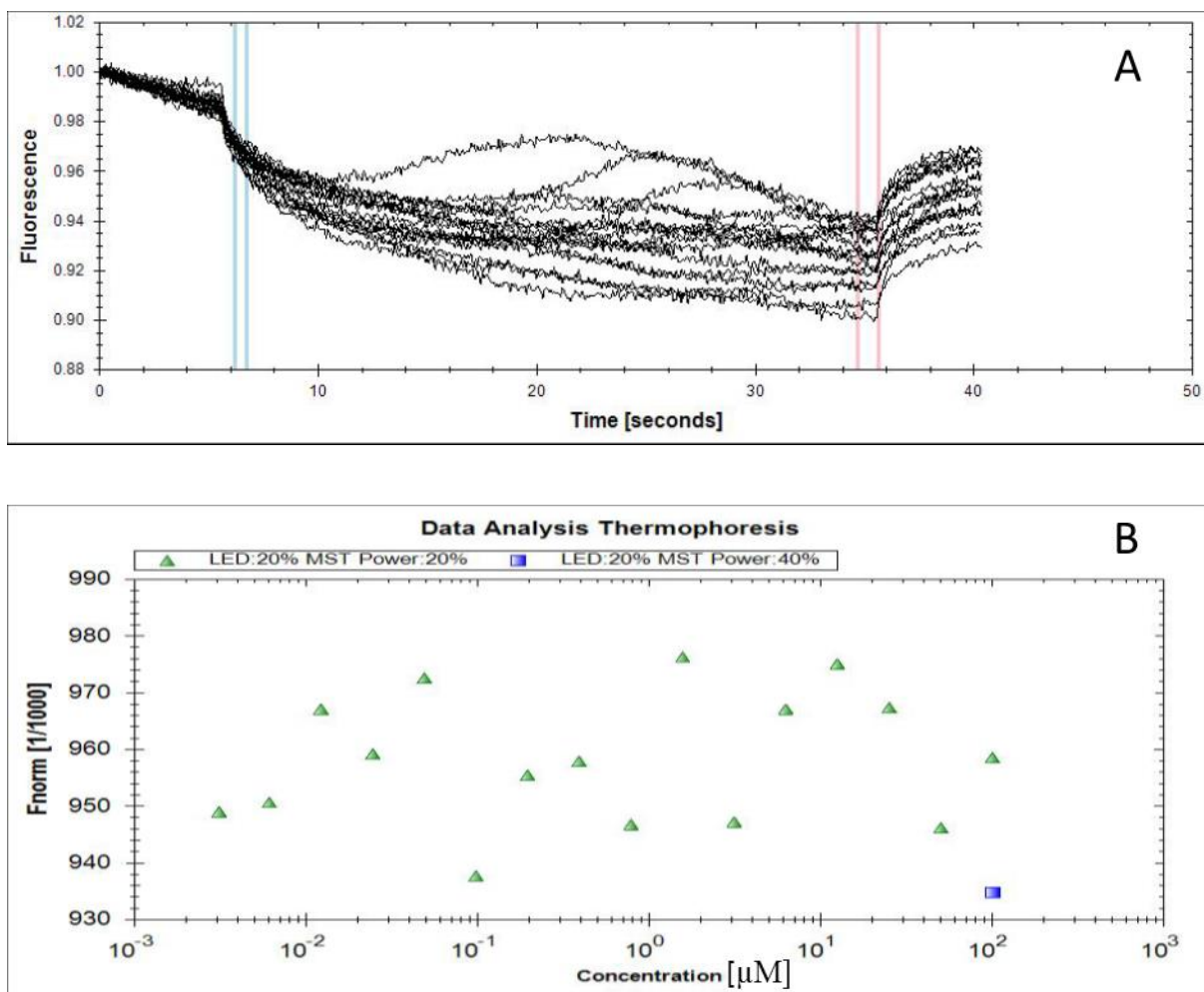
Det ble lagd en titreringsrekke som beskrevet i punkt 3.4, som ble analysert for å se om toppene hadde mindre enn 10 % forskjell i fluorescens, resultatet er vist i figur 4.4.2.



Figur 4.4.2 Kapillærscan av de 16 titreringskapillærene, med konsentrasjon av SN-peptidet fra 50  $\mu$ M- 0,76 nM fra venstre til høyre.

#### 4. Resultat

I figur 4.4.2 ser vi at de løøsningene 5 og 8 er utenfor de 10 %, mens de andre er innenfor, som er kravet for MST-analysen. Det ble kjørt termoforese av alle blandingene for å se om det var binding mellom CaMKII $\delta$ 335 og SN-peptidet. Konsentrasjonene av SN-peptidet gikk fra 0,1 mM-  $1,5 \times 10^{-6}$  mM, med halvering av konsentrasjonen for hvert kapillær, og konsentrasjonen for CaMKII $\delta$ 335 var 0,14  $\mu$ M i alle prøvene. Resultatet er vist i figur 4.4.3.



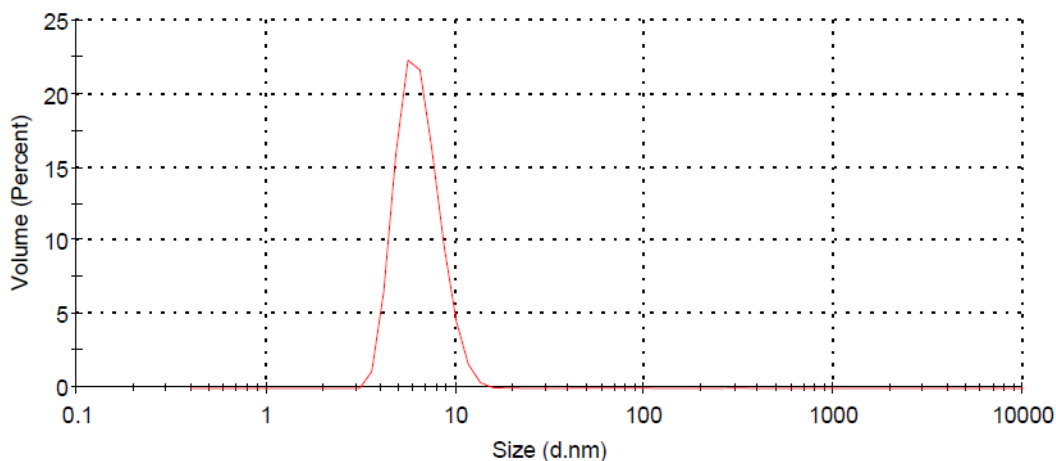
Figur 4.4.3. Termoforese av CaMKII $\delta$ 335 og SN-peptidet i MST-biacore buffer. A: Fluorescens forandret over tid B: Fluorescens i forhold til konsentrasjon.

Det ble observert en uregelmessig termoforesekurve for flere av prøvene. Dette er et typisk tegn på aggregering eller adhesjon av protein på kapillæroverflaten. Det ble derfor kjørt analyse av proteinet ved hjelp av DLS for å se på eventuell aggregering.

## 4. Resultat

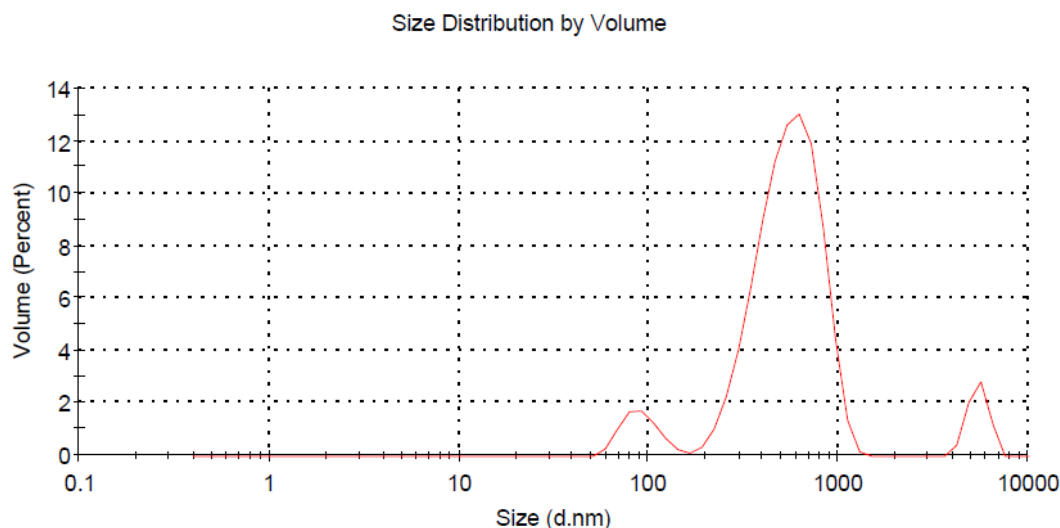
### 4.4.2 Dynamisk lysspredning (DLS) av CaMKII $\delta$ 335 i ulike buffere

Det ble utført DLS-analyse av CaMKII $\delta$ 335 etter rensing på Superdex 75 i elueringsbufferen med HEPES pH 7,5. Hensikten var å undersøke kvaliteten av CaMKII $\delta$ 335 brukt til krystalliseringsforsøk. Resultatet er vist i figur 4.4.4



Figur 4.4.4 DLS analyse av CaMKII $\delta$ 335 i Superdex75-buffere.

CaMKII $\delta$ 335 viser ingen tegn til aggregering i Superdex75-buffere. Videre ble CaMKII $\delta$ 335 løst i biacorebuffer, fortynnet til en konsentrasjon på 0,14  $\mu$ g/mL, undersøkt på DLS for å se hvordan proteinet oppfører seg i denne buffere. Resultatet er vist i figur 4.4.5

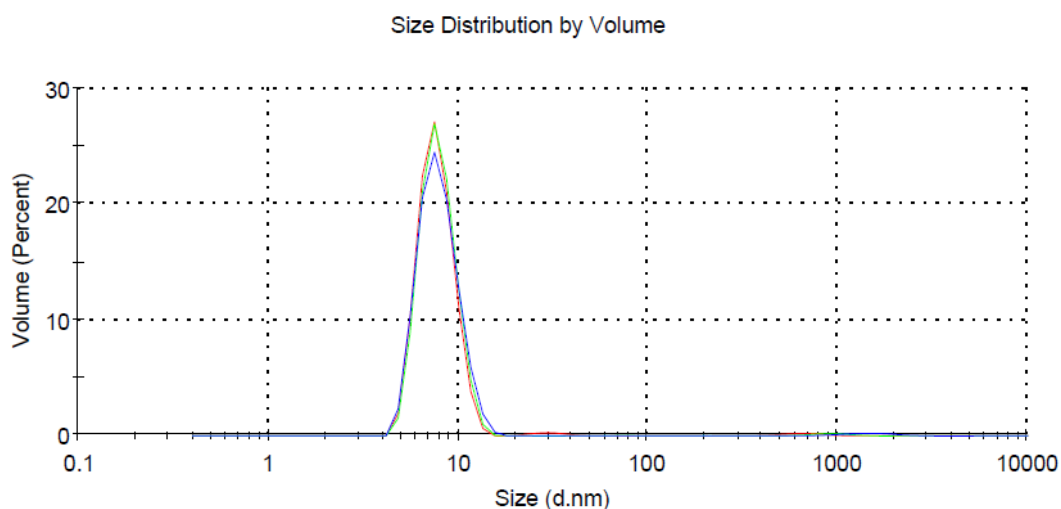


Figur 4.4.5. CaMKII $\delta$ 335 biacorebuffer. Toppene er på 6,5%, 97 % og 86,5 %, når man ser på stigende partikkelstørrelse i området 100-10 000 nanometer.

#### 4. Resultat

I figur 4.4.5 viser det seg å være flere store partikler i løsningen. Det var ingen topp ved 10 nanometer som er rundt den forventet til CaMKII $\delta$ 335, noe som tyder på at CaMKII $\delta$ 335 aggregerer i biacorebufferen.

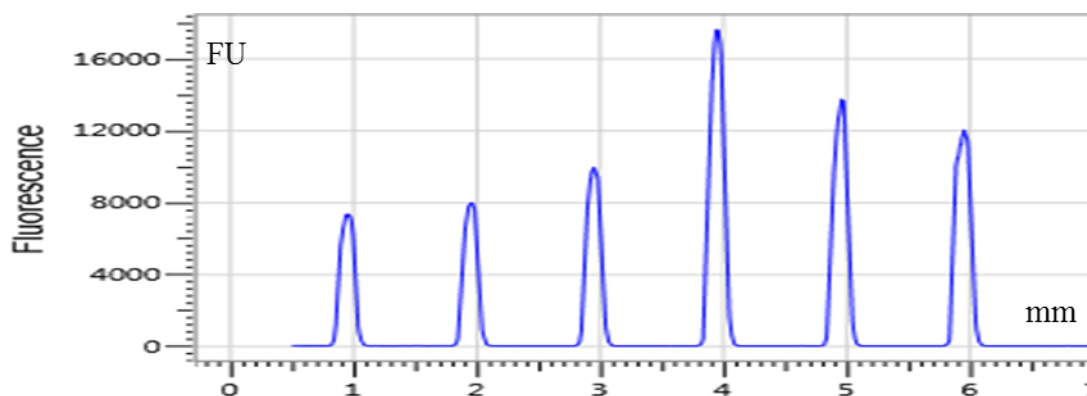
Det ble deretter kjørt en DLS-analyse av CaMKII $\delta$ 335 i MST-Standardbuffer. Resultatet er vist i figur 4.4.6, og viser at kinasen ikke aggregerer i MST-bufferen.



Figur 4.4.6. CaMKII $\delta$ 335 i MST standard buffer, viser en topp ved 10 nanometer som er forventet størrelse av CaMKII $\delta$ 335.

#### 4.4.3 Mikroskala termoforese i MST-Standard buffer

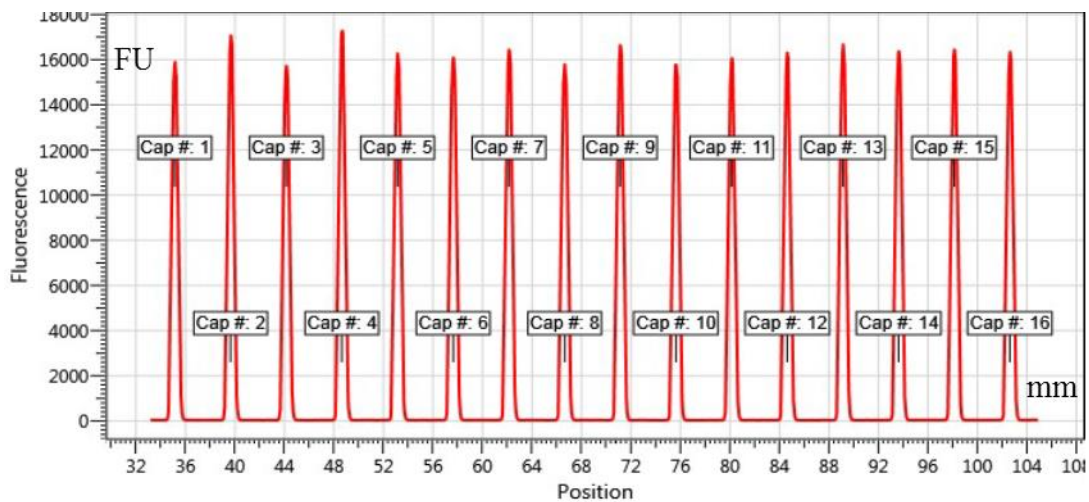
SN-peptidet og CaMKII $\delta$ 335 ble fortynnet til hhv 0,025  $\mu$ M og 0,012  $\mu$ M i MST-Standardbuffer. Det ble kjørt en kapillærscan av MilliQ-filtrert vann, MST-Standardbufferen, 25  $\mu$ M SN-peptid, CaMKII $\delta$ 335 i konsentrasjonene 1,2  $\mu$ M, 0,06  $\mu$ M og 0,03  $\mu$ M. Resultatet er vist i figur 4.4.7



Figur 4.4.7. Kapillærscan av kapillærer med MilliQ-filtrert vann, MST-Standardbuffer, 25  $\mu$ M SN-peptid og CaMKII $\delta$ 335 i konsentrasjonene 1,2  $\mu$ M, 0,06  $\mu$ M og 0,03  $\mu$ M CaMKII $\delta$ 335 fortynnet i MST-Standardbuffer.

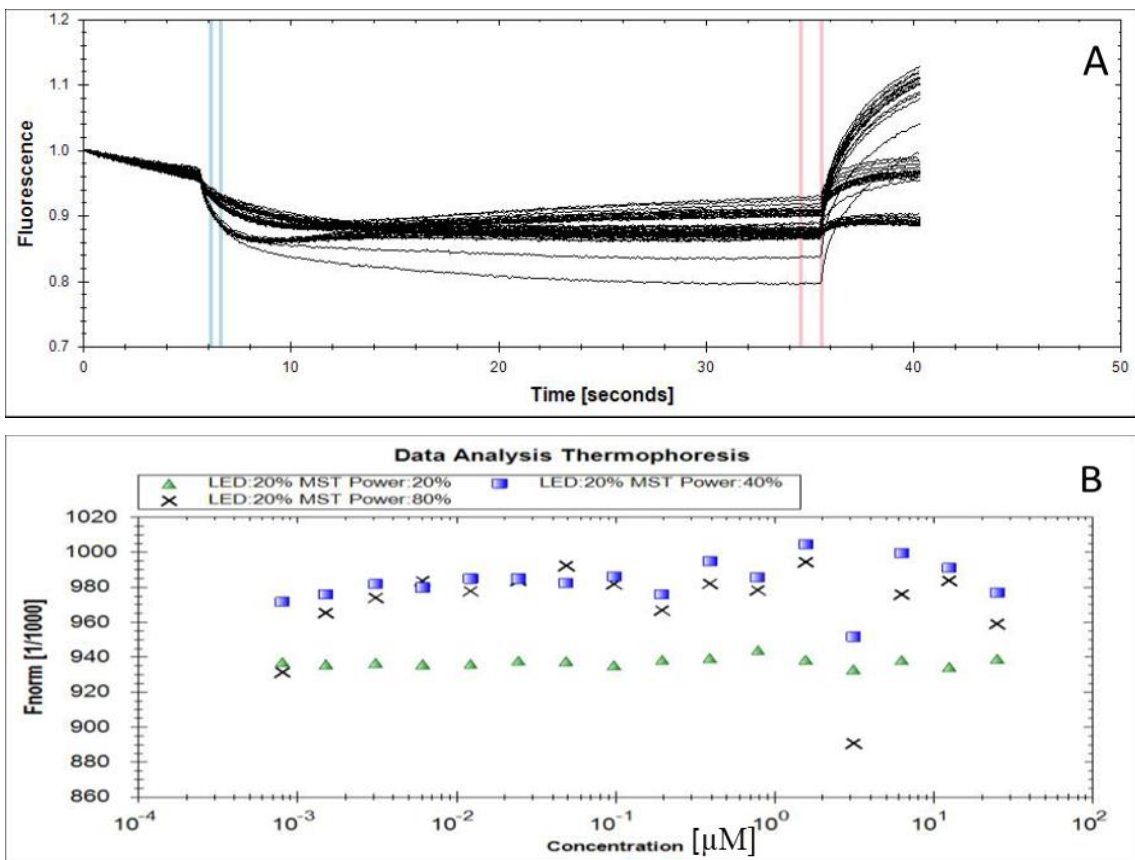
#### 4. Resultat

Det ble lagd en titreringsrekke som beskrevet i punkt 3.4, med SN-peptid verdier fra  $0,025 \mu\text{M}$ - $3,8 \times 10^{-7} \mu\text{M}$  som ble analysert for å se om toppene hadde mindre enn 10 % forskjell i fluorescens, resultatet er vist i figur 4.4.8.



Figur 4.4.8 Kapillærscan av de 16 titreringskapillærene med  $1,2 \mu\text{M}$  CaMKII $\delta$ 335 i MST-Standardbuffer og SN-peptid med konsentrasjon  $25 \mu\text{M}$  til  $0,36 \text{ nmol/L}$ .

Alle toppene var innenfor 10 % forskjell og i figur 4.4.9 er termoforese resultatene vist.



Figur 4.4.9 Termoforese av CaMKII $\delta$ 335 og SN-peptidet i MST-Standardbuffer.

A: Fluorescens forandret over tid B: Fluorescens i forhold til konsentrasjon.

I figur 4.4.9 ser vi ingen stigningskurve og  $K_d$  kunne ikke bestemmes.

## 4. Resultat

### 4.5 Krystallisering

Det ble lagd to blandinger av CaMKII $\delta$ 335 og SN peptidet, som ble krystallisert ved å bruke roboten og følgende screen, som beskrevet i punkt 3.6. Det ble observert få krystaller, og ingen av disse er undersøkt annet enn visuelt. Det ble observert svært få krystaller, og i tabell 4.2 er de betingelse som ga interessante resultatet for videre optimalisering for røntgenkrystallografi vist.

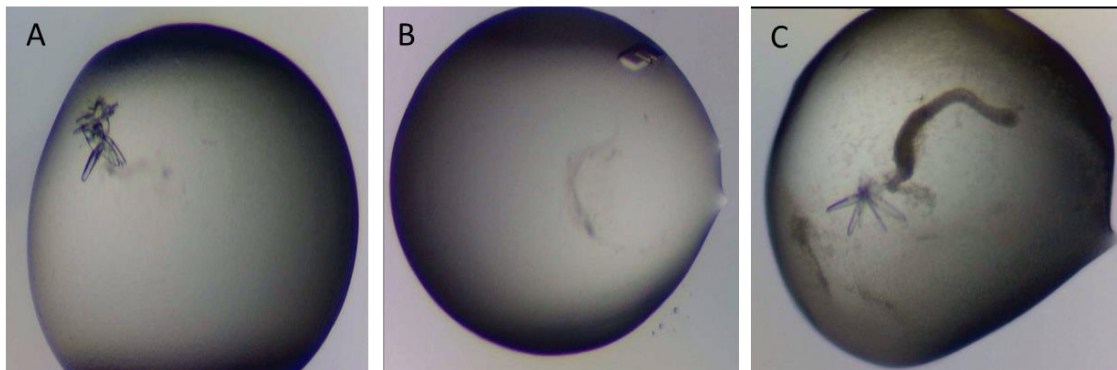
Tabell 4.2. Dråper som ble undersøkt som hadde interessante krystaller for videre optimalisering for røntgen krystallisering			
Protein kompleks	krystall form	Krystallscreen	Betingelse
CaMKII $\delta$ , med CaM og SN-peptid	små krystaller	MIDAS	A12
	små krystaller	Index	A1
	platekrystaller	Index	B5
	krystall	Index	B6
	krystaller	Index	G5
	Krystaller	Index	F8
	krystaller	Index	F9
	nålkrytaller	Wizard 1+2	H2
	platekrystaller	JCSG	H7
	krystall	Natrix 1+2	H7
CaMKII $\delta$ med SN-peptid	små krystaller	MIDAS	A12
	spherolitter	MIDAS	A3
	små krystaller	MIDAS	G5
	krystaller	Index	F8
	krystaller	Index	F9
	store platekrystaller	MIDAS	H8
	platekrystaller	JCSG	H7

MIDAS betingelse A12 ga krystaller for både CaMKII $\delta$ 335 blandet med SN-peptidet med og uten CaM tilstede. Disse krystallene ble undersøkt og var harde saltkrystaller. I A12 betingelsen er det K/Na fosfatbuffer og krystallene er mest sannsynlig saltet CaPO<sub>4</sub>. Det ble dannet krystaller for CaMKII $\delta$ 335 med SN-peptid med og uten CaM i følgende betingelser G5, F8 og F9 fra Index, og H7 fra JCSG. Disse betingelsene hadde alle salter i seg, men kan være proteinkrystaller. Dette må undersøkes ved å teste krystallene enten ved farging eller differaksjon i røntgenstråling.



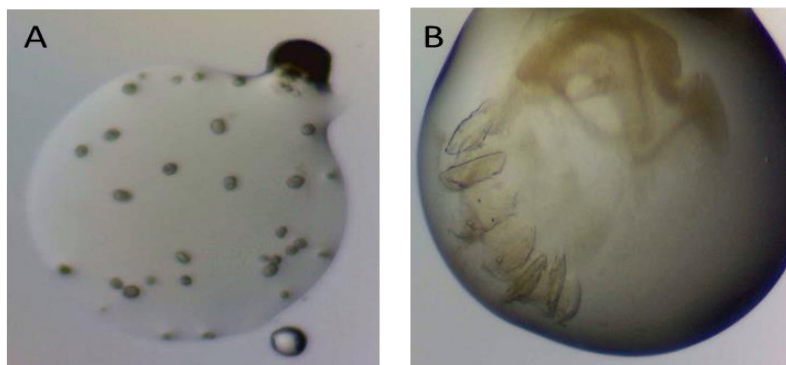
#### 4. Resultat

Det var noen betingelser som kun ga krystall for en av blandingene. For CaMKII $\delta$ , CaM, og SN-peptid blandingen var det B5 og B6 fra Index Screen, og H2 fra Wizard 1+2 som ga de beste krystallene og i figuren 4.5.1, er resultatet vist.



Figur 4.5.1 Krystaller i betingelser hvor proteinkomplekset CaMKII $\delta$ , CaM, og SN-peptid er tilsatt A. Platekrystaller i betingelse B5 fra Index screen B. Krystall fra betingelse B6 fra Index screen C. Platekrystaller fra betingelsen H2 Wizard 1+2

For krystallisering av CaMKII $\delta$ , SN-peptid og CaM bør disse betingelsene videre optimaliseres og krystallenes røntgenkrystallograferes. For CaMKII $\delta$  og SN-peptid var det spherulitter som blir dannet når man er nær krystallinsk betingelse i betingelsen A3 i Index, i tillegg ble det sett store plateformede krystaller i H8 fra Wizard 1+2. I figur 4.5.2, er dette resultatet vist.



Figur 4.5.2 Spherulitt og platekrystaller i betingelser blandet med CaMKII $\delta$  og SN-peptid. A. Spherulitter i betingelse A3 Index B. plate krystaller i betingelse H8 Wizard 1+2

CaMKII $\delta$  og SN-peptidet bør videre optimaliseres for betingelsene i H8 fra Wizard-kitet, og undersøkes ved røntgenkrystallografi.

Ingen krystaller er ennå testet for differaksjon, og grunnet liten tid er det ennå ikke utført optimalisering av betingelsene.

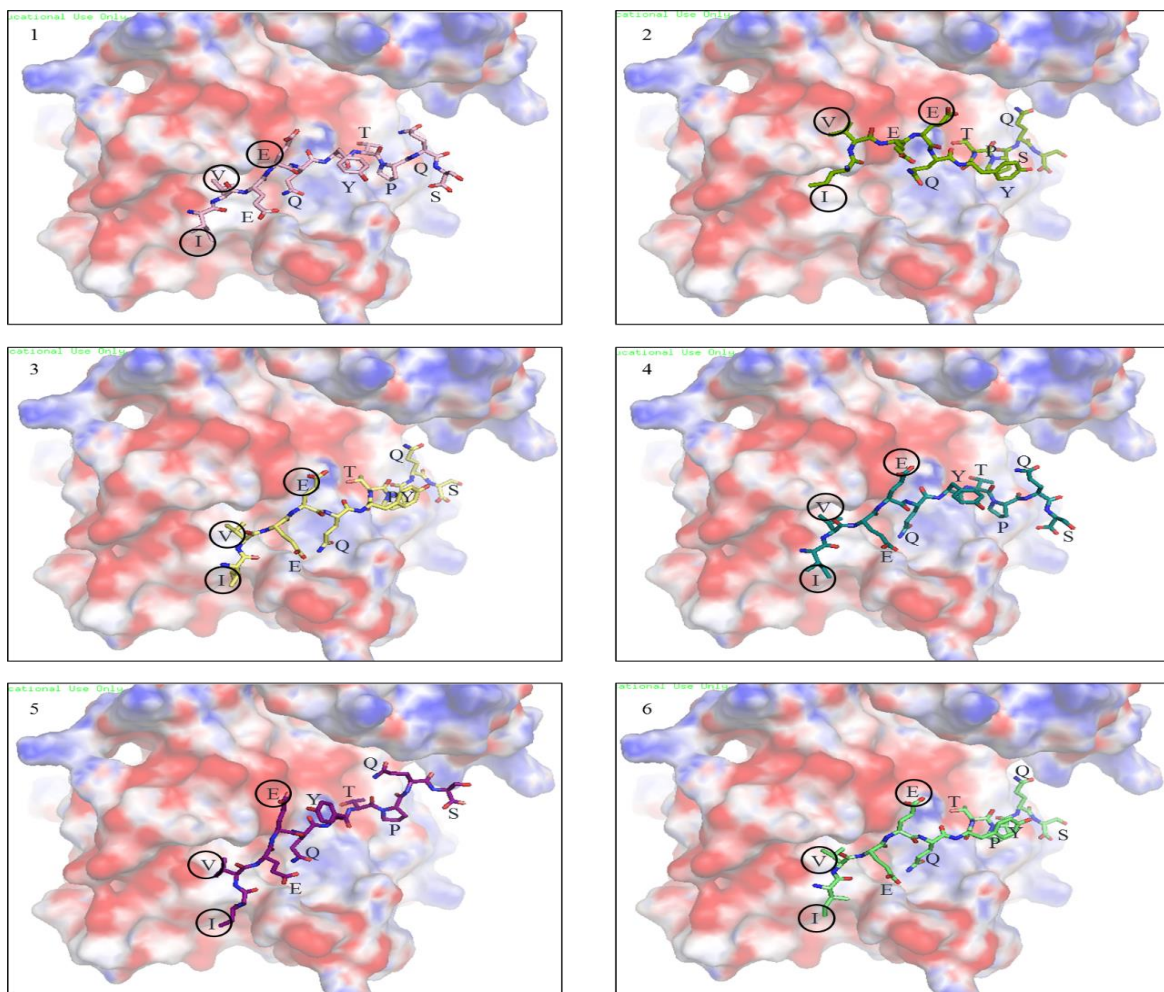
## 4. Resultat

### 4.6 Homologimodellering og peptiddocking

Det ble først lagd en sekvenssammenstilling av SN manuelt, i bindingsområdet. Resultatet er vist i tabell 4.3.

Tabell 4.3 Sekvenssammenstilling av det autoregulatoriske setet og SN-peptidet									
CaMKII $\delta$ (281-289)	M	M	H	R	Q	E	T	V	D
SN-peptidet	I	V	E	E	Q	Y	T	P	Q

Det ble lagd homologimodell av SN-peptidet bundet til CaMKII $\delta$  som beskrevet punkt 3.7, og de 6 beste peptiddockingmodellene ble valgt ut til videre bearbeiding ved APBS for å se på polariteten i bindingsområde. Resultatet er vist i figur 4.6.1.



Figur 4.6.1 Topp 6 peptid-docking modeller av SN-peptidet bundet til CaMKII $\delta$ , hvor aminosyrene i SN-peptidet er markert.

Vi ser at i alle modellene med unntak av to er isoleucin bundet til et hydrofobt område under den hydrofobe lommen hvor valin binder, og at glutamat 2 i rekken er, noe overraskende, lokalisert til et sterkt negativt ladet område. I modell 2, 3, 5 og 6 er den konserverte treoninen, som antas å tilsvare fosforyleringsetet T287 i CaMKII $\delta$ , bundet til det samme området, som har negativ ladning. Det ble oppgitt RMS-bb verdier for alle modellene, som beskriver strukturforandringer mellom homologimodellen og peptid-docking modellen.

## 5. Diskusjon og konklusjon

Hovedfokuset i denne oppgaven var å finne proteinstrukturen for SN-peptidet bundet til CaMKII $\delta$ . I CaMKII $\delta$  vil det C-terminale autoregulatoriske domenet ved aminosyre 281-291 forhindre binding av SN-peptidet om ikke CaM er tilstede. Strukturen til CaMKII $\delta$  før binding av CaM er svært ulik strukturen etter binding av CaM.

I CaMKII $\delta$  før binding av CaM vil det autoregulatoriske domenet være lokalisert i kjernestrukturen, mens det etter binding til CaM vil være strukket ut, og bundet til bindingsetet (Rellos, Pike et al. 2010).

Høyt nivå av CaMKII $\delta$  kan påvirke hjertet negativt ved å gi hjertefeil og kardiohypertrofi. SN-peptidet har vist seg ved tidligere forsøk vist seg å være en god inhibitor av CaMKII $\delta$  (Ottesen, Carlson et al. 2015) .I denne oppgaven ble det brukt ulike strategier for å finne en struktur av komplekset mellom CaMKII $\delta$  med SN-peptidet. Den ene strategien var å lage ulike mutanter av CaMKII $\delta$  og den andre var å lage en homologimodellering av CaMKII $\delta$  bundet til SN-peptidet.

Det ble lagd en flere ulike mutanter av CaMKII $\delta$ , to mutanter som terminerte før det autoregulatoriske setet ved hhv aminosyre 264 og 275 (CaMKII $\delta$ 264 og CaMKII $\delta$ 275), en mutant med stopkodon etter det autoregulatoriske setet ved aminosyre 291 (CaMKII $\delta$ 291), og to mutanter hvor hhv halve og hele SN-peptidet er mutert inn i det autoregulatoriske setet (CaMKII $\delta$ 1/2SN og CaMKII $\delta$ SN).

I mutantene som ble laget uten det autoregulatoriske domenet ble aminosyresekvensen terminert ved 264 og 275. CaMKII $\delta$  mutantene CaMKII $\delta$ 264 og CaMKII $\delta$ 275 er mutanter uten det autoregulatoriske domenet som starter ved aminosyre 281. Ingen av disse mutantene ble uttrykt. På generell basis er det flere årsaker til at proteiner ikke blir uttrykt f.eks at proteinet er toksisk, hemmer vekst av cellene eller at mutagenesen påvirker transkripsjonen pga strukturforandringer eller stabilitet av mRNA.

Det ble lagd to mutanter hvor aminosyresekvensen terminerte ved 280 (CaMKII $\delta$ 280), rett før det autoregulatoriske domenet. Disse mutantene hadde en NusA-løselighetstag med kort og lang aminosyrelinker mellom NusA og CaMKII $\delta$ 280 (NusA-CaMKII $\delta$ 280 og NusA-extended-CaMKII $\delta$ 280), for å se om dette kunne øke løseligheten til CaMKII $\delta$ 280 mutantene. Det var ingen ekspresjon av NusA-CaMKII $\delta$ 280 med kort

## 5. Diskusjon og konklusjon

linker, men mutanten med lang linker var uttrykt. Den forlengede aminosyresekvensen bidro dermed til uttrykking av NusA-extended-CaMKII $\delta$ 280, og dette kan skyldes at denne varianten er mindre cytotoxisk enn NusA-CaMKII $\delta$ 280, eller at konformasjonen med forlenget aminosyresekvens ikke hemmer celleveksten i like stor grad. NusA-extended-CaMKII $\delta$ 280 var ikke løselig etter fjerning av NusA fusjonspartneren, noe som tyder på at kinasen må ha det autoregulatoriske domenet tilstedet for å være løselig.

Det ble lagd en mutant med stop-kodon etter det autoregulatoriske domenet, men før CaM-bindingsdomenet. Ut fra strukturen til CaMKII $\delta$  uten CaM (Rellos, Pike et al. 2010) bør denne mutanten også tillate binding av SN-peptidet i det autoregulatoriske setet. Denne mutanten var godt uttrykt og bandt seg til Ni-NTA, men det ble dessverre ikke optimalisert ekspresjon for denne mutanten pga begrenset tid. Til tross for at denne mutanten har stop-kodon etter det autoregulatoriske domenet er det fortsatt mulig at SN-peptidet kan binde seg. Dette er mulig ved at det autoregulatoriske domenet binder seg til det autoregulatoriske setet først etter at CaM har bundet seg til CaMKII $\delta$ . Det autoregulatoriske domenet vil ikke være bundet til bindingsområdet før denne aktiveringen har funnet sted og dermed vil ikke SN-peptid bindingen være forhindret av dette. På en annen side, vil CaMKII $\delta$  gjennomgå store konformasjonsforandringer etter binding til CaM, som muligens ikke skjer på samme måte kun ved binding til SN-peptidet.

Når CaMKII $\delta$  har blitt bundet til CaM, er treonin 287 tilgjengelig for fosforylering, og ved fosforylering av treonin 287 aktiveres CaMKII $\delta$  (Elgersma, Sweatt et al. 2004). Det ble derfor lagd en mutant (CaMKII $\delta$ T287D) hvor treonin var omgjort til aspartat. Ved å omgjøre treonin til aspartat mimikerer man fosforylering, og denne mutanten vil da være relativt lik den fosforylerte og aktiverte CaMKII $\delta$ . CaMKII $\delta$ T287D uttryktes godt, men på samme måte som NusA-extended-CaMKII $\delta$ 280 var proteinet ikke løselig. Dette tyder på at forandringer på treonin 287 fører til forandringer i konformasjonen til CaMKII $\delta$  som er såpass store at det forandrer løseligheten til proteinet. Det er allment kjent at for noen proteiner kan kun en liten mutasjon føre til ustabilitet og uløselighet for proteinet, som viser hvor essensiell treonin 287 er for CaMKII $\delta$ .

Ingen av de overnevnte mutantene som var ment til ko-krystallisering med SN-peptidet lot seg uttrykke og rense i store nok mengder for krystallisering. Planen var å screene for krystalliseringsbetingelser for en 1:1 molar blanding av CaMKII $\delta$  og SN-peptidet.

## 5. Diskusjon og konklusjon

Strukturen for CaMKII $\delta$ 335 bundet til CaM viser CaMKII $\delta$  det autoregulatoriske domenet bundet i det autoregulatoriske sete (Rellos, Pike et al. 2010). Det er antatt at SN-peptidet binder seg på lik måte som det autoregulatoriske domenet til det autoregulatoriske setet. Det ble derfor designet en mutant med SN-peptidet satt inn i det autoregulatoriske domenet, ved at treonin 287 ble sammenstillt med treonin i SN-peptidet. Grunnen til at treonin sin plassering ble bevart i modellen er at treonin 287 er vist å være viktig for aktiviteten til CaMKII $\delta$  (Elgersma, Sweatt et al. 2004, Ottesen, Carlson et al. 2015).

SN-peptidet har tidligere blitt sammenstilt ved bioinformatiske analyser med det autoregulatoriske domenet, for å finne bindingsområdet. I denne sammenstillingen er ikke plasseringen av treonin konservert (Ottesen, Carlson et al. 2015), men ettersom de biokjemiske egenskapene til treonin er viktige for CaMKII $\delta$  er det mer naturlig å holde treonin 287s plassering konservert, som vist i tabell 4.3. Sammenstillingen ble brukt for å lage mutanten CaMKII $\delta$ SN, som ble laget ved å først lage en mellom-variant med halve SN-peptidet i sekvensen. Hypotesen er at CaMKII $\delta$ SN vil være lettere å krystallisere ettersom det ikke er nødvendig å tilsette SN-peptid, og det autoregulatoriske domenet ikke må fjernes for å gjøre bindingsetet tilgjengelig for CaMKII $\delta$ , og krystalliseringsbetingelsene bør være tilnærmet lik de for komplekset mellom CaMKII $\delta$ 335 og CaM.

Både CaMKII $\delta$ SN og CaMKII $\delta$ 1/2SN fragmenterte og aggregerte ved bruk av buffere med pH på 8,0 og 6,0. Aggregerings- og fragmenteringsbåndene på SDS-PAGE gelen ble undersøkt etter rensing på ResS av CaMKII $\delta$ SN, og ble bekreftet å være proteinet selv. I krystalliseringsforsøk må proteinet være rent og i høy konsentrasjon. Derfor ble ekspresjonen av CaMKII $\delta$ SN og CaMKII $\delta$ 1/2SN forsøkt økt ved å øke IPTG konsentrasjonen, men dette ga ingen effekt. Ekspresjon av CaMKII $\delta$ SN med NusA-løselighetstag, ga veldig god ekspresjon og løselig protein. Men ved fjerning av NusA-løselighetstag vha TEV-protease ved både pH 6,0 og pH 8,0 felte proteinet ut.

CaMKII $\delta$ 335 hadde de samme båndene ved rensing med buffere utenfor nøytralt pH område. Det ble forsøkt å få CaMKII $\delta$  renere ved bruk av Co-CMA med buffere med pH 8,0 og vask av kolonnen med lavsalt og høysaltbuffere pH 8,0, som skal forhindre uspesifikk binding, men dette ga veldig lite eller ikke noe protein. Høysalttrinnet gjorde sterk slitasje på agarose-materialene Co-CMA og Ni-NTA, og det var dermed fortrukket å bruke Ni-NTA materialet i rensing ettersom dette materialet kunne regenereres.

## 5. Diskusjon og konklusjon

Ni-NTA rensing med buffere med pH 7,5 og kun vask av kolonnen med lavsaltvask ble utført. Å bytte til buffer med pH 7,5 skulle i teorien gi svakere binding til Ni-NTA pga at ladningen på histidinegruppene kan være noe svakere, i tillegg til at det å fjerne høysalttrippet skal føre til at endel uspesifikk binding til Ni-NTA blir fjernet, og gi mer urent protein. Denne metoden ble allikevel forsøkt og viste seg i motsetning til teorien å gi et høyere utbytte og renere CaMKII $\delta$ 335. Båndene som var ved tidligere rensing av CaMKII $\delta$ 335, som også ble observert i CaMKII $\delta$ SN og CaMKII $\delta$ 1/2SN, ble borte hos CaMKII $\delta$ 335 ved å kun bruke Ni-NTA rensing ved pH 7,5 og Superdexbufferen som hadde en pH på 7,5. Denne metoden ble derfor benyttet til å rense CaMKII $\delta$ 335 til krystallisering og MST-analyse. Denne rensemetoden ble ikke benyttet for CaMKII $\delta$ SN og CaMKII $\delta$ 1/2SN, ettersom denne ble etablert sent i prosjektet fordi den ifølge teorien ikke skulle gi et forbedret resultat.

Det ble utført bindingsanalyse ved hjelp av mikroskala termoforese for å undersøke om CaMKII $\delta$ 335 kunne binde SN-peptidet uten aktivering av CaM tilstede. Mikroskala termoforese bindingsanalysen ble først utført i biacorebufferen med pH 5,0. Biacore bufferen var den samme som ble brukt til overflate plasmon resonanse analyse (SPR-analyse) som ga en dissosiasjonskonstant ( $K_d$ ) på  $8 \pm 3 \times 10^{-8}$  M (Ottesen, Carlson et al. 2015).

Resultatet fra mikroskala termoforese viste ingen binding mellom SN-peptid og CaMKII $\delta$ 335. Resultatet viste svært jevne termoforese grafer, som trolig skyldtes aggregeringen og resultatet viste at det var ingen påviselig binding i konsentrasjon rundt  $1 \times 10^{-7}$  M, som var forventet når dissosiasjonskonstanten til SN bundet til CaMKII $\delta$  var på  $8 \pm 3 \times 10^{-8}$  M.

Dynamisk lysspredningsanalyse av CaMKII $\delta$ 335 i biacorebuffer med pH 5,0 viste aggregering av CaMKII $\delta$ 335. Dette bekrefter at pH-avhengig aggregering kan skje for CaMKII $\delta$ 335. Det ble tatt en kontroll av CaMKII $\delta$ 335 etter Superdex 75, som viste ingen aggregering av CaMKII $\delta$ 335. Dette kan tyde på at CaMKII $\delta$ 335 sin aggregering er pH-avhengig og impliserer at dersom CaMKII $\delta$ SN blir renses i en nøytral pH kan dette føre til at CaMKII $\delta$ SN i mindre grad vil aggregere og fragmentere.

## 5. Diskusjon og konklusjon

Det ble i tillegg forsøkt MST-analyse med MST-standardbufferen med pH på 7,4, hvor det ved DLS ble avdekket at CaMKII $\delta$ 335 ikke aggregerte i denne løsningen. Dette ga jevne termoforesekurver, men viste fremdeles ingen binding i konsentrasjonsområdet  $1 \times 10^{-1} \mu\text{M}$ .

Noen av grunnene til at det ikke var påviselig binding ved MST-analyse mens SPR-analyse viser binding var at det ble det brukt en mutant av CaMKII $\delta$  med aminosyresekvens fra 69-282 til SPR-analysen. Siden det autoregulatoriske domenet begynner på aminosyre 281 vil det si at denne varianten ikke inneholder det autoregulatoriske domenet. Dermed er bindingsete tilgjengelig for binding av SN-peptidet. CaMKII $\delta$ 335, som ble analysert i denne oppgaven og som ble brukt til kokrystallisering, derimot inneholder hele det autoregulatoriske domenet som ligger i kjernestruktureringen (Rellos, Pike et al. 2010). Ettersom CaMKII $\delta$ 335 ikke har blitt aktivert ved CaM, og det skjer strukturelle forandringer ved binding for det autoregulatoriske domenet, er trolig årsaken til ingen binding forskjeller mellom proteinstrukturen til CaMKII $\delta$ 335 og CaMKII $\delta$  med aminosyrene 69-282. Det skal legges til at formen CaMKII $\delta$  69-282 er fremstilt kommersielt i kun små mengder og derfor ikke tilgjengelig for krystallisering. I tillegg har forsøkene gjort ved SPR-analyse vist at Ca<sup>2+</sup> må være tilstede i bufferen for at binding skal skje (Ottesen, Louch et al. 2015). Ettersom MST-Standardbufferen ikke inneholder Ca<sup>2+</sup>, kan også dette vært en årsak til at det ikke ble observert noe binding.

Det ble utført krystallscreening på over 800 betingelser for proteinkompleks med CaMKII $\delta$ , CaM og SN-peptid i tillegg til proteinkompleks med CaMKII $\delta$  og SN-peptid. Det ble funnet tre interessante betingelser for videre screening for CaMKII $\delta$ , CaM og SN-peptid og to betingelser for CaMKII $\delta$  og SN-peptid.

Det ble utført en homologi modellering, med energi minimisering i FlexPepDock. Det ble valgt ut 6 peptiddockings modeller fra ca. 200 dockinger gjort i programmet. Homologimodellen ble først lagd i PyMol ved å byttet ut sidekjedene med samme strategi benyttet for å lage CaMKII $\delta$ SN, hvor treonin 287 ble sammenstilt med treonin i SN-peptidet. I 5 av 6 peptiddockingsmodeller er isoleusin og valin bundet til en hydrofobisk lomme, glutamin nr to i sekvensen bundet til et sterkt negativt område, og den konserverte treonin bundet til et negativt ladet polart område.



## 5. Diskusjon og konklusjon

Peptiddocking er basert på energiminimerisering, men det kan være konformasjonsendringer i kinasen som skjer som følge av binding som ikke denne minimerisering tar hensyn til. Siden det i dag ikke finnes en røntgenstruktur av CaMKII $\delta$  bundet til SN-peptidet som vi kan sammenligne homologimodellene med, kan vi ikke konkludere om disse strukturene er representative for bindingen. Men ettersom vi vet at SN-peptidet binder seg i det autoregulatoriske domenet og vi vet at treonin er viktig for aktivitet (Ottesen, Carlson et al. 2015), så er det sannsynlig at dette er en representativ modell for binding.

## 6. Oppsummering og videre arbeid

CaMKII $\delta$ 291 viste god ekspresjon, løselighet og binding til Ni-NTA. Denne mutanten burde det derfor jobbes videre med. Dette bør gjøres ved å først optimalisere ekspresjonen, deretter utføre rensing i første omgang på Ni-NTA med en nøytral pH rundt 7,5, og deretter optimalisere rensemetoden for å få rent protein med høy konsentrasjon. Når rensemetoden er etablert for CaMKII $\delta$ 291 bør det utføres krystallscreening med SN-peptidet. MST-bufferen inneholder 0,05 % Tween-20 og DLS analysene viser at proteinet bør renses med små mengder detergent tilstede.

I tillegg bør bindingsanalyser av CaMKII $\delta$ 291 utføres. Dette må gjøres ved å først se på ulike buffere ved DLS-analyse for å finne en buffer hvor ikke CaMKII $\delta$  aggregerer og som egner seg til MST-analyser av CaMKII $\delta$  og SN-peptidet. Det bør utføres andre bindingsanalyser som SRP-analyse, i tillegg til MST for å få en mer nøyaktig K<sub>d</sub>-verdi.

CaMKII $\delta$ SN bør renses ved bruk av Ni-NTA buffere med pH 7,5 og superdex med pH 7,5, som kan gi CaMKII $\delta$ SN uten aggregering eller fragmentering. Igjen kan små mengder detergent være viktig å prøve ut. Det rene CaMKII $\delta$ SN-proteinet bør undersøkes sammen med og uten CaM ved krystallscreening, og det bør utføres DLS-analyse av CaMKII $\delta$ SN i ulike MST-buffere og MST-analyse av CaMKII $\delta$ SN med CaM. I tillegg bør det utføres flere bindingsanalyser som SPR-analyse og lignende for å få en mest nøyaktig K<sub>d</sub> verdi av bindingen.

Glutamin nr 2 i SN-peptidet viste seg å være svært konservert i de 6 peptid-dockingsmodellene. Det kan derfor være lurt å lages en variant av CaMKII $\delta$ SN som har en positiv aminosyre i stedet for Glu279 som for eksempel lysin. Det burde i tillegg lages et peptid hvor glutamin nr. to er byttet til lysin til bruk i krystallisering, eller andre forsøk på humane celler for å se effekten av dette peptidet på CaMKII $\delta$ .

Det kan i tillegg settes på ulike fusjonsproteiner på CaMKII $\delta$ 264, CaMKII $\delta$ 275 og CaMKII $\delta$ 280 som GST, MBP og thioreduxin (Trx) for å se om dette vil øke ekspresjon og løselighet. En annen mulighet som bør vurderes, er å utføre ekspresjon i eukaryote celler, for eksempel gjærceller eller insektceller, som kanskje kan forbedre ekspresjonen. En annen mulighet er å bytte CaMKII $\delta$  fra en annen modellorganisme i håp om at sekvensforskjellene kan ha betydning for protein stabilitet, ekspresjon og krystalliseringssegenskaper.

## Referanser

Agilent, T. (2015). "BL21-CodonPlus Expression Competent Cells - Details & Specifications." Lest 12.02.15, from <http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pageId=484>.

Alberts, B. (2004). Essential Cell Biology, Garland Science.

Basu, P. and M. Johnson (2009). The Integrated Approach to Chemistry Laboratory: Selected Experiments, Destech Publications Incorporated.

Bergfors, T. M. (2009). Protein Crystallization, International University Line.

Biosciences, A. (1999). "Superdex 75 HR 10/30." Lest 17.02.15, from [https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1314716762536/litdoc71603100AF\\_20110830180959.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314716762536/litdoc71603100AF_20110830180959.pdf).

BioTek (2009). "Multi-Volume Analysis of Nucleic Acids Using the Epoch™ Spectrophotometer System."

Bornhorst, J. A. and J. J. Falke (2000). "[16] Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags." Methods in enzymology **326**: 245-254.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**(1-2): 248-254.

Casali, N. and A. Preston (2003). E. Coli Plasmid Vectors: Methods and Applications, Humana Press.

Chothia, C. and A. M. Lesk (1986). "The relation between the divergence of sequence and structure in proteins." The EMBO Journal **5**(4): 823-826.

Chothia, C. and A. M. Lesk (1986). "The relation between the divergence of sequence and structure in proteins." The EMBO Journal **5**(4): 823-826.

Couchonnal, L. F. and M. E. Anderson (2008). The Role of Calmodulin Kinase II in Myocardial Physiology and Disease.

De Koninck, P. and H. Schulman (1998). "Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations." Science **279**(5348): 227-230.

De Marco, V., et al. (2004). "The solubility and stability of recombinant proteins are increased by their fusion to NusA." Biochemical and Biophysical Research Communications **322**(3): 766-771.

Dennison, C. (2003). A Guide to Protein Isolation, Springer.

Elgersma, Y., et al. (2004). "Mouse Genetic Approaches to Investigating Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Function in Plasticity and Cognition." The Journal of Neuroscience **24**(39): 8410-8415.

## Referanser

Elgersma, Y., et al. (2004). "Mouse Genetic Approaches to Investigating Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Function in Plasticity and Cognition." The Journal of Neuroscience **24**(39): 8410-8415.

Erickson, J. R., et al. (2008). "A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation." Cell **133**(3): 462-474.

Frey, N. and E. N. Olson (2003). "CARDIAC HYPERTROPHY: The Good, the Bad, and the Ugly." Annual Review of Physiology **65**(1): 45-79.

Gaberc-Porekar, V. and V. Menart (2001). "Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography." Journal of Biochemical and Biophysical Methods **49**(1-3): 335-360.

Ganong, W. F. (2005). "Review of Medical Physiology." (twenty-second edition): 81.

GE, H. (2008, 2008). "Ion Exchange columns and media." Lest 17.02.15, from [http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/IonExchange/GE\\_IEXcolumns.pdf](http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/IonExchange/GE_IEXcolumns.pdf).

Ghosh, A. K. and S. Gemma (2014). Structure-based Design of Drugs and Other Bioactive Molecules: Tools and Strategies, Wiley.

Hardin, J., et al. (2012). Becker's World of the Cell, Benjamin Cummings.

Hefti, M. H., et al. (2001). "A novel purification method for histidine-tagged proteins containing a thrombin cleavage site." Anal Biochem **295**(2): 180-185.

Hook, S. S. M. R. A. (2001). "Ca<sup>2+</sup>/CaM-Dependent Kinase: From Activation to Function." Annual Review Pharmacology Toxicology(41): 471-505.

Hudmon, A., H. Shulman (2002). "Structure-function of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II." Biochemical Journal: 593-611.

Janson, J. C. (2012). Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications, Wiley.

Jerabek-Willemsen, M., et al. (2011). "Molecular interaction studies using microscale thermophoresis." Assay Drug Dev Technol **9**(4): 342-353.

Kirchmair, R., et al. (2004). "The neuropeptide secretoneurin acts as a direct angiogenic cytokine in vitro and in vivo." Circulation **109**(6): 777-783.

Knipe, A. C. and W. E. Watts (2004). Organic Reaction Mechanisms, 1999, Wiley.

Lehninger, A. L., et al. (2005). Lehninger Principles of Biochemistry, W. H. Freeman.

## Referanser

Lesk, A. (2010). Introduction to Protein Science: Architecture, Function, and Genomics, OUP Oxford.

Lewin, B. (2007). Cells, Jones and Bartlett Publishers.

Lorsch, J. (2013). Laboratory Methods in Enzymology: DNA, Elsevier Science.

Lou, L. L., et al. (1986). "Activation of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: ATP modulates production of an autonomous enzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(24): 9497-9501.

Malvern. "Dynamic Light Scattering." Lest 01.03.15, from <http://www.malvern.com/en/products/technology/dynamic-light-scattering/default.aspx>.

Marín-García, J. (2011). Signaling in the Heart, Springer.

Martí, E., et al. (2001). "Differential regulation of chromogranin A, chromogranin B and secretoneurin protein expression after transient forebrain ischemia in the gerbil." Acta Neuropathologica **101**(2): 159-166.

Martin, E. A. and O. U. Press (2010). Concise Colour Medical Dictionary, OUP Oxford.

McNally, E. J., et al. (2007). Protein Formulation and Delivery, Second Edition, CRC Press.

Minor, L. K. (2006). Handbook of Assay Development in Drug Discovery, CRC Press.

Mitra, S. (2004). Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry, Wiley.

Naya, F. J., et al. (1999). "Transcriptional activity of MEF2 during mouse embryogenesis monitored with a MEF2-dependent transgene." Development **126**(10): 2045-2052.

Nelson, T. J., et al. (2005). "SRF-dependent gene expression in isolated cardiomyocytes: Regulation of genes involved in cardiac hypertrophy." Journal of Molecular and Cellular Cardiology **39**(3): 479-489.

Nussey, S. S. and S. A. Whitehead (2013). Endocrinology: An Integrated Approach, Taylor & Francis.

O'Dell, B. L. and R. A. Sunde (1997). Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements, Taylor & Francis.

Olson, E. N., et al. (1995). "Regulation of Muscle Differentiation by the MEF2 Family of MADS Box Transcription Factors." Developmental Biology **172**(1): 2-14.

Ottesen, A. H., et al. (2015). "Secretoneurin Is a Novel Prognostic Cardiovascular Biomarker Associated With Cardiomyocyte Calcium Handling." Journal of the American College of Cardiology **65**(4): 339-351.

PDB2PQR, A. "APBS & PDB2PQR: Electrostatic and solvation properties from complex molecules." Lest 1.3.15, from <http://www.poissonboltzmann.org/>.

## Referanser

Rappsilber, J. and M. Mann (2002). "What does it mean to identify a protein in proteomics?" Trends in Biochemical Sciences **27**(2): 74-78.

Raveh, B., et al. (2010). "Sub-angstrom modeling of complexes between flexible peptides and globular proteins." Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics **78**(9): 2029-2040.

Rellos, P., et al. (2010). "Structure of the CaMKII $\delta$ /Calmodulin Complex Reveals the Molecular Mechanism of CaMKII Kinase Activation." PLoS Biol **8**(7): e1000426.

Rosenberg, O. S., et al. (2005). "Structure of the autoinhibited kinase domain of CaMKII and SAXS analysis of the holoenzyme." Cell **123**(5): 849-860.

Rosenberg, O. S., et al. (2006). "Oligomerization states of the association domain and the holoenzyme of Ca<sup>2+</sup>/CaM kinase II." FEBS Journal **273**(4): 682-694.

Rupp, B. (2009). Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology, Taylor & Francis Group.

Russo Krauss, I., et al. (2013). "An Overview of Biological Macromolecule Crystallization." International Journal of Molecular Sciences **14**(6): 11643-11691.

Schworer, C. M., et al. (1986). "Reversible generation of a Ca<sup>2+</sup>-independent form of Ca<sup>2+</sup>-(calmodulin)-dependent protein kinase II by an autophosphorylation mechanism." J Biol Chem **261**(19): 8581-8584.

Scopes, R. K. (1994). Protein Purification: Principles and Practice, Springer.

SIGMA, L. S. (2006). "Competent cell compendium." Lest 12.02.15, from <https://www.sigmaaldrich.com/ifb/life-science/comp-cell-compend/competent-cell-compendium.html#/1/>.

Sousa, S. F., et al. (2006). "Protein-ligand docking: current status and future challenges." Proteins **65**(1): 15-26.

SPECTRUMLABS.COM (1999-2015). "Standard Regenerated Cellulose (RC) Membrane:." Lest 12.02.15, from <http://www.spectrumlabs.com/dialysis/RCsheet.html?Pn=132677>.

Stratagen. "QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit ". Lest 12.02.15, from <http://sevierlab.vet.cornell.edu/resources/Stratagene-QuikchangeManual.pdf>.

Ueda, E. K. M., et al. (2003). "Current and prospective applications of metal ion-protein binding." Journal of Chromatography A **988**(1): 1-23.

van Pelt-Verkuil, E., et al. (2008). Principles and Technical Aspects of PCR Amplification, Springer.

Wiedermann, C. J. (2000). "Secretoneurin: a functional neuropeptide in health and disease." Peptides **21**(8): 1289-1298.

## Referanser

Zang T., B. J. H. (2004). "Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in the cardiac hypertrophy and heart failure." Cardiovascular Research **63**: 476-486.

Zheng, L., et al. (2004). "An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol." Nucleic Acids Res **32**: e115.

Zourob, M., et al. (2008). Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems: Biosensors, Recognition Receptors, and Microsystems, Springer.

Zumdahl, S. and S. Zumdahl (2013). Chemistry, Cengage Learning.

## 7. Vedlegg

### Vedlegg A Nukleotid og aminosyre sekvens for CaMKII $\delta$ 335

#### A.1 Nukleotidsekvens for CaMKII $\delta$ 335

ATGCACCATCATCATCATCATTCTTCTGGTGTAGATCTGGGTACCGAGAACC  
TGTACTTCCAATCCATGACGGACGAGTATCAGCTTTTCGAGGAGCTTGGAAA  
GGGGGCATTCTCAGTGGTGAGAAGATGTATGAAAATTCCTACTGGACAAGA  
ATATGCTGCCAAAATTATCAACACCAAAAAGCTTTCTGCTAGGGATCATCAG  
AAACTAGAAAGAGAAGCTAGAATCTGCCGTCTTTTGAAGCACCTAATATTG  
TGCGACTTCATGATAGCATATCAGAAGAGGGCTTTCCTACTTGGTGTTTGA  
TTTAGTTACTGGAGGTGAACTGTTTGAAGACATAGTGGCAAGAGAATACTAC  
AGTGAAGCTGATGCCAGTCATTGTATACAGCAGATTCTAGAAAGTGTTAATC  
ATTGTCACCTAAATGGCATAGTTCACAGGGACCTGAAGCCTGAGAATTTGCT  
TTTAGCTAGCAAATCCAAGGGAGCAGCTGTGAAATTGGCAGACTTTGGCTTA  
GCCATAGAAGTTCAAGGGGACCAGCAGGCGTGGTTTGGTTTTGCTGGCACAC  
CTGGATATCTTTCTCCAGAAGTTTTACGTAAAGATCCTTATGGAAAGCCAGT  
GGATATGTGGGCATGTGGTGTCAATTCTCTATATTCTACTTGTGGGGTATCCAC  
CCTTCTGGGATGAAGACCAACACAGACTCTATCAGCAGATCAAGGCTGGAG  
CTTATGATTTTCCATCACCAGAATGGGACACGGTACTCCTGAAGCCAAAGA  
CCTCATCAATAAAATGCTTACTATCAACCCTGCCAAACGCATCACAGCCTCA  
GAGGCACTGAAGCACCCATGGATCTGTCAACGTTCTACTGTTGCTTCCATGA  
TGCACAGACAGGAGACTGTAGACTGCTTGAAGAAATTTAATGCTAGAAGAA  
AACTAAAGGGTGCCATCTTGACAACATGCTGGCTACAAGGAATTTCTCAGC  
AGCCAAGAGTTTGTGTTGAAGAAACCAGATGGAGTAAAGGAGTCAACTGAGAG  
TTCAAATTGA

#### A.2 Aminosyresekvens CaMKII $\delta$ 335

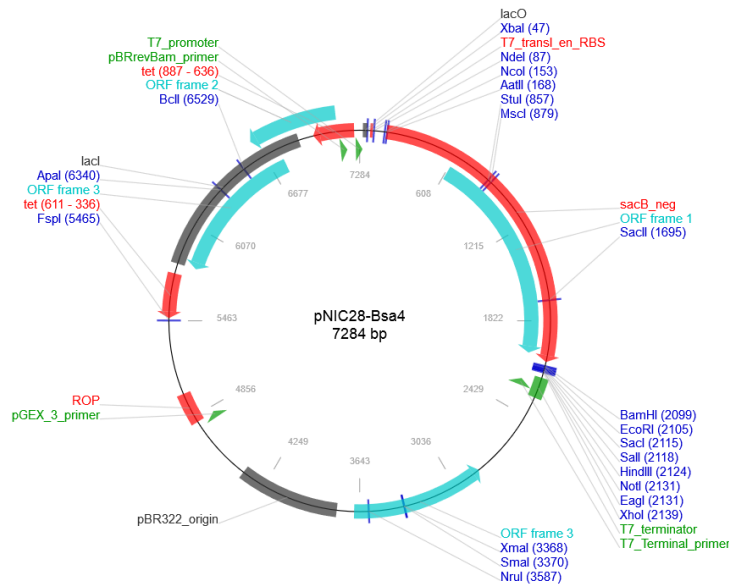
MHHHHHSSGVDLGTENLYFQSMTDEYQLFEELGKGAFSVVRRRCMKIPTGQEY  
AAKIINTKKLSARDHQKLEREARICRLKHPNIVRLHDSISEEGFHVYLVFDLVTG  
GELFEDIVAREYYSEADASHCIQQILESVDNHCHLNGIVHRDLKPENLLLASKSKG  
AAVKLADFLAIEVQGDQQA WFGFAGTPGYLSPEVLRKDPYKPVDMWACGV  
ILYILLVGYPFWDEDQHRLYQQIKAGAYDFPSPEWDTVTPEAKDLINKMLTINP  
AKRITASEALKHPWICQRSTVASMMHRQETVDCLKKFNARRKLGAILTTMLA  
TRNFSAAKSLLKPKPDGVKESTESSN



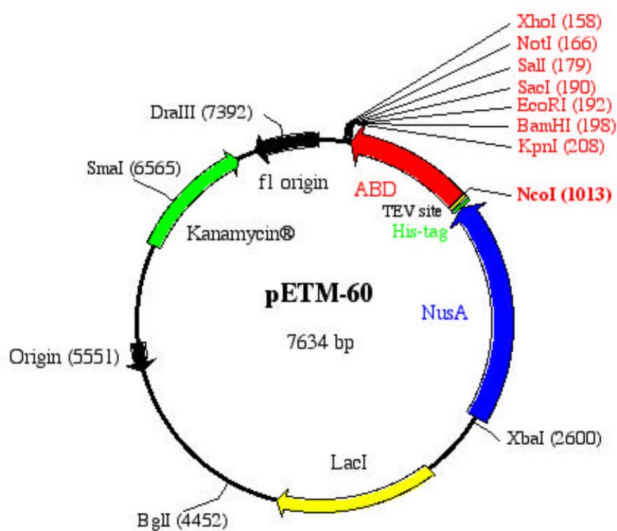
## 7. Vedlegg

### Vedlegg B Plasmider benyttet

B.1 pNiC28-Bsa4 plasmid brukt til CaMKII $\delta$ 335, CaMKII $\delta$ 264, CaMKII $\delta$ 275, CaMKII $\delta$ 291 og CaMKII $\delta$ T287D













B.2 pETM60 brukt til konstruktene NusA-CaMKII $\delta$ SN, NusA-extended-CaMKII $\delta$ 280, og NusA-CaMKII $\delta$ 280



## Vedlegg C Molekylvektsmarkør

### C.1 Molekylvektsmarkøren

Protein	Approximate Molecular Weights (kDa)				
	Tris-Glycine	Tricine	NuPAGE® MES	NuPAGE® MOPS	NuPAGE® Tris-Acetate
 Myosin	250	210	188	191	210
 Phosphorylase	148	105	98	97	111
 BSA	98	78	62	64	71
 Glutamic Dehydrogenase	64	55	49	51	55
 Alcohol Dehydrogenase	50	45	38	39	41
 Carbonic Anhydrase	36	34	28	28	n/a
 Myoglobin Red	22	17	17	19	n/a
 Lysozyme	16	16	14	14	n/a
 Aprotinin	6	7	6	n/a	n/a
 Insulin, B Chain	4	4	3	n/a	n/a

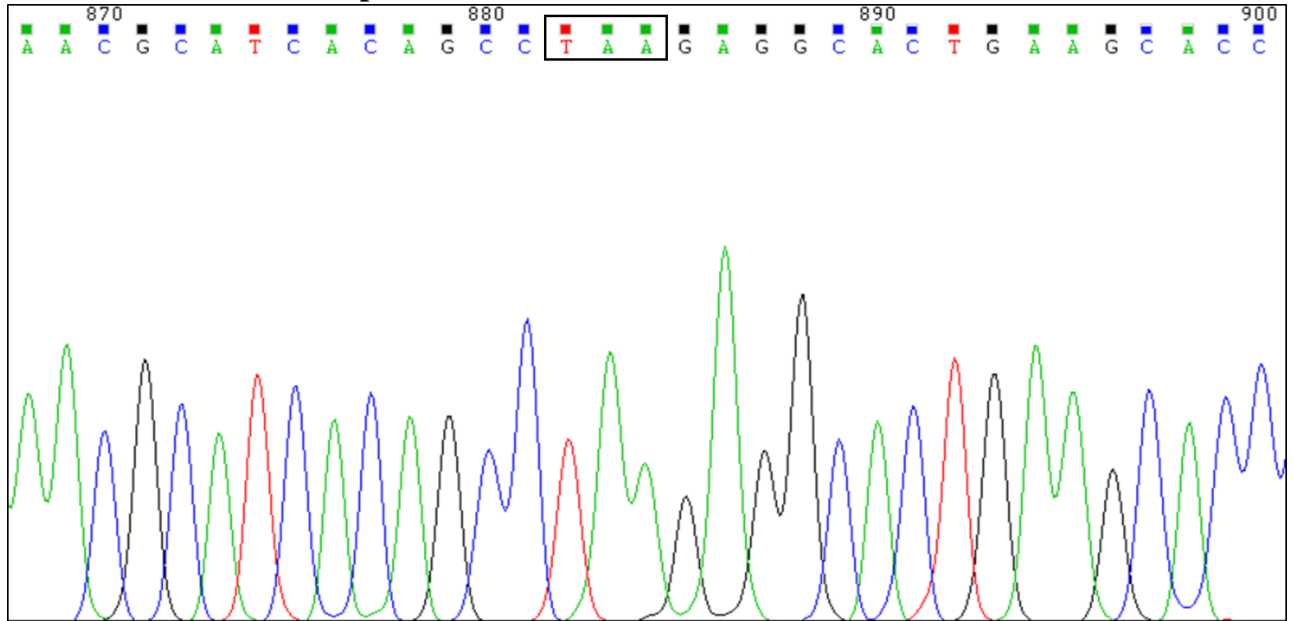
NuPAGE® Novex  
Bis-Tris 4-12% Gel

©1999-2002 Invitrogen Corporation. All rights reserved.

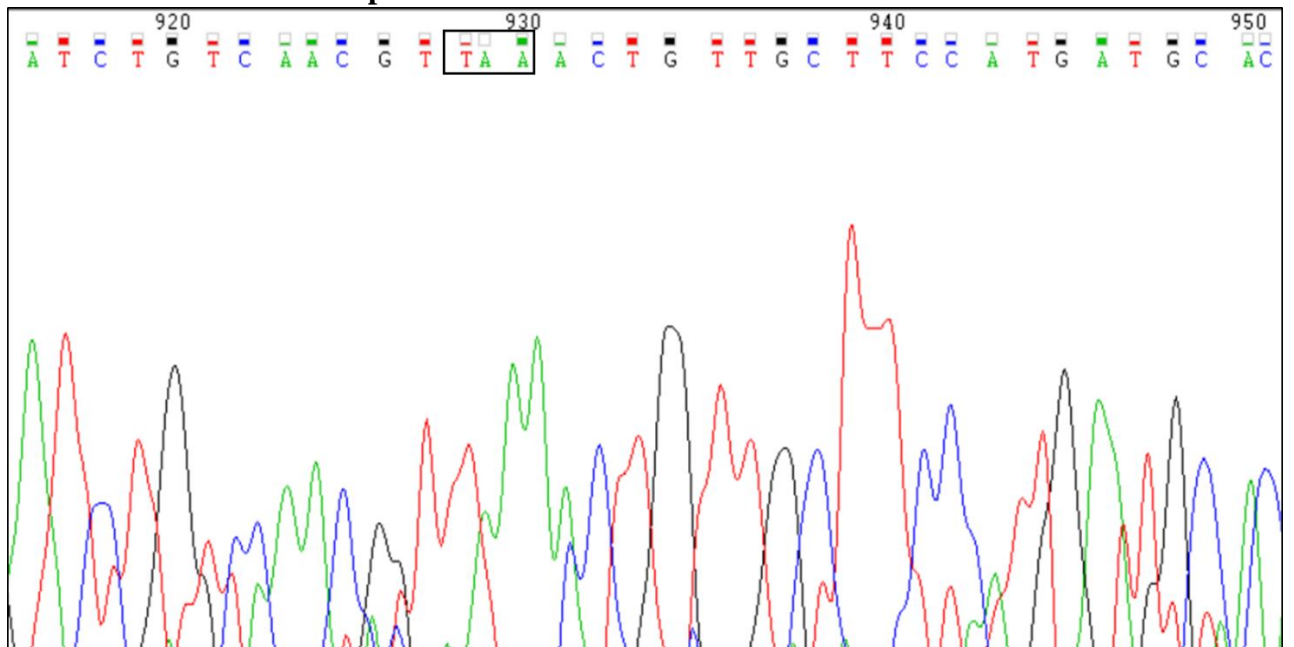
IM-1008F 072602

## Vedlegg D, Sekvenseringsdata fra QuikChange mutagenese

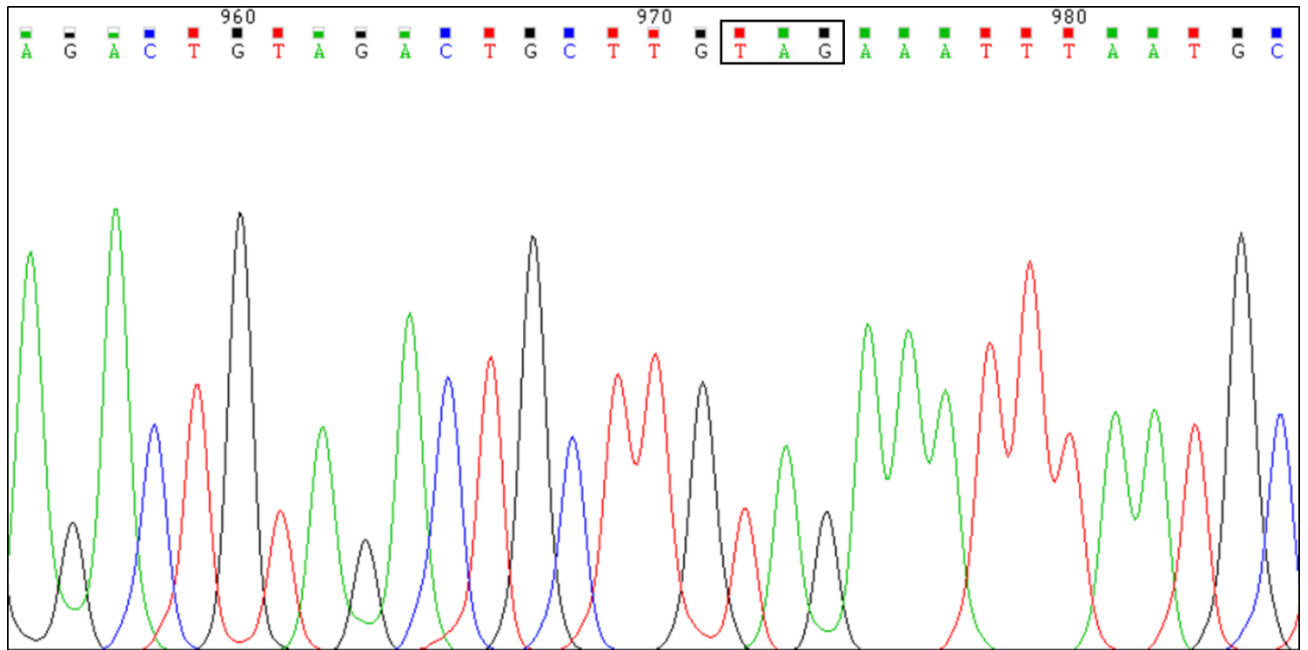
### D.1 CaMKII $\delta$ 264 med stopkodon TAA i sekvensen.



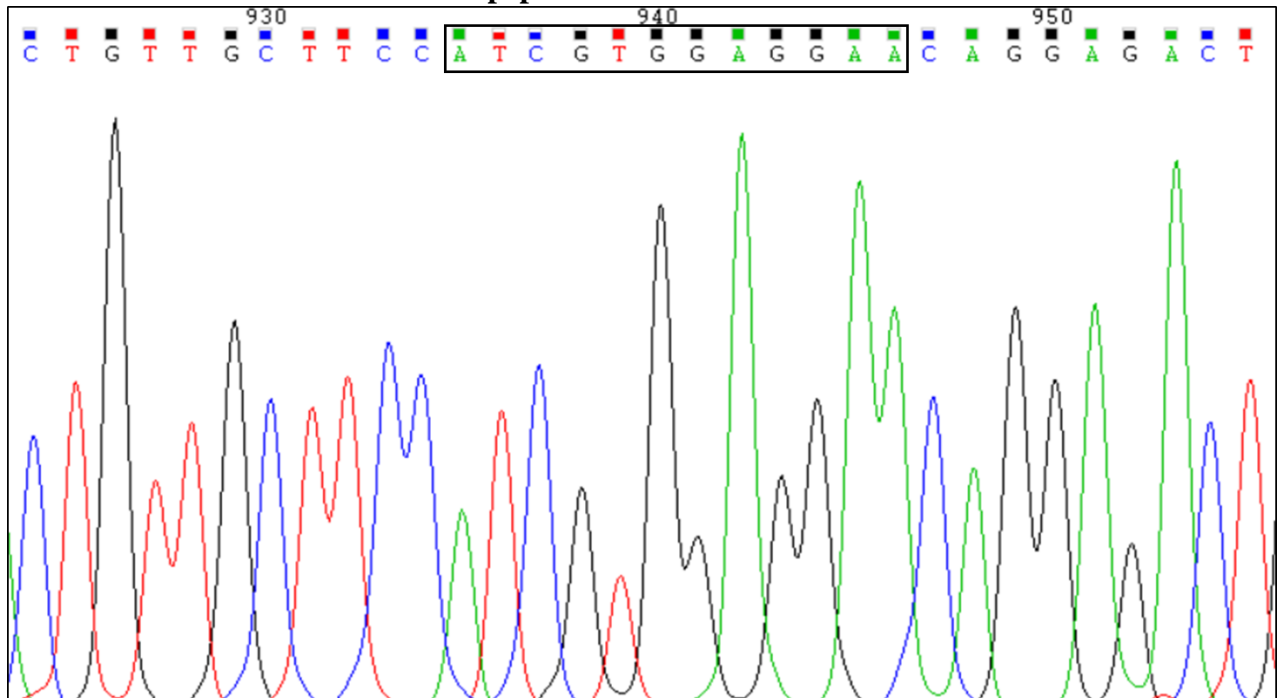
### D.2 CaMKII $\delta$ 275 med stopkodon TAA i sekvensen.



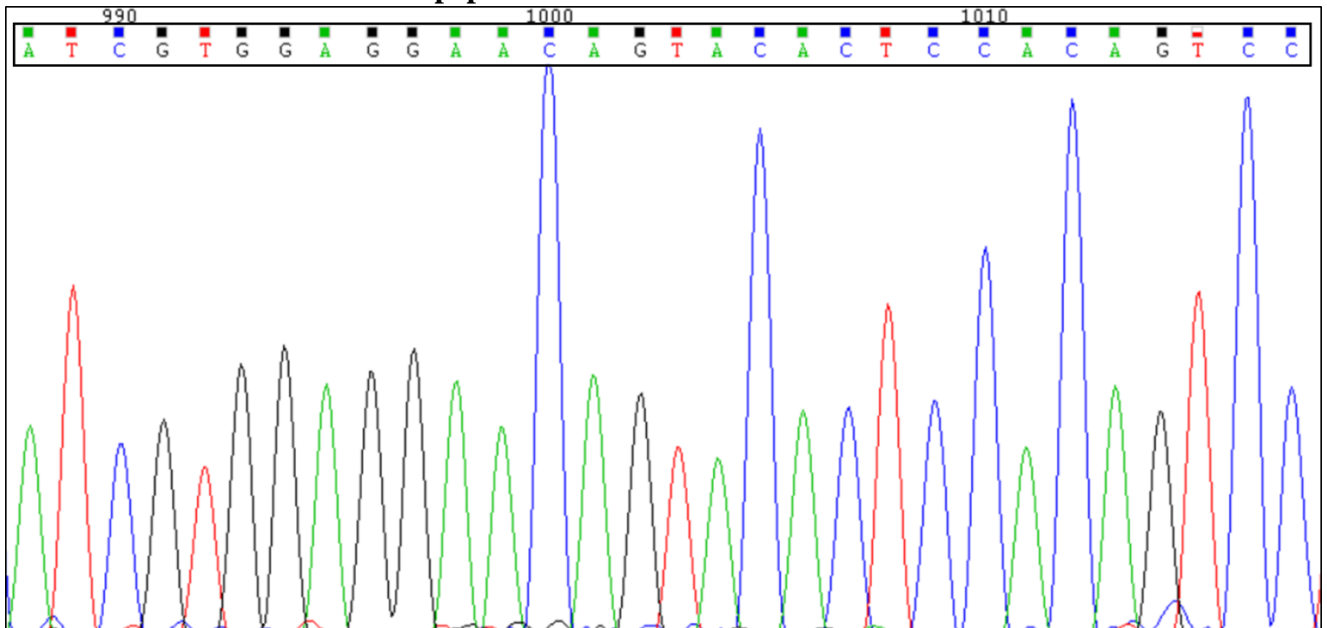
**D.3 CaMKII $\delta$ 291 med TAG i sekvensen**



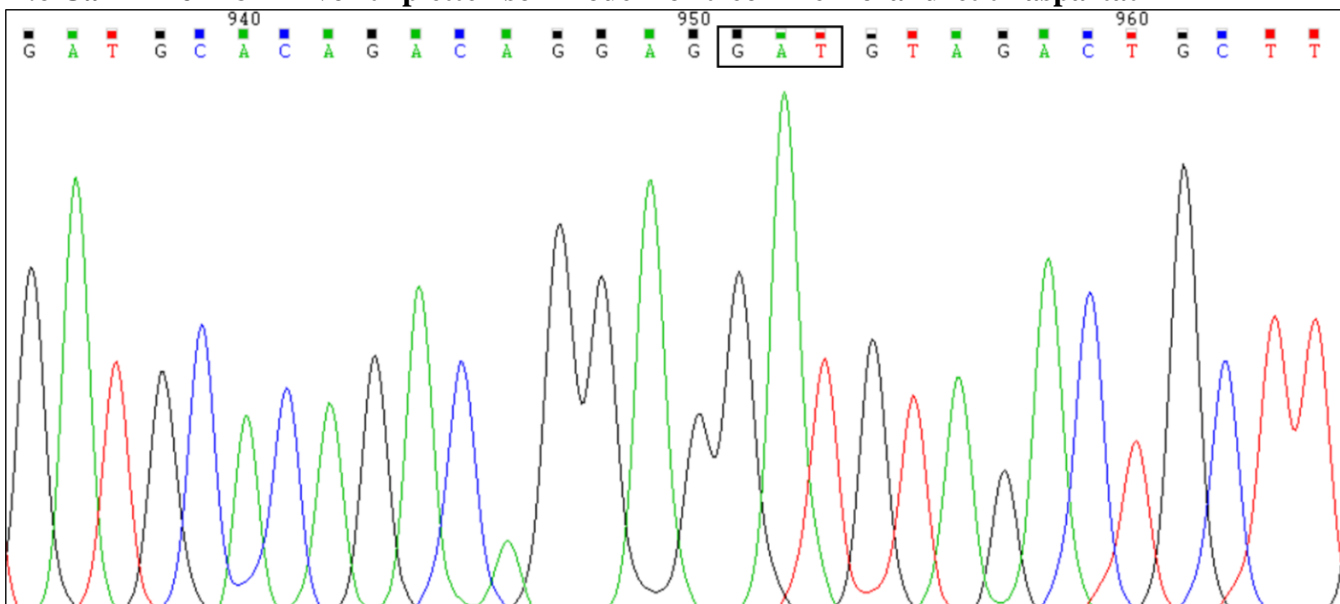
**D.4 CaMKII $\delta$ 1/2SN med halve SN-peptidet satt inn i sekvensen**



**D.5 CaMKII $\delta$ SN med hele SN-peptidet satt inn i sekvensen**



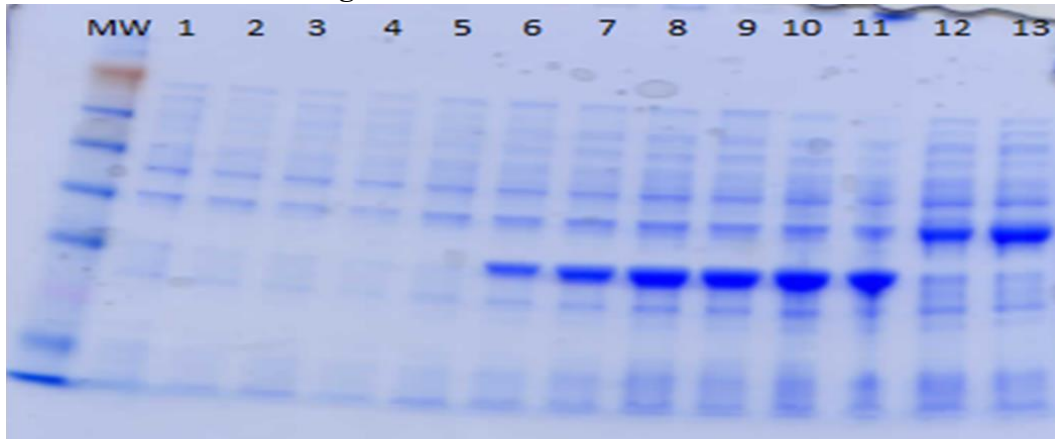
**D.6 CaMKII $\delta$ T287D hvor tripletten som koder for treonin er forandret til aspartat**



## 7. Vedlegg

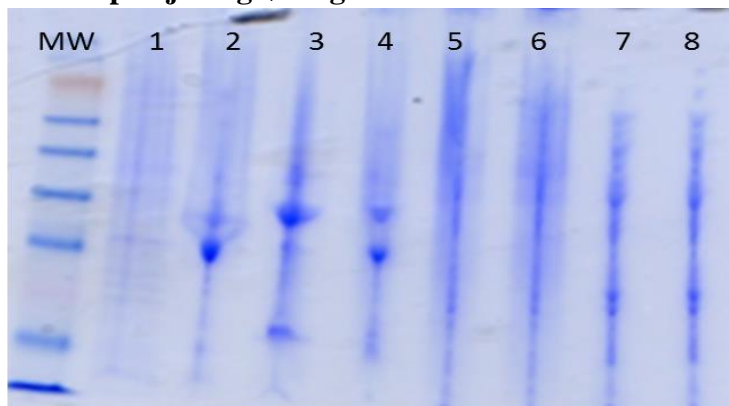
### Vedlegg E Ekspresjon og løselighetstester

#### E.1 Ekspresjonstest av CaMKII $\delta$ 335, CaMKII $\delta$ SN og CaMKII $\delta$ 1/2SN ved 18°C, og CaMKII $\delta$ 264 ved 18°C og 37°C



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
CaMKII $\delta$ 335	+												+
CaMKII $\delta$ 264		+			+	+	+	+	+	+	+		
CaMKII $\delta$ SN				+								+	
CaMKII $\delta$ 1/2SN			+										
IPTG	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
°C	18	18	18	18	37	37	37	37	37	37	18	18	18
Timer	-	-	-	-	-	1	2	4	6	8	1 dag	1 dag	1 dag

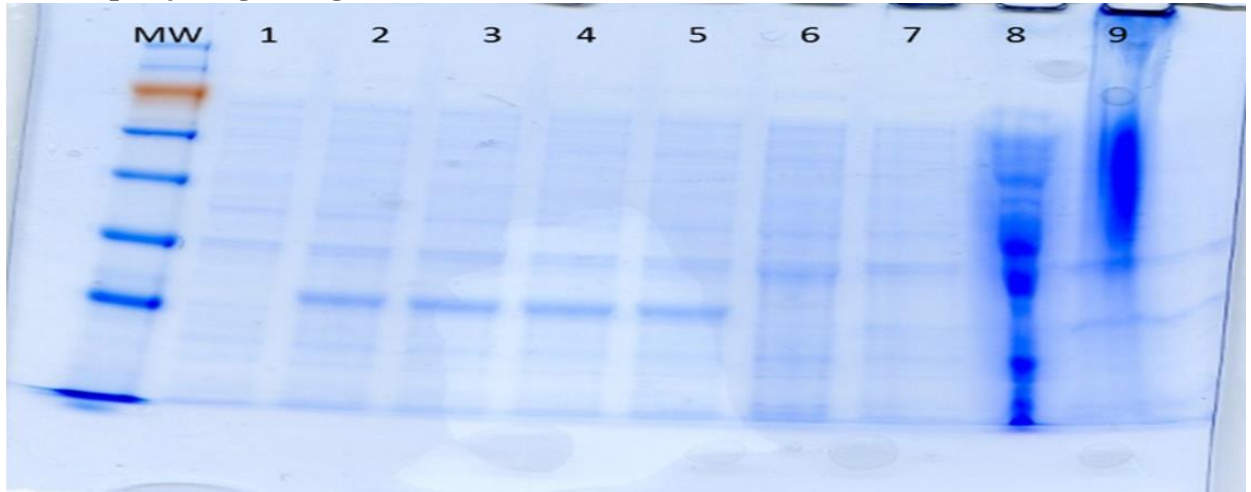
#### E.2 Ekspresjon og løselighetstest av CaMKII $\delta$ 264



	1	2	3	4	5	6	7	8
CaMKII $\delta$ 264	+	+	+	+	+	+	+	+
IPTG	-	+	+	-	-	-	+	+
Pellet fra sonikering			+	+				
Lysat fra sonikering					+	+	+	+

## 7. Vedlegg

### E.3 Ekspresjon og løselighetstest av CaMKII $\delta$ 275



	1	2	3	4	5	6	7	8	9
CaMKII $\delta$ 275	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IPTG	-	+	+	+	+	-			
°C	37	37	37	37	37	18	18	37	37
Timer	-	1	2	3	4	15	-		
Ni-NTA binding og løselighetstest								Lysat etter sonikering	Pellet etter sonikering

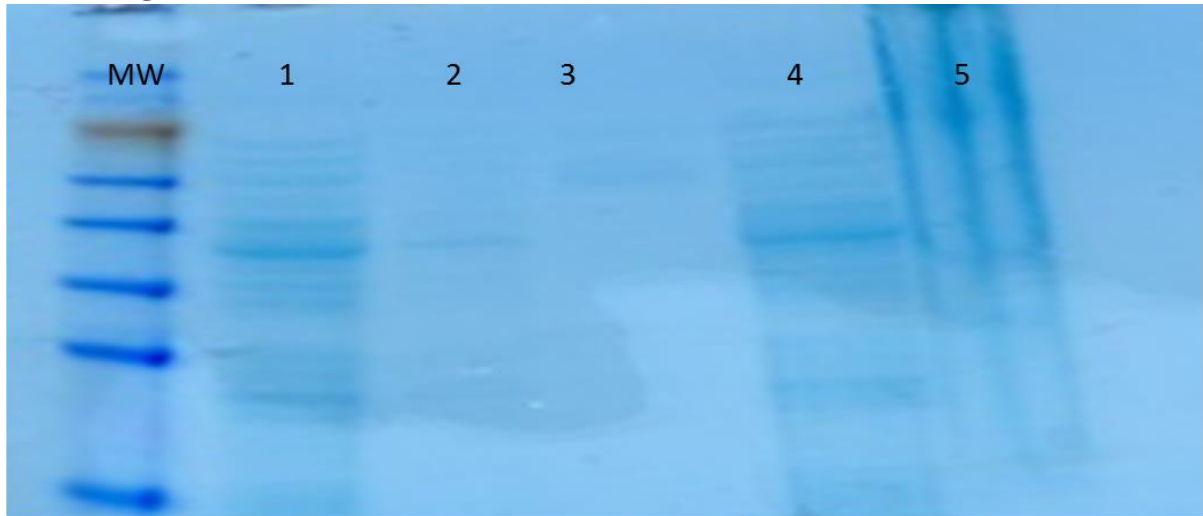
### E.4 Ekspresjonstest av NusA-extended



	1	2	3	4	5	6
NusA-extended-CaMKII $\delta$ 280	+	+	+	+	+	?
IPTG	-	+	+	+	+	-
°C	37	37	37	37	37	37
Timer	-	1	2	4	6	6

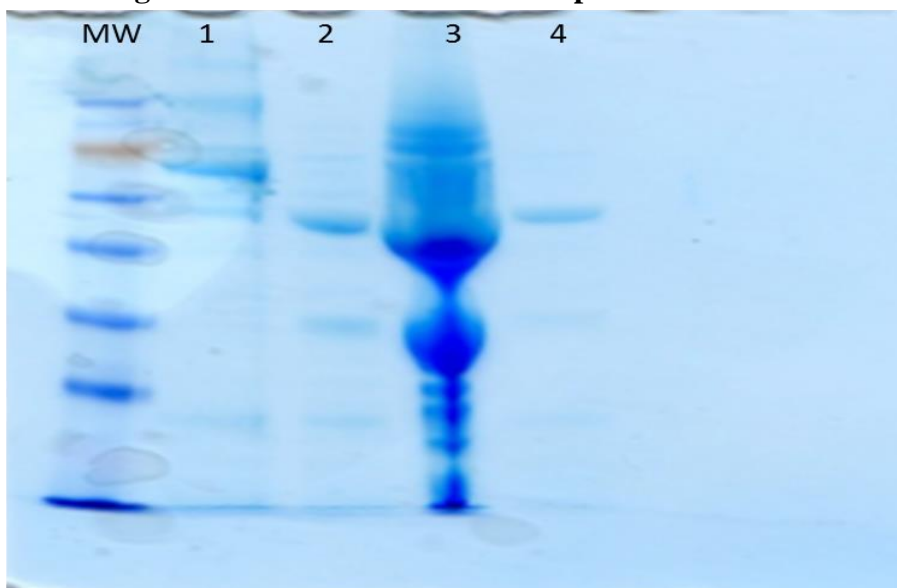
## 7. Vedlegg

### E.5 Løselighetstest av NusA-extended-CaMKII $\delta$ 280.



	1	2	3	4	5
<b>Ni-NTA binding og løselighetstest</b>	Flow through fra Ni-NTA	Vask fra Ni-NTA	Eluering fra Ni-NTA	Lysat etter sonikering	Pellet etter sonikering

### E.6 Løselighet av CaMKII $\delta$ SN etter TEV-proteaseaktivitet

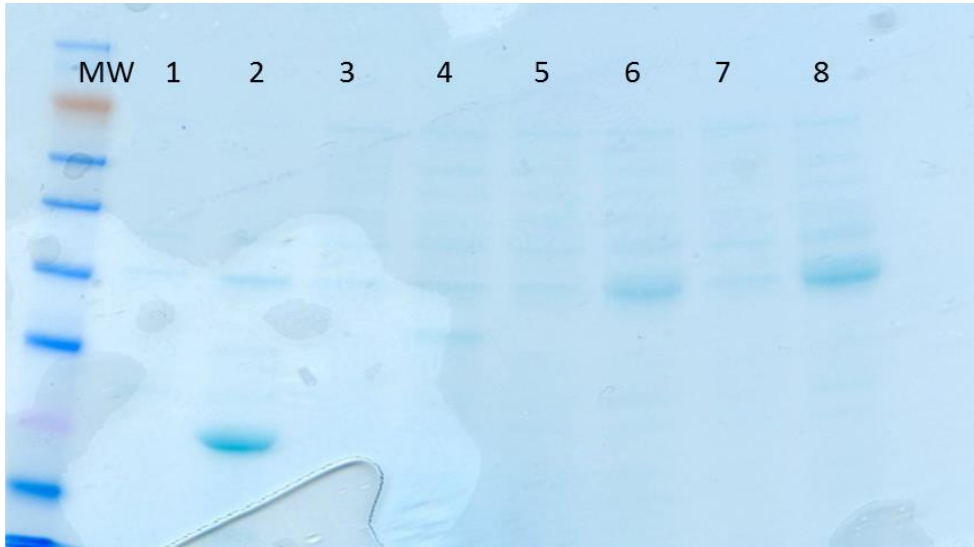


	1	2	3	4
<b>NusA-CaMKII<math>\delta</math>SN</b>	+	+	+	+
<b>TEV-kutting</b>	-	+		
<b>Ni-NTA binding og løselighetstest</b>			Pellet etter TEV	Lysat etter TEV



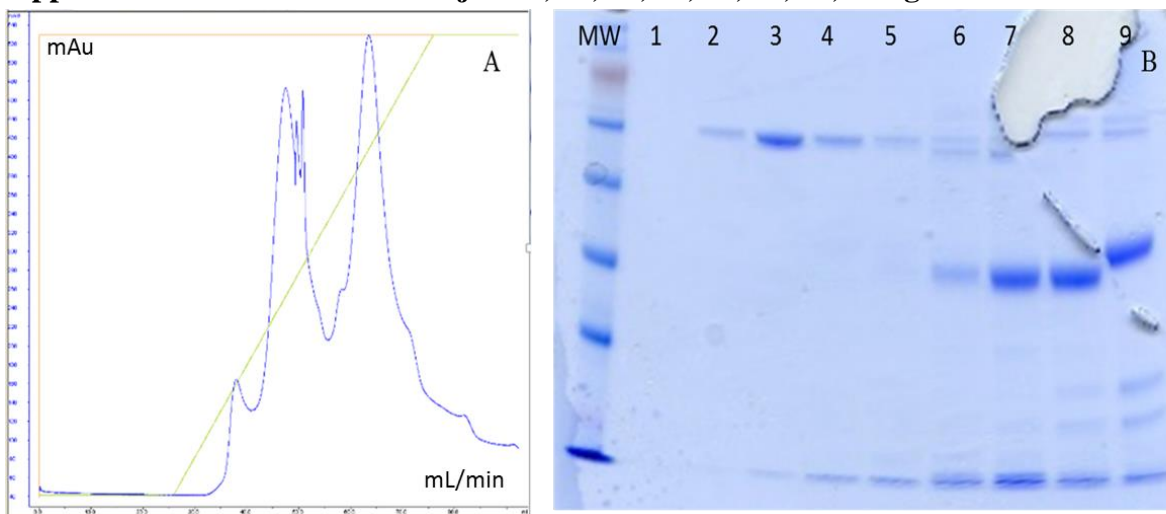
## 7. Vedlegg

### E.7 Ekspresjonstest av CaM, CaMKII $\delta$ 275, CaMKII $\delta$ 1/2SN, CaMKII $\delta$ SN



	1	2	3	4	5	6	7	8
CaM	+	+						
CaMKII $\delta$ 275			+	+				
CaMKII $\delta$ 1/2SN					+	+		
CaMKII $\delta$ SN							+	+
IPTG	-	+	-	+	-	+	-	+
°C	18	18	18	18	18	18	18	18
Timer	-	15	-	15	-	15	-	15

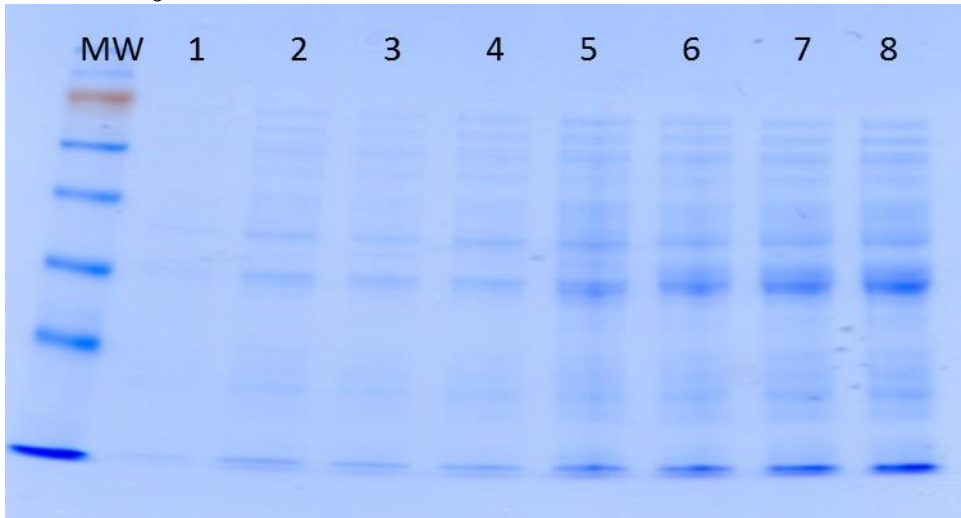
### E.8 E.8 Rensing av CaMKII $\delta$ 1/2SN ved HiTrapQ som viser eluatet fra de første to toppene. I brønn 1-9 er hhv fraksjon 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49 og 51



Kommentar: Fraksjon 45-51 ble videre rensset ved Superdex75.

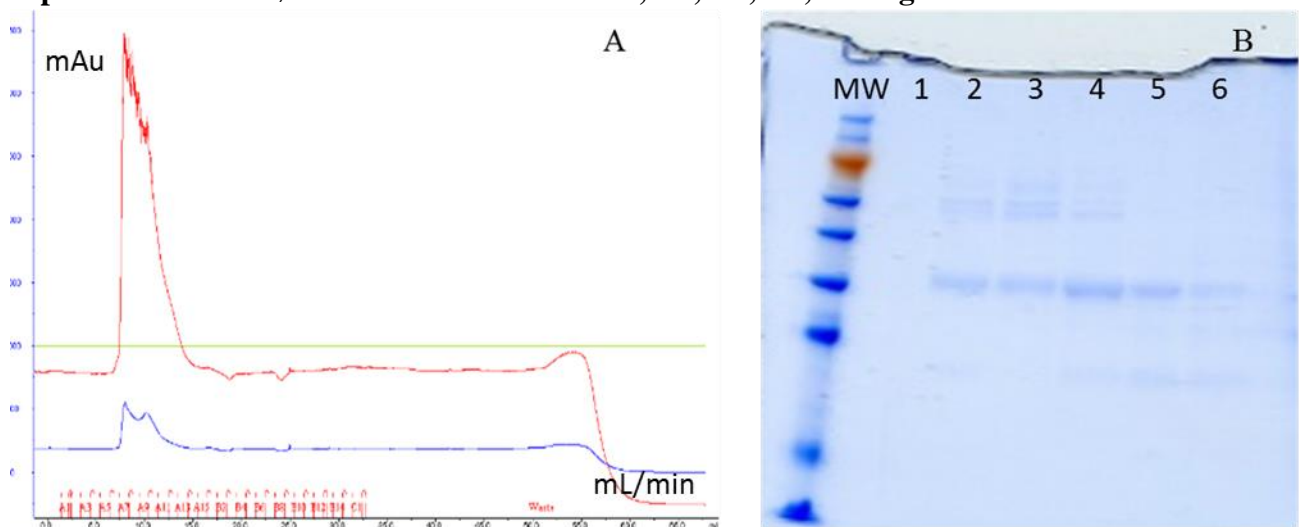
7. Vedlegg

**E.9 Induksjonstest av CaMKII $\delta$ SN**



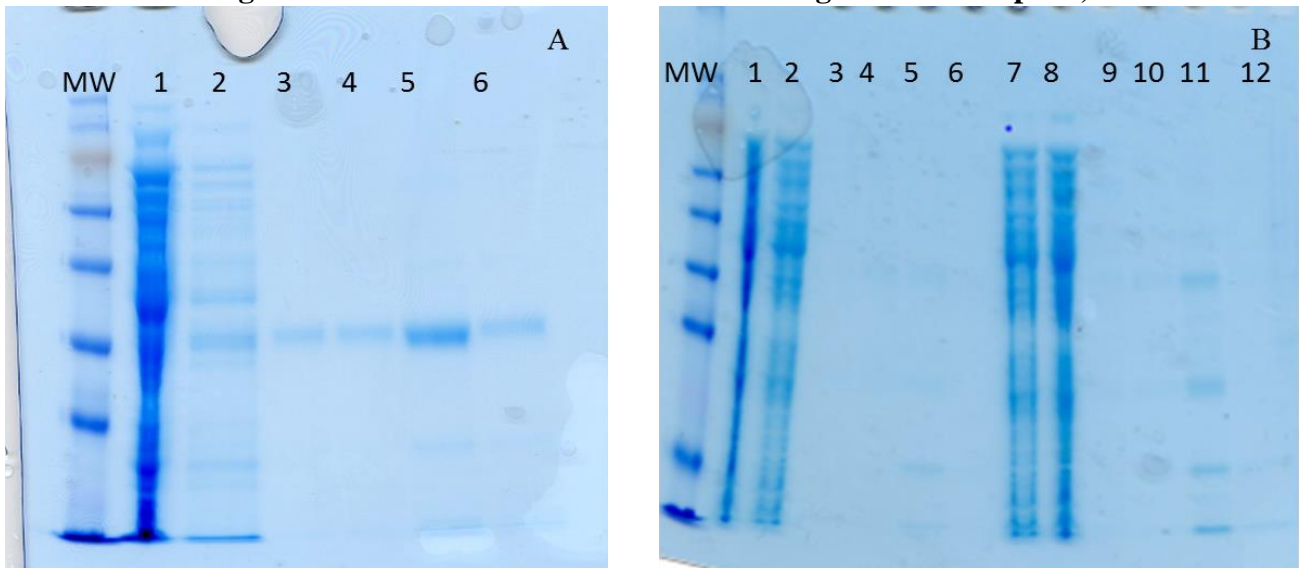
	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>IPTG</b>	-	-	-	-	-	+	+	+
<b>Kons IPTG mM</b>	-	-	-	-	-	0,25	0,50	1,00
<b>°C</b>	37	37	37	37	18	18	18	18
<b>Timer etter tilsatt IPTG</b>	-	-	-	-	-	15	15	15

**E. 10 Rensing av CaMKII $\delta$ 335 etter HiTrapQ pH 8,0 på superdex75. A Kromatogram fra eluering på superdex75 B SDS-PAGE gel med fraksjonene fra superdex75 hvor brønnene inneholder hhv A6, A7, A8, A9, A10 og A11**



## 7. Vedlegg

### E.11 E.11 Rensing av CaMKII $\delta$ 335 ved bruk av Co-CMA og buffere med pH 8,0.



Kommentar: A Rensing på Co-CMA hvor brønnen viser hhv flowthrough av lysat fra sonikering av CaMKII $\delta$ 335 i sonikeringsbuffer med Tris pH 8,0 (1), vask med høysalt vaskebuffer med Tris pH 8,0 (2), vask med lavsalt vaskebuffer med Tris pH 8,0 (3), elueringsfraksjon 1, 2 og 3 (4,5, og 6) med elueringsbuffer med pH 8,0.

B. Rensing på Co-CMA hvor brønnen viser rensing tidligere brukt Co-CMA hvor fraksjonene viser hhv to flowthrough av lysat fra sonikering av CaMKII $\delta$ 335 i sonikeringsbuffer med Tris pH 8,0 (1 og 2), vask med lavsaltvaskebuffer med Tris pH 8,0 (3), elueringsfraksjon 1, 2 og 3 (4, 5 og 6) med elueringsbuffer med pH 8,0. Rensing på ny Co-CMA hhv to flowthrough av lysat fra sonikering av CaMKII $\delta$ 335 i sonikeringsbuffer med Tris pH 8,0 (7 og 8), vask med lavsalt vaskebuffer med Tris pH 8,0 (9), elueringsfraksjon 1, 2 og 3 (10, 11 og 12) med elueringsbuffer med pH 8,0.

**Vedlegg F Massespektrometridata**

Tabell F. Massespektrometrianalyse av ukjente bånd med kjent proteinmasse fra rensing av CaMKII $\delta$ 1/2SN ved ResS						
	Proteinnavn	Distinkte peptider for proteinet	Molekylærvekt	MS-score	Gj. snt peptid-intensitet	iBAQ-nummer
Bånd 1	CAMK2D	7	54,127	478	279300000	11638000
Bånd 2	CAMK2D	7	54,127	478	1,3887E+10	578630000
Bånd 3	CAMK2D	7	54,127	478	585880000	24412000

Kommentar: Intensiteten til de distinkte peptidene og iBAQ nummeret er høye nok til å konkludere med at båndene fra ResS gelen er proteinet selv. Båndene havnet blant top 12 treff som er tilfredstillende nok, ettersom CaMKII $\delta$ SN proteinet er trunkert ved aminosyre 335 og har innsatt SN-peptidet i sekvensen som gjør at vi ikke kan få 100 % treff ved identifisering. Grunnen til at det ikke blir 100 % treff er at disse mutasjonene kan gi ulike peptidfragmenter ved nedbrytning av CaMKII $\delta$ , enn det man vil få ved nedbrytting av villtype CaMKII $\delta$

## 7. Vedlegg



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

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