

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



FORORD

Denne oppgaven ble utført ved Instituttet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM) ved Universitetet for Miljø- og Biovitenskap i perioden 2009-2010.

Jeg vil gjerne takke veilederen min, Morten Sørli, for plass til én til på laget, og for en evig optimisme og entusiasme.

Tusen takk til medveilederen min, Linn Wilhelmsen, for god hjelp med alt jeg måtte trenge hjelp til. Din dør har alltid vært åpen! Jeg vil også takke Øyvind Busk for hjelp med proteomikkdelen av oppgaven.

Tusen takk til min studievenninne, Anne Grethe Hamre, for stor hjelp med analysering av resultater. Takk for koselige kvelder med mye hjelp og mye frustrasjon!

Takk til alle ansatte på PEP-gruppa. Takk for at dere har holdt ut med oss fra 1. etasje!

Til sist vil jeg gjerne takke venner og familie for støtte og oppmuntring underveis.

Ås, 15. mai 2010

Margrethe Udjus

INNHALDSFORTEGNELSE

FORORD.....	i
INNHALDSFORTEGNELSE	ii
SAMMENDRAG	vii
ABSTRACT	ix
FORKORTELSER	xi
1 INTRODUKSJON	1
1.1 Forekomst av astma	1
1.2 Mekanismen til astma.....	1
1.2.1 Immunforsvaret	3
1.2.2 Airway remodeling.....	7
1.3 Cytokiner	7
1.3.1 Interleukin-13	8
1.3.2 Interleukin-4	10
1.3.3 Interleukin-5	10
1.4 Familie 18 glykosyl hydrolaser	11
1.4.1 Human chitotriosidase (HCHT)	13
1.4.2 Acidic mammalian chitinase (AMCase)	13
1.4.3 Sammenheng mellom AMCase og astma	14
1.4.4 Prosessivitet.....	16
1.5 Kloning av AMCase ved bruk av <i>Pichia pastoris</i>	18
1.5.1 Genkloning	18
1.5.2 <i>Pichia pastoris</i> som kloningsvert.....	18
1.5.3 <i>Pichia pastoris</i> – ekspresjonsvektorer.....	20
1.5.4 <i>Pichia pastoris</i> – ekspresjonsstammer	21
1.6 Bruk av cellekulturer som modellsystemer	22

INNHALDSFORTEGNELSE

1.6.1	Epitelceller	23
1.7	Proteomikk.....	24
1.7.1	Stabil isotopmerking av aminosyrer i cellekultur (SILAC)	25
1.8	Massespektrometri (MS)	27
1.8.1	Orbitrap	28
1.9	Mål med oppgaven	30
2	MATERIALER	31
2.1	Laboratorieutstyr og instrumenter	31
2.1.1	Laboratorieutstyr	31
2.1.2	Programvare til dataanalyse	33
2.2	Kjemikalier	33
2.2.1	Kjemikalier	33
2.3	Enzymer og proteiner	35
2.4	Medier.....	35
2.4.1	Selvlagde medier	35
2.4.2	Ferdige medier.....	37
2.5	Celler	38
2.6	Kit	38
2.7	Buffere og løsninger	41
2.8	Antibiotika	43
2.9	Molekylvektsmarkører.....	43
3	METODER.....	44
3.1	Tillaging av plasmid	44
3.1.1	Isolering av plasmid	46
3.1.2	PCR-reaksjon og transformering av mutanter.....	48
3.1.3	Test av transformanter.....	51
3.1.4	Tillaging av frysestock	54

INNHALDSFORTEGNELSE

3.1.5	Sekvensering	55
3.2	Transformerings, dyrking, selektering av kolonier og sjekk av aktivitet	57
3.2.1	Linearisering av WT- og W99A-plasmider.....	57
3.2.2	Tillaging og transformering av kompetente celler	58
3.2.3	Test av transformanter.....	60
3.2.4	Ekspresjon av rekombinante <i>P. pastoris</i> -stammer	62
3.2.5	Måling av kitinaseaktivitet	63
3.2.6	Måling av proteinkonsentrasjon	64
3.2.7	Oppskalering av ekspresjon	65
3.2.8	Oppkonsentrering og dialyse.....	66
3.2.9	Ionebyttekromatografi	67
3.2.10	Oppkonsentrering av AMCase	68
3.2.11	Test av protein ved SDS-PAGE	69
3.3	Induksjon av humane lungeceller med IL-13	70
3.3.1	BEAS-2B cellekultur.....	70
3.3.2	Celledyrking	71
3.3.3	Høsting av celler.....	71
3.3.4	Bestemmelse av celletall	72
3.3.5	Induksjon av BEAS-2B - celler med interleukin-13	73
3.3.6	Cellelysering.....	74
3.3.7	Proteinutfelling med aceton	76
3.3.8	Redusering og alkylering av disulfidbindinger	76
3.3.9	1-dimensjonal gelelektroforese	77
3.3.10	Trypsinering	78
3.3.11	Forberedelse til LC-MS analyse ved STop And Go Extraction Tips (STAGE-Tips)	79
3.3.12	LC-LTQ-Orbitrap-MS.....	80

INNHALDSFORTEGNELSE

3.3.13	Analyse av data	81
4	RESULTATER	87
4.2	Valg av seterrettede mutanter	87
4.2.1	Villtype.....	87
4.2.2	E140Q.....	87
4.2.3	W31A og W99A.....	88
4.2.4	Tillaging av plasmid.....	88
4.2.5	Sekvensering	91
4.2	Transformering, dyrking, selektering av kolonier og sjekk av aktivitet.....	92
4.3	Induksjon av humane lungeceller med IL-13	97
4.3.1	Proteiner knyttet til kalsiumhomeostase	107
4.3.2	Proteiner involvert i kollagensyntese	109
4.3.3	Proteiner involvert i immunrespons	111
4.3.4	Cadheriner og integriner.....	112
4.3.5	Proteiner involvert i dannelsen av stressfiber	113
4.3.6	Proteiner involvert i metabolisme	113
4.3.7	Proteiner med kutteaktivitet	115
4.3.8	Diverse membranproteiner	116
4.3.9	Protein uten kjent funksjon	118
4.3.10	Diverse proteiner	118
4.3.11	Interaksjonsanalyse	119
5	DISKUSJON	121
5.1	Tillaging av plasmid, transformering, dyrking, selektering av kolonier og sjekk av aktivitet.....	121
5.1.1	Oppsummering	124
5.2	Induksjon av humane lungeceller med IL-13	125
5.2.1	Proteiner involvert i kalsiumhomeostasen	126

INNHALDSFORTEGNELSE

5.2.2	Proteiner involvert i kollagensyntese	127
5.2.3	Proteiner involvert i immunresponsen	128
5.2.4	Cadheriner og integriner.....	129
5.2.5	Proteiner involvert i dannelsen av stressfibre	130
5.2.6	Proteiner involvert i metabolisme	131
5.2.7	Diverse proteiner	132
5.2.8	Protein uten kjent funksjon	133
5.2.9	Interaksjonsanalyse	133
5.2.10	Oppsummering	136
6	VIDERE ARBEID	139
7	REFERANSER	140
8	APPENDIKS	150

SAMMENDRAG

Astma er en alvorlig lungesykdom som antas å ramme rundt 300 millioner mennesker verden over og det er stadig flere som får det. Sykdommen er kronisk og svært kostbar for samfunnet.

Acidic mammalian chitinase (AMCase) er et humant enzym som kan bryte ned det uløselige karbohydratet kitin. Det er påvist en økning av AMCase i lungeceller hos astmapasienter. AMCase produseres av epitelceller og makrofager, og induserer en produksjon av kjemokiner. Disse kjemokinene fører til en økt rekruttering av T-celler, eosinofiler og makrofager til lungene og fører til at inflammasjon og hypersensitivitet i luftveiene øker.

For å lære mer om hvordan AMCase binder til substrat og inhibitor, i tillegg til å lære mer om enzymets eventuelle prosessivitet, er det nødvendig med en rekombinant villtype av AMCase som kan dyrkes opp i store mengder, samt ulike seterettede mutanter av enzymet.

I denne oppgaven har det blitt laget to plasmider hvor tryptofanresiduer i subsete – 1 og + 3 har blitt byttet ut med alaninresiduer. Dette fører til en endring i det substratbindende setet til AMCase. Det har også blitt laget et plasmid hvor den katalytiske syren glutamat har blitt byttet ut med glutamin, slik at substrathydrolyse ikke lenger er mulig. Villtype-AMCase og én av mutantene (W99A) har blitt dyrket opp og AMCase-protein har blitt produsert.

Ved å indusere lungeepitelceller med IL-13 utvikler cellene en astmaliknende respons. Lungecellene ble dyrket i lett og tungt SILAC-medium og analysert ved hjelp av Orbitrap massespektrometri.

I to paralleller ble det funnet til sammen 2150 identifiserte proteiner, hvorav 15 var opp- og 22 nedregulerte med en Benjamini-Hochberg korrigerert p-verdi på mindre enn 1 %. Det var kun to proteiner som ble funnet i begge parallellene.

Det ble funnet en rekke signifikant regulerte proteiner som viste en sammenheng med astma. Flere proteiner som er involvert i kalsiumhomeostase, kollagensyntese, metabolisme og immunrespons ble funnet. Disse deltar i blant annet celledisregulering og endring av celler og vev i luftveiene. Det ble også funnet noen proteiner som tar del i samme reaksjonsvei. Det ble for eksempel funnet to proteiner som deltar i "hematopoietic cell lineage", en reaksjonsvei som fører til at granulocytter, monocytter/makrofager, T-celler og B-celler blir produsert av hematopoietiske stamceller.

ABSTRACT

Asthma is a serious lung disease that affects approximately 300 million people worldwide. The disease is chronic and very costly for the community.

Acidic mammalian chitinase (AMCase) is a human enzyme that is capable of degrading the insoluble carbohydrate chitin. An increased amount of AMCase is shown in the lung cells of asthmatic patients. The great producers of AMCase are epithelial cells and macrophages. AMCase induces the production of chemokines which recruit T cells, eosinophils and macrophages to the lungs. This leads to an increased inflammation and hypersensitivity of the airways.

To learn more about how AMCase binds to substrates and inhibitors, in addition to learning more about any processivity AMCase might have, it is necessary to have recombinant wild type AMCase that can be produced in a large quantum, as well as different site-directed mutants of the enzyme.

In this thesis two plasmids has been made where tryptophan residues in subsites – 1 and + 3 were replaced with alanine residues. This leads to a change in the substrate binding site. Another plasmid was made where the catalytic acid glutamic acid 140 was replaced with glutamine. This leads to an inefficient substrate hydrolysis. Wild type and W99A have been cultured and AMCase protein has been produced.

By inducing epithelial lung cells with interleukin-13, the cells will develop an asthma-like response. Lung cells were cultured in light and heavy SILAC media and analyzed with Orbitrap mass spectrometry.

In two parallels there were found 2150 identified proteins. 15 of these were upregulated and 22 were downregulated with a Benjamini-Hochberg corrected p-value set to 1 %. Only two proteins were found in both parallels.

ABSTRACT

Several significantly regulated proteins were found that might have an importance in human asthma. There were found several proteins that were involved in calcium homeostasis, collagen synthesis, metabolism and immune responses. These are involved in a number of processes, including cell signaling and airway remodeling. There were also found some proteins that were involved in the same pathways. Two proteins involved in the hematopoietic cell lineage were found. This is a pathway that leads to the production of granulocytes, monocytes/macrophages, T cells and B cells from hematopoietic stem cells.

FORKORTELSER

°C	Grader (celsius)
4-MU	4-methylumbelliferon
4-MU-(GlcNac) ₂	4-methylumbelliferyl-β-D-N,N'-diacetylchitobiose
µg	Mikrogram
µl	Mikroliter
A	Alanin
AcN	Acetonitril
Ambic	Ammoniumbikarbonat
AMCase	Acidic mammalian chitinase
AOX	Alkohol oksidase
BALF	Væskeprøve tatt fra bronkier
BMGY	Buffered glycerol-complex medium
BMMY	Buffered methanol-complex medium
Bp	Basepar
BSA	Bovine serum albumin
Da	Dalton
ddNTP	Dideoksynukleotid trifosfat
dNTP	Deoksynukleotid trifosfat
DTT	Dithiothreitol
E	Glutamat
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
EtBr	Etidiumbromid
HCHT	Human chitotriosidase
IAA	Iodoacetamid
IgE	Immunoglobulin E
Kb	Kilobase

FORKORTELSER

kDa	Kilodalton
LC	Væskekromatografi
LTQ	Linear trap quadropole – ionefelle
MM	Minimal methanol
MD	Minimal dextrose
MS	Massespektrometri
MWCO	Molecular weight cut off
Ng	Nanogram
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PTM	Posttranslasjonelle modifiseringer
Q	Glutamin
Rcf	Relative centrifugal force
Rpm	Revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SILAC	Stable Isotopic Labeling by Amino Acids in Cell Culture
TFA	Trifluoro acetic acid
T _H 2-celler	T-hjelper 2-celler
Trp	Tryptofan
V	Volt
YNB	Yeast nitrogen base
W	Tryptofan

1 INTRODUKSJON

1.1 Forekomst av astma

Astma er en svært alvorlig, kronisk lungesykdom som kjennetegnes av gjentatte episoder med tungpustethet, hvesing, tetthet i brystet og hosting (Hammad & Lambrecht 2008).

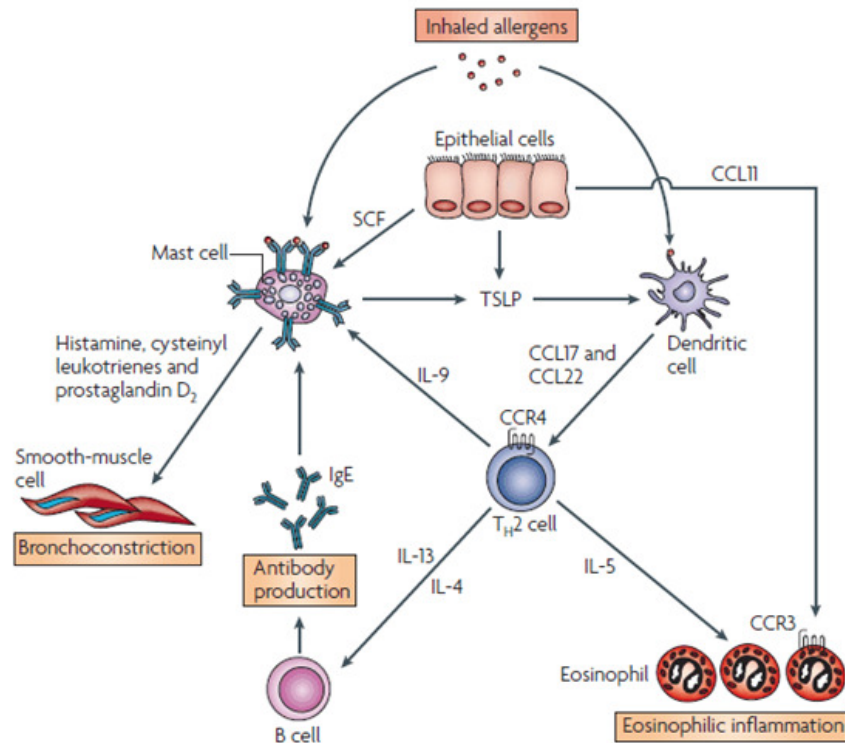
Forekomsten av astma er økende. Flere gutter enn jenter får sykdommen før 10-års alder, og omtrent 10 % av befolkningen vil på et tidspunkt i livet ha astma. Mange er ikke engang klar over at de lider av sykdommen og oppsøker derfor heller ikke lege for å få behandling (Nhi.no 2002).

Astma forekommer i alle aldre. Omtrent 50 % av barn med astma blir kvitt sine plager omkring pubertetsalder (Allergiviten.no 2005). Det er vanskelig å vite nøyaktig hvor mange som lider av denne sykdommen; da det ofte brukes spørreundersøkelser som diagnoseverktøy. Formuleringen av spørsmålene kan variere mye mellom undersøkelser og ha en avgjørende rolle i hvilke svar de spurte gir (Nystad 1999). Det antas likevel at omtrent 300 millioner mennesker verden over lever med astma. Innen 2025 antas det at 400 millioner mennesker vil lide av denne lungesykdommen. Mange astmatikere trenger kontinuerlig medisinsk hjelp og er derfor en enorm økonomisk byrde, både med hensyn til medisinske utgifter og sykemeldinger. Astma er ingen livstruende sykdom, men har trolig en avgjørende rolle i 1 av 250 dødsfall verden over (Shuhui et al. 2009).

1.2 Mekanismen til astma

Astma er en sykdom som karakteriseres av inflammasjon i luftveiene, overdrevet utskillelse av slim og økende innsnevring av bronkiene (Shuhui et al. 2009). Denne inflammasjonen styres av en økende ekspresjon av flere inflammatoriske proteiner, inkludert cytokiner, kjemokiner, adhesjonsmolekyler og reseptorer. Akutte anfall oppstår når intensiteten av inflammasjonen øker. Astmatiske symptomer oppstår ofte ved inhalering av irritanter, allergener eller kald luft, eller ved trening (Barnes 2008b).

Ved en astmatisk respons vil inhalerte allergener bli gjenkjent av immunsystemets celler og indusere en immunrespons (figur 1.1). De viktigste immuncellene som er deltagende i en astmatisk respons forklares i avsnitt 1.2.1.



Figur 1.1: Inflammatoriske celler og immunceller involvert i astma. Inhalerte allergener aktiverer mastceller ved å kryssbinde immunglobulin E (IgE)-molekyler på overflaten. Dette frigjør flere bronkiesammentrekkende mediatorer som histaminer, leukotriener og prostaglandiner. Epitelceller frigjør en stamcellefaktor (SCF) som er nødvendig for å opprettholde mastceller ved luftveienes overflate. Allergener blir behandlet av dendrittiske celler som er avhengige av tymisk stromalt lymfopoietin (TSLP), som skilles ut av epitelceller og mastceller, for å frigjøre kjemokinene CC-kjemokin ligand 17 (CCL17) og CCL22. Disse kjemokinene virker på CC-kjemokinreseptor 4 (CCR4) for å tiltrekke T-hjelper 2 (T_H2)-celler. T_H2-celler har en sentral rolle i dirigeringen av inflammatoriske responser ved å frigjøre interleukin (IL)-4 og IL-13, som stimulerer B-celler til å produsere IgE, IL-5 som er nødvendig for eosinofil inflammasjon og IL-9, som stimulerer mastcellenes celledeling. Epitelceller frigjør CCL11 som rekrutterer eosinofiler via CCR3 (Barnes 2008b).

Det finnes to typer astma, hvor atopisk astma er den vanligste formen. Atopisk astma kjennetegnes ved at pasienten har en allergisk inflammasjon. Immunglobulin E (IgE) er til stede ved eksponering for vanlige allergener (Barnes 2008b). IgE er et antistoffmolekyl som er virksomme ved betennelsesreaksjoner. IgE kan binde seg til overflaten av mastceller og basofile granulocytter, da disse har en egen reseptor for IgE. Dersom IgE-molekyler kryssbindes, for eksempel ved binding av antigen, vil det kunne føre til aktivering av cellene, fulgt av en frigjøring av betennelsesfremkallende stoffer som histamin, serotonin, ulike cytokiner og forbindelser med kjemotaktiske egenskaper (figur 1.1) (Lea 2006).

Omtrent 5 % av alle pasienter med astma lider av ikke-atopisk astma. Inflammasjonen i bronkiene er lik den ved atopisk astma, men for pasienter med ikke-atopisk astma kan vanlige medisiner være ineffektive og det vil være nødvendig med nye terapeutiske behandlingsmetoder (Barnes 2008b).

Hos friske personer vil antigenet oppfattes som ufarlig og dermed ikke sette i gang en immunologisk respons (Lea 2006).

1.2.1 Immunforsvaret

Det humane immunforsvaret kan deles i to; det medfødte og det adaptive immunforsvaret. Den medfødte immunresponsen består av blant annet komplementproteiner, akutt fase-reaktanter, cytokiner, naturlige drepeceller og fagocytter og har evnen til å reagere raskt på egenskaper som er felles for mange mikroorganismer. Adaptiv immunrespons består blant annet av antistoffer, cytokiner, B-celler, T-hjelperceller (T_H -celler), T-drepeceller og regulatoriske T-celler. Den adaptive immunresponsen bruker tid på å utvikle seg for å respondere på strukturer som er unike og karakteristiske for hver enkelt bakterie eller virus (Lea 2006).

Astma er forbundet med en økning i T-hjelper 2 (T_H2)-celleresponsen. En liknende T_H2 -respons er også sett ved parasittiske infeksjoner (Zhu et al. 2004). Det antas derfor at T_H2 -inflammasjonen oppstod for å hankses med parasitter og at atopisk astma dermed oppstod som en konsekvens av dårlig kontrollerte T_H2 -respons, fremprovosert uavhengig av en parasittisk infeksjon (Elias et al. 2005).

En T_H2 -celle er en $CD4^+$ T-celle som gjennom å produsere interleukin (IL)-4, IL-13 og andre cytokiner, kan hjelpe B-celler med å produsere IgE og andre antistoffer, og som gjennom utskillelse av blant annet IL-5 og IL-13 kan fremme en økning av eosinofiler, basofiler og mastceller (Hammad & Lambrecht 2008). T-celler produseres i beinmargen av stamceller som differensieres. T-cellene forflytter seg til thymus for å utvikle seg til høyt spesialiserte celletyper. Her utstyres de med reseptorer for antigen og sendes ut i blod- og lymfesystemet (Lea 2006). Dette er celler som er involvert i den humorale delen av immunforsvaret (Hammad & Lambrecht 2008) som er ansvarlig for alle celler som skiller ut løselige forbindelser og dermed påvirker immunsystemet (Lea 2006). Det kan derfor se ut som at cytokiner produsert av T_H2 -celler har en fordelaktig virkning i den adaptive delen av immunforsvaret ved en parasittisk infeksjon. Ved en for høy produksjon av disse cytokinene vil de kunne bidra til en astmatisk inflammasjon (Zhu et al. 1999).

T_H1 -celler er $CD4^+$ T-celler som har differensiert til cytokinproduserende celler som fremmer cellemediert immunitet (Barnes 2008b). T_H2 -celleresponsen motvirker T_H1 -celleresponsen. En ubalanse mellom T_H1 - og T_H2 -celleresponser antas å være medvirkende i patogenesen til ulike infeksjoner, allergiske responser og autoimmune sykdommer. Hos pasienter med astma øker antallet T_H2 -celler i luftveiene, mens det hos personer uten astma er overveiende T_H1 -celler i luftveiene (Barnes 2008b).

B-lymfocytter er celler som produseres i beinmargen, av stamceller som differensierer. Her utvikles cellene og får reseptorer for antigener før de sendes ut i blod- og lymfesystemet (Lea 2006). De har viktige roller i allergiske sykdommer, inkludert astma, gjennom frigjøring av IgE. IL-4 og IL-13 induserer B-cellene til å produsere IgE gjennom et immunglobulinklasseskifte (Barnes 2008b). Ustimulerte B-celler uttrykker kun monomert IgM og IgD i membranen. Ved stimulering av B-cellene vil det kunne foregå et skifte til produksjon av andre immunglobulinklasser (Lea 2006).

Dendritiske celler

Dendritiske celler finnes i blod, lymfoide organer og i annet kroppsvev. De kan være relativt stasjonære, men de har også evnen til å bevege seg dersom de blir aktivert. Dendritiske celler kan bli aktivert ved å komme i kontakt med invaderende mikroorganismer, eller ved en pågående betennelsesprosess. Da vil de dendritiske cellene bringe med seg informasjon i form av forskjellige forbindelser fra inhalerte allergener, og via lymfeåresystemet, bevege seg til en nærliggende lymfeknute. Her vil de sørge for at medbrakt informasjon blir presentert for T-cellene (Lea 2006). Dendritiske celler har dermed en viktig rolle i astma ved å fungere som regulatorer av T_H2 -celler (Barnes 2008b).

Granulocytter

Eosinofiler, basofiler og nøytrofiler går under fellesbetegnelsen granulocytter. Dette er celler som inneholder store vesikler fylt med ulike proteolytiske enzymer og en rekke forbindelser med sterkt steriliserende effekt (Lea 2006).

Nøytrofile og eosinofile granulocytter finnes hovedsakelig i blodbanen, men dersom en infeksjon oppstår, vil de raskt bevege seg til infeksjonsområdet ved at de tiltrekkes av lavmolekylære forbindelser som dannes på betennelsesstedet. Ved ankomst vil de fagocyttere mikroorganismer eller annet som er ansvarlig for infeksjonen (Lea 2006).

Basofile granulocytter uttrykker reseptorer for IgE på overflaten sammen med membranbundet IgE. Aktivering av basofiler resulterer i frigjøringen av en mengde potensielle mediatorer, inkludert cytokiner som IL-4 og IL-13 (Macfarlane et al. 2000).

Basofiler sirkulerer i blodbanen og finnes normalt ikke i friskt vev, men rekrutteres inn i vevet ved en immunologisk respons. Basofiler, i likhet med andre granulocytter, mangler evnen til celledeling og antas å gjennomgå apoptose etter at jobben de ble rekruttert til er gjort (Galli et al. 2005).

Inflammasjonen i astma betegnes ofte som eosinofil. Dette er fordi det i astma skiller ut eosinofile kjemotaktiske faktorer av epitelceller i luftveiene. Den funksjonelle rollen til eosinofiler er ennå ikke klar (Barnes 2008b).

Mastceller

Mastceller er en nær slektning av basofile granulocytter, men i motsetning til basofilene, finnes mastcellene i vevet. I likhet med basofilene, har også mastcellene overflatereseptorer for IgE. Mastcellene spiller en sentral rolle ved betennelsesreaksjoner og i utviklingen av øyeblikkelige hypersensitivitetsreaksjoner. Når mastcellene blir aktivert vil de frigjøre en rekke forbindelser med kraftig virkning, både lokalt i vevet og systemisk (Lea 2006).

Mastcellene frigjør flere forbindelser som fører til en sammentrekning av bronkiene. Disse forbindelsene er agenter som induserer en sammentrekning av den glatte muskulaturen i luftveiene. Dette fører til at det blir vanskelig å puste. Når de ulike forbindelsene frigjøres, vil de gi en variabel sammentrekning av bronkiene, ettersom de frigjøres av diverse triggere, blant annet allergener. Mastcellene frigjør også flere cytokiner, blant annet IL-4, IL-5 og IL-13, som har viktige roller i allergiske inflammasjoner (Barnes 2008b).

Makrofager

Makrofager er celler som fjerner mikroorganismer og døde celler ved å omslutte dem og bryte dem ned ved hjelp av fordøyelsesenzymmer som proteaser og glukosidaser (Lea 2006). Antallet makrofager øker i lungene hos personer med astma. Disse makrofagene kommer fra sirkulerende monocytter i blodbanen som migrerer til lungene som et svar på kjemoattraktanter (Barnes 2008b). Makrofager initierer det medfødte immunforsvaret ved å gjenkjenne patogener, fagocyttere dem og skille ut inflammatoriske formidlere (Ozinsky et al. 2000).

Økt rekruttering av makrofager under en astmatisk prosess kan resultere i en akkumulering av makrofager i vevet. Disse aktiveres av T_H2 -cytokiner og fører til en T_H2 -polarisert reaksjon og inflammasjon (Gordon 2003). Rekrutterte lungemakrofager har dermed potensialet til å fremme en astmatisk utvikling. Makrofager kan ha en proinflammatorisk effekt, siden de kan fremme en eosinofil inflammasjon i luftveiene og bli stimulert av allergener til å produsere proinflammatoriske cytokiner (Song et al. 2008). Andre studier har derimot vist det motsatte. Her vises det at makrofager er avgjørende for en nedregulering av allergisk astma. Makrofager kan ha en hemmende effekt på T_H2 -celler ved å aktivere T_H1 -celler og produsere regulatoriske faktorer (Vissers et al. 2005).

Vanskeligheten med å belyse rollen til lungemakrofager i astma kan skyldes makrofagenes heterogenitet og plastisitet (Song et al. 2008).

1.2.2 Airway remodeling

Hos astmatikere endres strukturen til lungene. Dette kalles "airway remodeling" og omfatter endringer i celler og vev hos astmatikere som ikke finnes i celler og vev hos friske personer. Disse endringene inkluderer en økning i størrelse og antall av glatte muskelceller i bronkiene og en økning av myofibroblaster som er produsenter av både kollagene og ikke-kollagene matriksmolekyler. En økt avleiring av kollagen er en følge av at det dannes flere myofibroblaster. Dette fører til en fortykning av veggene i luftveiene. Dette bidrar til at bronkiene trekker seg sammen og at luftveiene blir trangere (Elias 2000).

Ved normale omstendigheter danner epitelcellelaget i luftveiene en høyt regulert og nesten ugjennomtrengelig barriere. Ved astma blir epitelet skjørere og permeabiliteten øker, noe som fører til at allergener lettere trenger gjennom (Buc et al. 2009).

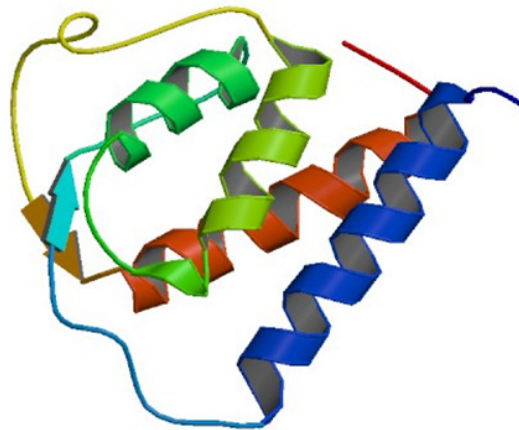
1.3 Cytokiner

Cytokiner er en gruppe løselige signalmolekyler som virker som kjemiske kommunikasjonsmidler mellom celler. De kan deles inn etter funksjon og struktur. Det finnes for eksempel interferoner, interleukiner og kolonistimulerende faktorer. Det er i hovedsak $CD4^+$ T_H -celler som er de store cytokinprodusentene blant blodcellene (Lea 2006).

Cytokiner har en sentral rolle som dirigenter av den kroniske inflammasjonen og de strukturelle endringene i luftveiene som oppstår ved astma. Dette gjør de ved å rekruttere, aktivere og fremme levedyktigheten til en rekke inflammatoriske celler i luftveiene. Mer enn 50 cytokiner har blitt identifisert i luftveissykdommer (Barnes 2008a). Noen cytokiner som har en innvirkning på astma er IL-13, IL-4 og IL-5. Genene som koder for disse er lokalisert på kromosom 5q31 hos mennesker (Kasaian & Miller 2008).

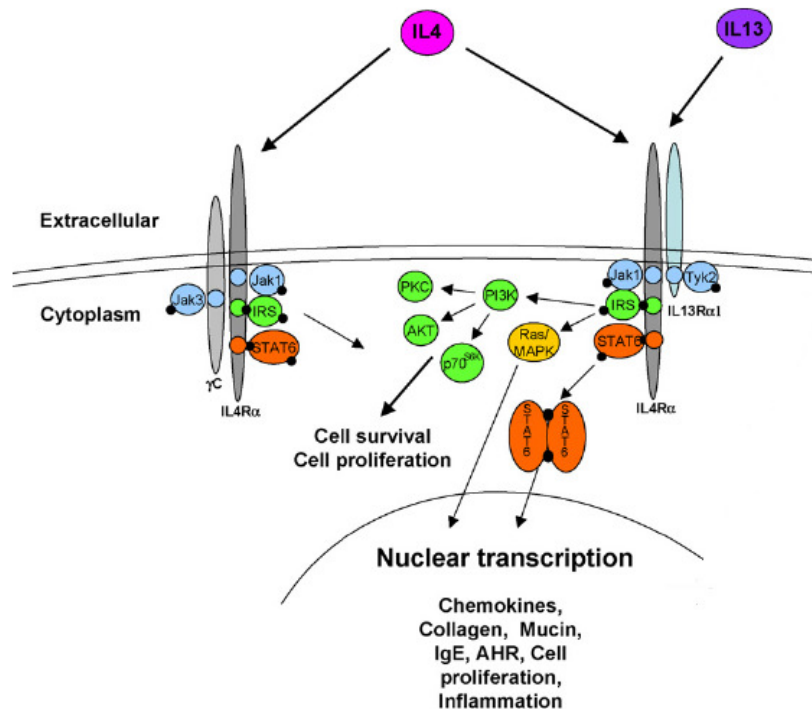
1.3.1 Interleukin-13

IL-13 er et 113 basepar (bp) stort cytokin bestående av fire α -helikser (figur 1.2) som syntetiseres av aktiverte $CD4^+$ - og $CD8^+$ -T-celler. En økt ekspresjon av IL-13 mRNA har blitt påvist i slimhinnene i luftveiene hos pasienter med både atopisk og ikke-atopisk astma (Chung & Barnes 1999).



Figur 1.2: Humant IL-13 (1IJZ). IL-13 består av 113 basepar og fire α -helikser. (Bildet er hentet fra www.pdb.org.)

IL-13 har en bioaktivitet som virker gjennom et reseptorkompleks bestående av to reseptormolekyler, IL-13R α 1 og IL-4R α (figur 1.3). IL-13 binder til IL-13R α 1/IL-4R α -reseptorkomplekset som finnes på overflaten til blant annet B-celler, monocytter og epitelceller. Heterodimeriseringen av IL-13R α 1 og IL-4R α på celleoverflaten setter i gang en signalisering av IL-13 via rekruttering av tyrosin kinaser som fører til en fosforylering av STAT6, et protein som er ansvarlig for signaloverføring og aktivering av transkripsjon. STAT6 forflytter seg til kjernen hvor den er med på å aktivere transkripsjon av en rekke gener. Dette fører til IgE-produksjon, eosinofili og hypersensitivetsreaksjoner i luftveiene. I astmamodeller hos mus er det vist at de som mangler STAT6 ikke utvikler hypersensitivitet og inflammasjon i luftveiene (Kasaian & Miller 2008).



Figur 1.3: Binding av IL-13 til IL-4Rα/IL-13Rα1-reseptorkomplekset aktiverer fosforyleringen av tyrosinkinase Jak 1 og Tyk 2. Disse fører til fosforyleringen av tyrosinresiduer på IL-4Rα-kjeden (vist med små, sorte prikker). Disse fosforylerte residuene rekrutterer insulinreseptorsubstrat (IRS) og "signal transducer and activator of transcription 6" (STAT6). Dette medfører at også disse blir fosforylert. IRS aktiverer ulike kinaser (PI3K, PKC, AKT og p70S6K) som fører til økt celledeling og bedrer cellenes evne til overlevelse. Fosforylert STAT6 dimeriserer og forflytter seg til kjernen, hvor den aktiverer transkripsjonen av en rekke gener. Dette fører til IgE-produksjon, eosinofili og hypersensitivetsreaksjoner i luftveiene (Kasaian & Miller 2008).

IL-13 regulerer ekspresjonen av en rekke gener i inflammatoriske og strukturelle målceller; som glatte muskelceller i luftveiene, makrofager og epitelceller. Den inflammatoriske responsen styres av evnen IL-13 har til å stimulere produksjonen av et stort antall kjemokiner som rekrutterer inflammatoriske celler til lungene (Elias et al. 2003).

I systemer hos gnagere har det blitt vist at blokkering av IL-13 effektivt begrenser astmatiske responser. En rekke monoklonale antistoff som er rettet mot IL-13, er under utvikling for behandling av astma (Kasaian & Miller 2008).

1.3.2 Interleukin-4

IL-4 uttrykkes av CD4⁺- og CD8⁺-T-celler, eosinofiler og mastceller ved både atopisk og ikke-atopisk astma. Et økt antall T-celler som uttrykker IL-4 mRNA er påvist i bronkoalveolene etter et allergenangrep (Chung & Barnes 1999).

IL-4 spiller en viktig rolle i differensieringen av T_H2-celler. Ved å fremme produksjonen av T_H2-celler blir produksjonen av T_H1-celler inhibert. Dette fører til en ytterligere forverring av den astmatiske responsen (Barnes 2008a). IL-4 har også en viktig rolle i aktiveringen av B-celler. Den fremmer immunoglobulinsyntesen til B-celler og bidrar til at B-cellenes produksjon av IgG endres til IgE (Chung & Barnes 1999).

Både IL-4 og IL-13 virker via IL-4R α /IL-13R α -reseptorkomplekset (figur 1.3). Fordi IL-4 i tillegg kan binde seg til reseptorkomplekset IL-4R α / γ , har denne flere andre aktiviteter som ikke er felles med IL-13. Dette inkluderer blant annet modning av T-celler og fører til en økt dannelse av T_H2-celler (Kasaian & Miller 2008).

1.3.3 Interleukin-5

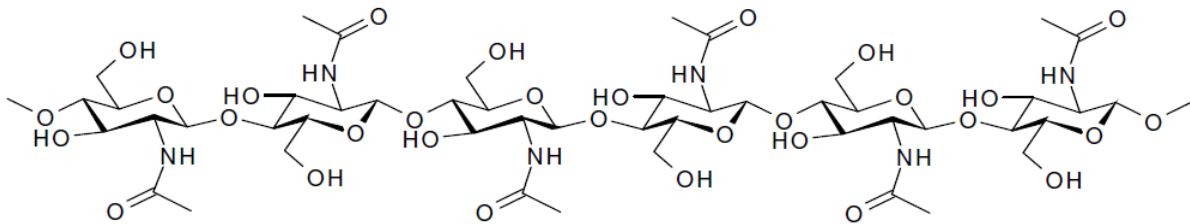
IL-5 produseres av T_H-celler. Det er påvist en økt ekspresjon av IL-5 mRNA i CD4⁺-T_H-celler i luftveiene hos astmatikere (Chung & Barnes 1999), men også i blære, hud, hjerte og tarmen under en eosinofil, inflammatorisk reaksjon (Collins et al. 1995).

IL-5 regulerer spredningen, differensieringen og aktiveringen av eosinofiler. IL-5 er ansvarlig for en rask mobilisering av eosinofiler fra ryggmargen til områder hvor den allergiske inflammasjonen er, ved hjelp av blant annet kjemokiner som eotaxin (Zhang et al. 1999).

Hos forsøksdyr kan blokkerende antistoffer som er spesifikke for IL-5 redusere antallet eosinofiler i lungene og inhibere allergenresponser. Hos mennesker reduseres antallet sirkulerende eosinofiler, men det er ingen endring i allergenresponsen. Dette kan skyldes at antistoffene ikke eliminerer eosinofilene fullstendig (Barnes 2008a).

1.4 Familie 18 glykosyl hydrolaser

Kitin er den nest mest forekomne polymeren i naturen, etter cellulose. Kitin er et lineært polysakkarid bestående av N-acetyl-D-glukosaminer (GlcNAc) som er bundet sammen med $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidbindinger (Shuhui et al. 2009) (figur 1.4).



Figur 1.4: Kitin er en uløselig homopolymer av GlcNAc-residuer. GlcNAc-enhetene er rotert 180° relativt til hverandre. Figuren er laget av Morten Sørli ved hjelp av ISIS Draw.

Kitin finnes blant annet i celleveggen hos sopp, i eksoskjelettet til krabber, reker og insekter og i spiserøret hos mange insekter (Boot et al. 2001).

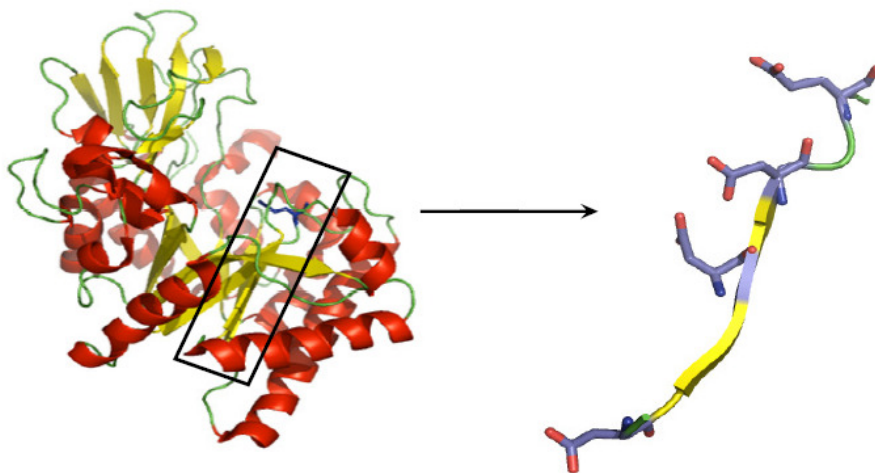
Familie 18 glykosyl hydrolaser er en fellesbetegnelse på enzymer som katalyserer hydrolyse av glykosidbindinger og omfatter familie 18-kitinaser. Disse kitinasene katalyserer hydrolyse av $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidbindinger som finnes i kitin (Elias et al. 2005).

Kitinaser produseres hos organismer som beskyttelse mot patogener som inneholder kitin og utgjør i disse tilfellene en viktig del av det medfødte immunforsvaret (Elias et al. 2005). Hos organismer som har et ytre lag bestående av kitin er det viktig å kunne bryte ned kitin ved vekst og død. Hos organismer som spiser kitinholdig mat er kitinase viktig for å kunne bryte ned kitinet til metabolitter som kan absorberes og dermed utnyttes energimessig (Shuhui et al. 2009).

Kitinaser kan bli klassifisert som endo- eller ekso-kitinaser. Endo-kitinaser kutter kitin tilfeldig ved interne seter. Ekso-kitinaser katalyserer hydrolyse av kitin progressivt fra enten den reduserende eller ikke-reduserende enden (Chou et al. 2006).

Pattedyr produserer ikke kitin og er heller ikke avhengige av kitin som energikilde. Det har derfor lenge vært trodd at pattedyr mangler kitinaser. Nyere forskning utført hos mennesker og gnagere viser derimot at dette ikke stemmer. Hos begge grupper har det blitt funnet både kitinaser med kitinolytisk aktivitet og kitinase-liknende proteiner (Elias et al. 2005). Det humane genomet koder for åtte familie 18-kitinaser (Jollès & Muzzarelli 1999). To av disse har kitinolytisk aktivitet; human chitotriosidase (HCHT) og AMCase (Shuhui et al. 2009).

Felles for alle glykosyl hydrolaser er at de som regel består av flere domener; ett katalytisk domene og ett eller flere ikke-katalytiske domener. De ikke-katalytiske domenene kan ha en substratbindende funksjon som bidrar til en mer effektiv hydrolyse (Davies & Henrissat 1995). Det katalytiske domenet består blant annet av et aktivt sete med et konservert motiv, DXXDXDXE, som finnes på β -strand 4 (figur 1.5) (Aronson et al. 2006).



Figur 1.5: Krystallstruktur av HCHT (venstre) med et utsnitt av β -strand 4 (høyre) med det konservative DXXDXDXE-motivet til familie 18-kitinaser (Fusetti et al. 2002).

Det aktive setet består av flere subseter hvor karbohydrater kan binde. Subsetene nummereres fra $-n$ til $+n$, hvor $-n$ representerer den ikke-reduserende enden og $+n$ den reduserende enden av sukkeret. Glykosidbindingen til substratet kuttet alltid mellom subsetene $+1$ og -1 . De resterende subsetene binder substratet og hjelper til med å stabilisere konformasjonsendringer (Davies & Henrissat 1995).

1.4.1 Human chitotriosidase (HCHT)

HCHT er én av to aktive humane familie 18-kitinaser. Human HCHT har 57 % sekvenslikhet med human AMCase og basert på krystallstruktur antas det at den er en endo-kitinase (Chou et al. 2006).

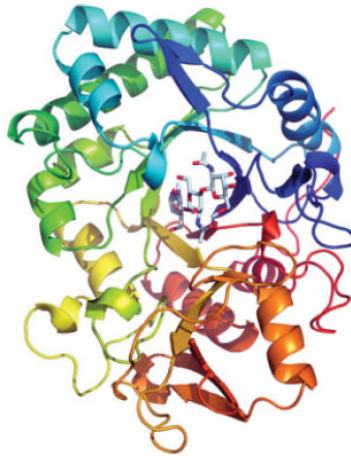
HCHT ble først oppdaget i plasma hos mennesker som lider av Gauchers sykdom, da det ble påvist en stor økning av HCHT-aktivitet i plasma hos disse pasientene (Hollak et al. 1994). Enzymet uttrykkes i modne makrofager og er senere blitt assosiert med flere lysosomale sykdommer, kroniske betennelsestilstander og malaria (Kzhyshkowska et al. 2007).

Den humane kitinasen kan inhibere patogene sopper og det kan derfor tyde på at enzymet er en del av menneskers medfødte immunforsvar (van Eijk et al. 2005).

Kitinasen kan opptre i to ulike isoformer; 39 kDa med et isoelektrisk punkt (pI) lik 8 og 50 kDa med pI lik 7,2. 50 kDa-isoformen kan ved posttranslasjonelle modifikasjoner omdannes til 39 kDa-isoformen (Renkema et al. 1995). 39 kDa-formen har kitinolytisk aktivitet og det tyder på at den 50 kDa store isoformen i tillegg har et kitinbindende domene (Fusetti et al. 2002).

1.4.2 Acidic mammalian chitinase (AMCase)

AMCase er et 50 kDa stort mammalsk protein som består av et 39 kDa N-terminalt katalytisk domene (figur 1.6) og et C-terminalt kitinbindende domene som holdes sammen av en hengselsregion (Boot et al. 2001). Enzymet er syrestabilt og har kitinasebioaktivitet (Elias et al. 2005). Hos mus er det påvist et pH-optimum på 2.0 og et annet pH-optimum rundt 3-6. Hos mennesker er derimot p_Hen ~ 4-5. Det er vist en sekvenslikhet på 82 % mellom AMCase hos mus og AMCase hos mennesker (Chou et al. 2006). AMCase ble først identifisert hos mus på grunn av deres lave pH som skilte seg betydelig fra p_Hen til HCHT (Boot et al. 2001).



Figur 1.6: Det katalytiske domenet til AMCase består av 395 aminosyrer. Metylallosamidin vises i midten. En disulfidbinding mellom Cys49 og Cys349 kobler sammen den C-terminale enden (i rødt) med den N-terminale enden (i blått). Det katalytiske domenet består av en TIM-barrel struktur (Olland et al. 2009).

Human AMCase antas å være en ekso-kitinase, da det ser ut til at enzymet gjenkjenner og kutter kitoooligosakkaridsubstrater fra den ikke-reduserende enden og gir disakkarid- og trisakkaridenheter som produkt (Chou et al. 2006).

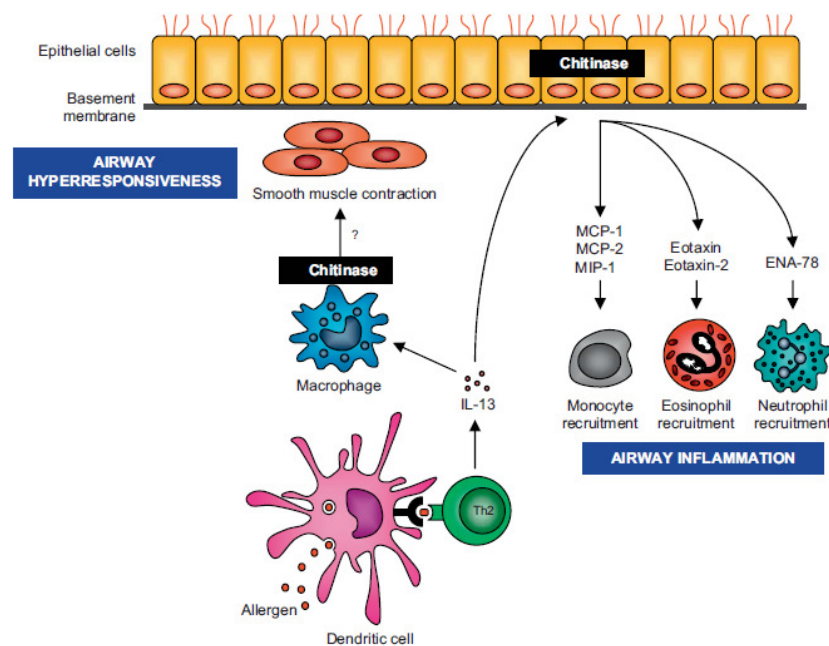
AMCase finnes i store mengder i magen og tarmene, og i en mindre grad i lungene, leveren, blodplasma og på tungen hos mennesker og gnagere (Boot et al. 2001). Kitinaser finnes ofte ved steder i kroppen hvor en inflammasjon har oppstått, for eksempel etter en parasittisk infeksjon. Dette tyder på at mammalske kitinaser spiller en vesentlig rolle i forsvaret mot parasitter og infeksjoner i kroppen (Elias et al. 2005).

1.4.3 Sammenheng mellom AMCase og astma

Lungeceller hos personer med astma inneholder betydelige mengder AMCase, mens det hos friske personer ikke er detekterbare mengder av enzymet (Elias et al. 2005).

Ved en parasittisk infeksjon vil immunresponsen hos en vert først inkludere det medfødte immunforsvaret, som kontrollerer og eliminerer parasittiske infeksjoner. Over tid vil også det adaptive immunforsvaret, som kontrollerer parasitten ved hjelp av antistoff, bli inkludert (Elias et al. 2005). Som nevnt tidligere er immunresponsen mot parasitter ofte T_H2 -dominert og gir økt produksjon av IL-4, IL-5, IL-13, IgE og eosinofiler (Zhu et al. 2004).

AMCase oppreguleres som respons på T_H2 -styrt inflammasjon i lungene. IL-13 spiller en viktig rolle ved å indusere AMCase-produksjon fra epitelceller og makrofager. Dette er celler som har reseptorer for IL-13 på overflaten. AMCase induserer produksjonen av kjemokiner som fører til en økt rekruttering av T-celler, eosinofiler og makrofager til lungene og som ytterligere forverrer inflammasjonen og hypersensitiviteten i luftveiene (figur 1.7) (Kawada et al. 2007).



Figur 1.7: Rollen til AMCase i allergisk astma. T_H2 -celler frigjør IL-13 som induserer ekspresjonen av kitinase i epitelceller i luftveiene og i makrofager. Ekspresjonen av kitinase i epitelceller kan stimulere frigjøringen av monocytt kjemotaktisk protein (MCP)-1, MCP-2, makrofag inflammatorisk protein (MIP)-1 β , eotaxin, eotaxin-2 og ENA-78 som rekrutterer henholdsvis monocytt, eosinofiler og nøytrofiler til luftveiene. Dette resulterer i en inflammasjon i luftveiene. Ekspresjonen av kitinase i makrofager kan direkte fremkalle en sammentrekning av den glatte muskulaturen som fører til en innsnevring av bronkiene. Dette er et karakteristisk kjennetegn på astma (Shuhui et al. 2009).

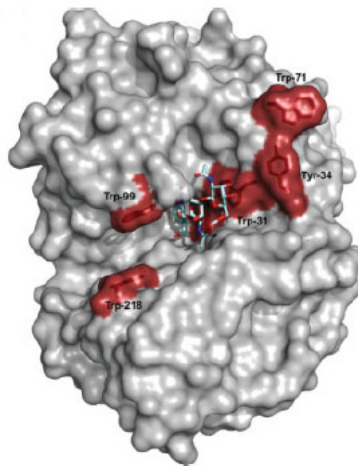
Inhibering av AMCase, for eksempel ved bruk av allosamidin eller metylallosamidin, kan hindre at IL-13-reaksjonsveier blir aktivert og at produksjonen av kjemokiner hemmes. Dette fører til en nedgang i T_H2-inflammasjonen ved astma (Kawada et al. 2007; Zhu et al. 2004).

1.4.4 Prosessivitet

Familie 18-kitinaser er designet for å bryte ned uløselige polymerer av kitin. I tillegg til det katalytiske domenet, har kitinaser ofte en eller flere karbohydratbindende moduler. Disse kan være fordelaktige for enzymaktivitet fordi de kan binde til, og av og til endre substratet (Horn et al. 2006).

Karbohydrater kan effektivt brytes ned ved prosessivitet. Det vil si at enzymet forblir bundet til substratet mellom hydrolytiske reaksjoner for å forhindre dissosiasjon fra det uløselige substratet og re-assosiasjoner mellom enkelte polymerkjeder (Horn et al. 2006). Dette reduserer antall ganger enzymet må utføre den energetisk ugunstige prosessen ved å binde til det uløselige substratet og å få tilgang til enkeltpolymerer. De substratbindende setene hos prosessive kitinaser er dekket med aromatiske residuer, spesielt tryptofanresiduer. Disse residuene antas å drive prosessiviteten ved å fungere som fleksible og hydrofobe seter hvor sukkerenhetene i kitin kan binde for å få polymerkjeden til å gli mot det katalytiske senteret. Den hydrofobe interaksjonen er ikke-spesifikk (Zakariassen et al. 2009).

En lang flate med aromatiske residuer hos AMCase, inkludert Tyr34, Trp71, Trp99, Trp218, og Trp360, fungerer som bindingssete for kitin (figur 1.8). Disse aromatiske residuene er veldig konserverte hos mange arter og antas å være viktige for prosessiv hydrolyse i AMCase (Horn et al. 2006; Olland et al. 2009).



Figur 1.8: Krystallstruktur av AMCase. De aromatiske aminosyrene som er involvert i kitinbinding er merket med rødt. Metylallosamidin vises i blått. Enhetene som korresponderer til $-n$ -subsetene vises fra venstre mot høyre. Positive subseter er mot venstre i denne figuren, med subsete +1 ved Trp99 og +2 ved Trp218 (Olland et al. 2009).

Prosessive kitinaser kan bryte ned kitinkjeder i to retninger. Noen kitinaser antas å bevege seg mot den reduserende enden på sukkeret og dermed frigjøre dimere produkter fra -1 - og -2 -subsetene. Andre kitinaser tror man beveger seg mot den ikke-reduserende enden på karbohydratet og frigjør produkter fra $+1$ - og $+2$ -subsetene (Zakariassen et al. 2009).

Mutasjoner i -3 -subsetet hos kitinase A (fra *Serratia marcescens*) fører til at prosessiviteten blir borte, mens det fortsatt er prosessiv aktivitet etter en mutasjon i -1 -subsetet. Dette tyder på at kitinase beveger seg mot den ikke-reduserende enden på substratet og frigjør produkter fra subsetene $+1$ og $+2$. Hos kitinase B (fra *S. marcescens*) forsvinner prosessiviteten ved en mutasjon i $+1$ -subsetet. Dette tyder på at kitinase beveger seg mot den reduserende enden på substratet og frigjør produkter fra subsetene -1 og -2 (Zakariassen et al. 2009).

Krystallstrukturer viser at AMCase har et tryptofan-tyrosin-tryptofan (Trp-Tyr-Trp)-motiv fra subsete -6 til -3 (figur 1.8) (Olland et al. 2009). Dette kan tyde på en nedbrytning av kitin fra den reduserende enden. Det kitinbindende domenet til AMCase derimot, befinner seg på motsatt side av Trp-Tyr-Trp-motivet og indikerer at nedbrytningen av kitin foregår fra den ikke-reduserende enden (Horn et al. 2006; Zakariassen et al. 2009).

1.5 Kloning av AMCase ved bruk av *Pichia pastoris*

1.5.1 Genkloning

Genkloning består av å lage mange identiske kopier av et ønsket DNA-molekyl ved hjelp av vektorer og restriksjonsenzymmer. Det lages da et nytt DNA-molekyl som består av et DNA-fragment som inneholder genet av interesse. Genet ”limes” fast til et annet DNA-molekyl, for eksempel et plasmid. Plasmider er små, sirkulære molekyler bestående av dobbelttrådet DNA som kan replikere på egen hånd. Plasmider finnes naturlig i bakterieceller og utgjør kun en liten del av bakteriens totale DNA (Mathews et al. 2000). Plasmider er likevel enkle å isolere fra resten av cellen på grunn av dets lille størrelse i forhold til kromosomalt DNA, som feller ut ved sentrifugering (Alberts 2008). Dette rekombinante DNA-molekylet blir så introdusert inn i en vertscelle. Etter hvert som verten vokser og deler seg blir også det rekombinante DNA-molekylet bli replikert sammen med vertscellen (Mathews et al. 2000).

1.5.2 *Pichia pastoris* som kloningsvert

Pichia pastoris er en metylotrof gjærsopp som kan metabolisere metanol som sin eneste karbonkilde. Det første trinnet i metabolismen av metanol involverer oksidasjon av metanol til formaldehyd og hydrogenperoksid ved hjelp av enzymet alkohol oksidase, AOX. Hydrogenperoksid er toksisk, så det første trinnet i metanolmetabolismen foregår derfor i en spesialisert organelle, peroksisomet. Denne organellen holder hydrogenperoksidet unna resten av cellen. Enzymet katalase finnes i peroksisomet og er ansvarlig for at hydrogenperoksid brytes ned til vann og oksygen. Noe formaldehyd forlater peroksisomet og oksideres videre for å danne karbondioksid ved hjelp av to cytoplasmatiske dehydrogenaser. Denne reaksjonen er kilden til energi for celler som vokser på metanol (Cregg et al. 2000).

De tre siste tiårene har *Escherichia coli* blitt mye brukt som en cellulær vert for proteinekspresjon. Proteiner fra eukaryote genomer krever korrekt folding og en rekke posttranslasjonelle modifikasjoner (PTM) for å bli funksjonelt. *E. coli* er en prokaryot og mangler derfor det indre maskineriet som kreves for korrekt folding av eukaryote proteiner. *P. pastoris* er en eukaryot og er derfor mulig å benytte for å produsere løselige, korrekt foldete rekombinante proteiner som har gjennomgått alle PTM som kreves for funksjonalitet. Sammenligningsstudier som har blitt gjort ved å klonere gener inn i både *E. coli* og *P. pastoris* viser at *E. coli* oftere produserer uløselige proteiner enn det *P. pastoris* gjør. *P. pastoris* er spesielt gunstig å bruke når det ønskede proteinet inneholder multiple disulfidbindinger eller krever glykosyleringer og fosforyleringer (Daly & Hearn 2005).

Det er mange fordeler ved å bruke *P. pastoris* som kloningsvert. Den er enklere å manipulere genetisk og dyrke enn celler fra pattedyr. Det er mulig å dyrke opp mye om gangen og linearisert fremmed DNA kan settes inn med høy effektivitet via homologe rekombinasjonsprosedyrer slik at det dannes stabile cellelinjer. *P. pastoris* har sterke promotorer som kan brukes til å uttrykke fremmede gener av interesse, og dermed åpne for produksjon av store mengder av et ønsket protein. Dette kan gjøres med relativt teknisk enkelhet og til en lavere kostnad enn mange andre eukaryote systemer (Daly & Hearn 2005).

Ekspresjon av fremmede gener i *P. pastoris* krever tre grunnleggende trinn: (1) insersjon av genet inn i en ekspresjonsvektor; (2) introduksjon av ekspresjonsvektoren inn i genomet til *P. pastoris*; og (3) undersøkelse av ekspresjonsstammer for å detektere det fremmede genproduktet (Cereghino & Cregg 2000).

Fremmede proteiner som uttrykkes i *P. pastoris* kan bli produsert enten intracellulært eller ekstracellulært. På grunn av stabilitet og krav til folding av proteiner, er det kun fremmede proteiner som blir utskilt av sine native verter som kan uttrykkes ekstracellulært. Det er imidlertid mulig å klonere fremmede gener inn i leserammen til sekvenser som koder for et sekresjonssignal i utvalgte vektorer. α -faktoren i pPIC9K-vektoren er et eksempel på et slikt sekresjonssignal (Cereghino & Cregg 2000).

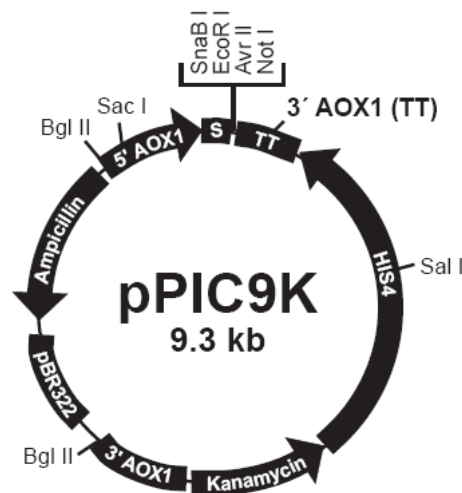
1.5.3 *Pichia pastoris* – ekspresjonsvektorer

Det finnes mange vektorer som kan brukes til å uttrykke fremmede gener i *P. pastoris*.

Vanlige vektorer er pPIC9K, pAO815 og pPIC3.5K (Invitrogen 2009). Det ønskede genet vil bli satt inn i en vektor for å få produsert fremmede proteiner ved hjelp av *P. pastoris*.

1.5.3.1 pPIC9K-ekspresjonsvektor

pPIC9K-vektoren har fire unike restriksjonssteder for kloning, *SnaB I*, *EcoR I*, *Avr II* og *Not I*, hvor et α -faktor sekresjonssignal medfører at det rekombinante proteinet blir skilt ut i supernatanten (figur 1.9). For å få et genprodukt av interesse utskilt i mediet, må genet klones inn i sekresjonssignalet leseramme (Invitrogen 2009).



Figur 1.9: pPIC9K-vektor. Figuren viser de viktigste genene vektoren har og hvor ulike restriksjonsenzymmer kutter for linearisering av vektoren (Invitrogen 2009).

pPIC9K-vektoren inneholder et kanamycinresistent gen som kan brukes til screening. I bakterieceller er vektoren resistent mot kanamycin, mens den i *P. pastoris* er resistent mot geneticin. Vektoren er 9276 basepar stort (Invitrogen 2009). Ettersom vektoren er så stor kan det være problematisk å bruke den til kloning. Integrering av så store vektorer kan føre til at transformanter blir mindre stabile (Daly & Hearn 2005).

1.5.4 *Pichia pastoris* – ekspresjonsstammer

Alle *P. pastoris*-ekspresjonsstammer er derivater av NRRL-Y 11430 (Northern Regional Research Laboratories, Peoria IL) (Li et al. 2007). Noen har mutasjoner i ett eller flere auxotrofe gener. Dette er gener som mangler evnen til å lage ett eller flere næringsstoffer og disse kan da brukes til selektering av ekspresjonsvektorer som inneholder det fremmede genet ved transformasjon. Før transformasjon kan alle *P. pastoris*-stammene vokse på et komplekst medium, men de krever supplementering av passende næringsstoffer for vekst på minimalt medium (Cereghino & Cregg 2000).

1.5.4.1 *KM71-ekspresjonsstamme*

De fleste *P. pastoris*-ekspresjonsstammene er villtype med hensyn til hvor fort metanol brytes ned (Mut^+ , methanol utilizing plus fenotype). Det er to gener hos *P. pastoris* som koder for alkohol oksidase; *AOX1* og *AOX2*. *AOX1*-genet er ansvarlig for majoriteten av alkohol oksidaseaktiviteten i cellen. Ekspresjon av *AOX1*-genet er meget strengt regulert og induseres av metanol i store mengder (Cregg et al. 2000). Stammer med slettede *AOX*-gener kan noen ganger være bedre produsenter av fremmede proteiner enn villtypen, Mut^+ (Li et al. 2007). I tillegg trenger disse mindre metanol ved ekspresjon enn Mut^+ -stammer (Cereghino & Cregg 2000).

KM71 er en ekspresjonsstamme hvor det kromosomale genet *AOX1* er delvis fjernet og erstattet med ARG 4-genet fra *Saccharomyces cerevisiae*. Denne stammen er derfor avhengig av å få alkoholoksidaseenzymet fra *AOX2*-genet. *AOX2* fungerer likt som *AOX1*, men har en mye svakere promotor, noe som fører til et lavere nivå av ekspresjon. *AOX2* er derfor kun i stand til å bryte ned metanol svært sakte (Mut^s, methanol utilizing slow fenotype) (Daly & Hearn 2005). KM71 har mulighet for å indusere ekspresjon fra *AOX1*-promotoren selv om *AOX1*-genet er fjernet (Li et al. 2007).

1.6 Bruk av cellekulturer som modellsystemer

Celler kan isoleres fra intakt vev og vil fortsette å vokse så lenge de tilføres passende næringsstoffer og har egnede vilkår. En kultur får enkeltceller til å opptre som uavhengige enheter. Cellene kan dele seg, øke i størrelse og vil fortsette å dele seg til betingelsene i kulturen endres (Chaudry 2004).

Det er mange fordeler ved å jobbe med cellekulturer. Celler som dyrkes i kultur gir en mer homogen populasjon og cellene kan bli observert over lengre tid. Effekten av tilsetning eller fjerning av bioaktive molekyler, som for eksempel hormoner eller vekstfaktorer, kan lettere studeres enn under *in vivo* forsøk (Alberts 2008). Den største fordelene ved å bruke cellekulturer som modellsystemer er reproduserbarheten av resultater som kan oppnås ved å bruke en "batch" med klonede celler (Chaudry 2004).

En ulempe ved å bruke cellekulturer er at cellenes karakteristika etter en stund med kontinuerlig vekst kan endres og bli annerledes enn de som opprinnelig ble funnet (Chaudry 2004). Det er heller ikke alle celler som kan dele seg i det uendelige. Friske celler vil normalt bare dele seg et bestemt antall ganger før de går inn i en tilstand hvor de slutter å dele seg (Kiyono et al. 1998). Celler uten normal vekstkontroll, fra for eksempel svulster eller fra pasienter med blodsykdommer som lymfoma og leukemi, vil kunne vokse kontinuerlig under de rette betingelsene (Lea 2006).

1.6.1 Epitelceller

Epitelceller, i forbindelse med det respiratoriske systemet, spiller en viktig rolle som en fysisk barriere for å beskytte det underliggende vevet og for å opprettholde miljøet i luftveiene (Atsuta et al. 1997). Epitelcellene utgjør en nærmest ugjennomtrengelig barriere ved å danne såkalte "tight junctions" mellom cellene. Cellelaget fungerer som et molekylært filter for å holde inhalerte antigener og patogener ute (Buc et al. 2009).

Det finnes over 40 ulike celler *in vivo* i lungene (Ehrhardt et al. 2005). Av lungecellekulturer er det spesielt to epitele cellelinjer som benyttes som *in vitro* modeller, BEAS-2B og A549.

1.6.1.1 BEAS-2B (Humane bronkiale epitelceller)

BEAS-2B-celler kommer fra normale humane bronkiale celler og har blitt "udødeliggjort" ved bruk av et DNA-virus (SV40 eller 12-SV40) (Reddel et al. 1988). De opprettholder typisk morfologi og mange funksjonelle karakteristika til epitelceller (Atsuta et al. 1997).

BEAS-2B-celler er adherente og vokser i ett lag (Cheng et al. 2002).

Humane bronkiale epitelceller brukes ofte til studier som involverer astma. Epitelceller er de første cellene som møter inhalerte allergener og de har en viktig rolle ved å aktivere dendritiske celler som tar opp allergener og presenterer dem som peptider for T_H2-celler (Buc et al. 2009).

1.6.1.2 A549 (Human karsinom cellelinje)

Epitelet i lunger består i hovedsak av to typer celler, type I og type II. Type I-celler dekker omtrent 96 % av overflaten til lungene og har ikke evne til celledeling. Type II-celler dekker et mye mindre område, men er større i antall. Type II-celler antas å være opphav til type I-celler (Foster et al. 1998).

A549-cellelinjen ble benyttet for første gang i 1972 og har mange av de karakteristiske kjennetegnene til type II alveolare epitelceller (Foster et al. 1998).

A549-cellene er ansvarlige for diffusjon av substanser som vann og elektrolytter over alveolene i lungene. Celler vokser, i likhet med BEAS-2B, adherent og i ett lag. De benyttes hovedsakelig til studier av transport og metabolske reaksjonsveier (Ehrhardt et al. 2005).

1.7 Proteomikk

Proteomikk er definert som studiet av alle proteiner i en celle, et vev eller en organisme (Downard 2004) og er en relativt ny retning innen biologisk forskning basert på identifikasjon, kvantifisering og karakterisering av proteiner og hvordan disse virker i forhold til hverandre (Rappsilber et al. 2003). Proteiner er involvert i omtrent alle biologiske aktiviteter, og alle proteiner i en celle utgjør cellens proteom. Proteomet til en celle er derfor en rik kilde til biologisk informasjon (Ashcroft 2003).

Komparativ proteomikk er en gren av proteomikken som baserer seg på å studere endringer i proteinuttrykk mellom to ulike biologiske tilstander. Komparative analyser av proteomer er essensielle for å forstå proteomenes dynamikk i biologiske systemer, og slike sammenstillinger involverer som regel kvantifisering (Liebler 2004).

Massespektrometri (MS) brukes som et kvantifiseringsverktøy til komparative analyser av to eksperimentelt ulike tilstander. De fleste massespektrometriske kvantifiseringsmetodene baserer seg på en differensiell merking av stabile isotoper. Merkingen kan utføres på proteiner eller peptider og kan skje metabolsk, kjemisk, enzymatisk eller ved syntetiske peptidstandarder (Bantscheff et al. 2007).

Den enkleste fremgangsmåten for introduksjon av stabile, isotopmerkede peptider er ved å kjemisk syntetisere dem og tilsette kjente mengder av dem til en prøve som interne standarder. De interne peptidstandardene introduseres sent i prøveopparbeidelsen. Mulige kvantitative variasjoner i prøvene vil derfor ikke bli korrigert av den interne standarden (Ong & Mann 2005).

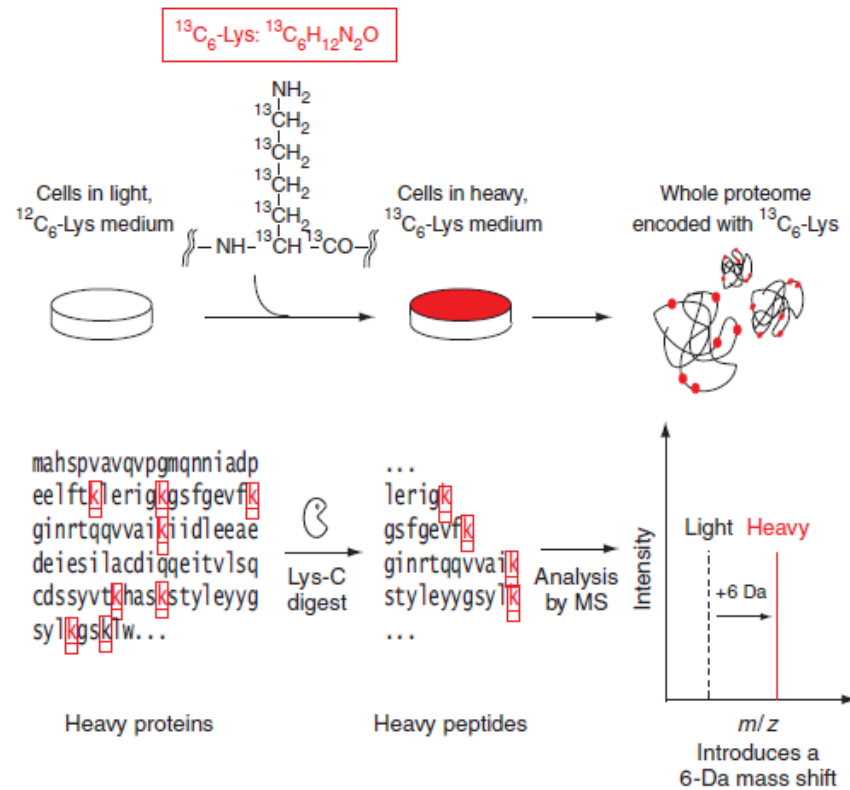
En annen fremgangsmåte for introduksjon av stabile isotoper er ved å kjemisk modifisere de to proteomene som skal studeres. Den ene blir merket med en lett kjemisk reagent og den andre med en tung. De kjemiske reagentene binder seg til reaktive seter på proteinet eller peptidet. Ofte er merkingen ikke-spesifikk og ikke-komplett, noe som kompliserer MS-identifikasjonen og kvantifiseringen (Ong & Mann 2005).

Stabil isotopmerking av aminosyrer i cellekultur baserer seg på metabolsk merking. Det er denne metoden som har blitt benyttet i denne oppgaven.

1.7.1 Stabil isotopmerking av aminosyrer i cellekultur (SILAC)

SILAC-teknologien er et verktøy som benyttes til kvantitativ analyse av blant annet opp- og nedregulerte proteiner etter stimulering med et biologisk aktivt molekyl, posttranslasjonelle modifiseringer og proteiner som er til stede i lave konsentrasjoner (Invitrogen 2006). Metoden er basert på inkorporering av stabile isotopmerkede aminosyrer i en cellekultur og kombineres med MS for å identifisere og kvantifisere proteiner i komplekse blandinger (Ong et al. 2002).

SILAC-metoden baserer seg på dyrking av to cellekulturer (figur 1.10). En cellekultur blir dyrket i medium med tunge (isotopiske) aminosyrer, den andre cellekulturen blir dyrket i medium med lette (normale) aminosyrer. Den naturlige metabolismen til cellene vil inkorporere og merke alle cellenes proteiner med de aktuelle aminosyrene. Proteinene gjennomgår trypsinproteolyse til peptider, og peptidene som stammer fra de to cellepopulasjonene vil deretter kunne skilles på grunn av masseskift (Ong et al. 2002). Det benyttes som regel arginin og lysin som de merkede aminosyrene, da det er disse trypsin retter seg mot. Slik sikres det at alle trypsinerte peptider inneholder de aminosyrene som man er avhengige av for kvantifisering (Invitrogen 2006).



Figur 1.10: Celler som har blitt dyrket i vanlig, lett medium overføres til et medium som inneholder tunge, isotopmerkede aminosyrer, som lysin med seks ^{13}C (merket i rødt).

Cellevekst, proteinsyntese og nedbrytning av proteiner fører til en metabolsk inkorporering av de tunge aminosyrene i hele proteomet. Proteinene blir kuttet til mindre peptider av spesifikke enzymer og analysert ved hjelp av massespektrometri. De tunge peptidene veier 6 Da mer enn de lette, noe som gjør det enkelt å skille dem (Ong & Mann 2006).

De to cellepopulasjonene kan utsettes for ulike stimuli, og det er dermed mulig å evaluere effekten av stimulien på et stort antall proteiner i ett enkelt forsøk. For å kunne detektere kvantitative forskjeller mellom cellepopulasjonene må de ha et celledtall som svarer til en ratio på 1:1 (Schmidt et al. 2007). Feil som kan oppstå under prøveoppbevaring og MS kan begrenses fordi begge populasjonene utsettes for de samme prosedyrene (Bantscheff et al. 2007). De to ulike populasjonene blandes før lysering, fraksjonering og rensing, og dermed vil ikke kvantifisering påvirkes av systematiske feil. Basert på den relative forskjellen i intensitet mellom de isotopiske peptidparene er det mulig å kvantifisere proteiner (Invitrogen 2006).

SILAC vil ikke ha noen innvirkning på cellenes vekst, morfologi eller den enzymatiske aktiviteten til proteinene (Ong et al. 2002). Dersom en liten andel aminosyrer i den tunge parallellen ikke skulle bli merket, vil disse anses som umerkede og regnes med i den lette parallellen. Dette vil gi en kvantifiseringsfeil, og understreker viktigheten av fullstendig inkorporering (Ong & Mann 2006).

Etter fem celledelinger vil omtrent 97 % av proteinene ha tunge aminosyrer inkorporert (Ong & Mann 2006).

Det er ikke alle cellelinjer som er egnet for metabolsk merking. Cellelinjer som er sensitive mot endringer i mediet eller som er vanskelige å dyrke og opprettholde i kultur, kan være uegnet for å ta imot metabolsk merking. Noen cellelinjer krever nøyaktig titrering av mengde arginin i mediet for å forhindre omdanning av arginin til prolin, en reaksjon som kan komplisere senere dataanalyse (Bantscheff et al. 2007).

Isotopisk merking kan utføres med både ^{13}C og ^{15}N , hvorav ^{13}C er vanligst, da ^{15}N -merking tidligere led under det faktum at det ikke fantes programmer for peptididentifisering som håndterte ^{15}N -merkede prøver tilfredsstillende (Ong & Mann 2005).

1.8 Massespektrometri (MS)

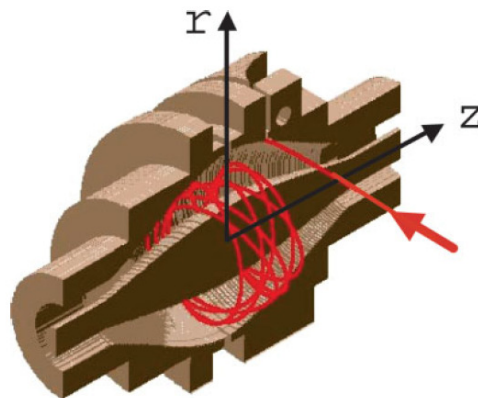
MS er en teknikk for å studere massen til atomer, molekyler eller fragmenter av molekyler. Den kan for eksempel brukes til å finne aminosyresekvensen til et protein, sekvensen til nukleinsyrer i DNA og strukturen til komplekse karbohydrater (Harris 2007). MS brukes ofte i forbindelse med proteomikk til identifisering, karakterisering og kvantifisering av komponenter i biologiske systemer (Scigelova & Makarov 2006).

Et massespektrometer består av tre enheter; en ionekilde, en masseanalysator og en detektor. I ionekilden blir molekylene i prøven ionisert og får en ladning. Ionene sendes inn i en masseanalysator, hvor de separeres etter størrelse og ladning ved hjelp av elektriske og/eller magnetiske felt. Til slutt sendes ionene inn i en detektor, hvor de produserer et elektrisk signal som amplifiseres og detekteres (Downard 2004).

1.8.1 Orbitrap

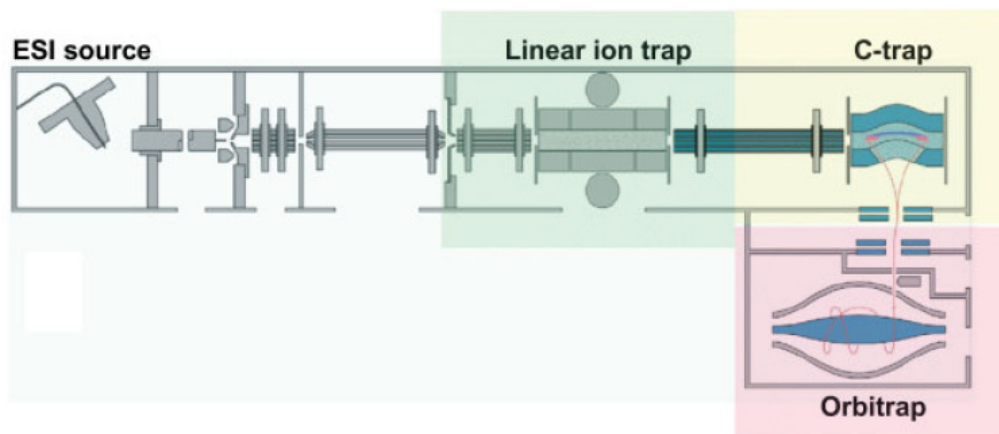
Orbitrap er en mye brukt masseanalysator som har evnen til å gi god massenøyaktighet og høy oppløsning. Dette er svært viktig for å oppnå signifikante identifiseringer i proteomikk (Scigelova & Makarov 2006).

Orbitrap-masseanalysatoren separerer ioner basert på deres masse/ladning (m/z)-ratio. Orbitrap fungerer nesten som en ionefelle, men i stedet for å bruke radiofrekvens eller magneter for å holde ionene inni analysatoren, brukes et elektrostatisk felt. Det vil oppstå en elektrostatisk tiltrekning mot den sentrale elektroden, og denne tiltrekningen kompenseres for ved hjelp av sentrifugalkrefter som oppstår fra den initielle farten til ionene. Det elektrostatiske feltet som ionene opplever inni Orbitrap, tvinger dem til å bevege seg i et komplisert spiralliknende mønster (figur 1.11) (Scigelova & Makarov 2006).



Figur 1.11: Modell av en Orbitrap masseanalysator. Den røde pilen indikerer hvor ionene injiseres inn i Orbitrap. Ionene injiseres vinkelrett på z-aksen og beveger seg i spiraler rundt den sentrale elektroden (Hu et al. 2005).

Selv om det er mulig å fragmentere ioner i Orbitrap, er det raskere og mer praktisk å først manipulere ionene i en annen masseanalysator og bruke Orbitrap som en detektor, slik man gjør ved et linear trap quadrupole (LTQ)-Orbitrap oppsett. LTQ-Orbitrap er et system som består av tre deler (figur 1.12). Ionene dannes i en ionekilde ved hjelp av elektroprayionisering før de separeres i en LTQ-ione-felle. Ionene føres inn i en radiofrekvensstyrt kvadrupol kalt en C-felle, hvor ionene akkumuleres og oppbevares før de føres inn i Orbitrap og detekteres. Dette systemet inneholder to masseanalysatorer; LTQ-ione-fellen og Orbitrap, som begge er i stand til å detektere ioner og ta opp spektra. De kan brukes sammen eller hver for seg, avhengig av de nødvendige analysebetingelsene (Scigelova & Makarov 2006).



Figur 1.12: Skjematisk fremstilling av LTQ-Orbitrap. Ionene dannes ved hjelp av elektroprayionisering og introduseres for en LTQ-ione-felle som er i stand til å detektere MS- og MSⁿ-spektra. Ionene akkumuleres i en C-felle og injiseres inn i Orbitrap hvor deres signal detekteres (Scigelova & Makarov 2006).

1.9 Mål med oppgaven

Astma er en kronisk sykdom som rammer svært mange. For å lære mer om mekanismen til astma, er målet med oppgaven å sette opp et modellsystem bestående av BEAS-2B-lungeepitelceller i kultur og indusere dem med IL-13 for å finne ut hva som skjer med proteinene som blir produsert. Dette gjøres ved hjelp av kvantitativ og funksjonell proteomikk.

Det er påvist en økt mengde AMC_{ase} i lungeceller hos astmatikere og det er vist at hemming av AMC_{ase} med inhibitoren allosamidin reduserer inflammasjon (Zhu et al. 2004). Inhibering av AMC_{ase} kan derfor være et terapeutisk mål innen astma. For å kunne studere AMC_{ase} mer inngående, er det nødvendig med tilgang til en rekombinant villtype som kan produseres i store mengder. Det er også av interesse å vite hvordan substrater og inhibitorer binder til enzymet og dermed finne ut om AMC_{ase} er et prosessivt enzym. For å kunne studere den eventuelle prosessiviteten til AMC_{ase}, er det nødvendig med tilgang til seterrettede mutanter av AMC_{ase} hvor aromatiske tryptofanresiduer i det aktive setet er byttet ut med ikke-aromatiske alaninresiduer (W31A og W99A). I tillegg vil en mutant uten kitinolytisk aktivitet kunne gi informasjon om binding av substrat (E140Q). Målet med denne delen av oppgaven er å få tilgang til villtype og seterrettede mutanter av AMC_{ase} gjennom å lage plasmider og transformere disse inn i den metylotrofe gjærsoppen *P. pastoris*.

2 MATERIALER

2.1 Laborieutstyr og instrumenter

2.1.1 Laborieutstyr

Laborieutstyr	Leverandør
24-brønnsplate	Becton Dickinson
Amiconrør (Ultra-15, 10 kDa)	Millipore
Autoklavteip	VWR
Automatpipetter, Finnpietter	ThermoLabsystems
Avtrekkskap (AV-100)	Telstar
Begerglass	Fisherbrand
Blåkorkflasker	Schott Duran
BioLogic LP kromatografisystem	Bio-Rad
C ₁₈ -materiale til STAGE TIPS	3M, Minneapolis, MN
Dialyseslanger (3,7 ml/cm, 10 000 MWCO)	Pierce
Dialyseklemmer (55 mm)	Spectrum
DyNA Quant TM 200 Fluorometer	Hoefer
Dyrkingskolber	Duran
Dyrkningsrør	Duran
Elektroforeseutstyr <ul style="list-style-type: none"> • Gelkjøringskammer • Gelspenningskilde • Gelkniv 	Invitrogen
Eppendorfrør	Axygen
Filter (0,22 µm)	Millipore
GELloader tips	Eppendorf

2 MATERIALER

Laboratorieutstyr	Leverandør
Inkubator <ul style="list-style-type: none"> • Multitron Standard • Multitron Eco 	Infors
Ionebyttekolonne (HiTrap CM FF 5 ml)	GE Healthcare
Mikrovekt	Sartorius
Målekolber	Schott Duran
Målesylinder	Schott Duran
NanoDrop, ND 1000	Thermo Scientific
NuPAGE SDS geler og buffere	Invitrogen
Oppkonsentrator (Amicon 8400)	Millipore
Oppkonsentratorfilter (10 000 MWCO)	Sigma-Aldrich
PCR-maskin (Mastercycler gradient)	Eppendorf
PCR-rør	Axygen
Petriskåler	Heger
pH-meter (MP 220)	Mettler-Toledo
Pipettespisser	Thermo Scientific
Rør m/skrukork, 15 og 50 ml	Greiner Bio One
Sekvenseringsmaskin (3100 Genetic Analyzer)	Applied Biosystems
Sentrifuge (Avanti™ J-25)	Beckman Coulter
Sentrifuge (Centrifuge 5415 R)	Eppendorf
Sentrifugerotor (JA-14)	Beckman Coulter
Sentrifugerør (250 ml)	Nalgene
Serologiske pipetter	Sarstedt
Sonikatorbad (Transonic 460/H)	Elma
Speed-Vac	Heto
Sterile 75 cm ² celledyrkingsflasker	NUNC™
Sterile tannpirkere	Jordan
Sterilbenk (AV-100)	Telstar
Vannbad	Julabo

Laboratorieinstrument	Leverandør
Vekt (Extend)	Sartorius
Qubit™ Fluorometer	Invitrogen
Z1 Coulter® cell and particle counter	Beckman Coulter

2.1.2 Programvare til dataanalyse

Programvare	Leverandør
Mascot Daemon (versjon 2.2)	Matrix Science
MaxQuant (versjon 1.0.13.13)	Max Planck Institute of Biochemistry
Xcalibur (versjon 2.0.7)	Thermo Fisher Scientific

2.2 Kjemikalier

2.2.1 Kjemikalier

Kjemikalier	Leverandør
6x loading buffer	New England Biolabs
10x loading buffer	TaKaRa
10x reaksjonsbuffer (ThermoPol)	New England Biolabs
4-methylumbelliferyl β -D-N,N'-diacetylchitobioside, $C_{26}H_{34}N_2O_{13} \cdot xH_2O$	Sigma-Aldrich
4-methylumbelliferone (4-MU), $C_{10}H_8O_3$	Sigma-Aldrich
Aceton, C_3H_6O	Sigma-Aldrich
Acetonitril (AcN), CH_3CN	Sigma-Aldrich
Agarose, SeaKem® LE Agarose	Cambrex Bio Science

2 MATERIALER

Kjemikalier	Leverandør
Ammoniumbikarbonat (Ambic), CH_5NO_3	Fluka Biochemika
Bacto™ Agar	Becton Dickinson
Bacto™ Gjærekstrakt	Becton Dickinson
Bacto™ Pepton	Becton Dickinson
Bacto™ Trypton	Becton Dickinson
Biotin, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue R250, $\text{C}_{47}\text{H}_{50}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2^+$	Bio-Rad
dNTP-mix	TaKaRa
Eddiksyre, $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$	Prolab
EDTA, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$	Sigma-Aldrich
Etidiumbromid, $\text{H}_{20}\text{BrN}_3$	Sigma-Aldrich
Etanol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Arcus
Ex Taq™ Buffer	TaKaRa
Glyserol, $\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$	Riedel-de Haën
Iodoacetmid (IAA), $\text{C}_2\text{H}_4\text{INO}$	Sigma
Isopropanol, $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$	Arcus
Kaliumklorid, KCl	Merck
Kaliumdihydrogenfosfat, KH_2PO_4	AppliChem
Magnesiumklorid, MgCl_2	Finnzymes
Magnesiumsulfat, MgSO_4	Sigma
Maursyre, HCOOH	Riedel-de Haën
Metanol, CH_3OH	Sigma-Aldrich
Natriumacetat, $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$	Sigma-Aldrich
Natriumklorid, NaCl	Merck
Natriumkarbonat, Na_2CO_3	Merck
NEBuffer I	New England Biolabs
Phosphate buffered saline (PBS)	PAA; The cell culture company
Trifluoroeddiksyre (TFA), $\text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$	Fluka Biochemika
Yeast Nitrogen Base med ammoniumsulfat, uten aminosyrer	Sigma-Aldrich

2.3 Enzymer og proteiner

Enzym/protein	Leverandør
Bovine serum albumin (BSA), 100x, 10 mg/ml	New England Biolabs
ExTaq TM HS Polymerase	TaKaRa
ExTaq TM Polymerase (5 U/ μ l)	TaKaRa
Interleukin 13	Sigma
Phusion TM High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/ μ l)	Finnzymes
Sac I	New England Biolabs
Trypsin	Promega

2.4 Medier

2.4.1 Selvlagde medier

Medium	Innhold
BMGY	10 g Bacto gjærekstrakt 20 g Bacto trypton 700 ml dH ₂ O Autoklaver 100 ml 1 M kaliumfosfatbuffer, pH 6 100 ml 10x YNB 2 ml 500x biotin 100 ml 10x glyserol

2 MATERIALER

Medium	Innhold
BMMY	10 g Bacto gjærekstrakt 20 g Bacto trypton 700 ml destillert vann Autoklaver 100 ml 1 M kaliumfosfatbuffer, pH 6 100 ml 10x YNB 2 ml 500x biotin 100 ml 10x metanol
MD	800 ml destillert vann 15 g agar Autoklaver 100 ml 10x YNB 2 ml 500x biotin 100 ml 10x dektrose
YPD-medium	10 g Bacto gjærekstrakt 20 g Bacto pepton 900 ml destillert vann Autoklaver 100 ml 10x dektrose

2.4.2 Ferdige medier

Medium	Innhold	Leverandør
RPMI 1640	1 L RPMI 1640 tilsettes: 50 ml FCS (inaktivert kalveserum) 5 ml natrium pyruvat 5 ml ikke-essensielle aminosyrer 0,3 ml Garamycin	Invitrogen
SILAC TM RPMI 1640, lett SILAC medium	1 L lett medium: 100 ml basalt medium erstattes med 100 ml dFBS 10 ml 100x L-glutamin 10 ml 100x Penicillin-Streptomycin L-lysin HCL L-arginine Oppbevares ved 2-8 °C, i fravær av lys.	Invitrogen
SILAC TM RPMI 1640, tungt SILAC medium	1 L tungt medium: 100 ml basalt medium erstattes med 100 ml dFBS 10 ml 100x L-glutamin 10 ml 100x Penicillin-Streptomycin [U- ¹³ C ₆]-L-lysin HCL [U- ¹³ C ₆ ¹⁵ N ₄]-L-arginin Oppbevares ved 2-8 °C, i fravær av lys.	Invitrogen

2.5 Celler

Celler	Leverandør
BEAS-2B	ATCC®

2.6 Kit

Kit	Innhold	Leverandør
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Ready Reaction Mix pGEM®-3Zf(+) double-stranded DNA Control Template -21 M13 Control Primer (forward) BigDye Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer (5X)	Applied Biosystems
E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit	HiBind™ Miniprep-kolonner 2 ml oppsamlingsrør Solution I Solution II Solution III Buffer HB Elution Buffer Wash Buffer, konsentrat RNase A, konsentrat Equilibration Buffer	Omega Bio-tek

2 MATERIALER

Kit	Innhold	Leverandør
Multi-copy <i>Pichia</i> Expression Kit	<p><i>Frysestocker:</i> GS115, KM71, GS115 Albumin, GS115 β-Gal, TOP10F'</p> <p><i>Vectors:</i> pAO815, pPIC3.5K, pPIC9K</p> <p><i>Primere:</i> 5' AOX1 sequencing primer (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3')</p> <p>3' AOX sequencing primer (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3')</p> <p>α-factor sequencing primer (5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3')</p> <p><i>Medier:</i> YP Base Medium, YP Base Agar Medium, Yeast Nitrogen Base</p>	Invitrogen
NuPage [®] Electrophoresis System	<p>NuPAGE[®] Novex[®] Bis-Tris Mini Gels</p> <p>20X NuPAGE[®] MOPS SDS Running Buffer</p> <p>NuPAGE[®] LDS Sample Buffer (4X)</p> <p>NuPAGE[®] Reducing Agent (10X)</p>	Invitrogen
Pichia EasyComp Kit	<p>Solution I</p> <p>Solution II</p> <p>Solution III</p>	Invitrogen

2 MATERIALER

Kit	Innhold	Leverandør
ProteoExtract [®] Subcellular Proteome Extraction Kit, Mini	Vaskebuffer Ekstraksjonsbuffer I Ekstraksjonsbuffer II Ekstraksjonsbuffer III Ekstraksjonsbuffer IV Proteasehemmer Benzonase [®] Nuklease	Calbiochem
Quant-iT [™] Protein Assay Kit	Proteinbuffer Proteinreagent Standarder, 0, 200 og 400 ng/μl	Invitrogen
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	<i>Pfu Turbo</i> DNA polymerase (2.5 U/μl) 10X reaction buffer Dpn I restriction enzyme (10 U/μl) Oligonucleotide control primer # 1 [34-mer (100 ng/μl)] 5'- CCA TGA TTA CGC CAA GCG CGC AAT TAA CCC TCA C – 3' Oligonucleotide control primer # 2 [34-mer (100 ng/μl)] 5'- GTG AGG GTT AAT TGC GCG CTT GGC GTA ATC ATG G – 3' pWhitescript 4.5-kb control plasmid (5 ng/μl) dNTP mix XL1-Blue supercompetent cells pUC18 control plasmid (0.1 ng/μl i TE buffer)	Stratagene

2.7 Buffere og løsninger

Buffer/løsning	Innhold
100 mM ammoniumbikarbonat (Ambic)	395,3 mg ammoniumbikarbonat 50 ml destillert vann
Avfargingsløsning for SDS-PAGE	10 % (v/v) metanol 10 % (v/v) eddiksyre Destillert vann
Biotin, 0,02 %	20 mg biotin 100 ml destillert vann Sterilfiltrer
Buffer A, pH 4.2	264 ml 0.05 M natriumacetat (4,1 g NaAc løst i 1 L dH ₂ O) 736 ml 0.05 M eddiksyre (3 ml eddiksyre løst i 1 L dH ₂ O)
Buffer B, pH 6.5	990 ml 0.05 M natriumacetat 10 ml 0.05 M eddiksyre
Dekstrose, 20 %	200 g D-glukose 1000 ml destillert vann Autoklaver
Dithiotreitol (DTT), 0.10 mM	15,4 mg dithiotreitol 1 ml 100 mM ammoniumbikarbonat
Dikaliumhydrogenfosfat (K ₂ HPO ₄) 1M	87,1 g K ₂ HPO ₄ 500 ml destillert vann Autoklaver
Glyserol, 10 %	23,5 ml 85 % glyserol 176,5 ml destillert vann Autoklaver
Iodoacetamid (IAA), 5.5 mM	10,17 mg iodoacetamid 1 ml 100 mM ammoniumbikarbonat
Kaliumdihydrogenfosfat (KH ₂ PO ₄) 1 M	68 g KH ₂ PO ₄ 500 ml destillert vann Autoklaver

2 MATERIALER

Buffer/løsning	Innhold
Mellvain-buffer, pH 5.2	23,3 ml 0.1 M sitronsyre 26,7 0.2 M natriumfosfat Fortynnes til 100 ml med destillert vann
Metanol, 5 %	5 ml metanol 95 ml destillert vann Sterilfiltrer
Natriumkarbonat (Na ₂ CO ₃), 0.2 M	2.12 g Na ₂ CO ₃ 100 ml destillert vann
TAE-buffer, 50x	242 g Tris-base 57,1 ml eddiksyre 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8.0 Destillert vann til 1 liter
Trypsinbuffer	10 % 100 mM Ambic 10 % 100 % AcN 80 % destillert vann 20 µg trypsin
YNB, 13,4 %	134 g YNB 1000 ml destillert vann Sterilfiltrer

2.8 Antibiotika

Antibiotika	Leverandør
Ampicillin, C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	Sigma
Geneticin, C ₂₀ H ₄₀ N ₄ O ₁₀	Sigma
Kanamycin, C ₁₈ H ₃₆ N ₄ O ₁₁	Sigma

2.9 Molekylvektsmarkører

Molekylvektsmarkører	Leverandør
1 kb DNA Ladder	New England Biolabs
BenchMark TM Protein Ladder	Invitrogen
Precision Plus Protein Dual Color Standards	Bio-Rad Life Sciences

3 METODER

3.1 Tillaging av plasmid

For å lage et plasmid med mutert AMC_{ase}-gen inkorporert, er det nødvendig med et plasmid med villtype (WT)-AMC_{ase} og primere som inneholder den ønskede mutasjonen.

Villtype-AMC_{ase}

AMC_{ase}-genet ble bestilt fra GenScript i en pUC57-vektor. Genet er kodonoptimalisert for *P. pastoris*, og det er satt inn kutteseter for EcoRI. AMC_{ase}-genet ble kuttet ut av pUC57-vektoren og ligert sammen med pPIC9K-vektoren som fulgte med Multi-copy *Pichia* Expression Kit fra Invitrogen. pPIC9K-vektoren ble kuttet ved hjelp av restriksjonsenzymet EcoRI som kutter i vektorens leseramme for sekresjonssignalet, α -faktor, slik at AMC_{ase}-genet ble inkorporert i denne leserammen. WT-AMC_{ase} i pPIC9K-vektoren ble transformert inn i *E. coli* TOP10-celler og lagret ved – 80 °C.

Seterettet mutagenese

In vitro seterettet mutagenese er en teknikk som kan brukes til å studere forholdet mellom proteiners struktur og funksjon, genekspressjon og for å utføre modifikasjoner på vektorer.

I denne oppgaven ble det benyttet et QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit fra Stratagene. Dette kitet brukes for å lage punktmutasjoner, bytte aminosyrer og sette inn eller fjerne en eller flere aminosyrer. Prosedyren baserer seg på bruk av en dobbeltrådet DNA-vektor med genet av interesse innsatt og to syntetiske oligonukleotider som fungerer som primere. Primerne forlenges gjennom en PCR-reaksjon ved hjelp av DNA polymerase. Inkorporering av primerne gir et mutert plasmid som har "nicks". Etter PCR-reaksjonen behandles plasmidene med restriksjonsenzymet Dpn I. Dette er en endonuklease som er spesifikk for metylert og hemimetylert DNA, og brukes til å fjerne plasmidene som har blitt brukt som templat (Stratagene 2005).

Plasmidene med de korrekte mutasjonene transformeres inn i XL-1 superkompetente celler (*E. coli*). De superkompetente cellene reparerer ”nicksene” i de muterte plasmidene (Stratagene 2005).

Design av primere

Primere som brukes til seterettet mutagenese er korte DNA-sekvenser som inneholder mellom 25 og 45 basepar; med den ønskede mutasjonen i midten. Primeren bør inneholde minst 40 % G- og C-baser og primeren bør ende med minst én G eller C. I tillegg bør smeltetemperaturen (T_m) være over eller lik 78 °C. T_m kan finnes ved hjelp av denne likningen:

$$T_m = 81,5 + 0,41 (\% \text{ GC}) - 675/N - \% \text{ mismatch},$$

hvor N er lengden på primeren i baser og verdiene for % GC og % mismatch er heltall (Stratagene 2005).

Begge mutageneseprimerne må inneholde den ønskede mutasjonen og være komplementære til den samme sekvensen på motsatte DNA-tråder i plasmidet (Stratagene 2005).

Primere ble laget ved hjelp av programvaren GENtle. Dette kan lastes ned gratis fra <http://gentle.magnusmanske.de/>. Primerne ble bestilt fra Invitrogen.

Det ble laget til sammen seks primere; én forward og én reverse til hver av de tre seterrettede mutantene, W31A, W99A og E140Q (tabell 3.1). Hos W31A ble TGG (tryptofan) byttet ut med GCG (alanin), hos W99A ble TGG (tryptofan) byttet ut med GCG (alanin) og hos E140Q ble GAA (glutamat) byttet til CAA (glutamin). Det ble valgt å lage disse mutasjonene basert på tidligere forsøk gjort med kitinase A for å bestemme retning av substrathydrolyse (Zakariassen et al. 2009). E140Q er en inaktiv mutant uten kitinolytisk aktivitet og kan brukes til å måle bindingsstyrke mellom enzym og substrat (Olland et al. 2009).

Tabell 3.1: Mutageneseprimere. Mutasjonene er merket med uthevet skrift. For å se hvor i AMCase-genet mutasjonene har foregått, se appendiks 1.

Navn	Sekvens
W31A Forward	5`-TGTTATTTTACTAACG CGG CTCAATACAGACCAGG-3`
W31A Reverse	5`-CCTGGTCTGTATTGAGCC CG GTTAGTAAAATAACA-3`
W99A Forward	5`-GCTTGCAATTGGAGGT GCG AACTTTGGAAGTCTCC-3`
W99A Reverse	5`-GGAGCAGTTCCAAAGTT CGC ACCTCCAATTGCAAGC-3`
E140Q Forward	5`-GCCTAGACTTTGACTGG CA ATATCCAGGCTCTAGAGG-3`
E140Q Reverse	5`-CCTCTAGAGCCTGGATATT GCC AGTCAAAGTCTAGGC-3`

3.1.1 Isolering av plasmid

E.Z.N.A.TM Plasmid Miniprep Kit I Spin Protocol fra Omega Bio-Tek er et kit som gjør det enkelt å ekstrahere og rense nukleinsyrer fra ulike kilder. HiBindTM-kolonnematriksen binder DNA og RNA reversibelt. Dette gjør at proteiner og andre kontaminanter kan fjernes før nukleinsyrene blir eluert ut ved hjelp av en buffer eller destillert vann. Metoden er optimalisert for å gi rent DNA raskt (Omega 2009).

Materialer

- 100 % etanol
- E.Z.N.A.TM Plasmid Miniprep Kit I Spin Protocol (Omega Bio-Tek)
- Frysestock med WT-pPIC9K-AMCase i *E. coli*-celler
- Luria-Bertani (LB)-medium med 200 µg/ml kanamycin

Prosedyre

- En steril tannpirker ble brukt til å overføre celler fra frysestocken med WT-pPIC9K-AMCase i *E. coli*-celler til en dyrkningskolbe med 10 ml LB-medium tilsatt 200 µg/ml kanamycin.

- Kolben ble satt til inkubering ved 37 °C og risting ved 225 rpm over natt.
- Cellene ble pelletert ved sentrifugering ved 10 000 x g i 1 minutt ved romtemperatur. Supernatanten ble dekantert.
- Pelleten ble resuspendert i 250 µl Solution I /RNAse A solution. Løsningen ble overført til et nytt eppendorfrør.
- 250 µl Solution II ble tilsatt og løsningen ble blandet ved å snu røret opp-ned et par ganger.
- 350 µl Solution III ble tilsatt og løsningen ble blandet ved å snu røret opp-ned.
- Løsningen ble sentrifugert ved 16 000 x g i 10 minutter ved romtemperatur.
- En HiBind™ DNA Miniprep-kolonne ble ekvilibrert ved å tilsette 100 µl Equilibration Buffer og sentrifugere ved 16 000 x g i 1 minutt. Oppsamlingsrøret ble tømt og kolonnen ble satt tilbake igjen.
- Supernatanten ble overført til den ekvilibrerte kolonnen og sentrifugert ved 16 000 x g i 1 minutt. Oppsamlingsrøret ble tømt og kolonnen ble satt tilbake igjen.
- Kolonnen ble vasket med 500 µl Buffer HB. Kolonnen ble sentrifugert i 1 minutt ved 16 000 x g. Oppsamlingsrøret ble tømt og kolonnen ble satt tilbake igjen.
- Kolonnen ble så vasket med 700 µl DNA Wash Buffer fortynnet med 100 % etanol. Kolonnen ble sentrifugert ved 16 000 x g i 1 minutt. Oppsamlingsrøret ble tømt og kolonnen ble satt tilbake igjen.
- Den tomme kolonnen ble sentrifugert i 2 minutter ved 16 000 x g for å tørke kolonnematriksen.
- Kolonnen ble plassert i et sterilt eppendorfrør. 40 µl Elution Buffer ble tilsatt og kolonnen ble sentrifugert i 1 minutt ved 16 000 x g for å få eluert ut plasmidene.

3.1.2 PCR-reaksjon og transformering av mutanter

For å oppamplifisere DNA kan man benytte en teknikk kalt polymerase kjedereaksjon (PCR). PCR generer mange kopier av en spesifikk DNA-sekvens gjennom en serie av reaksjoner. PCR-reaksjonen kan deles inn i tre trinn. Først må DNAet som skal amplifiseres, denatureres slik at DNA-trådene blir enkeltrådede. Dette gjøres ved en høy temperatur. Deretter senkes temperaturen slik at primerne kan binde seg til de denaturerte DNA-trådene. Primerne vil fungere som startsted for syntetisering av en ny DNA-tråd som er komplementær til den denaturerte DNA-tråden. En DNA polymerase tilsettes reaksjonen og denne forlenger primerne ved å feste nukleotider i en 5'-3'-retning. Disse tre trinnene gjentas x antall ganger til man har oppnådd ønsket mengde DNA. PCR-reaksjonen utføres i en maskin kalt en "thermocycler". Denne kan stilles inn slik at hele reaksjonen går automatisk (Klug 2005).

Isolert villtypeplasmid (avsnitt 3.1.1) ble benyttet som DNA-templat i denne oppgaven.

P. pastoris-vektoren pPIC9K har et kanamycinrestistent gen som fører til at vektoren er resistent mot kanamycin i bakterieceller og mot geneticin i *P. pastoris*-celler (Invitrogen 2009).

Materialer

- Isolert WT-pPIC9K-AMCase-plasmid (avsnitt 3.1.1)
- LB-plater med 0,1 mg/ml ampicillin
- LB-plater med 0,1 mg/ml kanamycin
- Mastercycler Gradient PCR-maskin (Eppendorf)
- Phusion DNA Polymerase (2 U/ μ l)
- Primere, W31A, W99A og E140Q forward og reverse (Invitrogen)
- Super optimal broth with catabolite repression (SOC)-medium
- QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)

Prosedyre

- En kontrollreaksjon ble laget:

Reagent	Mengde
10x reaction buffer	5 µl
pWhitescript 4.5 kb kontrollplasmid (5 ng/µl)	2 µl
Kontrollprimer 1 (34-mer (100 ng/µl))	1,3 µl
Kontrollprimer 2 (34-mer (100 ng/µl))	1,3 µl
dNTP mix	1 µl
Dobbeltdestillert vann (ddH ₂ O)	39,5 µl
Phusion DNA Polymerase (2 U/µl)	1,3 µl
Totalt	51,4 µl

- En PCR-reaksjon ble laget:

Reagent	Mengde
10x reaction buffer	5 µl
DNA-templat (WT-AMCase) (5, 10, 20 og 50 ng/µl)	1 µl
W31A, W99A eller E140Q Forward (100 ng/µl)	1,3 µl
W31A, W99A eller E140Q Reverse (100 ng/µl)	1,3 µl
dNTP mix	1 µl
Dobbeltdestillert vann (ddH ₂ O)	40,5 µl
Phusion DNA Polymerase (2 U/µl)	1,3 µl
Totalt	51,4 µl

- Reaksjonene ble laget i 20 µl PCR-rør med rund topp, og alt ble holdt på is under hele tillagingen.

- Følgende PCR-program ble kjørt:

	Temperatur	Varighet
1 runde	98 °C	30 sekunder
16 runder	98 °C	10 sekunder
	55 °C	30 sekunder
	72 °C	6 minutter
1 runde	4 °C	∞

- Reaksjonene ble plassert på is i 2 minutter for å bli kaldere enn 37 °C.
- 1 µl av restriksjonsenzymet Dpn I ble tilsatt PCR-produktet og blandet for å fjerne foreldretemplat.
- Reaksjonen ble inkubert ved 37 °C i én time.
- De superkompetente XL1-Blue-cellene ble forsiktig tint på is.
- 50 µl av de superkompetente cellene ble overført til sterile 15 ml dyrkningsrør i plast som var blitt nedkjølt på forhånd.
- 1 µl Dpn I-behandlet DNA ble overført til de superkompetente cellene. I tillegg ble det tatt med en transformasjonskontroll, pUC18. Samme fremgangsmåte ble fulgt for denne som for prøvene.
- Transformasjonsreaksjonene ble forsiktig blandet og inkubert på is i 30 minutter.
- Reaksjonene ble så varmet opp ved 42 °C i 45 sekunder før de ble avkjølt på is i to minutter.
- 500 µl SOC-medium ble varmet opp til 42 °C og tilsatt transformasjonsreaksjonene.
- Reaksjonene ble inkubert ved 37 °C og 230 rpm i én time.
- Reaksjonene ble sådd ut på plater, se tabell 3.2.

Tabell 3.2: Kontrollene pWhitescript og pUC18 ble sådd ut på LB-plater med ampicillin. Transformasjonsreaksjonene ble sådd ut på LB-plater med kanamycin.

Reaksjonstype	Plate	Volum til plate
pWhitescript mutagenesekontroll	LB med 0,1 mg/ml ampicillin	250 µl
pUC18 transformasjonskontroll	LB med 0,1 mg/ml ampicillin	5 µl avsatt i 200 µl SOC-medium
Transformasjonsreaksjon	LB med 0,1 mg/ml kanamycin	250 µl på to plater

- Platene ble inkubert ved 37 °C i 24 timer.

3.1.3 Test av transformanter

For å teste om et gen har blitt transformert inn i en vertscelle, kan man kjøre en PCR-reaksjon med én primer som tilhører genet og én primer som hører til vektoren genet er i. PCR-produktet kjøres så på agarosegel for å undersøke størrelsen.

Agarosegel

En agarosegel benyttes til å bestemme lengden og renheten på DNA-molekyler. Hvert nukleotid har en negativ ladning. Agarose er et polysakkarid som er isolert fra tang og gir geler som er porøse nok til at DNA kan passere. Når strøm settes over gelen vil DNA-molekylene bevege seg mot den positive elektroden. De største DNA-molekylene vil bevege seg saktere gjennom gelen enn de mindre DNA-molekylene. DNAet vil dermed bli separert etter størrelse (Alberts 2008).

DNA-båndene er usynlige på en agarosegel med mindre DNAet blir merket eller farget. En sensitiv måte å farge DNA på er ved å tilsette etidiumbromid (EtBr). EtBr fluorescerer i ultrafiolett lys når det er bundet til DNA (Alberts 2008).

Materialer

- 1x TAE-buffer
- 6 x loading buffer
- 10x ExTaq Buffer
- Agarose
- dNTP mix (12,5 mM)
- Etidiumbromid (10 mg/ml)
- ExTaq™ Polymerase (5U/μl)
- Kolonier fra skåler (avsnitt 3.1.2)
- Mastercycler Gradient PCR-maskin (Eppendorf)
- Molekylvektsmarkør, 1 kb (NEB)
- Primere, se tabell under og tabell 3.1

Prosedyre

- Følgende primere ble bestilt fra Invitrogen:

Navn	Sekvens
5`-AOX1 fwd	5`-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3`
3`-AOX1 rev	5`-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3`

- Det ble plukket noen kolonier med en tannpirker og forsiktig avsatt nedi bunnen på et PCR-rør.
- Deretter ble følgende tilsatt PCR-røret:

Reagent	Mengde
10x ExTaq Buffer	5 µl
dNTP mix (12,5 mM)	4µl
AOX fwd (5`) primer (64 ng/µl)	1,2 µl
W31A,W99A eller E140Q reverse primer (100 ng/µl)	1,2 µl
Destillert vann	38 µl
ExTaq™ (5U/µl) polymerase	0,5 µl
Totalt	49,9 µl

- PCR-programmet som ble brukt til W99A:

	Temperatur	Varighet
1 runde	98 °C	5 minutter
30 runder	98 °C	10 sekunder
	55 °C	30 sekunder
	72 °C	10 minutter
1 runde	4 °C	∞

- PCR-program til W31A og E140Q:

	Temperatur	Varighet
1 runde	94 °C	2 minutter
25 runder	94 °C	15 sekunder
	50 °C	15 sekunder
	72 °C	9 minutter
1 runde	72 °C	5 minutter
1 runde	4 °C	∞

- I tillegg ble det tatt med en positiv kontroll, 1 µl WT-AMCase-plasmid (50 ng/µl). Det ble brukt samme program og PCR-miks som for de ulike mutantene som ble kjørt.

- PCR-produktet ble undersøkt på 1 % agarosegel:
 - 0,5 g agarose ble blandet med 50 ml 1x TAE-buffer i en målekolbe.
 - Målekolben ble varmet opp i ca. 1-1 ½ minutter i en mikrobølgeovn til all agarosen ble løst opp.
 - Målekolben ble avkjølt under kaldt vann til løsningen ble omtrent 60 °C.
 - Blandingen ble da overført til et begerglass, og 1 µl EtBr ble tilsatt før den ble overført til et gelkammer med en brønnekam.
 - Gelen ble stiv på omtrent 30 minutter.
 - Gelen ble da overført til et bufferkammer, brønnekammen ble fjernet og gelen ble dekket med 1x TAE-buffer.
 - 10 µl PCR-produkt ble blandet med 1 µl 6x loading buffer og avsatt på gelen.
 - 10 µl 1 kb molekylvektsmarkør ble også avsatt på gelen.
 - Gelen ble kjørt ved 90 volt i 45 minutter.
 - Gelen ble kikket på under UV-lys.

3.1.4 Tillaging av frysestock

Materialer

- 87 % glyserol
- Overnattekultur med W31A-, W99A- og E140Q-AMCase

Prosedyre

- Det ble satt opp en overnattekultur med kolonier som viste vellykket transformasjon (avsnitt 3.1.3) i 5 ml LB-medium. Rørene ble inkubert ved 37 °C og 250 rpm.
- 700 µl overnattekultur ble blandet med 300 µl 87 % glyserol og overført til rør med skrukork.
- Rørene ble oppbevart ved – 80 °C.

- Det resterende av kulturene ble miniprepet (avsnitt 3.1.1) slik at plasmidene ble isolert.

3.1.5 Sekvensering

I denne oppgaven ble det benyttet et BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit fra Applied Biosystems. Dette er en metode som benytter kjedeterminering for å finne sekvensene til plasmidene. Det brukes dideoksynukleotid trifosfater (ddNTPer) i tillegg til deoksynukleotid trifosfater (dNTPer) til merking av DNA-trådene. Hver gang en ddNTP festes til DNA-tråden, vil denne tråden termineres. Hver av de fire ddNTPene er merket med hver sin fluorescerende farge. Det vil dermed være mulig å finne rekkefølgen til de ulike basene (Klug 2005). DNA polymeraser evner kun å sette på omtrent 500 dNTPer. Det er derfor nødvendig med flere primere som er overlappende for å sikre at hele genet blir sekvensert (Vaaje-Kolstad 2010).

Prøvene ble analysert på en sekvenseringsmaskin; 3100 Genetic Analyzer fra Applied Biosystems.

Materialer

- 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
- 70 % etanol
- 96 % etanol
- BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
- EDTA (125 mM)
- Isolert plasmid (W99A og WT)
- Mastercycler Gradient PCR-maskin (Eppendorf)
- Natriumacetat (3 M)
- Primere, se tabell på neste side

Prosedyre

- Primere ble laget og bestilt fra Invitrogen:

Navn	Sekvens
pPIC9K-seq-F	5`-TCCAACAGCACAAATAACGGGT-3`
pPIC9K-seq-R	5`-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3`
AMCase-seq-F1	5`-CCTTAGACAATATGAATTTGATGGC-3`
AMCase-seq-R1	5`-CATCAAGATCAATAGCCCAAACCAT-3`
AMCase-seq-F2	5`-CAAGGAATCTGGAATATGGGCTT-3`
AMCase-seq-R2	5`-TTGGGGAATTCATAACCAGATTG-3`

- WT- og W99A-plasmid ble dyrket opp i LB-medium over natt og miniprepet (se avsnitt 3.1.1).
- Følgende PCR-reaksjon ble laget:

Reagent	Mengde
Premix (BigDye)	2 µl
Plasmid (WT og W99A) (200 ng)	1 µl
Primer (én i hver reaksjon) (3,2 pmol)	1 µl
5X Seq buffer	3 µl
Destillert vann	13 µl
Totalt	20 µl

- Alt ble holdt på is under tillagingen
- Følgende PCR-program ble brukt:

	Temperatur	Varighet
1 runde	96 °C	1 minutt
25 runder	95 °C	10 sekunder
	50 °C	5 sekunder
	60 °C	4 minutter
1 runde	4 °C	∞

- For å felle ut DNAet, ble det tilsatt 2 µl 125 mM EDTA og 2 µl 3 M natriumacetat til 20 µl PCR-produkt.
- Deretter ble det satt til 52 µl 96 % etanol og blandet godt ved å snu på røret.
- Reaksjonene ble inkubert ved romtemperatur i 15 minutter.
- Rørene ble sentrifugert ved 4 °C og 16 000 x g i 30 minutter for å pellete DNAet.
- Supernatanten ble dekantert, og 70 µl 70 % etanol ble tilsatt for å vaske DNAet.
- Rørene ble sentrifugert ved 16 000 x g og 4 °C i 10 minutter.
- Supernatanten ble fjernet og rørene ble satt på benken til tørking.
- Sekvenseringen ble utført på 3100 Genetic Analyzer fra Applied Biosystems.

3.2 Transformering, dyrking, selektering av kolonier og sjekk av aktivitet

Alle manipulasjoner av *P. pastoris* ble utført sterilt for å forhindre kontaminasjon. *P. pastoris* er veldig temperaturfølsom, og det er viktig at temperaturen ikke overstiger 30 °C (Invitrogen 2009).

3.2.1 Linearisering av WT- og W99A-plasmider

Restriksjonsenzymet Sac I kutter i 5' AOX1 i pPIC9K-vektoren (figur 1.9).

Materialer

- 10x BSA
- Miniprep plasmid (WT og W99A)
- NEBuffer 1
- Sac I

Prosedyre

- WT- og W99A-AMCase ble dyrket opp over natt fra frysestock (avsnitt 3.1.4).
- Overnattkulturene ble miniprepet for å isolere plasmidene (se avsnitt 3.1.1).
- 60 µl plasmid ble blandet med 10 µl NEBuffer 1, 10 µl 10x BSA og 10 µl Sac I i et eppendorfrør.
- Rørene ble satt til inkubering i et vannbad ved 37 °C i tre timer før de ble satt direkte på is.

3.2.2 Tillaging og transformering av kompetente celler

*Pichia EasyComp*TM Kit fra Invitrogen ble brukt til preparering og transformering av kompetente *P. pastoris*-celler. Kitet benytter seg av en enkel metode for å raskt kunne produsere kompetente *P. pastoris*-celler, som enten kan benyttes umiddelbart eller fryses ned og lagres til fremtidig bruk. Transformasjonseffektiviteten vil variere basert på stammen som benyttes og effektiviteten av plasmidintegreringen inn i vertskromosomet (Invitrogen 2001).

Materialer

- Lineært W99A-AMCase-plasmid (avsnitt 3.2.1)
- Lineært WT-AMCase-plasmid (avsnitt 3.2.1)
- MD-plater med 0,25 mg/ml Geneticin
- *Pichia EasyComp*TM Kit (Invitrogen)
- *P. pastoris* KM71 frysestock (fra Multi-copy *Pichia* Expression Kit)
- YPD-medium

Prosedyre

- En steril tannpirker ble brukt til å få ut celler fra *P. pastoris* KM71 frysestocken. Tannpirkeren ble sluppet oppi en 100 ml dyrkingskolbe med 10 ml YPD-medium. Kolben ble satt til inkubering ved 30 °C og 230 rpm over natt.
- Det ble tatt ut 1 ml fra forkulturen og overført til 250 ml YPD-medium i en 1000 ml dyrkingskolbe.
- Kolben ble inkubert over natt ved 30 °C og 230 rpm.
- Cellene ble høstet ved sentrifugering ved 500 x g og romtemperatur i 5 minutter. Supernatanten ble kastet.
- Cellene ble resuspendert i 10 ml Solution I og sentrifugert ved 500 x g i 5 minutter ved romtemperatur. Supernatanten ble kastet.
- Pelleten ble resuspendert i 1 ml Solution I. Cellene er nå kompetente.
- Cellesuspensjonen ble overført til 1,5 ml sterile rør med skrukork og oppbevart ved – 80 °C.
- 50 µl av de kompetente KM71-cellene ble overført til et sterilt mikrosentrifugerør.
- For å transformere *P. pastoris*, ble 5 µg lineært WT-AMCase og W99A-AMCase satt til de kompetente KM71-cellene.
- 1 ml Solution II ble tilsatt DNA/celleblandingen. Løsningen ble blandet godt ved vortexing.
- Reaksjonen ble inkubert i én time i et 30 °C vannbad. Reaksjonen ble ristet på hvert 15. minutt for å øke effektiviteten av transformasjonen.
- Cellene ble gitt et varmesjokk ved å overføre dem til et vannbad på 42 °C i 10 minutter.
- Cellene ble pelletert ved sentrifugering i 5 minutter ved 3000 x g og romtemperatur. Supernatanten ble kastet.
- Cellene ble resuspendert i 100 µl Solution III.
- 100 µl av cellene ble sådd ut på to MD-plater med 0,25 mg/ml Geneticin og inkubert ved 30 °C i tre dager.
- Som kontroll ble det sådd ut KM71-celler som ikke var blitt transformert på MD-plater.

3.2.3 Test av transformanter

Det ble valgt ut kolonier fra platene som ble beskrevet i avsnitt 3.2.2, for å sjekke for suksessfull transformasjon.

Her ble det brukt to primere som hører til pPIC9K-vektoren; 3' AOX og 5' AOX. Disse vil gi et PCR-produkt som er 1929 bp stort.

Materialer

- 1 kb molekylvektsmarkør (NEB)
- 10x reaksjonsbuffer
- 3' AOX primer (64,1 ng/μl) (se tabell i avsnitt 3.1.3)
- 5' AOX primer (64,4 ng/μl) (se tabell i avsnitt 3.1.3)
- 87 % glyserol
- Buffered glycerol-complex medium (BMGY)
- dNTP mix (12.5 mM)
- Magnesiumklorid (50 mM)
- Mastercycler Gradient PCR-maskin (Eppendorf)
- Taq Hot Start Polymerase

Prosedyre

- En tannpirker med koloni på ble dyttet forsiktig ned i bunnen av et PCR-rør.
- Deretter ble følgende løsning laget i PCR-røret:

Reagent	Mengde
10x reaksjonsbuffer	5 μ l
Magnesiumklorid (50 mM)	2,5 μ l
dNTP mix (12,5 mM)	4 μ l
5' AOX primer (64,4 ng/ μ l)	1 μ l
3' AOX primer (64,1 ng/ μ l)	1 μ l
Destillert vann	36 μ l
Taq Hot Start Polymerase	0,5 μ l
Totalt	50 μl

- Som kontroll ble det benyttet 1 μ l WT-AMCase (50 ng/ μ l). Samme fremgangsmåte ble benyttet for denne som for transformantene.
- Alle reagensene ble holdt på is hele tiden.
- Etter at polymerase ble tilsatt ble følgende PCR-program benyttet:

	Temperatur	Varighet
1 runde	94 °C	2 minutter
30 runder	94 °C	15 sekunder
	55 °C	15 sekunder
	72 °C	45 sekunder
1 runde	72 °C	5 minutter
1 runde	4 °C	∞

- 10 μ l av prøven ble så avsatt på 1 % agarosegel sammen med 1 kb molekylvektsmarkør.
- Gelen ble kjørt på 90 V i 45 minutter.
- Gelen ble kikket på under UV-lys.
- Kolonier som viste vellykkede transformasjoner ble dyrket opp i BMGY-medium over natt ved 28 °C og laget frysestocker av (avsnitt 3.1.4).

3.2.4 Ekspresjon av rekombinante *P. pastoris*-stammer

Transformanter ble dyrket opp i medium med glyserol over natt, før mediet ble byttet ut med et medium med metanol. Dette induserer ekspresjon av AMC_{ase}-genet. Ekspresjonen ble opprettholdt ved å tilsette metanol én gang i døgnet.

Materialer

- 100 % metanol (HPLC-kvalitet)
- BMGY-medium
- Buffered methanol-complex medium (BMMY)
- GS115 Albumin kontroll (fra Multi-copy *Pichia* Expression Kit fra Invitrogen)
- Vellykkede WT- og W99A-transformanter (avsnitt 3.2.3)

Prosedyre

- Kolonier som viste vellykkede transformanter, ble sådd ut i 1 ml BMGY i hver sin brønn på en 24-brønnsplate. Disse ble inkubert ved 500 rpm og 28 °C over natt. Det samme ble gjort med kontrollen GS115 Albumin.
- Overnattkulturen ble overført til sterile eppendorfrør og sentrifugert ved 3000 x g i fem minutter ved romtemperatur. Supernatanten ble kastet.
- Cellepelletten ble resuspendert i 1 ml BMMY-medium og overført til brønner i en 24-brønnsplate. Platen ble inkubert over natt ved 500 rpm og 28 °C.
- 5 µl 100 % metanol (0,5 % av totalt volum) ble tilsatt prøvene hver 24. time for å opprettholde induksjonen av genekspresjonen.
- Hver 24. time ble 5 µl av kulturen overført til et 1,5 ml eppendorfrør for å måle kitinaseaktivitet.

3.2.5 Måling av kitinaseaktivitet

Kitinolytisk enzymaktivitet kan bli målt ved hjelp av hydrolyse av fluorescerende substrater, som 4-methylumbelliferyl- β -N,N'-diacetylchitobioside. Det vil si at to N-acetylglukosaminsukker er koblet til et fluorescerende 4-methylumbelliferone-molekyl (4-MU). En enzymatisk hydrolyse frigjør 4-MU, som ved ionisering i basisk pH kan bli målt ved hjelp av et fluorometer. Mengden 4-MU som dannes over et bestemt tidsrom er proporsjonal med mengden enzym i prøven (Seibold et al. 2009).

Materialer

- 0.2 M Na_2CO_3 -buffer
- 1.0 μM 4-methylumbelliferone-løsning (4-MU)
- 100x BSA
- 500 μM 4-methylumbelliferyl β -D-N,N'-diacetylchitobioside (4-MU-(GlcNAc)₂)
- DyNA QuantTM 200 Fluorometer (Hoefer)
- McIlvain-buffer, pH 5.2
- Prøve fra avsnitt 3.2.4

Prosedyre

- 50 μl 100x BSA ble blandet med 4,95 ml McIlvain-buffer.
- 85 μl McIlvain-buffer med BSA ble satt til et assayrør. Det ble så satt til 10 μl 500 μM 4-MU-(GlcNAc)₂ til røret.
- Rørene ble plassert på 37 °C vannbad, og 5 μl prøvemateriale ble tilsatt.
- Det ble laget en negativ kontroll med 5 μl McIlvain-buffer og BSA som ble satt til røret i stedet for prøvematerialet.
- Reaksjonen ble stoppet etter 60 minutter ved å tilsette 1,9 ml 0.2 M Na_2CO_3 -buffer.

- Fluorometeret ble kalibrert ved å tilsette 1,9 ml 0.2 M Na₂CO₃-buffer til kyvetten og trykke ZERO. Det ble så tilsatt 100 µl 1.0 M 4-MU til kyvetten og blandingen ble mikset godt ved å pipettere opp og ned. Det ble trykket CALIB, 500, ENTER. Dette ble gjort to ganger, hvor det ble samme resultat +/- 2 fluorescerende enheter.
- Kyvetten ble tømt og vasket med destillert vann og prøven ble tilsatt.
- Lokket på fluorometeret ble lukket og prøven ble automatisk avlest.

3.2.6 Måling av proteinkonsentrasjon

Quant-iTTM Protein Assay Kit fra Invitrogen består av en metode som benytter seg av fargereagenser som viser lite fluorescens i vandig miljø, men som gir fluorescens ved binding til proteiner. Assay som benytter seg av slike fargereagenser, er sensitive og nøyaktige for proteinet som kvantifiseres, i motsetning til assay som kun baseres på absorbans. Quant-iT proteinassay har et deteksjonsområde på 0,25-5 µg. Dersom konsentrasjonen på prøven faller utenfor deteksjonsgrensen, bør prøven fortynnes eller oppkonsentreres (Invitrogen 2007).

Materialer

- Prøve fra avsnitt 3.2.4
- Quant-iTTM Protein Assay Kit (Invitrogen)
- QubitTM assayrør (Invitrogen)
- QubitTM Fluorometer (Invitrogen)

Prosedyre

- 1 x n µl proteinreagent ble blandet med 199 x n µl proteinbuffer for å lage en arbeidsløsning. n er antall prøver og standarder som skal måles.
- 10 µl av tre standarder med BSA-konsentrasjoner på 0, 200 og 400 ng/µl ble blandet med 190 µl arbeidsløsning og overført til hvert sitt QubitTM assayrør.

- 1 µl prøvemateriale ble blandet med 199 µl arbeidsløsning og overført til hvert sitt Qubit™ assayrør.
- Alle rørene ble mikset på en vortex før de ble inkubert ved romtemperatur i 15 minutter.
- Prøvene ble målt på et Qubit™ Fluorometer, på innstillingen Quant-iT Protein. Først ble standardene målt og deretter prøvene.

3.2.7 Oppskalering av ekspresjon

Materialer

- 100 % metanol (HPLC-kvalitet)
- BMMY-medium
- BMGY-medium
- Frysestock med positive WT- og W99A-transformanter (avsnitt 3.2.3)

Prosedyre

- Det ble pirket løs celler fra frysestock med en tannpirker. Denne ble sluppet oppi et dyrkningsrør med 5 ml BMGY. Rørene ble inkubert over natt ved 28 °C og 250 rpm.
- 5 ml av forkulturen ble overført til 500 ml BMGY i 2-literskolber. Disse ble inkubert over natt ved 28 °C og 250 rpm.
- Cellene ble høstet ved å sentrifugere kulturene ved 3000 x g i 5 minutter. Supernatanten ble kastet og pelleten ble resuspendert i 100 ml BMMY og overført til 1000 ml-kolber. Kulturene ble inkubert ved 28 °C og 250 rpm.
- Hver 24. time ble 500 µl kultur tatt ut og målt for kitinaseaktivitet, samtidig som 500 µl 100 % metanol (0,5 % av det totale volumet) ble tilsatt.
- Etter 3 døgn med tilsetning av metanol, ble villtypecellene høstet ved sentrifugering ved 3000 x g i 5 minutter. Kun supernatanten ble tatt vare på.
- Mutanten (W99A) ble høstet etter 7 dager med tilsetning av metanol.

- Supernatanten ble filtrert gjennom et 10 000 MWCO filter og oppbevart ved 4 °C.

3.2.8 Oppkonsentrering og dialyse

Dialyse er en separasjonsteknikk som benytter diffusjon over en semipermeabel membran som en måte å rense prøver på. Prøven avsettes i en dialysepølse som består av en membran laget av cellulose som har porer med en bestemt størrelse. Porestørrelsen bestemmer hvilke molekyler som er for store til å kunne diffundere over membranen. Dialysepølsene legges i en dialysebuffer, og en differanse i konsentrasjon mellom bufferne får molekylene i prøven til å diffundere over membranen til likevekt oppnås. Når likevekt oppstår, vil molekylene slutte å diffundere. Det er da nødvendig å bytte dialysebuffer for å fortsette dialyseringen (Pierce 2007).

Materialer

- 0.05 M Buffer A (dialysebuffer), pH 4,2
- 10 000 MWCO-filter
- Oppkonsentrator, Amicon 8400
- Prøve fra avsnitt 3.2.7 (WT)
- SnakeSkin pleated dialysis tubing (Pierce)

Prosedyre

- De filtersteriliserte prøvene ble oppkonsentrert til et sluttvolum på 50 ml ved hjelp av en oppkonsentrator (Amicon 8400) med et 10 000 MWCO filter.
- Konsentratet ble deretter overført til dialyseslanger, lagt i en 5 liters bøtte med 0,05 M dialysebuffer og satt til dialyse i 3 dager ved 4 °C. Dialysebufferen ble skiftet hver dag.

- Etter endt dialyse ble konsentratet pipettert ut av slangene og spunnet ned, før supernatanten ble overført til nye rør.

3.2.9 Ionebyttekromatografi

Ionebyttekromatografi er basert på utveksling av ioner mellom en ladet stasjonærfase og en analytt med motsatt ladning. Stasjonærfasen består av et kolonnemateriale med ionebyttegrupper som adsorberer molekyler med motsatt ladning. Ulike molekyler vil ha ulik grad av interaksjoner med kolonnen på grunn av ulikheter i nettoladning, ladningstetthet og fordeling av overflateladninger. Ved å øke ionestyrken på elueringsbufferen, vil den okkupere flere av ladningssetene på kolonnen, og analytten (i dette tilfellet proteinet) vil bli eluert ut. Elueringsforløpet kan følges med en UV-detektor for å sikre god separasjon. pH er en viktig faktor i denne typen kromatografi fordi pH styrer ladningen på proteinene (Harris 2007).

Til rensing av AMCcase ble det benyttet en svak kationbytter. En kationbytter har utbyttbare kationer, kovalent bundet til negativt ladde funksjonelle grupper. Ved pH lavere enn pI, fester proteinene seg på kolonnen. AMCcase har en pI på 5,42 (Bussink et al. 2007). Eluering av proteinet skjer når pH endres, i dette tilfellet fra 4,2 til 6,5.

Materialer

- 20 % etanol
- BioLogic LP kromatografisystem (BioRad)
- Buffer A, pH 4,2
- Buffer B, pH 6,5
- Dialysert prøve (WT)
- HiTrap CM FF ionebyttekolonne (5 ml)

Prosedyre

- Ionebyttekolonnen ble først vasket med 5 x kolonnevolum (25 ml) buffer A for å fjerne konserveringsmidler. Dialyseløsningen ble videre satt direkte på kolonnen med en flow på 5 ml/min, ca. 25 ml per eluering.
- Deretter ble kolonnen vasket med buffer A (ca. 5-10 kolonnevolum) til en baselinje ble oppnådd.
- Et elueringsprogram med en gradient fra 0-100 % over 20 minutter ble benyttet for å eluere ut AMCase. Proteiner ble detektert ved bruk av en UV-detektor.
- AMCase ble samlet opp i fraksjoner.

3.2.10 Oppkonsentrering av AMCase

Amicon Ultra-15 er et sentrifugefilter som benyttes til å filtrere og oppkonsentrere ulike løsninger. I dette tilfellet ble det benyttet et Amicon Ultra-15 filter som slipper igjennom forbindelser med molekylvekt mindre enn 10 000 Da. Dette betyr at større molekyler vil bli igjen i filteret, mens mindre molekyler vil passere (Millipore 2010).

Materialer

- Amiconrør
- Renset protein (WT)

Prosedyre

- Det rensede proteinet ble overført til amiconrør og sentrifugert ved 3000 rpm ved 4 °C til det var omtrent 1,5 ml igjen.
- Det som gikk gjennom filteret, ble kastet mens det som var igjen, ble overført til et eppendorfrør og oppbevart ved 4 °C.

- Kitinaseaktiviteten ble målt (avsnitt 3.2.5), og proteinet ble analysert ved SDS-PAGE (avsnitt 3.2.11).

3.2.11 Test av protein ved SDS-PAGE

Proteiner kan bli separert og isolert på en sodium dodecyl sulfat-polyakrylamidgel (SDS-PAGE). Proteiner har vanligvis en nettopositiv eller nettonegativ ladning, avhengig av hvilke aminosyrer de består av. Et elektrisk felt vil få proteiner til å vandre gjennom gelen, avhengig av hvilken nettoladning de har i tillegg til deres størrelse og fasong (Alberts 2008).

En SDS-polyakrylamidgel består av et tett nettverk av kryssbundete polyakrylamidmolekyler. Porestørrelsen kan varieres etter hvilken størrelse det ønskede proteinet har. SDS er en negativt ladet detergent. Denne binder til hydrofobe områder på proteinmolekylet. Dette får proteinet til å folde ut og bryte bindingen til andre stoffer, som lipider og andre proteiner, og dermed være løselig i SDS-løsningen. Bindingen av SDS til proteinet gjør at det får en netto negativ ladning. Proteinene vil dermed vandre mot den positive elektroden når en spenning settes over gelen. Proteiner med lik størrelse vil vandre gjennom gelen med samme fart, fordi deres native struktur er helt utfoldet av SDS, slik at de har samme fasong. Proteiner med lik størrelse vil binde samme mengde SDS og dermed ha lik negativ ladning. Store proteiner vil vandre sent gjennom gelen, mens små proteiner lettere vil trenge gjennom porene i gelen.

Proteinene vil dermed bli separert i bånd etter størrelse i gelen. For å kunne se proteinbåndene på gelen, kan man farge den med Coomassie blue-, sølv- eller gullfarge (Alberts 2008).

SDS-PAGE er en vanlig teknikk å bruke for å separere proteiner fordi den kan brukes på alle proteiner. Ettersom gelen separerer proteinene etter størrelse, får man også informasjon om deres molekylvekt (Alberts 2008).

Materialer

- 20X NuPAGE[®] MOPS SDS Running Buffer (Invitrogen)
- Avfargingsløsning
- Coomassie fargeløsning
- NuPAGE[®] LDS Sample Buffer (4X) (Invitrogen)
- NuPAGE[®] Novex[®] Bis-Tris Mini Gels (10 %) (Invitrogen)
- NuPAGE[®] Reducing Agent (10X) (Invitrogen)
- Precision Plus Protein Dual Color Standard molekylvektsmarkør
- Renset protein (WT)

Prosedyre

- 13 µl rensed protein ble blandet med 2 µl reduserende agent og 5 µl sample buffer.
- Rørene ble satt i et 70 °C vannbad i 10 minutter.
- 20 µl prøve og 5 µl molekylvektsmarkør ble avsatt på gelen.
- En spenning på 200 volt ble satt over gelen i 50 minutter.
- Gelen ble overført til en boks, dekket med Coomassie fargeløsning og satt til risting i 30 minutter. Fargeløsningen ble dekantert, og gelen ble skylt med destillert vann før den ble dekket med avfargingsløsning og satt til risting over natt.

3.3 Induksjon av humane lungeceller med IL-13

3.3.1 BEAS-2B cellekultur

BEAS-2B- cellelinjen ble etablert og dyrket i Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium. Ved vekst i tungt medium, fikk cellene vokse til minst 5 delinger var gjennomført og den isotopiske merkingen var inkorporert.

3.3.2 Celledyrking

Cellelinjen BEAS-2B ble dyrket i RPMI- medium og videre i SILAC- medium. Cellene ble hele tiden oppbevart i en inkubator ved 37 °C og 5 % CO₂ atmosfære. Mediet bestod av de nødvendige næringsstoffer og vekstfaktorer som aminosyrer, glukose, salt, vitaminer og kalveserum. Kalveserum er viktig for å inaktivere trypsin.

3.3.3 Høsting av celler

Hver fjerde dag ble cellene løsnet fra flaskeveggen, fortynnet og sådd ut igjen i nye flasker.

Det tunge SILAC-mediet inneholder lysin- og arginin-aminosyrer hvor karbonene består av ¹³C i stedet for ¹²C. Ettersom begge aminosyrene inneholder seks ¹³C-atomer, vil hver lysin- og arginin-aminosyre være 6 Da tyngre enn sine lette paralleller.

Materialer

- Lett og tungt SILAC- medium
- Phosphate buffered saline (PBS)
- Trypsin

Prosedyre

- Næringsmediet ble sugd ut av flaskene.
- Flaskene ble vasket med 2 x 5 ml PBS. Bufferen ble sugd av.
- Det ble tilsatt 2,5 ml trypsin og flaskene ble inkubert ved 37 °C i 10 minutter.
- 5 ml medium med kalveserum ble tilsatt for å stoppe trypsineringen.
- Løsningen ble overført til sentrifugerør og sentrifugert ved 1300 rcf i 10 minutter.

- Supernatanten ble fjernet, og den gjenværende pelleten ble resuspendert i 1 ml medium.
- Celletallet ble bestemt ved å benytte en Beckman Coulter particle counter.
- $1-2 \times 10^6$ celler ble sådd ut i 75 cm² dyrkingsflasker.

3.3.4 Bestemmelse av celletall

For å bestemme celletallet, ble det benyttet en Z1™ Series COULTER COUNTER® Cell and Particle Counter fra Beckman Coulter. Dette instrumentet benytter seg av en elektrisk sensorteknologi. Cellene blir blandet sammen med en saltløsning. Når denne saltløsningen pumpes gjennom instrumentet, dannes det et elektrisk felt mellom to elektroder. En elektrisk puls genereres og antall pulsslag og pulsamplituden reflekterer antall celler i løsningen (Beckman 2006).

Materialer

- Beckman Coulter kyvette
- Saltløsning

Prosedyre

- 10 ml saltløsning ble overført til en Beckman Coulter kyvette.
- 20 µl celleduspensjon ble tilsatt saltløsningen.
- Celletallet ble målt på celledelleren og oppgitt som celler/ml

3.3.5 Induksjon av BEAS-2B - celler med interleukin-13

BEAS-2B-cellene i tungt medium ble induisert med 1 ng/ml IL-13. Dette ble gjort basert på lignende studier (Marion-Letellier et al. 2008), hvor Caco-2-celler ble induisert med 1 ng/ml IL-1 β . Dette er fordi det er ønskelig å se spesifikt hvilke endringer som skyldes IL-13.

Dersom en høyere konsentrasjon ble benyttet, kunne dette ført til flere uønskede reaksjoner, som for eksempel celledød og dermed stress på grunn av for mye IL-13. BEAS-2B-cellene ble induisert i 24 timer, da dette er vanlig prosedyre ved proteomiske studier (D'Hertog et al. 2007).

Materialer

- BEAS-2B-celler dyrket i minst 5 dager
- Interleukin-13

Prosedyre

- 1 ng/ml IL-13 ble tilsatt BEAS-2B-cellene i tungt SILAC-medium.
- Et tilsvarende volum med autoklavert vann ble tilsatt til cellene i lett SILAC-medium.
- Cellene ble inkubert ved 37 °C i 24 timer før de ble høstet på samme måte som i avsnitt 3.3.3.
- Cellene ble telt ved hjelp av en celteller (avsnitt 3.3.4), og tunge og lette celler ble blandet i et 1:1 forhold. Følgende formel ble brukt:

$$V_1N_1 = V_2N_2,$$

hvor V er volum i ml, og N er antall celler/ml.

3.3.6 Cellelysing

Cellelysing er første trinn i cellefraksjonering og proteinrensing. Det finnes mange ulike teknikker, inkludert fysisk cellelysing og detergentbaserte metoder. Det er også viktig at proteinutbyttet er tilstrekkelig til videre prosessering. Detergentbaserte lyseringsmetoder er enkle og rimelige i bruk. Detergenter gjør cellemembranen oppløselig og bryter lipid-proteininteraksjoner (Thermo 2010).

ProteoExtract[®] Subcellular Proteome Extraction Kit fra Calbiochem er et fraksjoneringskit som baserer seg på en subcellulær fraksjonering av mammalske proteiner. Prinsippet er at det er ulik løselighet mellom de forskjellige subcellulære delene i en celle.

Ekstraksjonsprosedyren er laget for å gi fire fraksjoner; proteiner fra cytosol, organeller/membran, cellekjerne og cytoskjelett (Calbiochem 2008).

Protokollen er laget for et celledtall mellom $3\text{-}5 \times 10^6$ celler. For å sikre et bra proteinutbytte, ble det benyttet mellom $25\text{-}27 \times 10^6$ celler.

Materialer

- Tunge og lette BEAS-2B-celler blandet i 1:1 forhold
- ProteoExtract[®] Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem)

Prosedyre

- Alt ble oppbevart på is under hele prosedyren.
- Cellesuspensjonen ble overført til eppendorfrør og sentrifugert ved $1300 \times g$ i 10 minutter ved $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Supernatanten ble fjernet.
- Cellepelleten ble forsiktig resuspendert i 2 ml vaskebuffer. Cellene ble pelletert ved sentrifugering i 10 minutter ved $100\text{-}300 \times g$ og $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Supernatanten ble fjernet, og vasketrinnet ble gjentatt enda en gang.

- En blanding av 1 ml ekstraksjonsbuffer I og 5 μ l proteasehemmer ble tilsatt cellepelleten. Pelleten ble forsiktig resuspendert før røret ble satt til forsiktig risting i 10 minutter ved 4 °C. Cellene ble pelletert ved sentrifugering i 10 minutter ved 500-1000 x g og 4 °C.
- Supernatanten ble overført til et rent eppendorfrør. Fraksjon 1; proteiner fra cytosol.
- Den gjenværende cellepelleten ble resuspendert i en blanding av 1 ml ekstraksjonsbuffer II og 5 μ l proteasehemmer. Røret ble inkubert i 30 minutter ved forsiktig risting ved 4 °C. Cellene ble pelletert ved sentrifugering i 10 minutter ved 5000-6000 x g og 4 °C.
- Supernatanten ble overført til et rent eppendorfrør. Fraksjon 2; proteiner fra membran og organeller.
- Cellepelleten ble resuspendert i en blanding av 500 μ l ekstraksjonsbuffer III, 5 μ l proteasehemmer og 1,5 μ l Benzonase[®] nuklease. Løsningen ble inkubert i 10 minutter ved forsiktig risting ved 4 °C. Cellene ble pelletert ved sentrifugering i 10 minutter ved 7000 x g og 4 °C.
- Supernatanten ble overført til et rent eppendorfrør. Fraksjon 3; proteiner fra cellekjernen.
- Det resterende cellematerialet ble resuspendert i en blanding av 500 μ l ekstraksjonsbuffer IV og 5 μ l proteasehemmer. Dette utgjorde fraksjon 4; proteiner fra cytoskjelettet.
- Fraksjonene ble oppbevart ved 4 °C.

3.3.7 Proteinutfelling med aceton

Aceton kan benyttes til å felle ut proteiner. Denne metoden oppkonsentrer proteinene og fjerner uønskede stoffer, som for eksempel salter (Pierce 2004).

Materialer

- BEAS-2B-celler blandet i et 1:1 forhold
- Iskald aceton (– 20 °C)

Prosedyre

- 4 x volumet til proteinløsningene ble tilsatt av iskald aceton. Inkubasjon ble utført på is i 15 minutter.
- Proteinene ble pelletert ved sentrifugering i 10 minutter ved 12 000 x g og 4 °C.
- Supernatanten ble dekantert og pelleten ble lufttørket.

3.3.8 Redusering og alkylering av disulfidbindinger

For å denaturere proteiner er det nødvendig å bryte disulfidbindingene som kobler aminosyrene i proteinene sammen. Milde reduserende kjemikalier benyttes for å omdanne disulfidbindingene til tiolgrupper (-SH). Dithiothreitol brukes for å redusere disulfidbindingene og bevare monotioler i redusert tilstand (Cleland 1964). Iodoacetamid benyttes for å alkylere frie SH-bindinger og dermed forhindre at disulfidbroer gjendannes (Boja & Fales 2001).

Materialer

- Acetonpresipitert pellet (avsnitt 3.3.7)
- Dithiothreitol (DTT), 0.1 mM
- Iodoacetamide (IAA), 5.5 mM

Prosedyre

- Pelleten ble resuspendert i 50 µl DTT og inkubert ved 56 °C i 30 minutter.
- Løsningen ble avkjølt til romtemperatur, og 100 µl IAA ble tilsatt. Dette ble blandet godt på en vortexer og inkubert i 20 minutter ved romtemperatur i mørket.
- Løsningen ble frysetørket til all væske fordampet bort.

3.3.9 1-dimensjonal gelelektroforese

Materialer

- Se avsnitt 3.2.11
- BenchmarkTM Protein Ladder (Invitrogen)
- Frysetørkede proteinfraksjoner fra avsnitt 3.3.8

Prosedyre

- De tørre proteinfraksjonene ble resuspendert i 100 µl av en blanding bestående av 100 µl sample buffer, 400 µl destillert vann og 50 µl reduserende agent.
- Deretter ble samme prosedyre ble fulgt som beskrevet i avsnitt 3.2.11
- 20 µl proteinfraksjon og 5 µl molekylvektsmarkør ble applisert på gelen, og en spenning på 150 V ble påsatt i 80 minutter.
- Gelen ble farget og avfarget på samme måte som beskrevet i avsnitt 3.2.11.

3.3.10 Trypsinering

Trypsin er et av de mest brukte enzymene for å hydrolysere proteiner til peptider for massespektrometriske analyser. Trypsin er en spesifikk serinprotease som hydrolyserer peptidkjeder i den C-terminale enden til aminosyrene arginin og lysin. Unntaket her er når aminosyren prolin er lokalisert på karboksylsiden til lysin eller arginin. Peptidkjeden vil da være nærmest umulig å kutte (Promega 2009).

Materialer

- 100 mM ammonium bikarbonat (Ambic)/AcN (1:1, vol/vol)
- 1D-gel med reduserte og alkylerte proteiner
- 5 % maursyre
- Trypsinbuffer

Prosedyre

- Det ble skåret ut 10 fraksjoner per prøve fra gelen. Disse bitene ble lagt i hvert sitt eppendorfrør.
- Gelbitene ble avfarget ved å dekke dem med 100 µl av en blanding med 100 mM Ambic/acetonitril (AcN) (1:1, vol/vol) og inkubert i 30 minutter ved romtemperatur. Rørene ble ristet på en vortexer med jevne mellomrom.
- 500 µl 100 % AcN ble tilsatt og inkubert ved romtemperatur helt til gelbitene krympet og ble hvite. Under inkuberingen ble rørene vortexet. AcN ble fjernet ved hjelp av en pipette.
- Trypsinbuffer (~ 50 µl) ble tilsatt de tørre gelbitene slik at disse ble dekket og de ble inkubert på is i 120 minutter. Etter 30 minutter ble det kontrollert at gelbitene fortsatt var dekket med trypsinbuffer. Det ble tilsatt mer trypsinbuffer dersom det var for lite i rørene.
- 10-20 µl Ambic ble tilsatt rørene for å holde gelbitene fuktige under kuttingen.

- Rørene ble inkubert ved 37 °C over natt.
- 100 µl ekstraksjonsbuffer (1:2 (vol/vol) 5 % maursyre/AcN) ble tilsatt til hvert rør og disse ble inkubert i 15 minutter ved 37 °C og risting.
- En pipette ble brukt til å forsiktig fjerne supernatanten fra rørene og overføre den til rene eppendorfrør.
- Ekstraktet ble frysetørket helt til all væske fordampet bort.

3.3.11 Forberedelse til LC-MS analyse ved STop And Go Extraction Tips (STAGE-Tips)

Den massespektrometriske teknologien er ofte ikke kompatibel med buffere som benyttes til trypsinering av peptider. Dette resulterer i behovet for å rense prøvene før analyse. Rappsilber og medarbeidere (Rappsilber et al. 2003) har beskrevet en rask og effektiv metode for å rense peptider. STop And Go Extraction Tips (STAGE Tips) er en kromatografisk metode som baserer seg på omvendt fase-prinsippet. Den faste fasen er en upolar C₁₈-kolonne. Rensing av proteiner baserer seg da på binding til kolonnematerialet. Proteinene vil kunne elueres ut ved bruk av et passende løsemiddel. Fastfasen består av mange små, upolare kuler dekket med Teflon som danner en liten plate. Det lille volumet til platen, i tillegg til Teflon, gjør at veldig få peptider binder irreversibelt (Rappsilber et al. 2003). C₁₈-materialet finnes som PTFE mesh i plater (3M, Minneapolis, MN) og pakkes i 20 µl GELloader tips (Eppendorf).

Produksjonen av STAGE-Tips er billig, enkel og reproducerbar. De er enkle å bruke, og ettersom de er til engangsbruk, forhindres forurensing mellom prøver. De er resistente mot fortetning og tap av prøve (Rappsilber et al. 2003).

Materialer

- 0,1 % trifluoroeddiksyre (TFA)
- 60 % (v/v) AcN
- 100 % metanol
- Trypsinerte peptider

Prosedyre

- 10-20 µl 0,1 % TFA ble tilsatt det tørre ekstraktet og blandet godt før det ble inkubert i 2-5 minutter i et sonikeringsbad for å bryte intermolekulære interaksjoner i proteinene.
- Rørene ble sentrifugert i 15 minutter ved 6,6 x 1000 g.
- C₁₈-kolonnematerialet ble aktivert ved at 5 µl metanol ble presset gjennom ved hjelp av en sprøyte.
- Kolonnematerialet ble ekvilibrert med 2 x 10 µl 0,1 % TFA som ble presset gjennom.
- 10 µl prøve ble applisert på og eluert ut av kolonnen.
- Kolonnen ble vasket med 2 x 10 µl 0,1 % TFA.
- Eluering ble gjort med 1 µl 60 % (v/v) AcN. Prøven ble da samlet i et rent rør.
- Prøvene ble frysetørket og analysert ved hjelp av LC-LTQ-Orbitrap-massespektrometri. Dette ble utført på Bioteknologisenteret ved Universitetet i Oslo.

3.3.12 LC-LTQ-Orbitrap-MS

I denne oppgaven har proteinidentifikasjon blitt utført ved hjelp av et UltiMate 3000 (Dionex)/LTQ-Orbitrap-XL-instrument (Thermo Scientific) på Bioteknologisenteret ved Universitetet i Oslo. Prøvene ble rensert ved hjelp av væskechromatografi (LC) på et UltiMate 3000-instrument. Peptidene ble eluert med en flow rate på 0,3 µl/min og med en gradient på 7-40 % B i 90 minutter, deretter 40-80 % B i 8 minutter. Løsning A bestod av 2 % AcN med 0,1 % maursyre, løsning B bestod av 90 % AcN med 0,1 % maursyre.

De rensede prøvene ble ført inn i ionekilden, hvor de ble ionisert ved hjelp av elektrosprayionisering. Prøvene ble så overført til LTQ-ionefellen, hvor produktioner ble dannet, før de ble introdusert for Orbitrap for å få høy oppløsning og massenøyaktighet.

3.3.13 Analyse av data

Dataanalyse av proteiner består av fem trinn og involverer flere softwareprogrammer:

1. Datainnsamling
 - Xcalibur
2. Påvisning av funksjoner og kvantifisering av peptider
 - Quant.exe (del av MaxQuant)
3. Assosiere fragmentspektra med aminosyresekvenser
 - Mascot
4. Validering og scoring av peptididentifikasjoner
 - Identify.exe (del av MaxQuant)
5. Analyse og manuell validering av identifiserte proteiner
 - Excel
 - PubMed

Råfiler genereres av instrumentets software (Xcalibur) og overføres til en lokal datamaskin hvor de lastes opp i Quant.exe, en del av MaxQuant som er en programvare bestående av algoritmer utviklet spesielt for høyt oppløselig, kvantitativ Orbitrap-MS-data. Quant.exe utfører alle oppgaver som kan utføres før identiteten til peptidene er kjent. Filer med behandlede MS/MS-spektra (.msm-filer) sendes fra Quant.exe til en MS/MS-søkemotor (Mascot). Resultatene fra søkemotoren blir overført til Identify.exe (også en del av MaxQuant), som utfører statistiske valideringer, setter sammen peptider til proteiner, kvantifiserer proteiner og lager tabeller med resultater som kan lastes opp i Microsoft Office Excel (Cox & Mann 2008).

Materialer

- Mascot Daemon installert på PC
- MaxQuant software (tilgjengelig ned fra <http://www.maxquant.org/>)
- Microsoft Office Excel 2007
- PC med minst 2 GB RAM
- Thermo Fisher Scientific Xcalibur software
- Tilgang til Mascot (Matrix Science) server
- Windows XP eller Windows Vista

Prosedyre

Deteksjon og kvantifisering

- Alle Xcalibur .raw-filene fra instrumentets software ble overført til en mappe på den lokale PCen. Xcalibur er et program som viser .raw-filene fra Orbitrap som massespektra, og som eksporterer topplister som kan brukes til videre søk.
- Quant.exe i mappen kalt "MaxQuant" ble startet og "Raw files"-folderen ble åpnet.
- Råfilene ble overført til MaxQuant ved å trykke på "Select folder"-knappen
- Deretter ble det valgt å kjøre to tråder. Det vil si at to filer ble kjørt samtidig.
- "Parameters"-folderen ble åpnet.
- Her ble det valgt "Orbitrap/ FT Ultra" under "Instrument".
- Under "SILAC" ble det valgt "Doublets" ettersom en dobbel SILAC-merking ble benyttet; lett og tung.
- Arg6 og Lys6 ble krysset av under "Heavy labels", da det var disse aminosyrene som ble inkorporert i de tunge cellene.
- Under "Max. Labeled AAs" ble det valgt 2. Dette er maksimum antall merkede aminosyrer et peptid kan ha for å bli detektert av MaxQuant.
- Under "Variable modifications" ble det valgt "Oxidation (M)" og "Acetyl (Protein N-term)". Dette betyr at oksiderte metioninresiduer og N-acetylte proteiner ble tatt med videre. Begge disse modifikasjonene er vanlige i humane celler.

- "Maximum missed cleavages" ble satt til 2. Det vil si at trypsin kan hoppe over to kløyvinger etter arginin og/eller lysin og likevel vil riktig protein bli funnet.
- Under "Fixed modifications" ble "Carbamidomethyl (C)" valgt. Karbamidometyl er en gruppe som finnes på alle cysteiner ettersom det har blitt benyttet iodoacetamid for å alkylere alle cysteiner.
- Under "Database" ble IPI_human database (v3.52) valgt. Denne sekvensdatabasen ble valgt for å bruke i Mascot-søket. Denne databasen er også manuelt oppdatert til å innholde kjente kontaminanter, samt den reverserte versjonen av den aktuelle databasen, som minsker sjansen for falske positive treff.
- Under "Enzyme" ble "Trypsin" valgt. Det er dette enzymet som proteinene har blitt kuttet med.
- "MS/MS tol." ble satt til 0.5 Da. Dette er maksimum avvik i masse som tillates for fragmenterte ioner.
- "Top MS/MS peaks per 100 Da" ble satt til 6. De seks mest intense toppene per 100 Da ble valgt å gå videre med til databasesøk med Mascot.
- "Max- .msm file size (MB)" ble satt til 350 MB. .msm-filer som Quant lager til søk i Mascot blir delt i to dersom de er større enn den valgte størrelsen. .msm-filer inneholder behandlede MS/MS spektra.
- Deretter ble "Raw files"-folderen valgt igjen og "Start" ble valgt. Det søkes nå etter treff i IPI_human databasen.

Søking med Mascot

- Etter at Quant.exe var ferdig, ble en mappe kalt "combined" laget automatisk av programmet. Her er både .msm filer og .par filer, hvor alle parametrene som har blitt brukt til analysen, er oppsummert.
- Mascot Daemon ble startet og "Task editor"-folderen ble valgt.
- Under "Parameter set" ble den ene .par-filen valgt og under "Data file list" ble den korresponderende .msm-filen lagt inn.
- "Run" ble så valgt. Dette ble gjort for å assosiere fragmentspektra med aminosyresekvenser.
- De to ovenstående punktene ble gjentatt helt til alle .msm-.par-parene var blitt valgt.

- Etter endt søk ble de resulterende .dat-filene, til hver .msm-fil, med aminosyresekvenser funnet på Mascot-serveren.
- En kopi av .dat-filene ble overført til "combined"-mappen.

Identifisering og validering

- "Identify.exe" ble funnet i mappen kalt "MaxQuant". Programmet ble startet og .raw-filene og .dat-filene ble lastet opp under "Input files".
- Under "Protein sequences" ble rett sekvensdatabase (FASTA) valgt. Det er viktig at denne er lik databasen som ble brukt til søk i Mascot ("IPI_human database (v3.52)).
- Under "Parameters" i Identify ble "Peptide FDR" og "Protein FDR" satt til 0,05. Det betyr at det er 5 % sjanse for at treffet er feil.
- "Max peptide PEP" ble satt til 1. Dette er sannsynligheten for et falskt treff gitt peptididentifikasjonscore og lengden på peptidet. Satt til 1 betyr at det ikke er noen ytterligere filtrering.
- "Min. peptide length" ble satt til 6. Dette er minste lengde et peptid må ha for å bli identifisert og kvantifisert.
- "Min. unique peptides" og "Min. peptides" ble satt til 1. Dette er hvor mange unike og totale peptider en proteingruppe bør ha for å bli vurdert som identifisert og rapportert i den siste tabellen.
- "Reverse string" ble satt til "REV_" og "Contaminant string" ble satt til "CON_". Alle proteiner i databasen har blitt lagt inn med deres reverse sekvenser. Dersom det oppstår et treff i den reverse databasen, er det sannsynlig at den er en falsk positiv. Det er lagt inn en del vanlige kontaminanter i databasen. Dersom det oppstår et treff her vil det være en kontaminant.
- Under "Protein quantification" ble "Use unique and razor peptides" valgt. Kvantifisering ble gjort ved å bruke Occam's razor prinsipp for å finne ut hvilken proteingruppe peptider unike for to proteingrupper hører til.
- "Min. ratio count" ble satt til 2. Dette er minste antall SILAC-par som er nødvendig for proteinkvantifisering.
- "Number of threads" ble satt til 2. Det vil si at to filer ble kjørt samtidig.

- ”Re-quantify”-boksen ble trykket bort. Dette vil si at Identify ikke kalkulerer ratioen til isotope mønstre som ikke er SILAC-par.
- ”Keep low-scoring versions of identified peptides” ble trykket bort. Da ble ikke peptider med for lav peptidscore kvantifisert.
- ”Start” ble trykket og søk etter validering og scoring av peptididentifikasjoner ble utført.

Etterbehandling av resultater

- Filen ”proteinGroups.txt” fra Identify.exe ble åpnet i Excel. Arket ble kalt ”All proteins”. Listene ble sortert etter ”Contaminants” og ”Reverse hits”.
- En kopi ble laget av arket og kalt ”No CON or REV”. Alle rader med ”+” i ”Contaminants” eller ”Reverse hits”-kolonnene ble fjernet.
- En kopi ble laget av arket og kalt ”> 2 peptides”. Listene ble sortert etter ”Peptide Counts (all)” fra minst til størst verdi. Rader med mindre enn 2 peptider for et protein ble slettet.
- En kopi av arket ble laget og kalt ”Corrected p-values”. Listene ble sortert etter ”Ratio H/L Significance (B)” fra høyest til lavest verdi. ”Significance A” ble funnet ved å bruke den naturlige logaritmen til alle proteinratioene for å kalkulere standardavvik. Hver ratio sammenlignes med en gjennomsnittsverdi og avstanden fra gjennomsnittet måles i antall standardavvik. Hver ratio får dermed en z-verdi som er lik xSD fra gjennomsnittet. Deretter ble sannsynligheten (p-verdien) for å få en z-verdi som er så stor eller større kalkulert. ”Significance B” ble funnet ved samme prosedyre, men her ble proteinene delt inn i grupper med ~300 proteiner basert på deres proteinintensitet.
- Det ble satt inn to kolonner etter ”Ratio H/L Significance (B)” Den første ble kalt ”Rank” og den andre ble kalt ”Benjamini-Hochberg corrected p-values”.
- Det proteinet med minst differanse i ”Ratio H/L Significance (B)” fikk verdi 1 i ”Rank”. Det ble fylt inn tall oppover i kolonnen, slik at proteinet med størst differanse i ”Ratio H/L Significance (B)” fikk høyest verdi.

- I kolonnen for "Benjamini-Hochberg corrected p-values" ble følgende formel satt inn: $=[\text{P-VALUE}] * n / [\text{RANK}]$. Her er "P-VALUE" en referanse til p-verdiene i "Ratio H/L Significance (B)" og "RANK" en referanse til verdiene i "Rank"-kolonnen. Hvert protein ble statistisk testet for om det er signifikant regulert eller ei ("Significance B"). Ved mange proteiner i et datasett vil hvert protein bli testet, og statistisk sett vil noen av dem ved en tilfeldighet gi en lav p-verdi. Det er derfor nødvendig å korrigere p-verdiene ut i fra hvor mange tester som blir utført. Benjamini-Hochberg-metoden korrigerer for dette.
- En ny kopi av arket ble laget og kalt "Only regulated proteins". Alle rader med "Benjamini-Hochberg corrected p-values" høyere enn grensen som ble satt til 0,1 (dvs. at det er 1 % sjanse for at treffet er feil) ble slettet.

Til slutt ble proteinene sortert etter "Ratio H/L normalized". Dette er de statistisk signifikante regulerte proteinene. Proteiner større enn 1 er oppregulerte, mens proteiner mindre enn 1 er nedregulerte.

4 RESULTATER

4.2 Valg av seterrettede mutanter

Det er av interesse å få en økt forståelse av AMCcase fordi dette enzymet kan være et viktig terapeutisk mål innen astma (Elias et al. 2005). For å oppnå dette, spesielt med hensyn til hvordan mammalske kitinaser hydrolyserer kitin, er det svært fordelaktig med tilgang på en rekombinant villtype og utvalgte seterrettede mutanter av AMCcase.

I dette arbeidet har tre mutanter blitt laget. Mutasjonene er på viktige residuer i det aktive setet til AMCcase; Trp31 (W31), Trp99 (W99) og Glu140 (E140). I tillegg er villtype rekombinant fremstilt.

4.2.1 Villtype

For å kunne studere hvordan AMCcase bryter ned ulike typer substrat og binder til inhibitorer, er det fordelaktig å ha tilgang til en rekombinant versjon av enzymet som kan produseres i store mengder.

4.2.2 E140Q

Glutamat 140 (E140) er den katalytiske syren i AMCcase. Protonering av denne katalytiske syren er siste trinn i hydrolysen av kitin. For glykosyl hydrolaser er det vanlig å mutere denne til glutamin 140 (Q140) for å gjøre disse inaktive uten at det går utover bindingsegenskaper enzymet har til for eksempel substrater (Olland et al. 2009). Mutanten E140Q kan dermed brukes til bindingsstyrkemålinger.

4.2.3 W31A og W99A

W31A er en mutasjon i – 3-subsetet og W99A er en mutasjon i + 1-subsetet hos AMCase. Her byttes den aromatiske aminosyren tryptofan ut med den ikke-aromatiske aminosyren alanin. Disse mutasjonene vil kunne gi informasjon om hvilken retning kitin hydrolyseres. Trp-Tyr-Trp-motivet til AMCase som befinner seg fra subsete –6 til –3 indikerer at kitin brytes ned fra den reduserende enden, som observert for kitinase A (Zakariassen et al. 2009). Det kitinbindende domenet til AMCase befinner seg på motsatt side av Trp-Tyr-Trp-motivet og kan tyde på at kitin brytes ned fra den ikke-reduserende enden (Horn et al. 2006; Zakariassen et al. 2009).

Dersom prosessiviteten for AMCase mistes på grunn av en mutasjon fra W31 til A31, indikerer dette at kitin brytes ned fra den reduserende enden og motsatt dersom prosessiviteten mistes ved en mutasjon fra W99 til A99.

4.2.4 Tillaging av plasmid

AMCase-genet i en pUC57-vektor ble bestilt fra GenScript. Genet ble kuttet ut av vektoren og ligert inn i en *P. pastoris*-vektor, pPIC9K. pPIC9K-vektoren med AMCase-genet innsatt ble transformert inn i *E. coli*-celler. For å undersøke om genet ble korrekt ligert inn i vektoren, ble plasmidet isolert og sekvensert. Dette ble utført av Ingunn Alne Hoell.

Mutasjonene i AMCase ble laget ved å bruke spesialdesignede primere i en PCR-reaksjon, hvor AMCase-genet i pPIC9K-vektoren ble brukt som templat. Det ble laget to primere til hver mutasjon; én forward og én reverse (tabell 3.1).

Plasmidene ble transformert inn i *E. coli*-celler. Transformasjonsreaksjonene ble sådd ut på agarskåler, og kolonier ble dyrket opp. Det ble forsøkt med ulike mengder templat til mutagenesen for å finne ut hvor mye templat som er optimalt å bruke (tabell 4.1).

Tabell 4.1: Omtrentlig antall kolonier som vokste fram etter seterettet mutagenese med ulike mengder DNA-templat, i tillegg til mutagenese- og transformasjonskontroller.

Prøve	Antall kolonier
5 ng templat	0
10 ng templat	2-10
20 ng templat	10-50
50 ng templat	10-50
Mutagenesekontroll (pWhitescript)	~ 50
Transformasjonskontroll (pUC18)	~ 200

Noen kolonier ble valgt ut og undersøkt for å se om pPIC9K-vektoren med AMC_{Case}-genet innsatt ble inkorporert inn i *E. coli*-cellene (figur 4.1-4.3). pPIC9K-vektor med AMC_{Case}-genet innsatt (50 ng/μl) ble brukt som kontroll ved transformasjonstestene.

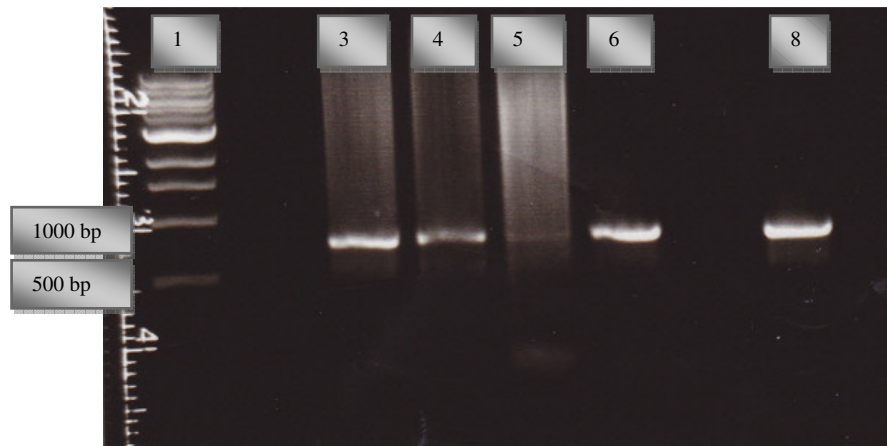
I figur 4.1 vises resultatene etter at W31A ble testet. Det ble brukt to primere; én genprimer (W31A reverse) og én vektorprimer (5' AOX fwd). Primerne gir et PCR-produkt på 464 basepar. Kontrollen vises i brønn nr. 7.



Figur 4.1: Test av transformanter; W31A i *E. coli*-celler. Det ble plukket tilfeldige kolonier på skålene som ble testet for vellykket transformasjon. Brønn 1: 1 kb ladder; brønn 3, 4 og 6: Ulike W31A-kolonier (ved en vellykket transformasjon vil PCR-produktet bli 464 bp stort). I brønn nr. 7 ble en kontroll avsatt: pPIC9K-vektor med AMC_{Case}-genet innsatt (50 ng/μl).

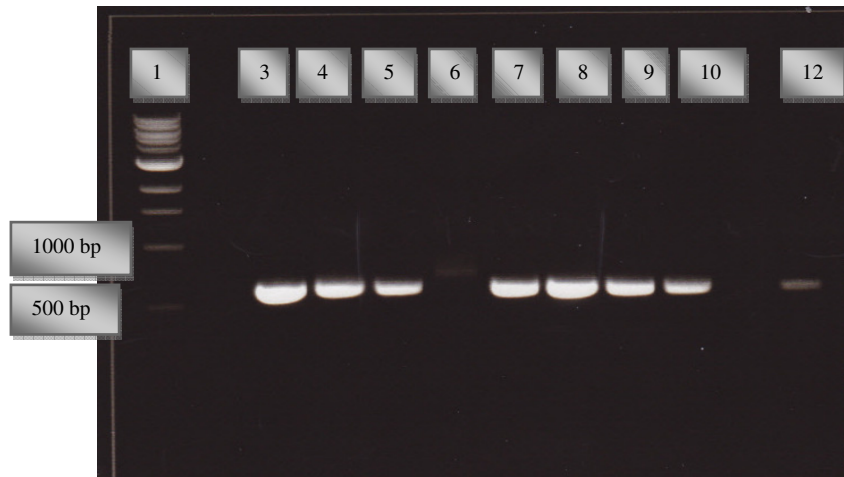
4 RESULTATER

I figur 4.2 vises resultatene etter at kolonier med E140Q ble testet. Primerne som ble brukt, E140Q reverse og 5' AOX fwd, gir et PCR-produkt som er 789 bp stort. Kontrollen vises i brønn nr. 8.



Figur 4.2: Test av transformanter; E140Q i E. coli-celler. Det ble plukket tilfeldige kolonier på skålene som ble testet for vellykket transformasjon. Brønn 1: 1 kb ladder; brønn 3, 4, 5 og 6: Ulike E140Q-kolonier (ved en vellykket transformasjon vil PCR-produktet bli 789 bp stort). I brønn nr. 8 ble en kontroll avsatt: pPIC9K-vektor med AMC_{ase}-genet innsatt (50 ng/μl).

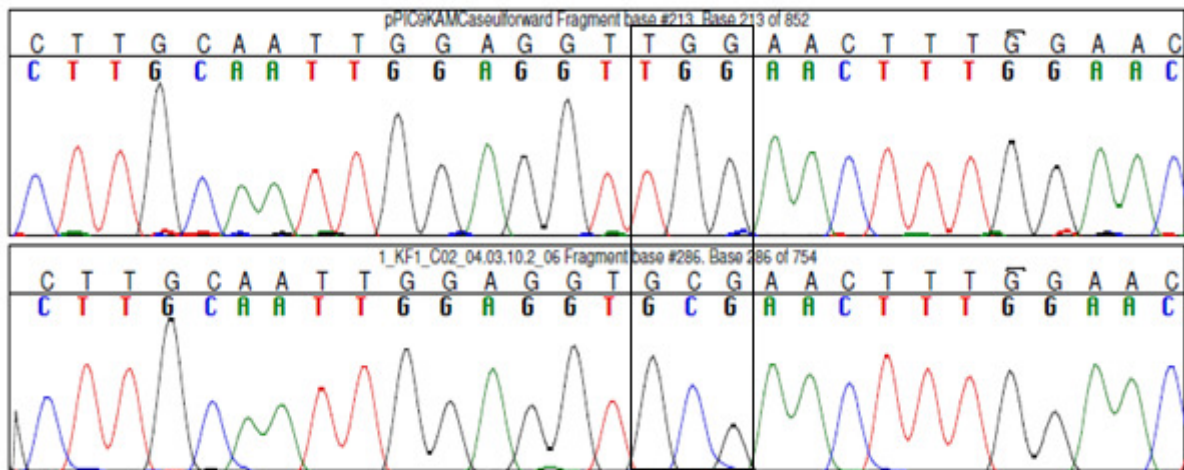
I figur 4.3 vises resultatene etter at W99A ble testet. Primerne som ble brukt, W99A reverse og 5' AOX fwd, gir et PCR-produkt som er 667 bp stort. Kontrollen vises i brønn nr. 12.



Figur 4.3: Test av transformanter; W99A i E. coli-celler. Det ble plukket tilfeldige kolonier på skålene som ble testet for vellykket transformasjon. Brønn 1: 1 kb ladder; brønn 3-10: Ulike W99A-kolonier (ved en vellykket transformasjon vil PCR-produktet bli 667 bp stort). I brønn nr. 12 ble en kontroll avsatt: pPIC9K-vektor med AMCcase-genet innsatt (50 ng/μl).

4.2.5 Sekvensering

Som en videre kontroll for å sjekke om mutasjonen ble korrekt inkorporert i AMCcase-genet, ble mutant W99A sekvensert og sammenliknet med WT-AMCcase. Kromatogrammene er vist i figur 4.4. Det er tydelig at nukleotidene TGG har blitt byttet ut med GCG som gjør at tryptofan har blitt til alanin.



Figur 4.4: Sekvensering av W99A-AMCase. Det øverste kromatogrammet viser sekvensering utført på WT-AMCase, mens det nederste kromatogrammet viser W99A-mutanten.

Rektangelet viser området hvor aminosyren tryptofan (TGG) har blitt byttet ut med alanin (GCG) hos W99A.

Grunnet tidsmangel ble kun W99A og WT sekvensert, og det er bare disse som har blitt brukt videre i transformasjon inn i *P. pastoris* og til oppskalering av cellevekst for å få uttrykt protein.

4.2 Transformering, dyrking, selektering av kolonier og sjekk av aktivitet

AMCase er et mammalsk protein som krever korrekt folding (Boot et al. 2001). *P. pastoris* er en eukaryot vert som har det indre maskineriet som kreves for at AMCase skal foldes korrekt og få alle sine PTM og bli et fungerende protein (Daly & Hearn 2005).

Isolerte WT- og W99A-plasmid ble transformert inn i *P. pastoris*-ekspresjonsstammen KM71. Transformasjonsreaksjonene ble sådd ut på skåler og etter et par dager vokste det frem ~ 50 små kolonier. På kontrollskålen vokste det ikke opp noen kolonier, noe det heller ikke skulle, da dette er en kontroll med KM71-celler som ikke har blitt transformert. Noen kolonier ble valgt ut og testet for om transformasjonen av WT-AMCase og W99A inn i KM71 var vellykket.

To primere ble benyttet; 5' AOX fwd og 3' AOX rev. Disse gir et PCR-produkt som er 1929 bp stort. PCR-produktene ble undersøkt på 1 % agarosegel for å bestemme størrelsen (figur 4.5 og 4.6). Som kontroll ble det benyttet WT-AMCase i pPIC9K (50 ng/ μ l).



Figur 4.5: Test av transformasjon; WT-AMCase i *P. pastoris*. PCR-produktet skal bli 1929 bp stort. Brønn 1: 1 kb ladder; brønn 3, 4 og 7: WT i *P. pastoris*; brønn 12: Kontroll med WT-AMCase i pPIC9K-vektor.

I figur 4.6 vises gelbildet etter at W99A-mutanten i *P. pastoris* ble testet for vellykket transformasjon.

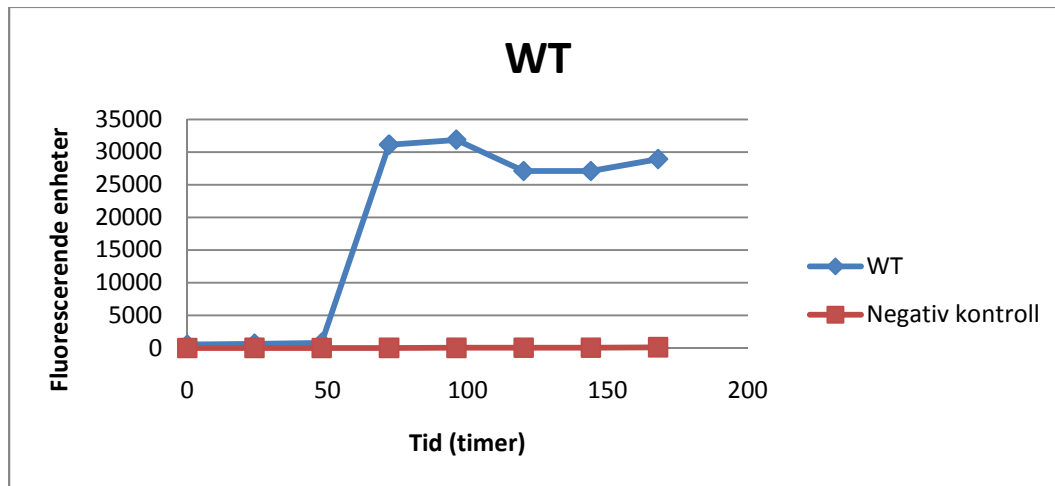


Figur 4.6: Test av transformasjon; W99A-AMCase i *P. pastoris*. PCR-produktet skal bli 1929 bp stort. Brønn 1: 1 kb ladder; brønn 2, 3, 4 og 6: W99A i *P. pastoris*.

De koloniene som viste vellykket transformasjon ble brukt til oppdyrking for å få uttrykt protein. WT- og W99A-cellene ble indusert med metanol hver 24. time i henholdsvis 6 og 9 dager, og kitinaseaktiviteten ble målt jevnlig.

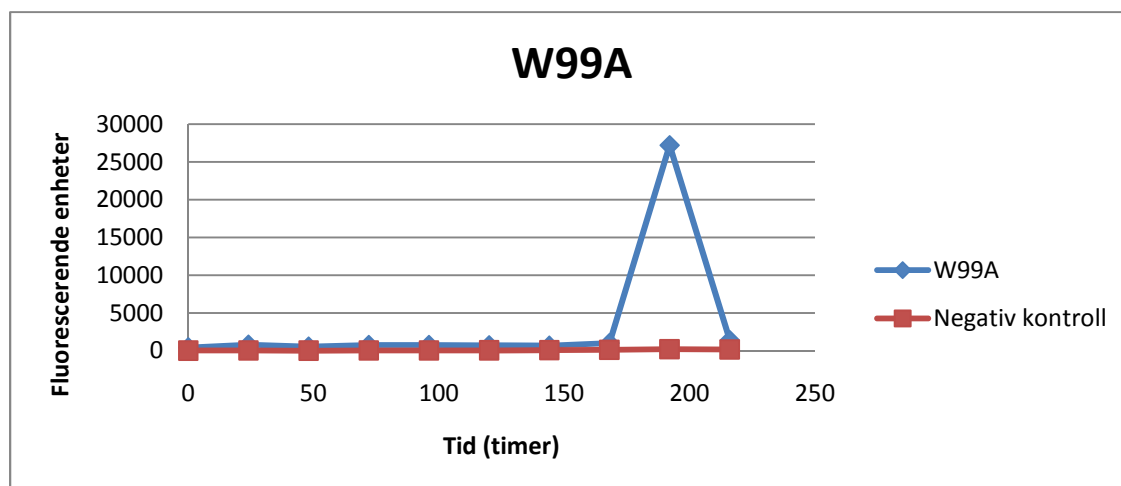
Kitinaseaktiviteten ble målt fluorometrisk ved 4-MU enzymassay (Overdijk & Van Steijn 1994; Seibold et al. 2009; Zhu et al. 2004). Når det er kitinase i prøvene, vil enzymet binde seg til 4-MU-substratet og kutte dette, slik at en fluorofor dannes (4-MU). Mengden 4-MU som dannes, henger sammen med mengden enzym som er i prøven. En plutselig og kraftig økning ved måling av den kitinolytiske aktiviteten viser at det har blitt dannet kitinase.

I figur 4.7 vises 4-MU-aktivitet i KM71-celler som er transformert med WT-AMCase-vektor etter 0, 1, 2, 3, 4, 5 og 6 dager. Enzymaktiviteten øker til ~ 30 000 fluorescerende enheter etter 3 dager. Etter 4 dager er aktiviteten høyest og den holder seg stabil over lengre tid.



Figur 4.7: Produksjon av WT-AMCase etter 0, 24, 48, 72, 96, 120 og 144 timer. Kitinaseaktiviteten er størst etter 96 timer (dag 4).

KM71-celler som ble transformert med W99A-vektor viste å øke kraftig i kitinolytisk aktivitet etter 8 dager (figur 4.8). Aktiviteten forsvant igjen etter bare én dag av uvisse grunner. En ny oppdyrking av celler transformert med W99A-vektor, viste også aktivitet.

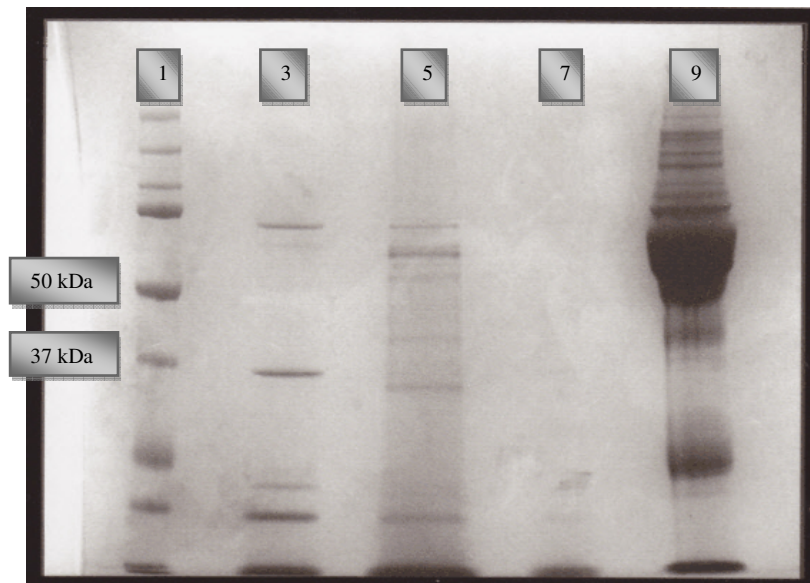


Figur 4.8: Produksjon av W99A-AMCase etter 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 og 216 timer. Aktiviteten er høyest etter 192 timer (dag 8). Den negative kontrollen er tilnærmet lik null hele tiden.

Kolonier som viste enzymaktivitet ble dyrket på nytt i et større volum. Celler transformert med WT-AMCase-vektor, ble induert med metanol i 3 døgn før cellene ble høstet. Den kitinolytiske aktiviteten i supernatanten var da på 25 760 fluorescerende enheter.

Celler transformert med W99A-AMCase-vektor, ble induert med metanol i 7 dager før det ble påvist kitinolytisk aktivitet i supernatanten, og cellene ble høstet. Den kitinolytiske aktiviteten var da på 26 250 fluorescerende enheter.

WT-AMCase ble oppkonsentrert og dialysert før videre rensing ved hjelp av ionebyttekromatografi. Dette ga kun en liten topp med sluttprodukt ved 100 % buffer B (resultater ikke vist). Toppen ble samlet opp, oppkonsentrert og undersøkt ved SDS-PAGE. På gelen vises det flere bånd (figur 4.9). Dette tyder på at proteinet ikke har blitt tilstrekkelig rensert (brønn 3 i figur 4.9). Det er heller ikke noe bånd på 50 kDa, som tilsvarer molekylvekten til AMCase. I brønn nr. 5 vises proteinene som er til stede i supernatanten før prøven ble dialysert. I brønn nr. 7 vises proteinene som er igjen i supernatanten etter at prøvene har blitt dialysert. Det er også tatt med en kontroll med nasale polypper som har fått påvist tilstedeværelse av AMCase ved Western blot.



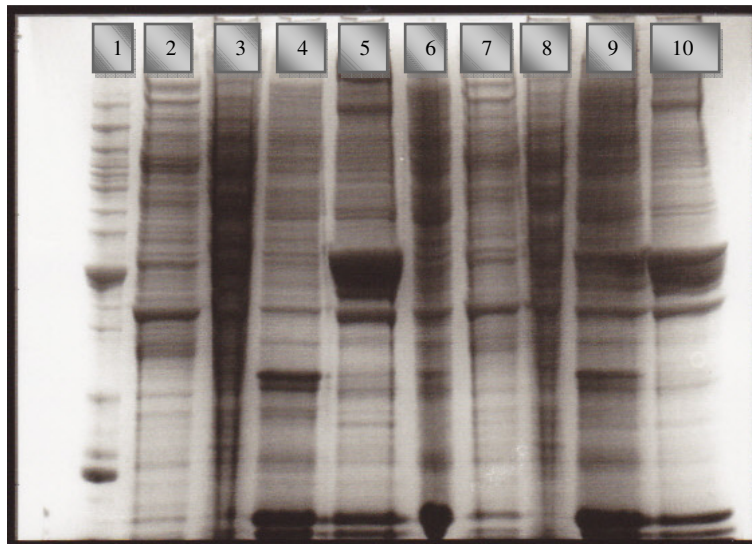
Figur 4.9: Gelbilde av 1: Molekylvektsmarkør; 3: Supernatant fra cellekultur rensed ved ionebyttekromatografi og oppkonsentrert; 5: Supernatant fra cellekultur før dialyse; 7: Supernatant fra cellekultur etter dialyse; 9: Kontroll med nasale polypper.

Kitinaseaktiviteten ble målt i den rensede fraksjonen og viste en meget høy aktivitet med 27 141 fluorescerende enheter (negativ kontroll: 14 fluorescerende enheter). Total mengde protein etter rensing og oppkonsentrering var 0,64 mg, mens den var 39 mg før dialysen og ~27 mg etter dialysen.

4.3 Induksjon av humane lungeceller med IL-13

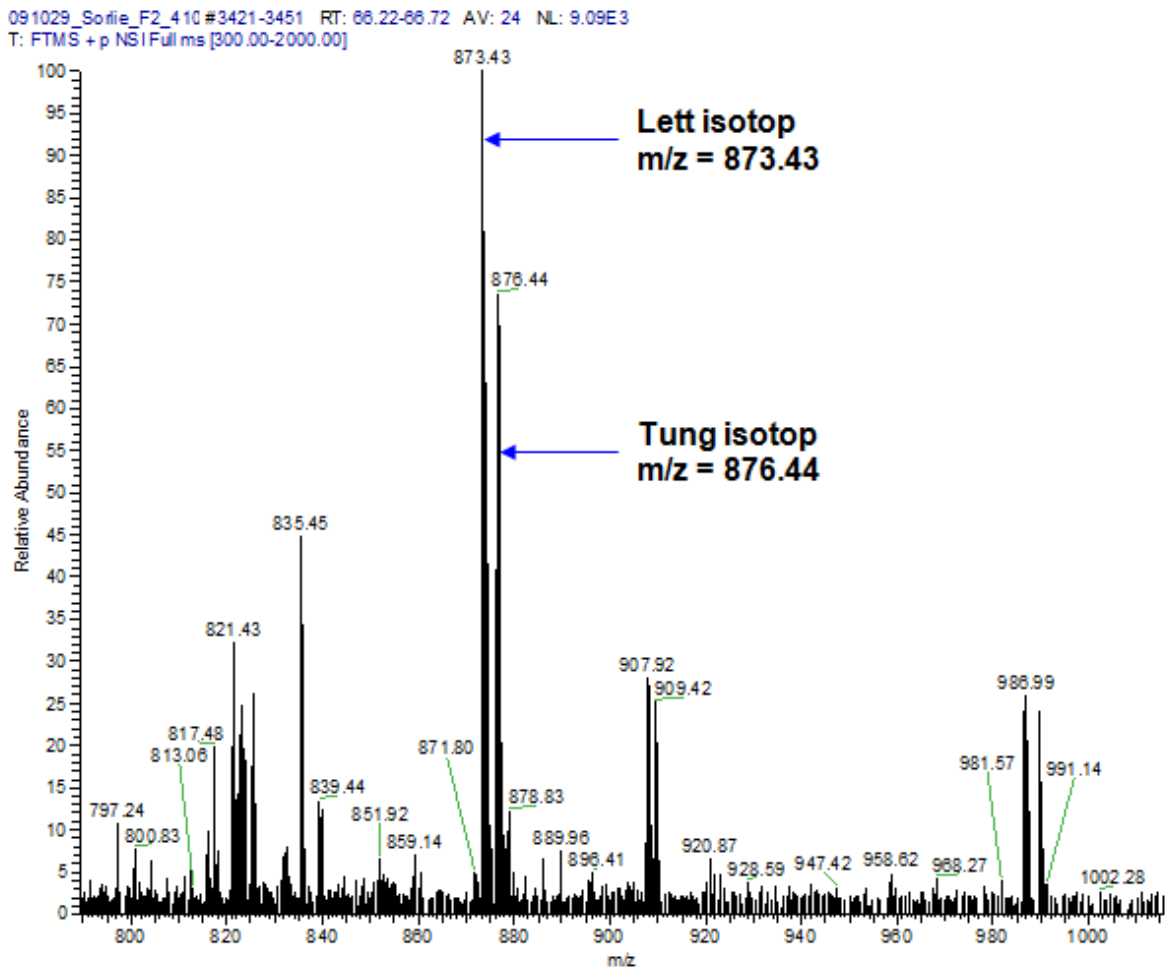
For å kunne detektere og kvantifisere opp- og nedregulerte proteiner, ble SILAC kombinert med cellefraksjonering, gelelektroforese, LC og MS. I denne proteinalysen ble et LC-LTQ-Orbitrap-MS-oppsett benyttet.

Proteiner fra cellene ble separert i ulike fraksjoner; cytosol, membran/organeller, cellekjerne og cytoskjelett ved subcellulær fraksjonering. Etter fraksjoneringen ble proteinene ytterligere separert ved hjelp av 1D-gelelektroforese (figur 4.10).



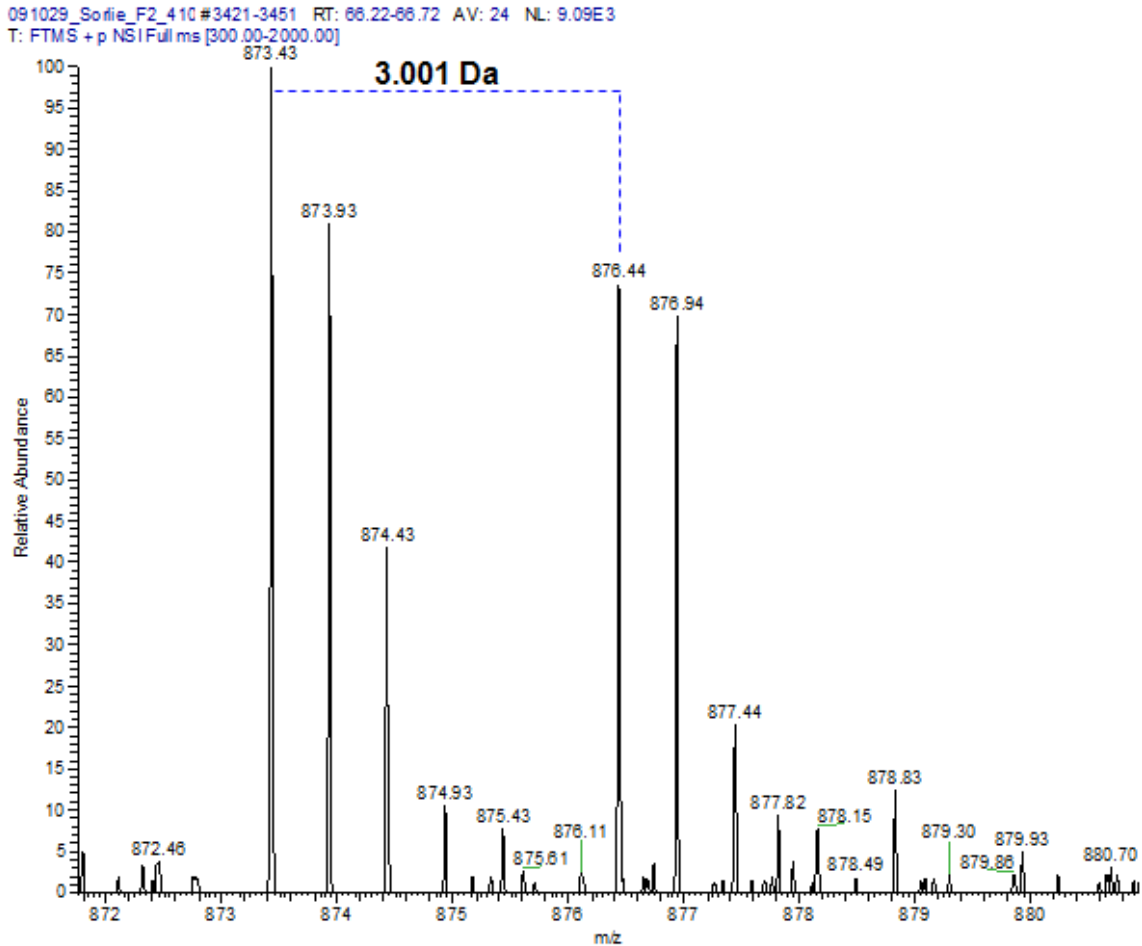
Figur 4.10: De ulike fraksjonene ble kjørt på 1D-gel. Hver bane ble kuttet ut og delt i ti deler med omtrent like mye protein i hver. Brønn 1: Molekylvektmarkør; brønn 2+7: Fraksjon 1, cytosolproteiner; brønn 3+8: Fraksjon 2, membran- og organelleproteiner; brønn 4+6+9: Fraksjon 3, cellekjerneproteiner; brønn 5+10: Fraksjon 4; cytoskjelettproteiner.

Proteinbåndene ble kuttet ut av gelen før proteinene ble trypsinert. På denne måten ble det dannet peptider som ble analysert ved hjelp av LC-LTQ-Orbitrap-MS. Figur 4.11 viser et massespektrum for tiden 66,22-66,72 minutter. Det er her ett av peptidene som identifiserte Transferrin receptor protein 1 (TFRC), ble funnet. Dette er et tilfeldig valgt protein som i den videre analysen viste nedregulering. Den lette varianten av peptidet har en masse lik 1746,86 Da, mens den tunge varianten har en masse lik 1752,88 Da. Ettersom peptidet har dobbeltladning, blir massen halvert og kan ses i spekteret ved henholdsvis m/z 873,43 og 876,44. Dette betyr også at differansen mellom tunge og lette peptider tilsvarer 3,001 Da i stedet for 6,002 Da.



Figur 4.11: MS-spekter for ett av peptidene som identifiserte TFRC. Her vises peptidtoppene til den lette (m/z 873,43) og den tunge (m/z 876,44) isotopen.

Et utsnitt av spekteret i figur 4.11 ble forstørret for å lettere kunne se isotoppåret (figur 4.12).

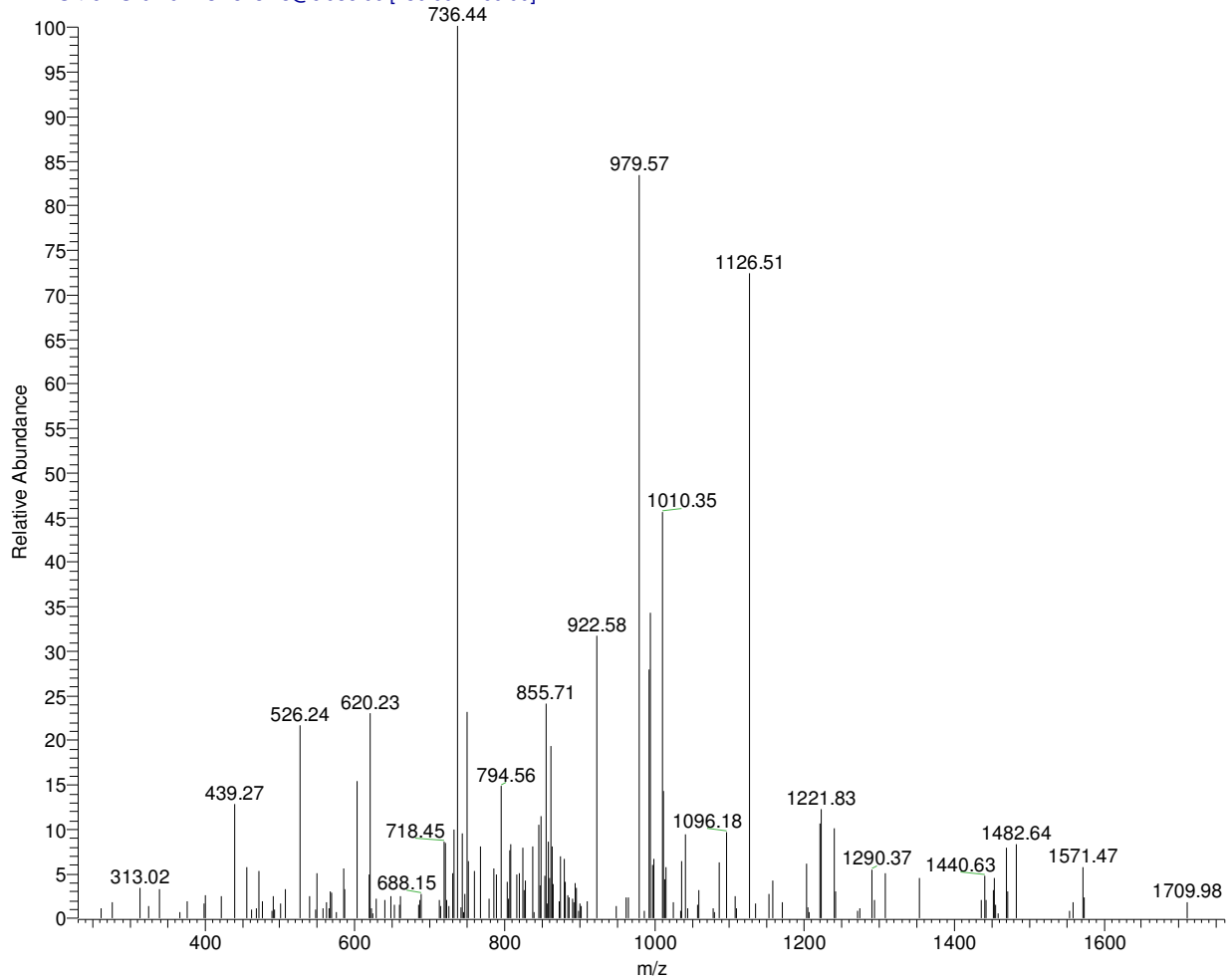


Figur 4.12: Forstørret utsnitt av spekteret i figur 4.11. Her vises tydelig isotoppåret. Intensiteten til den lette varianten er høyere enn intensiteten til den tunge varianten. Dette indikerer at peptidet er nedregulert.

4 RESULTATER

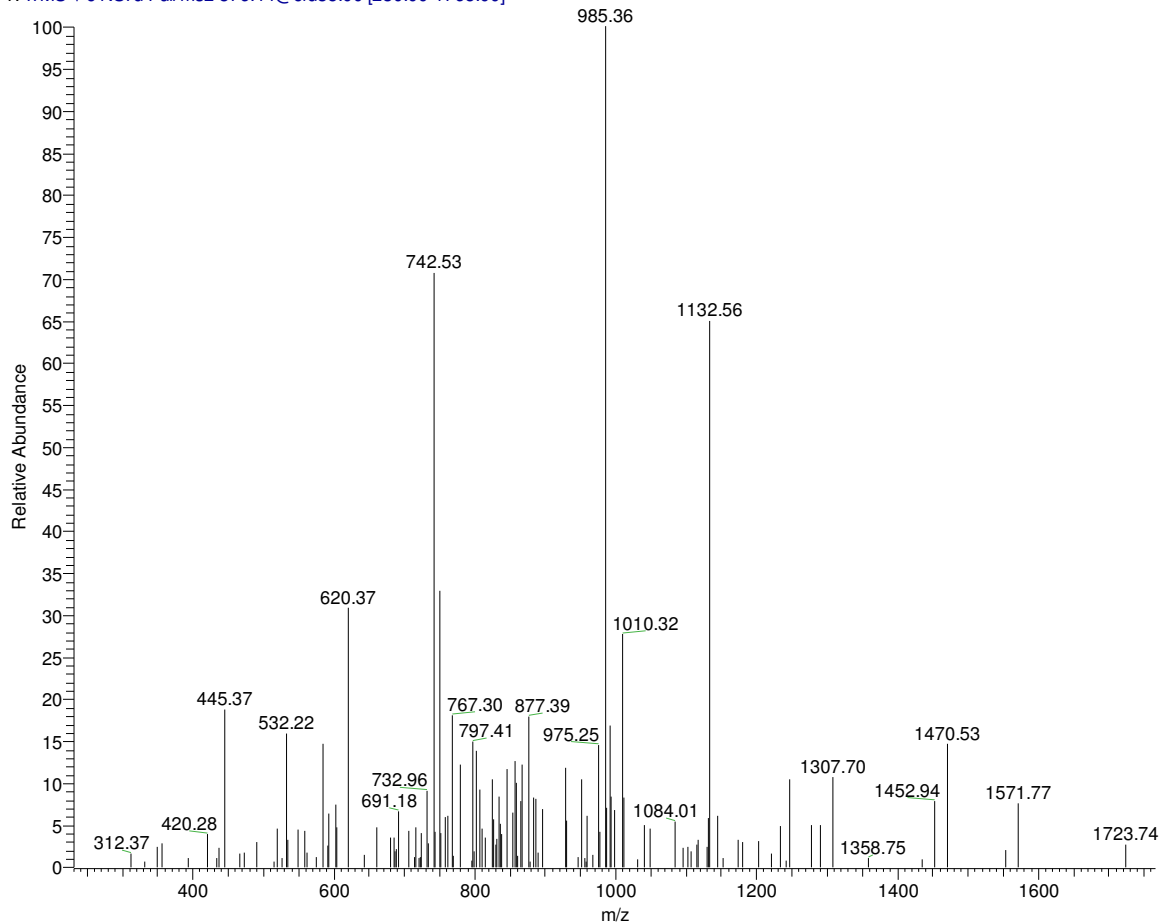
MS-toppene for det lette og det tunge peptidet ble fragmentert, hvilket gir nye topper som gir grunnlag for identifisering av peptidet og dermed også proteinet. MS/MS-spekterne for det lette og det tunge peptidet vises henholdsvis i figur 4.13 og 4.14.

091029_Sorlie_F2_410 #3449 RT: 66.69 AV: 1 NL: 2.25E2
T: ITMS + c NSI d Full ms2 873.43@cid35.00 [230.00-1760.00]



Figur 4.13: MS/MS-spekter for det lette TFRC-peptidet. Her har toppen ved m/z 876,44 blitt fragmentert. Fragmenteringsmønsteret gir grunnlag for en videre identifisering av peptidsekvensen, SAFSNLFGGEPLSYTR, og dermed også proteinet.

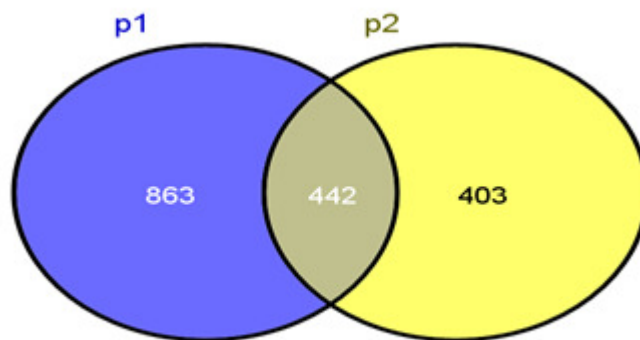
091029_Sortie_F2_410 #3443 RT: 66.59 AV: 1 NL: 1.86E2
T: ITMS + c NSI d Full ms2 876.44@cid35.00 [230.00-1765.00]



Figur 4.14: MS/MS-spekter for det tunge TFRC-peptidet. Her har toppen ved m/z 873,44 blitt fragmentert. Fragmenteringsmønsteret gir grunnlag for en videre identifisering av peptidsekvensen, SAFSNLFGGEPLSYTR, og dermed også proteinet.

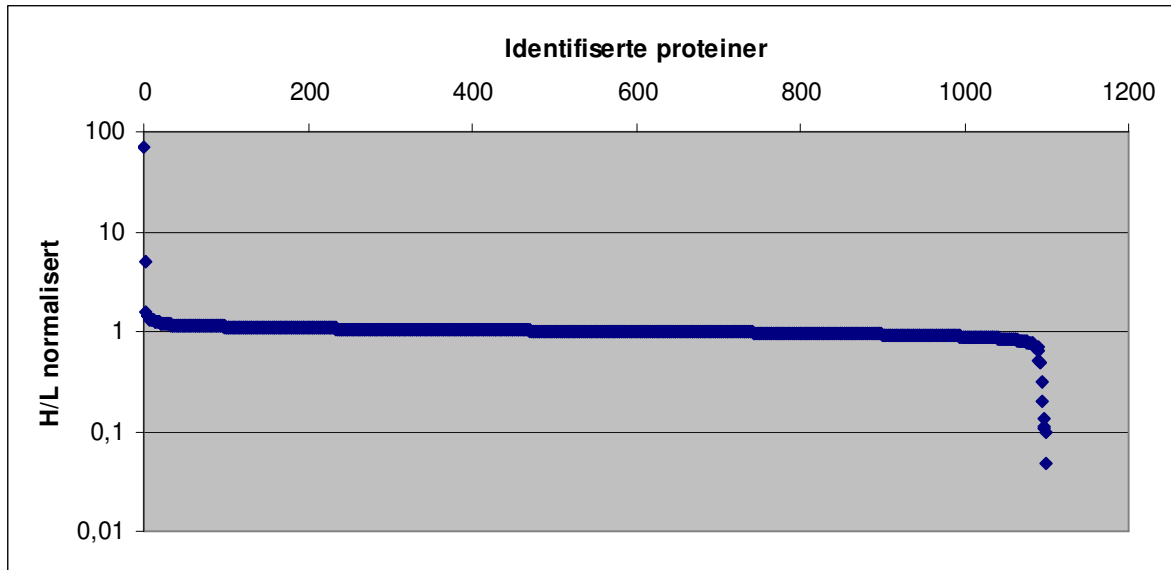
Databasesøk, validering og evaluering av data ble utført ved bruk av Mascot-databasen og Maxquant (Cox & Mann 2008). Det ble valgt å godkjenne regulerte proteiner med Benjamini-Hochberg korrigerede p-verdier under 1 %. Det vil si at det er mindre enn 1 % sjans for at proteintreffet er feil. Grunnet manglende tilgang på analysetid på LC-LTQ-Orbitrap ved Bioteknologisenteret er det i denne oppgaven kun rukket å analysere to biologiske paralleller (analysen av den siste biologiske parallellen vil bli inkludert senere i en eventuell publisering av resultatene). Analysing av proteinene ble utført i samarbeid med Anne Grethe Hamre.

Det er i nyere publikasjoner vanlig å godta proteiner som er tilstede i minst to av tre biologiske paralleller. Selv om proteinet kun er funnet i én parallell, ble det valgt å se på treffet som signifikant dersom minst to unike peptider som hører til samme protein ble identifisert. I denne analysen ble kun to proteiner funnet regulert i begge parallellene. Totalt 1305 proteiner ble identifisert i parallell 1, mens 845 proteiner ble identifisert i parallell 2. Et venndiagram (figur 4.15) ble laget for å vise at 442 proteiner er felles i de to parallellene.



Figur 4.15: Venndiagrammet viser at det av 1305 identifiserte proteiner i parallell 1 (p1) og 845 i parallell 2 (p2) er 442 proteiner som er felles i begge parallellene (Oliveiros 2007).

En grafisk fremstilling som viser distribusjonen av H/L-normaliserte verdier for alle de regulerte proteinene ble laget (figur 4.16). Grafen viser at forholdet mellom proteiner funnet i tung og lett parallell er tilnærmet lik 1 hos de fleste identifiserte og regulerte proteinene.



Figur 4.16: Distribusjon av H/L-normaliserte verdier for alle regulerte proteiner. Duplikater i de to parallellene er fjernet. Signifikante regulerte proteiner er godkjent med Benjamini-Hochberg korrigerede p-verdier under 1 %. Da vil det første oppregulerte proteinet ha H/L-normalisert verdi på 1,205. Det første nedregulerte proteinet vil ha H/L-normalisert verdi lik 0,831.

Det ble funnet totalt 37 ulike regulerte proteiner med Benjamini-Hochberg-korrigerede p-verdier under 1 %, hvor 15 er opp- og 22 er nedregulert. Tabell 4.2 gir en oversikt over alle de regulerte proteinene.

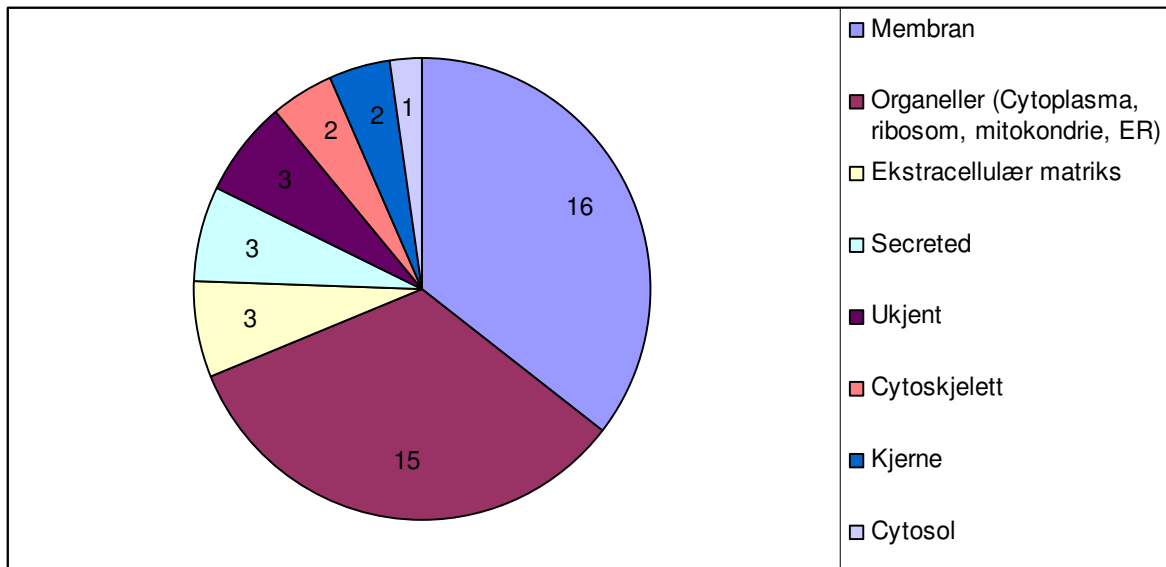
4 RESULTATER

Tabell 4.2: Oversikt over regulerte proteiner som ble identifisert etter at BEAS-2B-celler ble stimulert med 1 ng/ml IL-13 i 24 timer. Listen viser gen- og proteinnavn i tillegg til H/L-normalisert ratio. Dersom forholdet mellom tunge og lette proteiner er mindre enn 1 er proteinet nedregulert, mens de er oppregulert dersom ratioen er over 1.

Gennavn	Proteinnavn	H/L-normalisert ratio
P4HA1	Prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I	0,823, 0,669
PRSS3	Protease, Serine, 3	0,112, 0,048
ACADS	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-2 to C-3 short chain	0,831
ATP2B4	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 4	1,319
ADPGK	ADP-dependent glucokinase	0,214
MKI67	Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	0,709
CDH2	Cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)	0,634
CALML5	Calmodulin-like 5	0,198
C5ORF15	Chromosome 5 open reading frame 15	0,308
COL6A1	Collagen, type VI, alpha 1	1,306
C3	Complement component 3	0,798
DERL1	Der1-like domain family, member 1	1,553
DCD	Dermcidin	0,105
FAM62B	Family with sequence similarity 62 (C2 domain containing) member B	0,750
HK1	Hexokinase 1	1,451
H1F0	H1 histone family, member 0	0,785
ITGA5	Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)	1,267
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1	0,756
IFITM3	Interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)	0,685
KIAA0391	KIAA0391	1,348
L1CAM	L1 cell adhesion molecule	0,520
LNPEP	Leucyl/cystinyl aminopeptidase	1,222
LIMA1	LIM domain and actin binding 1	1,350
MAP7D1	MAP7 domain containing 1	1,438

Gennavn	Proteinnavn	H/L-normalisert ratio
NLN	Neurolysin (metallopeptidase M3 family)	1,205
NT5E	5'-nucleotidase, ecto (CD73)	1,254
OAT	Ornithine aminotransferase	1,335
PDLIM1	PDZ and LIM domain 1	0,710
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	0,757
PDGFRB	Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide	0,697
PLP2	Proteolipid protein 2 (colonic epithelium-enriched)	1,405
RPL27	Ribosomal protein L27	1,281
SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	0,772
SRP14	Signal recognition particle 14kDa (Homologous Alu RNA binding protein)	0,485
TFRC	Transferrin receptor protein 1	0,796
TGFBI	Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	0,486
UBE4A	Ubiquitination factor E4A (UFD2 homolog, yeast)	70,366

Ved å søke i Uniprot (UniProt 2010) ble den subcellulære lokaliseringen til de regulerte proteinene funnet. 16 proteiner ble lokalisert til membranen, mens 15 ble lokalisert til organeller som cytoplasma, ribosomer, mitokondrier og endoplasmatisk retikulum (ER). Det ble også funnet to cytoskjelettproteiner, to kjerneproteiner og ett cytosolprotein. Tre proteiner hadde tilholdssted i den ekstracellulære matriksen, mens tre proteiner skilles ut i vevet rundt cellen. Ytterligere tre proteiner hadde ukjent lokalitet. En oversikt over lokaliteten til de ulike proteinene vises i figur 4.17.



Figur 4.17: Oversikt over subcellulær lokaliserings til de regulerte proteinene (se tabell 4.2). Totalt ble det funnet 37 regulerte proteiner. Av disse var det ett cytosolprotein, to kjerneproteiner, to cytoskjelettproteiner, tre proteiner fra ekstracellulær matriks, 15 organelleproteiner og 16 membranproteiner. Tre proteiner hadde ukjent lokaliserings, mens tre proteiner utskilles fra cellen til vevet rundt. Åtte proteiner hadde flere lokaliserings. For disse er alle lokaliserings tatt med i diagrammet hver for seg.

En kort beskrivelse av de regulerte proteinene følger. Beskrivelsen inneholder i hovedsak proteinenes funksjon. PubMed ble hovedsakelig benyttet til dette.

4.3.1 Proteiner knyttet til kalsiumhomeostase

ATPase, Ca⁺⁺ transporting, plasma membrane 4 (ATP2B4)

Dette proteinet er en isoform av proteinet "ATPase, Ca⁺⁺ transporting, plasma membrane" og er med på å holde et lavt konsentrasjonsnivå av frie Ca²⁺-ioner i cytoplasma. (Marin et al. 2008) Dette proteinet ble oppregulert.

Calmodulin-like 5 (CALML5)

CALML5 er et kalsiumbindende protein som kan binde fire kalsiumioner. I tillegg er proteinet involvert i keratinocytt-differensiering. Keratinocytter er celler som i hovedsak finnes i epidermis. Der er de med på å danne en barriere for å beskytte organismer mot det utvendige miljøet og mot vanntap. Når keratinocyttene differensieres, begynner de å uttrykke blant annet kalsiumbindende proteiner som CALML5. CALML5 opptrer sent i differensieringen og ser derfor ut til å være viktig i reguleringen i det siste differensieringstrinnet; der keratinocytten blir til corneocyt (Durussel et al. 2002). Proteinene ble nedregulert.

Family with sequence similarity 62 (C2 domain containing) member B (FAM62B)

Proteinene er også kjent som "extended synaptotagmin-like protein 2" (ESYT2) og er lokalisert i plasmamembranen. Det er kalsiumbindende og har vist seg å mediere kalsiumavhengig fosfolipidbinding både til negativt ladde og nøytrale fosfolipider. Det er sannsynlig at dette proteinene har en rolle i membrantransport. Proteinene festes til membranen ved en spesiell mekanisme som benytter et av proteinets domener som er uavhengig av kalsium (Min et al. 2007). ESYT2 ble nedregulert.

Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin) (SPARC)

SPARC er et glykoprotein som binder kalsium, og har en viktig rolle i interaksjoner mellom celle og matriks ved for eksempel celledifferensiering, cellemigrering og reparasjoner av skader i vevet. SPARC innehar også en rolle i utviklingen av kreftsvulster (Suzuki et al. 2005). Studier hvor fenotypen til mus som mangler SPARC ble undersøkt, viser at dette proteinene regulerer remodellering av vev og er nødvendig for korrekt sammensetning av kollagenmatrix og modning av kollagen (Arnold & Brekken 2009). Dette proteinene ble regulert ned.

4.3.2 Proteiner involvert i kollagensyntese

Collagen, type VI, alpha 1 (COL6A1)

COL6A1 er én av tre ulike proteinkjeder som setter sammen det ekstracellulære matriksproteinene kollagen VI. Dette proteinkomplekset er nært assosiert med det tynne fiberlaget under epitelcellene i skjelettmuskler og er med på å binde denne membranen til den rundtliggende ekstracellulære matriksen (Pace et al. 2008). COL6A1 er en del av mikrofibrillstrukturen i flere ulike typer vev. Disse mikrofibrillene lokaliseres i celler, nerver og blodårer og antas å ha en festefunksjon. Bindingsaktiviteten antyder at denne typen kollagen er involvert i cellemigrasjon, differensiering og fosterutvikling (Fujita et al. 2008). Dette proteinet er også funnet i en astmamodell hos mus, og det kan være et potensielt terapeutisk mål for behandling av astma (Di Valentin et al. 2009). Proteinet ble oppregulert.

Ornithine aminotransferase (OAT)

OAT er nødvendig for transamineringen av ornitin. Ornitin er en aminosyre som er involvert i urinstoffsyklusen. Enzymet katalyserer en reversibel reaksjon der L-glutamat og glutamat- γ -semialdehyd dannes fra L-ornitin og α -ketoglutarat (Levillain et al. 2005). Funn viser at IL-13 stimulerer arginaseaktivitet i makrofager. Arginase benytter L-arginin som et substrat for å danne L-ornitin som igjen konverteres til prolin via en ornitin aminotransferase. Prolin er en essensiell aminosyre som er involvert i kollagenproduksjon (Wynn 2003). OAT ble oppregulert.

Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide (PDGFRB)

PDGF er et 30-38 kDa stort glykoprotein. Det er en potensiell mitogen som fremmer celledeling i tillegg til å virke som en kjemoattraktant for fibroblaster og en stimulator av kollagensyntese. To polypeptidkjeder kalt PDGFA og PDGFB kodes for av ulike gener og kan dimerisere (PDGFAA, PDGFBB eller PDGFAB) slik at PDGF-molekylet dannes. Disse utviser ulik bindingsspesifisiteter for to reseptorer, PDGFRA og PDGFRB. PDGFA kan kun binde til reseptor PDGFRA, mens PDGFB kan binde til både PDGFRA og PDGFRB. PDGF er et potensielt viktig cytokin som er involvert i blant annet økningen av glatte muskelceller som foregår ved en astmatisk reaksjon (Tada et al. 2003). Dette proteinet ble nedregulert.

Prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I (P4HA1)

Dette proteinet er medlem av proteingruppen prokollagen hydroksylaser og er blant de viktigste enzymene i denne klassen. De har som oppgave å katalysere dannelsen av 4-hydroksyprolin som er et viktig trinn i dannelsen av trippelheliksen i kollagen. P4HA1 er én av tre isoformer (Grimmer et al. 2006). Denne prokollagen hydroksylasen ble regulert ned og ble funnet i begge parallellene.

Transforming growth factor, beta-induced, 68 kDa (TGFBI)

Dette proteinet detekteres i ekstracellulær matriks i ulike vevstyper. Det innehar et arginin-glysin-aspartat (RGD)-motiv og induseres av proteinet transforming growth factor β (TGFB) i ulike celler. Proteinet tar del i en rekke forskjellige celleprosesser som vekst, differensiering, sårreparasjon og apoptose. Også i forbindelse med nyresvikt, netthinne- og vaskulære sykdommer ses dette proteinet. Med unntak av fibroblaster har de fleste celler et lavt uttrykk av proteinet. TGFBI binder til ulike komponenter i den ekstracellulære matriksen slik som fibronektin, laminin og noen kollagener i tillegg til at det interagerer med enkelte integriner. TGFBI har dermed en viktig rolle i interaksjoner mellom celler (Yoo et al. 2007). Dette proteinet ble nedregulert.

4.3.3 Proteiner involvert i immunrespons

Complement component 3 (C3)

Komplementsystemet spiller en viktig immunoregulatorisk rolle ved både medfødt og adaptivt immunforsvar. Studier viser at C3 har en sammenheng med overreaktive luftveier. Komplementsystemet beskytter verten fra invaderende mikroorganismer ved å sette i gang inflammatoriske og immunologiske responser og ved å fremme cellelysis. Mus som mangler C3 eller C3-reseptoren, C3aR, er beskyttet mot muskelsammentrekninger i bronkiene. Nivået av C3 øker i prøver tatt fra bronkiene hos pasienter med bronkial astma. Dette tyder på at en C3-reaksjonsvei er involvert i human bronkial astma (Hasegawa et al. 2004). Proteinet ble nedregulert.

Dermcidin (DCD)

DCD er et antimikrobielt peptid som uttrykkes i svettekjertler. Det skilles ut i svetten for så å bli transportert til overflaten av epidermis. På denne måten tar det del i hudens forsvarsverk. Dersom enkelte typer tumorceller utsettes for oksidativt stress, danner de proteolytisk bearbeidede DCD-peptider med ulike funksjonelle egenskaper (Rieg et al. 2005) Proteinet virker som en overlevelsesfaktor i ulike kreftcellerlinjer som utsettes for oksidativt stress. DCD uttrykkes også i forbindelse med cellevekst og -overlevelse i enkelte kreftformer (Stewart et al. 2008). DCD ble nedregulert i de IL-13-induserte lungecellene.

Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1)

ICAM1 uttrykkes på epitelcellers overflate. Molekylet fungerer som en cellereseptor og er viktig i mobiliseringen av immunsystemets effektorceller. Nivået av ICAM1, som blir uttrykt av epitelceller, er derfor viktig i prosesser som fører til viral binding, vertsinfeksjoner og inflammatoriske hendelser. En høy intensitet av ICAM1 på overflaten til epitelceller vil føre til at den virale infeksjonen vedvarer, og at det rekrutteres flere pro-inflammatoriske celler til luftveiene. En forverring av de astmatiske symptomene vil dermed uttrykkes. T_H2-assosierte cytokiner øker ICAM1-ekspresjonen på epitelceller. Spesielt IL-13 fører til en femdobling av ICAM1 på epitelcellenes overflate (Bianco et al. 1998). Proteinet ble nedregulert.

L1 cell adhesion molecule (L1CAM)

L1CAM er et transmembrant glykoprotein tilhørende superfamilien immunoglobulin. Proteinet har en viktig rolle i både cellemigrering og aksonvekst i nervesystemet, og det er funnet en sammenheng mellom overuttrykk av L1CAM og dårlige prognoser ved kreft (Issa et al. 2009). Proteinet ble nedregulert.

4.3.4 Cadheriner og integriner

Cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal) (CDH2)

N-cadherin tilhører cadherin-familien som består av transmembrane glykoproteiner (Hartland et al. 2009). Generelt er cadheriner kalsiumavhengige celler som deltar i "adherens junctions", spiller viktige roller i fosterutviklingen og er med på å opprettholde en normal vevsstruktur. N-cadherin er med på flere cellulære prosesser, blant annet celle-celle adhesjon, celledifferensiering, cellemigrasjon, celleinvasjon og signaltransduksjon (Ko et al. 2009). N-cadherin uttrykkes i endotel-, nerve- og muskelceller. Uttrykket øker i kreftceller dersom ekspresjonen av E-cadherin synker. Dette fører til større grad av cellemigrering og invasjon av ulike kreftceller (Sarray et al. 2009). CDH2 ble nedregulert.

Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide) (ITGA5)

Fibronektinreseptoren bygges opp av to subenheter; β 1-subenheten og α 5-subenheten. Generelt har alle subenheter en stor ekstracellulær region, et transmembrant domene og en kort cytoplasmatisk hale. Proteinet er sentralt i cellemigrasjon i tillegg til at det er viktig for cellenes levedyktighet. Dersom α 5-subenheten ikke er til stede, kan dette føre til tidlig fosterdød. Interaksjoner med ligander kan aktivere intracellulære signalveier og cytoskjelettdannelse. Integrin kan også motta signaler fra innsiden av cellene og blant annet aktivere ekstracellulære domener (Gu et al. 2009). ITGA5 ble oppregulert.

4.3.5 Proteiner involvert i dannelsen av stressfiber

LIM domain and actin binding 1 (LIMA1)

LIMA1 er også kjent som Epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN). Det er et aktinbindende protein som gjør buntingen av aktinfilamenter lettere. Aktin er involvert i muskelcellenes evne til å trekke seg sammen (Gunst & Zhang 2008). I tillegg kan det stabilisere buntene ved å undertrykke depolymerisering av F-aktin (Abe & Takeichi 2008). Videre øker EPLIN antall og størrelsen til aktin stressfibre i tillegg til å inhibere Rac1-proteinets dannelse av en ruglete og ujevn membran. Proteinets uttrykkes i hovedsak i epitelceller (Maul et al. 2003). EPLIN ble oppregulert.

PDZ and LIM domain 1 (PDLIM1)

Proteinets har et PDZ- og et LIM-domene som sørger for assosiasjon med cytoskjelettet og med proteiner som er involvert i signaltransduksjon. I tillegg assosieres det med stressfiber og aktinfilament i aktiverte blodplater og endotelceller. Dersom endotelceller aktiveres av inflammatorisk stimuli endres aktincytoskjelettet deres til runde, sammentrukne celler med stressfiber (Bauer et al. 2000). Proteinets ble regulert ned.

4.3.6 Proteiner involvert i metabolisme

Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-2 to C-3 short chain (ACADS)

Dette enzymet katalyserer det første trinnet i β -oksidasjonen av fettsyrer (Jethva et al. 2008), hvor det i hovedsak er butyryl- og heksanoyl-CoA som dehydrogeneres (Tein et al. 2008). Enzymet er en homotetramer hvor hver monomer har et ikke-kovalent flavenin adenin dinukleotid molekyl bundet som en prostetisk gruppe (Jethva et al. 2008). Katalysen foregår i mitokondriene og det overføres underveis elektroner til et elektronoverføringsprotein (Pedersen et al. 2008). Fra dette proteinets føres elektronene direkte inn i elektrontransportkjeden (Jethva et al. 2008). Denne dehydrogenasen ble nedregulert.

ADP-dependent glucokinase (ADPGK)

ADPGK er et enzym som katalyserer fosforyleringen av glukose til glukose-6-fosfat i glykolysen. Enzymets metabolske aktivitet kan sees i sammenheng med aktiviteten til de ATP-avhengige heksokinasene. Ved å spare ATP senkes den primære energikostnaden i reaksjonen. Dette kan være nyttig ved flere sykdomsstadier (Ronimus & Morgan 2004). Dette proteinet ble regulert ned.

Hexokinase 1 (HK1)

Heksokinaser katalyserer reaksjonen hvor glukose-6-fosfat dannes etter fosforylering av glukose (av ADPGK). HK1 er et viktig enzym i vev som er avhengig av glukose for å fungere fysiologisk (de Vooght et al. 2009). I enkelte tumorceller binder HK1 til en spenningsavhengig anionekanal i den ytre mitokondriemembranen. Enzymet senker konduktiviteten i kanalen og inhiberer frigjøringen av cytokrom c slik at cellene beskyttes mot apoptose (Abu-Hamad et al. 2008). Proteinets uttrykk ble oppregulert.

5'-nucleotidase, ecto (CD73)

CD73 er et protein som er bundet til den ytre overflaten av plasmamembranen. Enzymet katalyserer dannelsen av nukleosider fra ikke-sykliske nukleosidmonofosfater og da spesielt dannelsen av adenosin fra adenosinmonofosfat (AMP) (Bavaresco et al. 2008). Proteinets uttrykk finnes på flere ulike celletyper som for eksempel lymfocytter, endotelceller og epitelceller (Mills et al. 2008) og deltar både i cellevekst, modning og differensiering. CD73 er funnet sterkt uttrykt i kreftsvulster (Bavaresco et al. 2008). Adenosin har også sammenheng med leukocytfforflyttelse og produksjon av inflammatoriske cytokiner er funnet. Under inflammasjon og igangsetting av immunforsvaret dannes adenosin ved hjelp av blant annet CD73. Adenosin er med på å hemme immunresponsen, inhibere dannelsen av proinflammatoriske cytokiner og sørge for dannelsen av IL-10.

Den motvirker altså ukontrollert inflammasjon og letter ødeleggelsen av friskt vev (Mills et al. 2008). Det er sett at adenosinnivået i lungene til astmapasienter er forhøyet (Volmer et al. 2006). Proteinets uttrykk ble oppregulert.

Phosphoglycerate kinase 1 (PGK1)

Dette er et glykolyseenzym som katalyserer omgjøringen av 1,3-difosfoglyserat til 3-fosfoglyserat. Også ATP dannes i denne reaksjonen. Proteinet påvirker både DNA-replikasjon og -reperasjon. Generelt antas det at gener som er relatert til glykolysen spiller en viktig rolle i dannelsen av tumorer. Tumorceller benytter slike enzymer til å danne ATP når de har begrenset tilgang på oksygen (Zieker et al.). Denne kinasen ble nedregulert.

Ribosomal protein L27 (RPL27)

I bakterier er det vist at proteinet assosieres med et domene som er en del av peptidyltransferasesenteret og er nødvendig for effektiv dannelse av peptidbindinger (Wower et al. 1998). Proteinet ble oppregulert.

4.3.7 Proteiner med kutteaktivitet

KIAA0391

Dette proteinet er også kjent som Mitochondrial RNase P protein 3 (MRPP3). Det har en antatt binding til RNA og innehar også et metallonukleasedomene. Proteinet antas å stå for den enzymatiske kutteaktiviteten til en human mitokondriell ribonuklease, human mtRNase P (Walker & Engelke 2008). MRPP3 er nødvendig for prosessering av tRNA (Rackham et al. 2009). Proteinet ble oppregulert i denne analysen.

Leucyl/cystinyl aminopeptidase (LNPEP)

LNPEP er et sinkavhengig membranprotein. Enzymet har evnen til å kutte N-terminale aminosyrer fra ulike bioaktive peptider *in vitro*. Eksempler på slike peptider er oxytocin, vasopressin, lys-bradykinin og andre peptidhormoner (Vanderheyden 2009). Peptidasen er den eneste som kan inaktivere hormoner som har en cysteinring i N-terminal ende. Dermed antas det at enzymet har en viktig rolle i opprettholdelsen av en normal graviditet (Tsujiimoto et al. 2008). Dette proteinet ble regulert opp.

Neurolysin (metallopeptidase M3 family) (NLN)

NLN er medlem av sinkmetallopeptidase M3-familien og er funnet i ulike cellekomponenter. De metaboliserer i hovedsak små, bioaktive peptider ved å hydrolysere peptidbindingene ved hjelp av en sinkionekofaktor. Bioaktive peptider virker i utgangspunktet som signalmolekyler i blant annet sentralnervesystemet (Lim et al. 2007). NLN ble oppregulert.

Protease, serine, 3 (PRSS3)

PRSS3 kalles også mesotrypsin og er en human isoform av trypsin som i hovedsak uttrykkes i bukspyttkjertelen. I forhold til vanlig trypsin danner denne betydelig svakere bindinger med naturlig forekommende polypeptid trypsininhibitorer. Dette fører til en redusert grad av inhibering. Mesotrypsin innehar samme spesifisitet som vanlig trypsin, det vil si at den hydrolyserer peptidbindingen etter arginin og lysin, men sammenlignet med trypsin er den mindre effektiv. Det antas at den gjenkjenner inhibitorene og hydrolyserer peptidbindingene i deres aktive sete (Sahin-Toth 2005). Proteinet ble nedregulert og ble funnet i begge parallellene.

4.3.8 Diverse membranproteiner

Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67 (MKI67)

Dette proteinet er til stede i alle aktive faser av celledyklusen. Proteinet kan derfor benyttes som markør for å si noe om veksten til en gitt cellepopulasjon. I interfase detekteres proteinet kun i cellekjernen, mens det i mitosen hovedsakelig relokaliseres til overflaten av kromosomene (Cimpean et al. 2009). Proteinet ble nedregulert.

Der1-like domain family, member 1 (Derlin-1) (DERL1)

Retrotranslokalisering er en mekanisme som fjerner misfoldede proteiner fra endoplasmatisk retikulum (ER). Det er sett at DERL1 er en del av retrotranslokaliseringskanalen (Ye et al. 2005). Videre er det vist at DERL1 undertrykker stressindusert apoptose i kreftceller. Tumorvekst er avhengig av respons fra intakte proteiner som ikke er foldet. Stressresponsive proteiner kan lekke til overflaten av kreftceller og virke som molekylære mål. DERL1 er funnet overuttrykt på overflaten til ondartede celler. Antistoffer rettet mot DERL1 kan da angripe denne og undertrykke tumorvekst (Ran et al. 2008). Proteinet ble oppregulert.

Interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U) (IFITM3)

Mye tyder på at IFITM3 innehar en viktig rolle i tidlige stadier i utviklingen av tarmkreft og at proteinet kan benyttes som en biomarkør for dette (Fan et al. 2008). Ved siden av rollen i kreft er IFITM3-proteiner viktige i immuncellesignalisering, celleadhesjon og beinmineralisering, i tillegg til å ha en rolle i modningen av kjønnsceller. Det er i senere tid funnet at disse proteinene stopper et tidlig trinn i virusreplikasjonen til influensa A (Brass et al. 2009). Proteinet ble regulert ned.

Proteolipid protein 2 (colonic epithelium-enriched) (PLP2)

PLP2 er et membranprotein lokalisert i endoplasmatisk retikululum i epitelceller i tarmen. Proteinet består av alfahelikser som går gjennom membranen og da i hovedsak plasmamembranen. Det kan multimerisere og danne ionekanaler. Proteinet assosieres med CCR1 som er en kjemokinreseptor med et cystein-cystein motiv. PLP2 kan med dermed ha en funksjonell rolle i kjemotaksis dannet av CCR1. CCR1 spiller viktige roller i både immun- og inflammatoriske responser (Lee et al. 2004). PLP2 ble oppregulert.

Transferrin receptor protein 1 (TFRC)

TFRC er nødvendig for overføring av jern fra transferrin-proteinet til de fleste av kroppens celler. Ved å regulere denne overføringen, og dermed jernopptaket til cellene, har TFRC en viktig rolle i jernhomeostasen i kroppen (Aisen 2004). I tarmen er det funnet at jernabsorpsjonen går ned ved en inflammasjon (Fleming & Bacon 2005). Jern er en komponent i proteiner som er viktige både i respirasjon og celledeling. Bruken av jern er begrenset, da den kan være med i potensielt dødelige oksiderende forbindelser. De jernregulerende proteinene, sammen med proteinene de regulerer, danner et homeostatisk nettverk som gjør det mulig å utnytte de positive egenskapene til jern, mens de giftige undertrykkes (Eisenstein & Blemings 1998). TFRC ble nedregulert.

4.3.9 Protein uten kjent funksjon

Chromosome 5 open reading frame 15 (C5ORF15)

C5ORF15 er et gen som koder for proteinet ”keratinocyte-associated transmembrane protein 2” (KCT2). I UniProt (UniProt 2010) ble det funnet at proteinet er et membranprotein. Ingen flere funksjoner ble funnet. Dette proteinet ble nedregulert.

4.3.10 Diverse proteiner

H1 histone family, member 0 (H1F0)

Det lysinrike H1(0)-histonet er medlem av histonfamilien H1. Generelt er denne histonfamilien knyttet til genregulering. De fleste H1-histonene er bundet til kromatin, men de flyttes raskt mellom ulike kromatinregioner i cellekjernen. Uttrykket av histon H1(0) er for det meste lavt gjennom cellesyklus, men øker når cellene begynner å differensiere. Fravær av slike histoner kan føre til at differensieringen av dendritiske celler blir defekt, og det kan derfor antas at disse proteinene deltar i transkripsjonsreguleringen av genene som er ansvarlige for differensieringen av de dendritiske cellene (Gabilovich et al. 2002). Dette proteinet ble regulert ned.

MAP7 domain containing 1 (MAP7D1)

Det ble ikke funnet funksjon til selve proteinet, men ved et BLAST-søk (NCBI 2010) med sekvensen oppnås en sekvenslikhet på 92 % med KIAA1187. Ulikheten ligger kun i den C-terminale enden og kan for eksempel være et signalpeptid som har blitt fjernet. KIAA1187 er lokalisert til mikrotubuli, som er en del av cytoskjelettet, under mitosen. Under mitosen i celledelingen dannes to nye datterceller som begge trenger én kopi av hvert kromosom. For å oppnå dette, drar den mitotiske spindelen søsterkromatider mot motsatt ende av cellen som deler seg (Sauer et al. 2005). Dette proteinet ble oppregulert.

Signal recognition particle 14 kDa (Homologous Alu RNA binding protein) (SRP14)

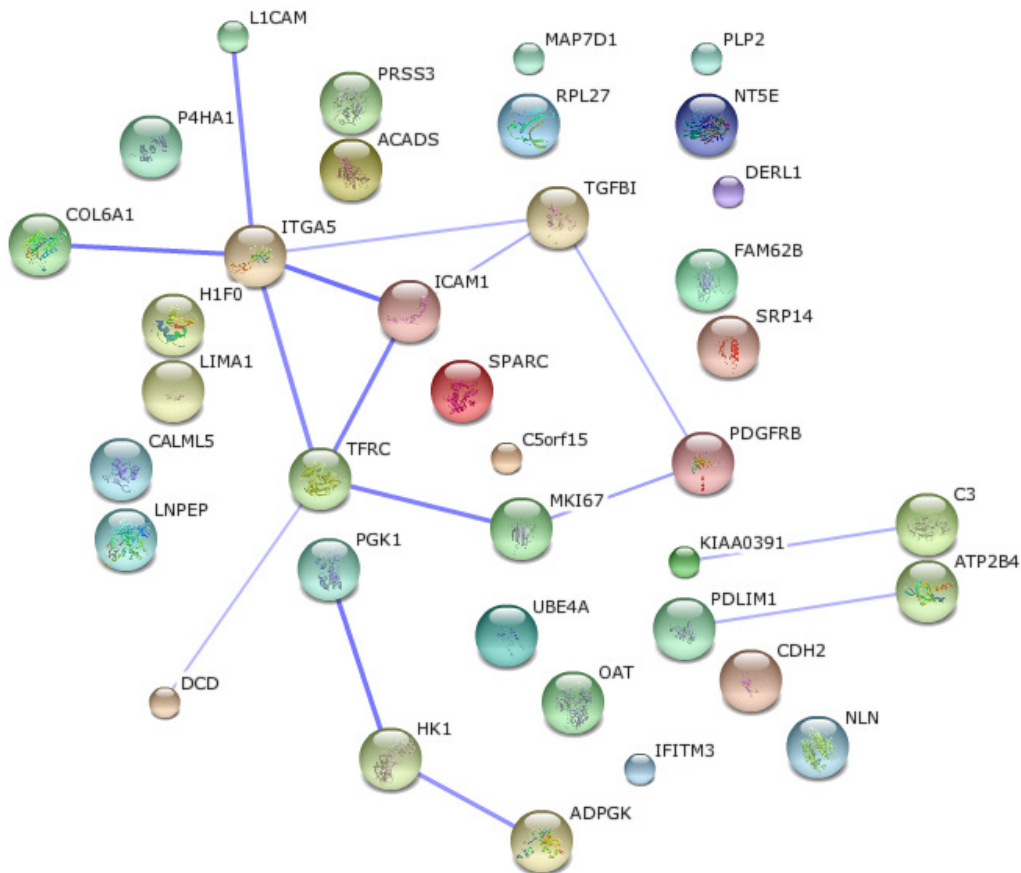
SRP14 er et ribonukleoproteinkompleks som gjenkjenner signalsekvenser som kommer fra ribosomet (Rosenblad et al. 2003). Proteinet ble nedregulert.

Ubiquitination factor E4A (UFD2 homolog, yeast) (UBE4A)

Det indikeres at dette proteinet har en rolle i kontrollering av cellyklusen. Proteinene kan også spille en rolle i andre biologiske prosesser, som for eksempel vekst og differensiering. Det finnes i cellekjernen og cytoplasma (Contino et al. 2004). UBE4A ble oppregulert.

4.3.11 Interaksjonsanalyse

Det webbaserte programmet Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) (Jensen et al. 2009) ble benyttet til analyse av interaksjoner mellom de regulerte proteinene (figur 4.18).



Figur 4.18: Opp- og nedregulerte proteiner ble analysert ved hjelp av softwareverktøyet STRING for å finne interaksjoner mellom proteinene. Interaksjonssøket ble satt til "medium confidence". Kraftigere linjer indikerer at det er vist en høyere grad av sammenheng mellom disse proteinene.

Det ble funnet fire grupperinger ved bruk av STRING. Tre av disse består kun av to eller tre proteiner, mens den siste grupperingen innehar flere proteiner. ITGA5 fremstår som det sentrale proteinet i denne grupperingen, da det har direkte sammenheng med fem andre proteiner. Enkelte av de andre proteinene i denne grupperingen viser også sammenheng med mer enn ett protein.

5 DISKUSJON

Det var lenge antatt at pattedyr ikke hadde bruk for kitinaser og derfor heller ikke kunne produsere dem. Dette ble motbevist da man klonet og karakteriserte den første mammalske kitinasen, HCHT (Hollak et al. 1994). Siden den gang har også AMCase blitt klonet og karakterisert (Boot et al. 2001). Det har i senere tid vist seg at AMCase har en sentral rolle i inflammasjonen som oppstår ved en astmatisk respons (Zhu et al. 2004).

5.1 Tillaging av plasmid, transformering, dyrking, selektering av kolonier og sjekk av aktivitet

For å oppnå en økt forståelse av interaksjoner AMCase har til inhibitorer og substrat, og da spesielt med hensyn til prosessivitet, er det nødvendig med tilgang til rekombinant villtype-AMCase og ulike mutante utgaver av enzymet. Det ble derfor laget plasmider med tre ulike mutasjoner, W31A, W99A og E140Q. W31 og W99 er involvert i substratbinding, mens E140 er en katalytisk syre som er vesentlig i hydrolysen av substrat. WT-plasmider har blitt laget ved et tidligere tidspunkt.

Det ble brukt ulike mengder templat til den seterrettede mutagenesen for å finne ut hvor mye DNA-templat som er nødvendig å bruke (tabell 4.1) til transformasjon av *E. coli*-cellene. Det viste seg at 5 ng templat ikke ga noen kolonier, mens 10 ng templat kun ga noen få kolonier. 20 og 50 ng templat ga flest kolonier. Mutagenesekontrollen (pWhitescript) og transformasjonskontrollen (pUC18) ga omtrent det antallet kolonier som var anbefalt i QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit-manualen. Kontrollene viser at både mutagenesen og transformasjonen har vært vellykket.

I teorien skal alle koloniene som vokste opp på agarskålene inneholde pPIC9K-vektoren, ettersom skålene inneholdt et antibiotikum, kanamycin, som vektoren har resistens mot. Ettersom falske positive kolonier kan oppstå, ble noen kolonier valgt ut for å teste om de virkelig inneholdt genet. Ved å sammenlikne størrelsene på båndene til transformasjonsreaksjonene på gelbildene (figur 4.1-4.3) med molekylvektsmarkøren, viser dette at størrelsene er som ønsket.

Ettersom kontrollene også får bånd på samme størrelse som prøvene, indikerer dette at transformasjonen av W31A, W99A- og E140Q-AMCase i *E. coli* har vært vellykket. Det er ikke alle koloniene som har vist bånd på gelene. Disse antas da å ikke inneholde AMCase-genet.

På grunn av tidsmangel ble det kun valgt å arbeide videre med kolonier inneholdende WT- og W99A-genet. For å sjekke om mutasjonen til W99A-AMCase var blitt korrekt utført ble plasmidene til disse sekvensert (figur 4.4) og sammenlignet med sekvensen til WT-AMCase. Her kommer det tydelig fram at mutasjonen fra tryptofan (TGG) til alanin (GCG) er vellykket. Toppene i kromatogrammene er godt nok separert til at det er tydelig hvilket nukleotid som kommer i hvilken rekkefølge.

Isolerte WT- og W99A-plasmider ble brukt til å transformere *P. pastoris*. Det vokste fram omtrent 50 kolonier på skålene, hvorav noen ble plukket og testet for om transformasjonen var vellykket. Det ble også laget kontroller uten plasmid. På disse skålene vokste det ikke opp noen kolonier. Dette var forventet da disse skålene inneholdt antibiotikumet geneticin. Ettersom pPIC9K-vektoren har et gen som koder for geneticinresistens, vil celler uten denne vektoren ikke kunne vokse opp på skåler med geneticin.

Test av transformanter skulle gi et PCR-produkt på 1929 bp. Ut i fra gelbildet tatt av WT-AMCase (figur 4.5) kommer det fram at koloniene i brønn 3, 4 og 7 var vellykkede transformanter. Båndene er å se like under 2000 bp-båndet til molekylvektsmarkøren. Kontrollen, som består av WT-AMCase i pPIC9K-vektor, har omtrent samme størrelse. Her er båndet veldig kraftig og tyder på at det ble avsatt for mye plasmid på gelen.

Transformasjonstesten til W99A viser at koloniene i brønn 2, 3, 4 og 6 (figur 4.6) var vellykkede. Båndene har den korrekte størrelse på 1929 bp. Det ble også tatt med en kontroll i denne testen, men den viste ikke noe PCR-produkt. Dette er den samme kontrollen som har blitt benyttet ved tidligere transformasjonstester (WT-AMCase i pPIC9K-vektor), hvor den har vist seg å fungere fint ved samme betingelser. Grunnen til at den ikke synes nå, skyldes antageligvis en menneskelig svikt. En mulighet kan være at det har blitt glemt å tilsette noe til PCR-reaksjonen. Ettersom flere av koloniene som ble testet, viste tydelige bånd med samme størrelse, antas det at disse har blitt transformert korrekt.

Det ble valgt ut noen kolonier som ble dyrket opp i 1 ml BMGY-medium i en 24-brønnsplate. Kitinaseaktiviteten ble målt én gang i døgnet og høy aktivitet tyder på at både WT- og W99A-AMCase-protein har blitt dannet (figur 4.7 og 4.8). Aktiviteten var høyest etter 3-4 dager hos WT og etter 8 dager hos W99A. Hos WT holdes aktiviteten stabil over flere dager, men hos W99A forsvant aktiviteten igjen allerede etter én dag. Dette kan tyde på at enzymet er ustabil og at det har blitt inaktivt. De negative kontrollene som ble målt, var som forventet. Dette tyder på at resultatene til WT- og W99A-aktiviteten er troverdige.

De koloniene som viste kitinolytisk aktivitet, ble oppskalert for å få produsert nok AMCase-protein, til å kunne rense det og bruke det til videre undersøkelser. Da det ble påvist kitinolytisk aktivitet hos disse, ble kulturene sentrifugert, og supernatanten filtrert. På grunn av tidsmangel ble det valgt kun å gå videre med, og rense WT-AMCase.

Rensingen av WT-AMCase var ikke vellykket. Dette kan ses på gelbildet (figur 4.9), hvor det er flere bånd i brønn 3. Her skulle det kun vært ett bånd på 50 kDa, da dette er størrelsen på AMCase-proteinet. Før prøven ble dialysert, var det flere proteiner i prøven, men heller ikke her var det noe bånd på 50 kDa. Etter dialyseringen var nærmest alle proteinene forsvunnet. Dette skyldes delvis at små proteiner har diffundert over membranen og at prøven inni dialysepølsen har blitt fortynnet. Mengden protein etter rensing og oppkonsentrering var kun 0,64 mg. Ettersom den kitinolytiske aktiviteten var såpass høy (27 141 fluorescerende enheter) og at 4-MU assay er en veldig spesifikk metode å detektere kitinaser på, vil det si at kitinase har blitt produsert. Det ble tatt med en kontroll, hvor det tidligere er påvist AMCase ved Western blot, på gelen. Denne er tatt fra nasale polypper hos mennesker. Det er en vesentlig forskjell mellom prøve og kontroll; AMCase i prøvene har blitt laget ved hjelp av rekombinant genteknologi, mens AMCase i de nasale polyppene er hentet fra humane celler. Her vises det en overvekt av protein ved 50 kDa. Ettersom proteinet ikke ble ordentlig rensset, er det umulig å vite hvor stor andel av proteinkonsentrasjonen som er AMCase. Det kan være en veldig lav konsentrasjon av AMCase som gjør at den ikke synes på gelen.

En annen teori som kan forklare hvorfor det ikke er noe bånd på 50 kDa, kan være at det er 39 kDa-isoformen av AMCase som har blitt produsert i stedet for 50 kDa-isoformen. AMCase består av to domener; et 39 kDa katalytisk domene og et kitinbindende domene (Boot et al. 2001). Dette kan forklare den høye kitinolytiske aktiviteten. Det er et bånd på gelen til den rensede fraksjonen som kan stemme med størrelsen, 39 kDa. I følge molekylvektsmarkøren er båndet mindre enn 37 kDa, men det kan være av interesse å undersøke dette båndet nærmere for å identifisere det.

5.1.1 Oppsummering

Målet med oppgaven var å få tilgang til WT-AMCase og utvalgte seterrettede mutanter ved å lage plasmider og få disse transformert inn i *P. pastoris*. Mutasjonene ble valgt på grunn av deres sentrale rolle i AMCases aktivitet; W31A-, W99A- og E140Q-AMCase. WT-AMCase-plasmidet ble tillaget før arbeidet med denne oppgaven begynte. Plasmidene til WT og W99A ble klonet inn i *P. pastoris* og dyrket opp. Ved induksjon av metanol ble genene uttrykt og WT- og W99A-protein ble dannet. Tilstedeværelse av enzymene ble bekreftet ved et spesifikt kitinaseassay, og det ble vist høy kitinolytisk aktivitet i begge prøvene. WT-AMCase ble oppskalert og forsøkt rensed. Her ble det påvist høy kitinolytisk aktivitet i supernatant og tilstedeværelse av andre proteiner som vist ved SDS-PAGE. Videre vises det ikke noe bånd ved 50 kDa, hvor det forventes at AMCase-proteinet skal være. Dette kan skyldes at konsentrasjonen av AMCase er for lav til å kunne detekteres på en gel eller at det er en 39 kDa-isoform som har blitt produsert i stedet for 50 kDa-isoformen. Et bånd på rundt 37 kDa som vises på gelen, kan være 39 kDa-isoformen som har blitt dannet. Dette vil være av interesse å finne ut av, for eksempel ved å analysere båndet ved hjelp av massespektrometri.

5.2 Induksjon av humane lungeceller med IL-13

Proteinfraksjonene ble kjørt på 1D-gel slik at de ble separert. Gelbildet (figur 4.10) viser at det er oppnådd god separasjon av proteinene i de ulike fraksjonene. Dette tyder på at fraksjoneringen har vært vellykket. Proteinene ble trypsinert til peptider som ble analysert ved hjelp av LC-LTQ-Orbitrap-MS. Figur 4.11-4.14 viser MS- og MS/MS-spektra til et av peptidparene som førte til identifisering av proteinet, transferrin receptor protein 1 (TFRC). Reguleringen til peptidet og informasjon som fører til identifikasjon av proteinet kan tolkes ut fra slike figurer.

I figur 4.12 vises reguleringen til peptidet ved at intensiteten til den lette isotopen var høyere enn intensiteten til den tunge. MS/MS-spekter gir generelt informasjon om fragmenteringen til proteinet, og det vil derfor være til hjelp til å finne sekvensen til proteinet, som igjen kan føre til en positiv identifikasjon. Det er data fra disse MS/MS-spekterne, som sammen med en statistisk tolkning av reguleringsdata, fra for eksempel figur 4.12, som etter omfattende statistisk bearbeiding og validering, fører til ratioen som blir brukt til å si om et protein er regulert eller ikke.

Et vennediagram (figur 4.15) ble laget for å vise hvor mange proteiner som er felles av de identifiserte proteinene i de to parallellene. Av 1305 proteiner i parallell 1 og 845 proteiner i parallell 2 ble kun 442 proteiner identifisert i begge parallellene. Dette kan forklares med at prøvene er så komplekse, det vil si at de inneholder så mange peptider, at LC-gradienten som ble benyttet ikke har separert prøvene tilfredsstillende.

Figur 4.16 viser distribusjonen av H/L-normaliserte verdier for alle identifiserte proteiner. Den viser at de fleste proteinene har en H/L-normalisert ratio tilnærmet lik 1. Dette er forventet, da det er de færreste proteinene som reguleres ved indusering. Ut i fra beregninger gjort med de Benjamini-Hochberg-korrigerede p-verdiene, vil alle proteiner med H/L-normalisert ratio mindre eller lik 0,831 og over eller lik 1,205, være signifikant regulerte.

Det vises i figur 4.17 at de fleste regulerte proteinene befinner seg i membranen og i ulike organeller. Når celler stimuleres, er det naturlig at mye informasjon sendes ut og inn av cellene. I den forbindelse er membranproteiner viktige, og dette kan derfor forklare hvorfor så mange av de regulerte proteinene har tilholdssted i membranen. Celler deler seg hele tiden. Organeller er derfor alltid aktive, og dette kan være årsaken til at det ble funnet så mange organelleproteiner.

I proteinanalysen av de IL-13-stimulerte BEAS-2B-cellene ble det funnet flere proteiner som kan ha en mulig sammenheng med astma og/eller IL-13. En del av disse viser regulering som i stor grad samsvarer med tidligere funn, mens andre ikke gjør det. Videre har det kun blitt benyttet gennavn for å forenkle leseopplevelsen.

5.2.1 Proteiner involvert i kalsiumhomeostasen

Alle eukaryote celler har kalsiumpumper i plasmamembranen. Disse benytter energi fra ATP-hydrolyse til å pumpe Ca^{2+} ut fra cytosol. Spesielt muskel- og nerveceller benytter Ca^{2+} -signalisering. Det er mange ekstracellulære signaler som fører til en økning av Ca^{2+} -konsentrasjonen i cytosol. Ca^{2+} fra utsiden av cellen transporteres til cytosol via ulike kalsiumkanaler i plasmamembranen. Disse kanalene åpnes som respons på blant annet ligandbinding og depolarisering av membranen (Alberts 2008).

Det er vist at IL-13 øker det basale, intracellulære Ca^{2+} -nivået, og at dette cytokinet gir økt kalsiumrespons i glatte muskelceller i luftveiene som svar på enkelte fysiologiske agonister (kjemikalier som binder seg til reseptorer for å utløse en cellerespons) (Gao et al.). I proteinanalysen ble det funnet flere proteiner knyttet til kalsiumhomeostasen i kroppen. ATP2B4 er et protein som er med på å holde kalsiumkonsentrasjonen i cytoplasma lav. Proteinets visste oppregulering. På grunn av mer kalsium i cellene, vil det være behov for flere proteiner som kan redusere denne konsentrasjonen til normalt nivå.

Andre proteiner som kan ses i sammenheng med kalsium ble også funnet. Dette er FAM62B, CALML5 og SPARC. Selv om det kan tenkes at disse proteinene også ble oppregulert, viste det seg at de ble regulert ned. Årsaken til dette kan være at disse proteinene kommer senere inn i IL-13-responsen enn det ATP2B4 gjør. På denne måten er allerede kalsiumnivået senket, og det er bruk for færre kalsiumbindende proteiner.

5.2.2 Proteiner involvert i kollagensyntese

Strukturen i luftveienes cellevegg endres ved astma. Slike endringer kan blant annet føre til mer glatt muskulatur, nye blodårer og kollagenavsetninger i vevet. Denne avsetningen involverer hele den indre veggen i luftveiene (Davies 2009). Det er i denne analysen funnet flere proteiner som kan ses i sammenheng med kollagen. Kollagen er et protein som befinner seg i den ekstracellulære matriksen og er en viktig komponent i hud og skjelett. Kollagen er bygd opp av tre polypeptidkjeder i en heliks bestående av en overvekt av aminosyrene prolin og glycin (Alberts 2008).

I mus er det vist at mangel på proteinet SPARC gir dysfunksjonelle epitelceller og unormalt store kollagenfibriller. Dette kan settes i sammenheng med astma, da epitelcellers respons på mekanisk stress i form av sammentreknings i bronkiene, er økt kollagensyntese (Olman 2003). SPARC ble nedregulert i denne analysen.

Både TGFBI og PDGFRB er to viktige proteiner som er med på å endre epitelcellelaget og gjøre det tykkere. Dette er et vanlig kjennetegn ved astma (Elias et al. 1999). TGFBI er et kollagenbindende protein. Dannelsen av TGFBI i makrofager fører til en oppregulering av kollagenproteiner (Nacu et al. 2008). P4HA1 og PDGFRB er proteiner som deltar i produksjonen av kollagen. Dersom det dannes flere kollagenproteiner, vil det være naturlig om det også dannes flere av proteinene som er med i produksjon, men i denne analysen viste både TGFBI, P4HA1 og PDGFRB nedregulering. Dette kan komme av at cellene har mekanismer som motsetter seg den inflammatoriske stimulien de påføres. Når så proteinuttrykket etter 24 timer studeres, er det verdien etter at cellene har motsatt seg endringen som observeres.

Det ble funnet ett kollagenprotein, COL6A1, som var oppregulert. Dette proteinet er også funnet i en astmamodell i mus. I denne modellen ble en allergisk reaksjon hos mus stimulert ved hjelp av proteinet ovalbumin. Om dette proteinet ble opp- eller nedregulert nevnes ikke, men generelt ble gener som kodet for kollagen oppregulert etter at mus hadde blitt utsatt for ovalbumin i 5 uker (Di Valentin et al. 2009).

Funn viser at IL-13 stimulerer arginaseaktivitet i makrofager. Arginase benytter L-arginin som et substrat for å danne L-ornitin som igjen konverteres til prolin via en ornitin aminotransferase. Prolin er en essensiell aminosyre som er involvert i kollagenproduksjon (Wynn 2003). OAT er et protein som ble funnet oppregulert i de IL-13-stimulerte lungecellene. Som nevnt tidligere, er det vist at kollagenproduksjonen øker i stressutsatte epitelceller. Det er da naturlig at et enzym som er med på å danne et av de involverte proteinene i kollagensyntesen oppreguleres.

5.2.3 Proteiner involvert i immunresponsen

Studier viser at C3 har en sammenheng med astma. C3 er funnet oppregulert i epitelceller fra alveolene i lunger som har blitt indusert med IL-13 (Therien et al. 2008). I denne analysen er derimot C3 funnet nedregulert. Dette kan skyldes at betingelsene i den nevnte analysen er forskjellige fra de som er benyttet i denne undersøkelsen. Det ble for eksempel benyttet en annen epitelcellelinje (A549) og induksjonstiden var 6 timer lengre.

Det antimikrobielle peptidet DCD ble i de IL-13-stimulerte lungecellene nedregulert. Dette stemmer bra med at det i tidligere undersøkelser er funnet at mengden DCD reduseres betydelig hos individer med atopisk eksem (Hata & Gallo 2008). Atopisk eksem kan ses i sammenheng med andre atopiske tilstander som for eksempel astma og høysnue (NAAF 2009).

I følge studier som har blitt utført, fører en induksjon av IL-13 til en femdobling av ICAM1 på overflaten til epitelceller og rekrutterer blant annet flere proinflammatoriske celler til bronkiene, slik at de astmatiske symptomene forverres (Bianco et al. 1998). Dette proteinet viste derimot nedregulering i denne analysen. Årsaken til dette kan være at analysen der femdoblingen av ICAM1 ble funnet, har andre analysebetingelser. Det er blant annet benyttet 10 ng/ml IL-13 i motsetning til 1 ng/ml som ble benyttet i denne analysen (Bianco et al. 1998).

5.2.4 Cadheriner og integriner

Cadheriner er kalsiumavhengige adhesjonsmolekyler. De har et ekstracellulært domene som danner bindinger med andre cadheriner på naboceller, og et intracellulært domene som binder til ligander inni cellen. Integriner er transmembrane adhesjonsmolekyler mellom celler og cellematrix. Disse befinner seg i cellemembranen, med et ekstracellulært domene som binder til matrixproteiner og et intracellulært domene som binder til cytoskjelettet (Alberts 2008). Det er vist både funksjonelle og fysiske interaksjoner mellom cadheriner og integriner (Sarray et al. 2009).

I denne analysen ble det funnet både et cadherin- og et integrinprotein; CDH2 og ITGA5. Det er i dendritiske celler hos allergipasienter funnet en oppregulering av CDH2 (Lindstedt et al. 2005). Det kan derfor tenkes at CDH2 også vil være oppregulert i denne analysen. Proteinene ble derimot regulert ned. Årsaken til dette kan være at det i denne analysen er epitelceller som er studert, mens det i analysen der CDH2 ble oppregulert var dendritiske celler som ble studert. Det er tidligere vist at integriner kan være med på å transportere eosinofile celler fra blodbanen til luftveiene. Dette er en viktig del av et astmaanfall (Barthel et al. 2008). Da det er vist ulike former for interaksjoner mellom integriner og cadheriner, kan det tenkes at integrinet, ITGA5, vil vise samme type regulering som CDH2, men ITGA5 ble regulert opp. Det vil være av interesse å studere forbindelsen mellom CDH2 og ITGA5 videre, da det er antydning av en sammenheng mellom cadherin- og integrinsignalveier og at CDH2 er funnet hos allergipasienter i tillegg til at det er funnet en rolle for integriner i astma.

5.2.5 Proteiner involvert i dannelsen av stressfibre

To av proteinene som ble funnet har et LIM-domene. LIM-domenet er en sinkfingerstruktur som finnes i flere ulike proteiner. Proteiner som har et LIM-domene spiller en viktig rolle i fundamentale biologiske prosesser, som for eksempel cytoskjelettorganisering og utvikling av organer. I tillegg kan de være involvert i patologiske funksjoner som kan være med på å føre til kreft (Bach 2000). PDLIM1 assosieres med cytoskjelett, aktinfilament og stressfiber (Bauer et al. 2000). PDZ-domenet er viktig for protein-proteininteraksjoner og er involvert i mange intracellulære komplekser, som igjen er med i cellulære funksjoner (Tonikian et al. 2008). Når for eksempel inflammatorisk stimuli aktiverer endotelceller som dekker kroppens indre hulrom, endres aktincytoskjelettet til runde sammentrukne celler med stressfiber (Bauer et al. 2000). LIMA1 er et protein som er med på å fremme dannelsen av stressfiber (Jiang et al. 2008). Stressfibre er sammentrukne aktomyosinbunter. Disse er viktige for celleadhesjon og for morfologiendringer (Hotulainen & Lappalainen 2006). Studier viser at dannelsen av stressfiber kan være viktig i muskelsammentrekningene som blir sett i luftveiene hos astmapasienter (Bitko et al. 2003). BEAS-2B-cellene ble i denne analysen stimulert med IL-13, hvilket kan bli sett på som inflammatorisk stimuli. Da vil det som nevnt, dannes stressfiber. Det er derfor naturlig at LIMA1 ble oppregulert. PDLIM1, som assosieres med stressfiber burde derfor også vist en oppregulering, men dette proteinet ble derimot regulert ned. Å indusere BEAS-2B-celler med IL-13 vil ikke kunne gi en komplett sammenligning med et virkelig astmaanfall, da lunger har større diversitet enn lungeceller som er dyrket på laboratoriet.

5.2.6 Proteiner involvert i metabolisme

Infeksjoner fører vanligvis til en rekke endringer, som for eksempel økt metabolsk aktivitet (Kurpad 2006). Det ble i denne analysen funnet flere proteiner involvert i metabolisme.

Astmatikere har en kronisk betennelsestilstand i lungene som medfører at luften som strømmer gjennom bronkiene hindres (LHL. 2008). Dersom en celle har begrenset tilgang til oksygen er den avhengig av glykolysen for anaerob ATP-produksjon (Fajardo et al. 2004). Dette vil logisk sett føre til at glykolyseproteiner oppreguleres. I denne analysen ble det funnet tre glykolyseproteiner; ADPGK, HK1 og PGK1. To av disse ble nedregulert.

OAT, som ble diskutert under punkt 5.2.2, er et protein som deltar i proteinmetabolismen. Det er funnet forhøyede nivåer av nukleosidet adenosin i lungene til astmatikere (Volmer et al. 2006). Adenosin kan dannes fra adenosinmonofosfat ved hjelp av CD73 (Bavaresco et al. 2008). Astmatikere viser en spesiell sensitivitet mot inhalert adenosinmonofosfat (Volmer et al. 2006). Det er dermed vist en sammenheng mellom astma og CD73, og det er derfor naturlig at dette proteinet ble funnet oppregulert i de IL-13-stimulerte lungecellene. Det antas videre at dannelsen av adenosin, ved hjelp av CD73, er viktig i vevsbeskyttelsen (Volmer et al. 2006). I tillegg har ekstracellulært adenosin en rekke immunundertrykkende egenskaper, da det er med på å hemme dannelsen av proinflammatoriske cytokiner (Mills et al. 2008).

RPL27 er et annet protein som deltar i proteinmetabolismen, da dette er nødvendig for effektiv dannelse av peptidbindinger (Wower et al. 1998). I denne analysen ble dette proteinet oppregulert. Ved en inflammatorisk respons øker antall celler (Fedorov et al. 2005), og det kan derfor tenkes at det i den sammenheng lages flere proteiner, hvilket igjen fører til at det er nødvendig med flere proteiner som danner peptidbindinger.

Et protein som deltar i lipidmetabolismen, ble også funnet. ACADS er med på å katalysere det første trinnet i β -oksidasjonen av fettsyrer (Jethva et al. 2008). I denne analysen ble proteinet nedregulert.

Ikke alle metabolismeproteinene som ble funnet, hadde den forventede reguleringen. Enkelte ble regulert ned, da det logisk sett skulle blitt oppregulert. Dette kan komme av at det i denne analysen ble sett på proteinuttrykket 24 timer etter indusering med IL-13. Det vil være interessant i fremtidige forsøk å gjøre en tidskurvesanalyse av uttrykket til disse proteinene, for eksempel ved bruk av Western blot og real time PCR, for å se om graden av regulering endres.

5.2.7 Diverse proteiner

MKI67 er til stede i alle aktive faser av celledyklus og kan derfor benyttes som en markør for veksten til en gitt cellepopulasjon (Cimpean et al. 2009). I alvorlig astma er det vist en økning i antall celler som følge av celledeling og cellevekst i luftveiene. Dette fører til at epitelcellelaget og det basale lamina blir tykkere (Fedorov et al. 2005). I epitelet til pasienter med alvorlig astma, øker uttrykket av MKI67, som tyder på en økning av antall celler (Cohen et al. 2007). I denne analysen ble derimot dette proteinet nedregulert. Årsaken kan være at det er stor forskjell på ekte lunger og en lungecellekultur. Lungecellekulturen, BEAS-2B, som benyttes i denne analysen, kan for eksempel ikke vokse i flere lag slik som epitelcellelaget i lungene kan gjøre (Bosch et al. 1988).

UBE4A viste en særdeles høy oppregulering. Mange proteiner i eukaryote celler merkes med ubiquitin for så å brytes ned. Nedbrytning av regulatoriske proteiner spiller en viktig rolle i mange prosesser, inkludert celledyklus, signaltransduksjon, regulering av transkripsjon og endocytose. Ubiquitinsystemet er også med i immunresponser og apoptose. Dersom noe er feil i ubiquitinprosessen kan det ha alvorlige patologiske konsekvenser, som for eksempel dannelsen av ondartede celler (Hershko & Ciechanover 1998). Det kan tenkes at årsaken til at UBE4A er så kraftig oppregulert, er at det fungerer som en respons på økt celleproduksjon.

I og med at dette proteinet er så kraftig oppregulert, sammenlignet med de andre proteinene, vil det være interessant med videre analyser som Western blot og real time PCR. På denne måten kan det kontrolleres om responsen faktisk er der, og at det ikke bare er en feil med teknikken. I tillegg vil disse metodene kunne si noe om når responsen eventuelt oppstår tidsmessig. Dersom resultatet stemmer, kan det hende at dette proteinet har en hittil ukjent rolle i utviklingen eller bekjempelsen av astma eller andre inflammatoriske sykdommer.

5.2.8 Protein uten kjent funksjon

Funksjonen til C5ORF15 ble ikke funnet. Ettersom proteinet har blitt regulert av IL-13 vil det være av interesse å finne funksjonene for å forstå mer om proteinet og hvorfor det ble regulert.

5.2.9 Interaksjonsanalyse

En interaksjonsanalyse kan utføres for å sjekke om de regulerte proteinene som ble funnet i analysen har noen sammenheng. Det antas at når en cellelinje induseres med en ligand, vil liganden kun virke på enkelte proteiner. Det er derfor sannsynlig at de påvirkede proteinene har en sammenheng, blant annet ved å være involvert i samme reaksjonsvei. Dersom interaksjonsanalysen ikke finner noen sammenhenger, kan dette ha to årsaker. Det kan være at resultatene er tilfeldige og at ingen spesifikke reaksjoner er startet av liganden. Den andre årsaken kan være at analysen ikke er god nok; det vil si at det er mange flere proteiner som reguleres enn det som blir funnet. På denne måten vil ikke sammenhengene bli sett fordi enkelte "biter" mangler. Dette er som regel tilfellet (Busk 2010).

STRING inneholder informasjon fra to typer kilder; fra både automatisk og manuelt innhentet informasjon. Ved manuell innhenting blir informasjonen fra ulike eksterne databaser hentet inn av eksperter som validerer og systematiserer den. I begge type kilder kan falske positive oppstå. Det kan være vanskeligheter med å identifisere hvilke proteiner som beskrives i ulike tekster, da det benyttes flere navn for de fleste proteiner. I tillegg kan identiske navn ha blitt gitt til proteiner fra ulike proteinfamilier i forskjellige organismer. Å ha felles systemer for annotering og navnsetting av gener og proteiner er derfor viktig. STRING ser etter fysiske interaksjoner, som for eksempel om to proteiner tidligere er vist å henge sammen i dimerer eller store komplekser. I tillegg ser STRING også etter proteiner som er nevnt sammen i tekster. I disse tilfellene kan programmet vise liten "forståelse" for om de virkelig har en sammenheng. Metoden virker likevel relativt bra, da proteiner som nevnes sammen ofte gjerne har en funksjonell forbindelse. Sjansene for at falske positive skal oppstå, reduseres ved at informasjon fra ulike kilder benyttes. Falske negative kan også bli funnet, og mange kjente protein-protein assosiasjoner kan da gå tapt. STRING behøver tilgang til nødvendige tekster for å kunne foreta en interaksjonsanalyse. Ved bruk av PubMed har STRING kun tilgang til sammendrag. I tillegg til PubMed benyttes også informasjon fra andre databaser, som for eksempel *Saccharomyces* Genome Database (SGD) og Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). STRING kan også ha vanskeligheter med å avgjøre hvilken organisme proteinforbindelsene finnes i. Det kan i tillegg være vanskelig å finne enkelte gennavn, da disse kan være de samme som vanlige engelske ord. Selv med mange muligheter for å innhente feilaktige opplysninger, er STRING en nyttig kilde til informasjon (STRING 2010). Med bakgrunn i dette ble STRING-proteininteraksjonsanalysen studert. Proteinene som viste åpenbare sammenhenger, vil bli diskutert nedenfor.

STRING-proteininteraksjonsanalysen resulterte i dannelsen av nettverk mellom proteiner (figur 4.18). Det ble funnet en interaksjon mellom ADPGK, HK1 og PGK1. Alle disse tre er kinaser og involverte i glykolysen der glukose gjennom flere trinn omdannes til pyruvat. ADPGK og HK1 er begge enzymer som katalyserer fosforyleringen av glukose til glukose-6-fosfat (de Vooght et al. 2009; Ronimus & Morgan 2004). PGK1 kommer inn senere i glykolysen og katalyserer omgjøringen av 1,3-difosfoglyserat til 3-fosfoglyserat.

I analysen ble det vist en sammenheng mellom ATP2B4 og PDLIM1. Da linjen mellom disse proteinene er tynn, tyder det på at det er funnet en relativt svak grad av sammenheng. Ca^{++} -ATPaser spiller en rolle i opprettholdelsen av et lavt Ca^{++} -nivå i cytosol hos hvilende blodplater. Det er videre vist at PDZ-motivet i PDLIM1 assosieres med Ca^{++} -ATPaser, som fører til translokalisering av Ca^{++} -ATPasene til filopodia i aktiverte blodplater. PDLIM1 danner interaksjoner med cytoskjelettet i blodplatene siden den binder til α -aktinin som er et aktinbindende protein. På denne måten kobler PDLIM1 Ca^{++} -ATPaser til cytoskjelettet (Bozulich et al. 2007), hvilket kan være årsaken til at disse kobles sammen i STRING-analysen.

ITGA5 er det proteinet som i STRING-analysen viste sammenheng med flest proteiner. ITGA5 er et protein som er viktig i celledifferensiering (Gu et al. 2009). Det kan da tenkes at ligandene som er bundet til dette, også er med i celledifferensiering. En interaksjon mellom ITGA5, COL6A1 og L1CAM ble funnet. De to sistnevnte interagerer ikke med hverandre. Felles for disse tre proteinene er at de alle er involvert i celledifferensiering. L1CAM har i tillegg en ekstracellulær region som kan binde integriner (Haspel & Grumet 2003). Integriner kan også fungere som kollagenreseptorer (Heino 2000). Videre ble det i STRING-analysen vist at ITGA5 har en interaksjon med ICAM1. Dette stemmer bra med tidligere funn som viser at integriner virker som reseptorer for ICAM1 (Bernstein et al. 1998). En sammenheng mellom ITGA5 og TFRC ble også funnet i STRING-analysen. Tidligere er det funnet at integrin α 3-subenheten binder til transferrinreseptorer via disulfidbindinger (Coppolino et al. 1995). Det kan derfor tenkes at transferrinreseptoren kan binde til α 5-subenheten, som i så tilfelle kan være årsaken til forbindelsen mellom ITGA5 og TFRC. Det siste proteinet ITGA5 viser en sammenheng med, er TGFBI. I tidligere studier er det funnet at RGD-motivet i TGFBI kan fungere som et ligandgjenkjennelsestede for integriner. Dette fører til regulering av adhesjoner, celledeling, differensiering, antiapoptose og utvikling av tumorer (Zhang et al. 2009).

MKI67 er et protein som er til stede i alle aktive faser av celledelingen (Cimpean et al. 2009). Det er i STRING-analysen vist at dette proteinet har en sammenheng med PDGFRB. Dette proteinet er med i celledelingen som fører til et økt antall celler i de glatte musklene under en astmatisk respons (Tada et al. 2003). At et protein som er til stede i alle aktive faser av celledelingen viser sammenheng med et protein som deltar i celledelingen, er derfor en logisk slutning å trekke. Det kan også tas med i betraktningen at STRING-figuren viser en relativt svak sammenheng mellom de to proteinene.

STRING-proteininteraksjonsanalysen tyder på at IL-13 påvirker de ulike grupperingene. Ved å søke i UniProt (UniProt 2010) ble KEGG-reaksjonsveiene som de ulike proteinene deltar i, funnet. Kun ITGA5 og TFRC, i tillegg til PGK1 og HK1, er forbindelser som deltar i samme reaksjonsveier. ITGA5 og TFRC deltar i "hematopoietic cell lineage", hvor hematopoietiske stamceller differensierer for å gi opphav til blant annet erytrocytter, monocytter/makrofager, granulocytter, B-celler og T-celler. Det er da naturlig å tenke at disse to proteinene ble oppregulert, men det var det kun ITGA5 som ble. PGK1 og HK1 deltar i glykolysen, noe som er diskutert tidligere i dette avsnittet. Dette antyder at disse reaksjonsveiene påvirkes av IL-13.

Generelt viser ikke proteinene i de ulike grupperingene sammenfallende regulering. Ettersom de er regulert, tyder dette på at IL-13 har en virkning på disse. Det vil derfor være av interesse å studere proteinene i disse grupperingene mer inngående.

5.2.10 Oppsummering

Det er i denne analysen funnet en rekke regulerte proteiner som har sammenheng med astma. Flere av de regulerte proteinene viser sammenheng med kalsiumhomeostase. ATP2B4 viste oppregulering. Dette stemmer overens med forventet resultat, da det er vist økt kalsiumnivå i celler induisert med IL-13 (Gao et al.). Det vil da være behov for proteiner som reduserer kalsiumkonsentrasjonen. Når det gjelder proteiner involvert i kollagensyntesen, var det to proteiner, OAT og COL6A1, som viste forventet regulering. Disse ble regulert opp, og dette stemmer overens med at endringer i luftveiene ved astma fører til økt kollagenavleiring i vevet (Davies 2009).

LIM-domenet er med på å fremme dannelsen av stressfiber (Jiang et al. 2008). Stressfiber dannes etter inflammatorisk stimuli (Bauer et al. 2000), som for eksempel IL-13. Det kan derfor tenkes at proteiner som innehar LIM-domenet viste oppregulering, noe også ett av to proteiner med dette domenet viste. Det er tidligere funnet at alvorlige infeksjoner ofte ses i sammenheng med økt metabolsk aktivitet (Kurpad 2006), og dette kan føre til betydelige endringer i karbohydrat-, lipid- og proteinmetabolismen i cellene. Av metabolismeproteinene som ble funnet, ble HK1, CD73 og RPL27 oppregulert. Det ble også funnet noen proteiner som var del av samme reaksjonsvei; PGK1 og HK1 deltar i glykolysen, mens ITGA5 og TFRC deltar i "hematopoietic cell lineage", hvor det blant annet produseres erytrocytter, monocytter/makrofager, granulocytter, B-celler og T-celler.

Mange av de regulerte proteinene viste en annen regulering enn det som skulle tenkes ut fra litteraturen og hva tidligere utførte analyser har vist. En av årsakene til dette kan blant annet være at proteinene i denne analysen for det meste kun er funnet i én parallell. Dersom proteinene ble funnet i to eller flere paralleller, ville treffet vært mer signifikant. Enkelte av de tidligere analysene det er sett på, er utført på mus. Dette kan være en årsak til at det er funnet andre resultater i analysen som har blitt utført i denne oppgaven enn i litteraturen. I lignende publiserte artikler har ikke analysebetingelsene vært de samme, og det er derfor ikke mulig å trekke entydige konklusjoner. Et eksempel er IL-13-konsentrasjonen. I denne analysen ble det brukt en relativt lav konsentrasjon (1 ng/ml). Det er mulig at resultatene hadde blitt tydeligere dersom denne hadde blitt økt. Det hadde derimot vært vanskeligere å skille hvilke endringer som kun skyldes stimulering av IL-13 og hvilke som skyldes stress som cellen opplever ved å plutselig få tilført veldig mye stimulant.

Et annet eksempel på annerledes analysebetingelser er at lungecellene ble induisert med IL-13 i 24 timer. Det vites ikke om cellene har mekanismer som motsetter den inflammatoriske stimulien, slik at når proteinuttrykket studeres, er det verdiene etter at cellene har motsatt seg endringen, som ses. Ved kortere induksjonstid vil verdiene kunne se annerledes ut. For å studere dette, kan noen viktige proteiner velges ut og studeres ved bruk av for eksempel real time PCR, slik at uttrykket kan studeres ved flere tidspunkt.

Bruk av IL-13 til å indusere lungeceller for å gi disse cellene astma, kan ikke sammenlignes fullstendig med en reell astmatisk respons. Årsaken til dette er at lungene er et mer biologisk mangfoldig organ sammenlignet med lungecellekulturer. I motsetning til epitelcellene i humane lunger vokser BEAS-2B-cellene, som benyttes i denne analysen, kun i monolag. At enkelte av proteinene viser variasjoner, er derfor ikke unaturlig.

6 VIDERE ARBEID

I forbindelse med de IL-13-induserte lungecellene ble kun to av tre paralleller analysert. Det vil derfor være svært interessant å analysere den tredje og siste parallellen med lungeceller for å få et større og mer fullstendig bilde av hvilke proteiner som er involvert i IL-13-indusert astma. Det kan også være av interesse å velge ut noen proteiner for mer inngående studier, for eksempel UBEA4 som viste en voldsom oppregulering. Videre kan det også være interessant å velge for eksempel organelle- og membranfraksjonen, som har vist å ha flest regulerte proteiner, til en mer detaljert analyse ved lengre gradienter på LC før den massespektrometriske analysen. I tillegg kan 1D-gelen deles i 20 biter i stedet for 10, slik at mindre mengde protein appliseres. Dette vil gi en bedre separasjon av peptider med mindre overlapp og bedre deteksjon.

For produksjon av AMCase vil det være nødvendig å dyrke opp større mengder og utvikle en bedre rensemetode. Det vil også være nødvendig å transformere W31A og E140Q inn i *P. pastoris* for å få laget protein på samme måte som for WT og W99A.

Det vil deretter være av interesse å utføre en biokjemisk og fysikalsk-kjemisk karakterisering av villtype-AMCase og mutanter.

I forbindelse med astma kan celler som overuttrykker AMCase benyttes for å se på opp- og nedregulering av proteiner og finne markører for inflammasjon. Det vil også være nødvendig å gjøre dette med inhibitorer av AMCase og følge markørene for å eventuelt kunne finne terapeutiske mål som kan være nyttige ved behandling av astma.

7 REFERANSER

- Abe, K. & Takeichi, M. (2008). EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (1): 13-9.
- Abu-Hamad, S., Zaid, H., Israelson, A., Nahon, E. & Shoshan-Barmatz, V. (2008). Hexokinase-I protection against apoptotic cell death is mediated via interaction with the voltage-dependent anion channel-1: mapping the site of binding. *J Biol Chem*, 283 (19): 13482-90.
- Aisen, P. (2004). Transferrin receptor 1. *Int J Biochem Cell Biol*, 36 (11): 2137-43.
- Alberts, B. (2008). *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science. XXXIII, 1268, [90] s. s.
- Allergiviten.no. (2005). *Forekomst og forløp av astma*: Allergiviten.no. Tilgjengelig fra: <http://www.allergiviten.no/index.asp?G=1510&ID=2657> (lest 7. mars 2010).
- Arnold, S. A. & Brekken, R. A. (2009). SPARC: a matricellular regulator of tumorigenesis. *J Cell Commun Signal*.
- Aronson, N. N., Jr., Halloran, B. A., Alexeyev, M. F., Zhou, X. E., Wang, Y., Meehan, E. J. & Chen, L. (2006). Mutation of a conserved tryptophan in the chitin-binding cleft of *Serratia marcescens* chitinase A enhances transglycosylation. *Biosci Biotechnol Biochem*, 70 (1): 243-51.
- Ashcroft, A. E. (2003). Protein and peptide identification: the role of mass spectrometry in proteomics. *Nat Prod Rep*, 20 (2): 202-15.
- Atsuta, J., Sterbinsky, S. A., Plitt, J., Schwiebert, L. M., Bochner, B. S. & Schleimer, R. P. (1997). Phenotyping and cytokine regulation of the BEAS-2B human bronchial epithelial cell: demonstration of inducible expression of the adhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 17 (5): 571-82.
- Bach, I. (2000). The LIM domain: regulation by association. *Mech Dev*, 91 (1-2): 5-17.
- Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J. & Kuster, B. (2007). Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem*, 389 (4): 1017-31.
- Barnes, P. J. (2008a). The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest*, 118 (11): 3546-56.
- Barnes, P. J. (2008b). Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol*, 8 (3): 183-92.
- Barthel, S. R., Johansson, M. W., McNamee, D. M. & Mosher, D. F. (2008). Roles of integrin activation in eosinophil function and the eosinophilic inflammation of asthma. *J Leukoc Biol*, 83 (1): 1-12.
- Bauer, K., Kratzer, M., Otte, M., de Quintana, K. L., Hagmann, J., Arnold, G. J., Eckerskorn, C., Lottspeich, F. & Siess, W. (2000). Human CLP36, a PDZ-domain and LIM-domain protein, binds to alpha-actinin-1 and associates with actin filaments and stress fibers in activated platelets and endothelial cells. *Blood*, 96 (13): 4236-45.
- Bavaresco, L., Bernardi, A., Braganhol, E., Cappellari, A. R., Rockenbach, L., Farias, P. F., Wink, M. R., Delgado-Canedo, A. & Battastini, A. M. (2008). The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. *Mol Cell Biochem*, 319 (1-2): 61-8.

- Beckman, C. (2006). *The Coulter Principle*. Tilgjengelig fra: http://www.beckmancoulter.com/coultercounter/homepage_tech_coulter_principle.jsp?id=frombec&source=301redirect.
- Bernstein, C. N., Sargent, M. & Gallatin, W. M. (1998). Beta2 integrin/ICAM expression in Crohn's disease. *Clin Immunol Immunopathol*, 86 (2): 147-60.
- Bianco, A., Sethi, S. K., Allen, J. T., Knight, R. A. & Spiteri, M. A. (1998). Th2 cytokines exert a dominant influence on epithelial cell expression of the major group human rhinovirus receptor, ICAM-1. *Eur Respir J*, 12 (3): 619-26.
- Bitko, V., Oldenburg, A., Garmon, N. E. & Barik, S. (2003). Profilin is required for viral morphogenesis, syncytium formation, and cell-specific stress fiber induction by respiratory syncytial virus. *BMC Microbiol*, 3: 9.
- Boja, E. S. & Fales, H. M. (2001). Overalkylation of a protein digest with iodoacetamide. *Anal Chem*, 73 (15): 3576-82.
- Boot, R. G., Blommaert, E. F., Swart, E., Ghauharali-van der Vlugt, K., Bijl, N., Moe, C., Place, A. & Aerts, J. M. (2001). Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *J Biol Chem*, 276 (9): 6770-8.
- Bosch, F. X., Leube, R. E., Achtstatter, T., Moll, R. & Franke, W. W. (1988). Expression of simple epithelial type cytokeratins in stratified epithelia as detected by immunolocalization and hybridization in situ. *J Cell Biol*, 106 (5): 1635-48.
- Bozusic, L. D., Malik, M. T., Powell, D. W., Nanez, A., Link, A. J., Ramos, K. S. & Dean, W. L. (2007). Plasma membrane Ca(2+) -ATPase associates with CLP36, alpha-actinin and actin in human platelets. *Thromb Haemost*, 97 (4): 587-97.
- Brass, A. L., Huang, I. C., Benita, Y., John, S. P., Krishnan, M. N., Feeley, E. M., Ryan, B. J., Weyer, J. L., van der Weyden, L., Fikrig, E., et al. (2009). The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell*, 139 (7): 1243-54.
- Buc, M., Dzurilla, M., Vrlík, M. & Bucova, M. (2009). Immunopathogenesis of bronchial asthma. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 57 (5): 331-44.
- Busk, Ø. (2010). *E-post*. Ås (20.04.2010).
- Bussink, A. P., Speijer, D., Aerts, J. M. & Boot, R. G. (2007). Evolution of mammalian chitinase(-like) members of family 18 glycosyl hydrolases. *Genetics*, 177 (2): 959-70.
- Cereghino, J. L. & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*, 24 (1): 45-66.
- Chaudry, A. (2004). *The Science Creative Quarterly: Cell Culture*. Tilgjengelig fra: <http://www.scq.ubc.ca/cell-culture/> (lest 27. februar 2010).
- Cheng, G., Arima, M., Honda, K., Hirata, H., Eda, F., Yoshida, N., Fukushima, F., Ishii, Y. & Fukuda, T. (2002). Anti-interleukin-9 antibody treatment inhibits airway inflammation and hyperreactivity in mouse asthma model. *Am J Respir Crit Care Med*, 166 (3): 409-16.
- Chou, Y. T., Yao, S., Czerwinski, R., Fleming, M., Krykbaev, R., Xuan, D., Zhou, H., Brooks, J., Fitz, L., Strand, J., et al. (2006). Kinetic characterization of recombinant human acidic mammalian chitinase. *Biochemistry*, 45 (14): 4444-54.
- Chung, K. F. & Barnes, P. J. (1999). Cytokines in asthma. *Thorax*, 54 (9): 825-57.
- Cimpean, A. M., Saptefrati, L., Ceausu, R. & Raica, M. (2009). Characterization of endoglin and Ki-67 expression in endothelial cells from benign and malignant lesions of the uterine cervix. *Pathol Int*, 59 (10): 695-700.
- Cleland, W. W. (1964). Dithiothreitol, a New Protective Reagent for Sh Groups. *Biochemistry*, 3: 480-2.
- Cohen, L., E, X., Tarsi, J., Ramkumar, T., Horiuchi, T. K., Cochran, R., DeMartino, S., Schechtman, K. B., Hussain, I., Holtzman, M. J., et al. (2007). Epithelial cell

- proliferation contributes to airway remodeling in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 176 (2): 138-45.
- Collins, P. D., Marleau, S., Griffiths-Johnson, D. A., Jose, P. J. & Williams, T. J. (1995). Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *J Exp Med*, 182 (4): 1169-74.
- Contino, G., Amati, F., Pucci, S., Pontieri, E., Pichiorri, F., Novelli, A., Botta, A., Mango, R., Nardone, A. M., Sangiuolo, F. C., et al. (2004). Expression analysis of the gene encoding for the U-box-type ubiquitin ligase UBE4A in human tissues. *Gene*, 328: 69-74.
- Coppolino, M., Migliorini, M., Argraves, W. S. & Dedhar, S. (1995). Identification of a novel form of the alpha 3 integrin subunit: covalent association with transferrin receptor. *Biochem J*, 306 (Pt 1): 129-34.
- Cox, J. & Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol*, 26 (12): 1367-72.
- Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J. & Higgins, D. R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol*, 16 (1): 23-52.
- D'Hertog, W., Overbergh, L., Lage, K., Ferreira, G. B., Maris, M., Gysemans, C., Flamez, D., Cardozo, A. K., Van den Bergh, G., Schoofs, L., et al. (2007). Proteomics analysis of cytokine-induced dysfunction and death in insulin-producing INS-1E cells: new insights into the pathways involved. *Mol Cell Proteomics*, 6 (12): 2180-99.
- Daly, R. & Hearn, M. T. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit*, 18 (2): 119-38.
- Davies, D. E. (2009). The role of the epithelium in airway remodeling in asthma. *Proc Am Thorac Soc*, 6 (8): 678-82.
- Davies, G. & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3 (9): 853-9.
- de Vooght, K. M., van Solinge, W. W., van Wesel, A. C., Kersting, S. & van Wijk, R. (2009). First mutation in the red blood cell-specific promoter of hexokinase combined with a novel missense mutation causes hexokinase deficiency and mild chronic hemolysis. *Haematologica*, 94 (9): 1203-10.
- Di Valentin, E., Crahay, C., Garbacki, N., Hennuy, B., Gueders, M., Noel, A., Foidart, J. M., Grooten, J., Colige, A., Piette, J., et al. (2009). New asthma biomarkers: lessons from murine models of acute and chronic asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 296 (2): L185-97.
- Downard, K. (2004). *Mass spectrometry: a foundation course*. Cambridge: Royal Society of Chemistry. XVI, 210 s. s.
- Durussel, I., Mehul, B., Bernard, D., Schmidt, R. & Cox, J. A. (2002). Cation- and peptide-binding properties of human calmodulin-like skin protein. *Biochemistry*, 41 (17): 5439-48.
- Ehrhardt, C., Kim, K. J. & Lehr, C. M. (2005). Isolation and culture of human alveolar epithelial cells. *Methods Mol Med*, 107: 207-16.
- Eisenstein, R. S. & Blemings, K. P. (1998). Iron regulatory proteins, iron responsive elements and iron homeostasis. *J Nutr*, 128 (12): 2295-8.
- Elias, J. A., Zhu, Z., Chupp, G. & Homer, R. J. (1999). Airway remodeling in asthma. *J Clin Invest*, 104 (8): 1001-6.
- Elias, J. A. (2000). Airway remodeling in asthma. Unanswered questions. *Am J Respir Crit Care Med*, 161 (3 Pt 2): S168-71.

- Elias, J. A., Lee, C. G., Zheng, T., Shim, Y. & Zhu, Z. (2003). Interleukin-13 and leukotrienes: an intersection of pathogenetic schema. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 28 (4): 401-4.
- Elias, J. A., Homer, R. J., Hamid, Q. & Lee, C. G. (2005). Chitinases and chitinase-like proteins in T(H)2 inflammation and asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 116 (3): 497-500.
- Fajardo, I., Svensson, L., Bucht, A. & Pejler, G. (2004). Increased levels of hypoxia-sensitive proteins in allergic airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*, 170 (5): 477-84.
- Fan, J., Peng, Z., Zhou, C., Qiu, G., Tang, H., Sun, Y., Wang, X., Li, Q., Le, X. & Xie, K. (2008). Gene-expression profiling in Chinese patients with colon cancer by coupling experimental and bioinformatic genomewide gene-expression analyses: identification and validation of IFITM3 as a biomarker of early colon carcinogenesis. *Cancer*, 113 (2): 266-75.
- Fedorov, I. A., Wilson, S. J., Davies, D. E. & Holgate, S. T. (2005). Epithelial stress and structural remodelling in childhood asthma. *Thorax*, 60 (5): 389-94.
- Fleming, R. E. & Bacon, B. R. (2005). Orchestration of iron homeostasis. *N Engl J Med*, 352 (17): 1741-4.
- Foster, K. A., Oster, C. G., Mayer, M. M., Avery, M. L. & Audus, K. L. (1998). Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Exp Cell Res*, 243 (2): 359-66.
- Fujita, A., Sato, J. R., Festa, F., Gomes, L. R., Oba-Shinjo, S. M., Marie, S. K., Ferreira, C. E. & Sogayar, M. C. (2008). Identification of COL6A1 as a differentially expressed gene in human astrocytomas. *Genet Mol Res*, 7 (2): 371-8.
- Fusetti, F., von Moeller, H., Houston, D., Rozeboom, H. J., Dijkstra, B. W., Boot, R. G., Aerts, J. M. & van Aalten, D. M. (2002). Structure of human chitotriosidase. Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. *J Biol Chem*, 277 (28): 25537-44.
- Gabrilovich, D. I., Cheng, P., Fan, Y., Yu, B., Nikitina, E., Sirotkin, A., Shurin, M., Oyama, T., Adachi, Y., Nadaf, S., et al. (2002). H1(0) histone and differentiation of dendritic cells. A molecular target for tumor-derived factors. *J Leukoc Biol*, 72 (2): 285-96.
- Galli, S. J., Kalesnikoff, J., Grimbaldston, M. A., Piliponsky, A. M., Williams, C. M. & Tsai, M. (2005). Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol*, 23: 749-86.
- Gao, Y. D., Zou, J. J., Zheng, J. W., Shang, M., Chen, X., Geng, S. & Yang, J. Promoting effects of IL-13 on Ca(2+) release and store-operated Ca(2+) entry in airway smooth muscle cells. *Pulm Pharmacol Ther*.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*, 3 (1): 23-35.
- Grimmer, C., Balbus, N., Lang, U., Aigner, T., Cramer, T., Muller, L., Swoboda, B. & Pfander, D. (2006). Regulation of type II collagen synthesis during osteoarthritis by prolyl-4-hydroxylases: possible influence of low oxygen levels. *Am J Pathol*, 169 (2): 491-502.
- Gu, J., Isaji, T., Sato, Y., Kariya, Y. & Fukuda, T. (2009). Importance of N-glycosylation on alpha5beta1 integrin for its biological functions. *Biol Pharm Bull*, 32 (5): 780-5.
- Gunst, S. J. & Zhang, W. (2008). Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: a new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295 (3): C576-87.
- Hammad, H. & Lambrecht, B. N. (2008). Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol*, 8 (3): 193-204.
- Harris, D. C. (2007). *Quantitative chemical analysis*. New York: Freeman. XVII, 663, [136] s. s.

- Hartland, S. N., Murphy, F., Aucott, R. L., Abergel, A., Zhou, X., Waung, J., Patel, N., Bradshaw, C., Collins, J., Mann, D., et al. (2009). Active matrix metalloproteinase-2 promotes apoptosis of hepatic stellate cells via the cleavage of cellular N-cadherin. *Liver Int*, 29 (7): 966-78.
- Hasegawa, K., Tamari, M., Shao, C., Shimizu, M., Takahashi, N., Mao, X. Q., Yamasaki, A., Kamada, F., Doi, S., Fujiwara, H., et al. (2004). Variations in the C3, C3a receptor, and C5 genes affect susceptibility to bronchial asthma. *Hum Genet*, 115 (4): 295-301.
- Haspel, J. & Grumet, M. (2003). The L1CAM extracellular region: a multi-domain protein with modular and cooperative binding modes. *Front Biosci*, 8: s1210-25.
- Hata, T. R. & Gallo, R. L. (2008). Antimicrobial peptides, skin infections, and atopic dermatitis. *Semin Cutan Med Surg*, 27 (2): 144-50.
- Heino, J. (2000). The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions. *Matrix Biol*, 19 (4): 319-23.
- Hershko, A. & Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, 67: 425-79.
- Hollak, C. E., van Weely, S., van Oers, M. H. & Aerts, J. M. (1994). Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest*, 93 (3): 1288-92.
- Horn, S. J., Sikorski, P., Cederkvist, J. B., Vaaje-Kolstad, G., Sorlie, M., Synstad, B., Vriend, G., Varum, K. M. & Eijsink, V. G. (2006). Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (48): 18089-94.
- Hotulainen, P. & Lappalainen, P. (2006). Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J Cell Biol*, 173 (3): 383-94.
- Hu, Q., Noll, R. J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M. & Graham Cooks, R. (2005). The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom*, 40 (4): 430-43.
- Invitrogen. (2001). *Pichia EasyComp Kit*. 8 s.
- Invitrogen. (2006). *SILAC™ Protein Identification (ID) and Quantitation Kits*. 63 s.
- Invitrogen. (2007). *Quant-iT™ Protein Assay Kit*. 9 s.
- Invitrogen. (2009). *Multi-Copy Pichia Expression Kit User Manual*: Invitrogen. 111 s.
- Issa, Y., Nummer, D., Seibel, T., Muerkoster, S. S., Koch, M., Schmitz-Winnenthal, F. H., Galindo, L., Weitz, J., Beckhove, P. & Altevogt, P. (2009). Enhanced L1CAM expression on pancreatic tumor endothelium mediates selective tumor cell transmigration. *J Mol Med*, 87 (1): 99-112.
- Jensen, L. J., Kuhn, M., Stark, M., Chaffron, S., Creevey, C., Muller, J., Doerks, T., Julien, P., Roth, A., Simonovic, M., et al. (2009). STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res*, 37 (Database issue): D412-6.
- Jethva, R., Bennett, M. J. & Vockley, J. (2008). Short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Mol Genet Metab*, 95 (4): 195-200.
- Jiang, W. G., Martin, T. A., Lewis-Russell, J. M., Douglas-Jones, A., Ye, L. & Mansel, R. E. (2008). Eplin-alpha expression in human breast cancer, the impact on cellular migration and clinical outcome. *Mol Cancer*, 7: 71.
- Jollès, P. & Muzzarelli, R. A. A. (1999). *Chitin and chitinases*. Basel: Birkhäuser. XI, 340 s.
- Kasaian, M. T. & Miller, D. K. (2008). IL-13 as a therapeutic target for respiratory disease. *Biochem Pharmacol*, 76 (2): 147-55.
- Kawada, M., Hachiya, Y., Arihiro, A. & Mizoguchi, E. (2007). Role of mammalian chitinases in inflammatory conditions. *Keio J Med*, 56 (1): 21-7.

- Kiyono, T., Foster, S. A., Koop, J. I., McDougall, J. K., Galloway, D. A. & Klingelutz, A. J. (1998). Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature*, 396 (6706): 84-8.
- Klug, W. S., Cummings, M.R. (2005). *Essentials of genetics*. 5 utg.: Pearson Education, Inc. 568 s.
- Ko, J. A., Yanai, R. & Nishida, T. (2009). IGF-1 released by corneal epithelial cells induces up-regulation of N-cadherin in corneal fibroblasts. *J Cell Physiol*, 221 (1): 254-61.
- Kurpad, A. V. (2006). The requirements of protein & amino acid during acute & chronic infections. *Indian J Med Res*, 124 (2): 129-48.
- Kzhyshkowska, J., Gratchev, A. & Goerdt, S. (2007). Human chitinases and chitinase-like proteins as indicators for inflammation and cancer. *Biomark Insights*, 2: 128-46.
- Lea, T. (2006). *Immunologi og immunologiske teknikker*. Bergen: Fagbokforl. 400 s. s.
- Lee, S. M., Shin, H., Jang, S. W., Shim, J. J., Song, I. S., Son, K. N., Hwang, J., Shin, Y. H., Kim, H. H., Lee, C. K., et al. (2004). PLP2/A4 interacts with CCR1 and stimulates migration of CCR1-expressing HOS cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 324 (2): 768-72.
- Levillain, O., Diaz, J. J., Blanchard, O. & Dechaud, H. (2005). Testosterone down-regulates ornithine aminotransferase gene and up-regulates arginase II and ornithine decarboxylase genes for polyamines synthesis in the murine kidney. *Endocrinology*, 146 (2): 950-9.
- LHL. (2008). Astma. Tilgjengelig fra: <http://www.lhl.no/Leve-med-sykdom-/A-leve-med-lungesykdom/Astma/> (lest 13.08.2009).
- Li, P., Anumanthan, A., Gao, X. G., Ilangovan, K., Suzara, V. V., Duzgunes, N. & Renugopalakrishnan, V. (2007). Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Appl Biochem Biotechnol*, 142 (2): 105-24.
- Liebler, D. C. (2004). *Proteomics in cancer research*. Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons. XII, 201 s. s.
- Lim, E. J., Sampath, S., Coll-Rodriguez, J., Schmidt, J., Ray, K. & Rodgers, D. W. (2007). Swapping the substrate specificities of the neuropeptidases neurolysin and thimet oligopeptidase. *J Biol Chem*, 282 (13): 9722-32.
- Lindstedt, M., Schiott, A., Bengtsson, A., Larsson, K., Korsgren, M., Greiff, L. & Borrebaeck, C. A. (2005). Genomic and functional delineation of dendritic cells and memory T cells derived from grass pollen-allergic patients and healthy individuals. *Int Immunol*, 17 (4): 401-9.
- Macfarlane, A. J., Kon, O. M., Smith, S. J., Zeibecoglou, K., Khan, L. N., Barata, L. T., McEuen, A. R., Buckley, M. G., Walls, A. F., Meng, Q., et al. (2000). Basophils, eosinophils, and mast cells in atopic and nonatopic asthma and in late-phase allergic reactions in the lung and skin. *J Allergy Clin Immunol*, 105 (1 Pt 1): 99-107.
- Marin, R., Riquelme, G., Godoy, V., Diaz, P., Abad, C., Caires, R., Proverbio, T., Pinero, S. & Proverbio, F. (2008). Functional and structural demonstration of the presence of Ca-ATPase (PMCA) in both microvillous and basal plasma membranes from syncytiotrophoblast of human term placenta. *Placenta*, 29 (8): 671-9.
- Marion-Letellier, R., Butler, M., Dechelotte, P., Playford, R. J. & Ghosh, S. (2008). Comparison of cytokine modulation by natural peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands with synthetic ligands in intestinal-like Caco-2 cells and human dendritic cells--potential for dietary modulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in intestinal inflammation. *Am J Clin Nutr*, 87 (4): 939-48.
- Mathews, C. K., Ahern, K. G. & Van Holde, K. E. (2000). *Biochemistry*. San Francisco, Calif.: Benjamin/Cummings. XXVIII, 1186 s. s.

- Maul, R. S., Song, Y., Amann, K. J., Gerbin, S. C., Pollard, T. D. & Chang, D. D. (2003). EPLIN regulates actin dynamics by cross-linking and stabilizing filaments. *J Cell Biol*, 160 (3): 399-407.
- Millipore. (2010). *Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units*: Millipore.com. Tilgjengelig fra: <http://www.millipore.com/catalogue/module/c7715#Typical> Protein Recovery.
- Mills, J. H., Thompson, L. F., Mueller, C., Waickman, A. T., Jalkanen, S., Niemela, J., Airas, L. & Bynoe, M. S. (2008). CD73 is required for efficient entry of lymphocytes into the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (27): 9325-30.
- Min, S. W., Chang, W. P. & Sudhof, T. C. (2007). E-Syts, a family of membranous Ca²⁺-sensor proteins with multiple C2 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (10): 3823-8.
- NAAF. (2009). *Eksem*. Tilgjengelig fra: http://www.naaf.no/no/Fakta/Eksem/Viktig_a_vite_om_eksem/ (lest 05.03.2010).
- Nacu, N., Luzina, I. G., Highsmith, K., Lockett, V., Pochetuh, K., Cooper, Z. A., Gillmeister, M. P., Todd, N. W. & Atamas, S. P. (2008). Macrophages produce TGF-beta-induced (beta-ig-h3) following ingestion of apoptotic cells and regulate MMP14 levels and collagen turnover in fibroblasts. *J Immunol*, 180 (7): 5036-44.
- NCBI. (2010). *Basic Local Alignment Search Tool*. Tilgjengelig fra: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> (lest 13.04.2010).
- Nhi.no. (2002). *Astma, hva skjer i kroppen?*: Norsk helseinformatikk. Tilgjengelig fra: <http://nhi.no/sykdommer/lunger/astma/astma-hva-skjer-i-kroppen-6472.html>.
- Nystad, W. (1999). Astma. *Norsk Epidemiologi*.
- Oliveiros, J. C. (2007). *VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams*. Tilgjengelig fra: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> (lest 23.02.2010).
- Olland, A. M., Strand, J., Presman, E., Czerwinski, R., Joseph-McCarthy, D., Krykbaev, R., Schlingmann, G., Chopra, R., Lin, L., Fleming, M., et al. (2009). Triad of polar residues implicated in pH specificity of acidic mammalian chitinase. *Protein Sci*, 18 (3): 569-78.
- Olman, M. A. (2003). Epithelial cell modulation of airway fibrosis in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 28 (2): 125-8.
- Omega, B.-T. (2009). *E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I and Mini Kit II Table of Contents*. Tilgjengelig fra: <http://www.omegabiotek.com/files/resource/Handbook/85674700.pdf>.
- Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A. & Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 1 (5): 376-86.
- Ong, S. E. & Mann, M. (2005). Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat Chem Biol*, 1 (5): 252-62.
- Ong, S. E. & Mann, M. (2006). A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat Protoc*, 1 (6): 2650-60.
- Overdijk, B. & Van Steijn, G. J. (1994). Human serum contains a chitinase: identification of an enzyme, formerly described as 4-methylumbelliferyl-tetra-N-acetylchitotetraoside hydrolase (MU-TACT hydrolase). *Glycobiology*, 4 (6): 797-803.
- Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L. & Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (25): 13766-71.

- Pace, R. A., Peat, R. A., Baker, N. L., Zamurs, L., Morgelin, M., Irving, M., Adams, N. E., Bateman, J. F., Mowat, D., Smith, N. J., et al. (2008). Collagen VI glycine mutations: perturbed assembly and a spectrum of clinical severity. *Ann Neurol*, 64 (3): 294-303.
- Pedersen, C. B., Kolvraa, S., Kolvraa, A., Stenbroen, V., Kjeldsen, M., Ensenauer, R., Tein, I., Matern, D., Rinaldo, P., Vianey-Saban, C., et al. (2008). The ACADS gene variation spectrum in 114 patients with short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency is dominated by missense variations leading to protein misfolding at the cellular level. *Hum Genet*, 124 (1): 43-56.
- Pierce. (2004). *Acetone precipitation of proteins*. 2 s.
- Pierce, T. S. (2007). *Thermo Scientific Pierce® High-Performance Dialysis and Desalting Technical Handbook*. 26 s.
- Promega. (2009). *Sequencing Grade Modified Trypsin, Frozen*. 2 s.
- Rackham, O., Davies, S. M., Shearwood, A. M., Hamilton, K. L., Whelan, J. & Filipovska, A. (2009). Pentatricopeptide repeat domain protein 1 lowers the levels of mitochondrial leucine tRNAs in cells. *Nucleic Acids Res*, 37 (17): 5859-67.
- Ran, Y., Hu, H., Hu, D., Zhou, Z., Sun, Y., Yu, L., Sun, L., Pan, J., Liu, J., Liu, T., et al. (2008). Derlin-1 is overexpressed on the tumor cell surface and enables antibody-mediated tumor targeting therapy. *Clin Cancer Res*, 14 (20): 6538-45.
- Rappsilber, J., Ishihama, Y. & Mann, M. (2003). Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal Chem*, 75 (3): 663-70.
- Reddel, R. R., Ke, Y., Gerwin, B. I., McMenamin, M. G., Lechner, J. F., Su, R. T., Brash, D. E., Park, J. B., Rhim, J. S. & Harris, C. C. (1988). Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res*, 48 (7): 1904-9.
- Renkema, G. H., Boot, R. G., Muijsers, A. O., Donker-Koopman, W. E. & Aerts, J. M. (1995). Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. *J Biol Chem*, 270 (5): 2198-202.
- Rieg, S., Steffen, H., Seeber, S., Humeny, A., Kalbacher, H., Dietz, K., Garbe, C. & Schittek, B. (2005). Deficiency of dermcidin-derived antimicrobial peptides in sweat of patients with atopic dermatitis correlates with an impaired innate defense of human skin in vivo. *J Immunol*, 174 (12): 8003-10.
- Ronimus, R. S. & Morgan, H. W. (2004). Cloning and biochemical characterization of a novel mouse ADP-dependent glucokinase. *Biochem Biophys Res Commun*, 315 (3): 652-8.
- Rosenblad, M. A., Gorodkin, J., Knudsen, B., Zwieb, C. & Samuelsson, T. (2003). SRPDB: Signal Recognition Particle Database. *Nucleic Acids Res*, 31 (1): 363-4.
- Sahin-Toth, M. (2005). Human mesotrypsin defies natural trypsin inhibitors: from passive resistance to active destruction. *Protein Pept Lett*, 12 (5): 457-64.
- Sarray, S., Siret, C., Lehmann, M., Marrakchi, N., Luis, J., El Ayeb, M. & Andre, F. (2009). Lebectin increases N-cadherin-mediated adhesion through PI3K/AKT pathway. *Cancer Lett*, 285 (2): 174-81.
- Sauer, G., Korner, R., Hanisch, A., Ries, A., Nigg, E. A. & Sillje, H. H. (2005). Proteome analysis of the human mitotic spindle. *Mol Cell Proteomics*, 4 (1): 35-43.
- Schmidt, F., Strozynski, M., Salus, S. S., Nilsen, H. & Thiede, B. (2007). Rapid determination of amino acid incorporation by stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC). *Rapid Commun Mass Spectrom*, 21 (23): 3919-26.
- Scigelova, M. & Makarov, A. (2006). Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics. *Proteomics*, 6 Suppl 2: 16-21.

- Seibold, M. A., Reese, T. A., Choudhry, S., Salam, M. T., Beckman, K., Eng, C., Atakilit, A., Meade, K., Lenoir, M., Watson, H. G., et al. (2009). Differential enzymatic activity of common haplotypic versions of the human acidic Mammalian chitinase protein. *J Biol Chem*, 284 (29): 19650-8.
- Shuhui, L., Mok, Y. K. & Wong, W. S. (2009). Role of mammalian chitinases in asthma. *Int Arch Allergy Immunol*, 149 (4): 369-77.
- Song, C., Luo, L., Lei, Z., Li, B., Liang, Z., Liu, G., Li, D., Zhang, G., Huang, B. & Feng, Z. H. (2008). IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma. *J Immunol*, 181 (9): 6117-24.
- Stewart, G. D., Skipworth, R. J., Pennington, C. J., Lowrie, A. G., Deans, D. A., Edwards, D. R., Habib, F. K., Riddick, A. C., Fearon, K. C. & Ross, J. A. (2008). Variation in dermcidin expression in a range of primary human tumours and in hypoxic/oxidatively stressed human cell lines. *Br J Cancer*, 99 (1): 126-32.
- Stratagene. (2005). *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual*. 18 s.
- STRING. (2010). *Automated Textmining: challenges and pitfalls*. Tilgjengelig fra: http://string-db.org/newstring.cgi/show_help_topic.pl?UserId=jUDtavpvfnAO&sessionId=pWzGoIOuCpUJ&topic=textmining_pitfalls (lest 15.04.2010).
- Suzuki, M., Hao, C., Takahashi, T., Shigematsu, H., Shivapurkar, N., Sathyanarayana, U. G., Iizasa, T., Fujisawa, T., Hiroshima, K. & Gazdar, A. F. (2005). Aberrant methylation of SPARC in human lung cancers. *Br J Cancer*, 92 (5): 942-8.
- Tada, H., Ogushi, F., Tani, K., Nishioka, Y., Miyata, J. Y., Sato, K., Asano, T. & Sone, S. (2003). Increased binding and chemotactic capacities of PDGF-BB on fibroblasts in radiation pneumonitis. *Radiat Res*, 159 (6): 805-11.
- Tein, I., Elpeleg, O., Ben-Zeev, B., Korman, S. H., Lossos, A., Lev, D., Lerman-Sagie, T., Leshinsky-Silver, E., Vockley, J., Berry, G. T., et al. (2008). Short-chain acyl-CoA dehydrogenase gene mutation (c.319C>T) presents with clinical heterogeneity and is candidate founder mutation in individuals of Ashkenazi Jewish origin. *Mol Genet Metab*, 93 (2): 179-89.
- Therien, A. G., Bernier, V., Weicker, S., Tawa, P., Falgoutyret, J. P., Mathieu, M. C., Honsberger, J., Pomerleau, V., Robichaud, A., Stocco, R., et al. (2008). Adenovirus IL-13-induced airway disease in mice: a corticosteroid-resistant model of severe asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 39 (1): 26-35.
- Thermo, S. (2010). *Detergents for Cell Lysis and Protein Solubilization*. Tilgjengelig fra: <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=5558F7E4-5056-8A76-4E55-4F3977738B63>.
- Tonikian, R., Zhang, Y., Sazinsky, S. L., Currell, B., Yeh, J. H., Reva, B., Held, H. A., Appleton, B. A., Evangelista, M., Wu, Y., et al. (2008). A specificity map for the PDZ domain family. *PLoS Biol*, 6 (9): e239.
- Tsujimoto, M., Goto, Y., Maruyama, M. & Hattori, A. (2008). Biochemical and enzymatic properties of the M1 family of aminopeptidases involved in the regulation of blood pressure. *Heart Fail Rev*, 13 (3): 285-91.
- UniProt. (2010). Tilgjengelig fra: <http://www.uniprot.org/> (lest 10.03.2010).
- Vaaje-Kolstad, G. (2010). *Muntlig samtale*. Ås (15.04.2010).
- van Eijk, M., van Roomen, C. P., Renkema, G. H., Bussink, A. P., Andrews, L., Blommaart, E. F., Sugar, A., Verhoeven, A. J., Boot, R. G. & Aerts, J. M. (2005). Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity. *Int Immunol*, 17 (11): 1505-12.
- Vanderheyden, P. M. (2009). From angiotensin IV binding site to AT4 receptor. *Mol Cell Endocrinol*, 302 (2): 159-66.

- Visser, J. L., van Esch, B. C., Hofman, G. A. & van Oosterhout, A. J. (2005). Macrophages induce an allergen-specific and long-term suppression in a mouse asthma model. *Eur Respir J*, 26 (6): 1040-6.
- Volmer, J. B., Thompson, L. F. & Blackburn, M. R. (2006). Ecto-5'-nucleotidase (CD73)-mediated adenosine production is tissue protective in a model of bleomycin-induced lung injury. *J Immunol*, 176 (7): 4449-58.
- Walker, S. C. & Engelke, D. R. (2008). A protein-only RNase P in human mitochondria. *Cell*, 135 (3): 412-4.
- Wower, I. K., Wower, J. & Zimmermann, R. A. (1998). Ribosomal protein L27 participates in both 50 S subunit assembly and the peptidyl transferase reaction. *J Biol Chem*, 273 (31): 19847-52.
- Wynn, T. A. (2003). IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol*, 21: 425-56.
- Ye, Y., Shibata, Y., Kikkert, M., van Voorden, S., Wiertz, E. & Rapoport, T. A. (2005). Inaugural Article: Recruitment of the p97 ATPase and ubiquitin ligases to the site of retrotranslocation at the endoplasmic reticulum membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (40): 14132-8.
- Yoo, J. H., Kim, E., Kim, J. & Cho, H. S. (2007). Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the fourth FAS1 domain of human BigH3. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 63 (Pt 10): 893-5.
- Zakariassen, H., Aam, B. B., Horn, S. J., Varum, K. M., Sorlie, M. & Eijsink, V. G. (2009). Aromatic residues in the catalytic center of chitinase A from *Serratia marcescens* affect processivity, enzyme activity, and biomass converting efficiency. *J Biol Chem*, 284 (16): 10610-7.
- Zhang, D. H., Yang, L., Cohn, L., Parkyn, L., Homer, R., Ray, P. & Ray, A. (1999). Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3. *Immunity*, 11 (4): 473-82.
- Zhang, Y., Wen, G., Shao, G., Wang, C., Lin, C., Fang, H., Balajee, A. S., Bhagat, G., Hei, T. K. & Zhao, Y. (2009). TGFBI deficiency predisposes mice to spontaneous tumor development. *Cancer Res*, 69 (1): 37-44.
- Zhu, Z., Homer, R. J., Wang, Z., Chen, Q., Geba, G. P., Wang, J., Zhang, Y. & Elias, J. A. (1999). Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest*, 103 (6): 779-88.
- Zhu, Z., Zheng, T., Homer, R. J., Kim, Y. K., Chen, N. Y., Cohn, L., Hamid, Q. & Elias, J. A. (2004). Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science*, 304 (5677): 1678-82.
- Zieker, D., Konigsrainer, I., Tritschler, I., Loffler, M., Beckert, S., Traub, F., Nieselt, K., Buhler, S., Weller, M., Gaedcke, J., et al. Phosphoglycerate kinase 1 a promoting enzyme for peritoneal dissemination in gastric cancer. *Int J Cancer*, 126 (6): 1513-20.

8 APPENDIKS

Tabell 8.1: Nukleotidsekvensen til AMCase. Områdene som har blitt mutert er uthevet.

atggctactaaattgattttacttactggtttggactgatccttaatttgcaactaggttcagcctatcaattaacatgtattttactaactggg
 ctcaatacagaccaggattgggtagattcatgcctgacaatatagatccatgcttgtgtaccacttgatctatgcttttctggttagacaaa
 ataataaatcactacaattgagtggaatgatgtaactctgtaccaggtttcaatggactgaaaaacaagaactcacaactaaagacatt
 gcttgaattggaggtt**ggaactttggaactgctccttt**acagctatggtagtacaccagaaaatagacaaacttctacttcagttatt
 aagttccttagacaatatgaatttgatggcctagactttgact**gggaat**atccaggctctagaggttcacccctcaagacaagcatttgtt
 cactgtattagtacaagagatgagagaagcttttgaacaggaggcaagcaattaacaaaccaagattgatggttactgctgcagtag
 cagcaggtatataatattcaatctgggtatgaaattcccaattgagfcaacttggattacatccatgtgatgacctatgacctacatgg
 tagctgggagggatatactggagaaaatagtcattatacaagtatcctactgatacaggttcaaatgcctacttaaatgtagattatggtat
 gaattattggaaagataatggtgctccagctgaaaagctgattgltggtttccacttatggtcacaatfttctctgagtaatcctccaaca
 caggtattggtgccctacctctggagcaggaccagcaggtccatatgccaaggaatctggaatatggcctactatgaaatctgacttt
 cttgaagaatggtgctaccagggttgggatgctcctcaggaagtgccctatgcctatcaaggtaatglttgggttgggtatgacaacatta
 aatctttgatattaaggcccaatggttgaagcacaataagtttgggtggagcaatggttgggctattgatcttgatatttacaggtacatt
 ctgcaatcaaggaaaattccctctaataatctactttgaagaaggcacttggtttacagtctgctagtgtgcacagctcctgctcagcctattga
 acctactgcagcaccctcaggatcaggtaatggatcaggttcatcctctggtggttctctggtggatctggttctgtgctggttag
 agccaatggtttataccagttgctaataataggaatgcttttggcactgtgtcaatggagttactaccaacaaaattgccaggctggttt
 ggtatttgatacctcatgtattgttgaactgggcctaatgacgaattctgca

Tabell 8.2: Aminosyresekvensen til AMCase. Det konserverte aktive setet til glykosyl
 hydrolaser (DXXDXDXE) vises i uthevet skrift.

MATKLILLTGLVLILNLQLGSA YQLTCYFTNWAQYRPGLGRFMPDNIDPCLCTHLLIYA
 FAGRQNNEITTIEWNDVTLYQAFNGLKNKNSQLKTLAIGGWNFGTAPFTAMVSTPE
 NRQTFITSVIKFLRQYEF**DGLDFDWE**YPGSRGSPQDKHLFTVLVQEMREAFEQEAK
 QINKPRLMVTAAVAAGISNIQSGYEIPQLSQYLDYIHVMTYDLHGWSWEGYTGENSPL
 YKYPTDTGSNAYLNVDMNYWKDNGAPAEKLIVGFPTYGHNFILSNPSNTGIGAPT
 SGAGPAGPYAKESGIWAYYEICTFLKNGATQGWDAPEVQPYAYQGNVWVGYDNIK
 SFDIKAQWLKHNKFGGAMVWAIDLDDFTGTFCNQGKFPLISTLKKALGLQASACTAP
 AQPIEPITAAPSGSGNGSGSSSSGGSSGGSGFCAVRANGLYPVANNRNAFWHCVNGV
 TYQQNCQAGLVFDTSCDCCNWA—RIL

Tabell 8.3: Nukleotidsekvensen til pPIC9K-vektoren med AMCase-genet inkorporert.

AMCase vises i uthevet skrift.

agatctaacaatccaaagacgaaaggttgaatgaaaccttttgcacatccgacatccacaggtccattctcacacataagtgccaaacgca
 acaggaggggafacactagcagcagaccggtgcaaacgcaggaccctccactcctctctcctcaacaccacttttgccatcgaaaaac
 cagcccagttattgggcttgattggagctcgcctcaattcctctctctctctctctcaacaccacttttgccatcgaaaaac
 ccccctggcgagggttcatgtttgtttatccgaatgaacaagctccgcattacaccgaacatcactccagatgagggcttctgagtgt
 ggggtcaaatagtttcatgttccccaaatggcccaaaaactgacagtttaaacgctgtcttgaacctaataatgacaaaaagcgtgatctcat
 ccaagatgaactaagtttggttcgttgaatgtaacggccagttggtaaaaaagaaacttccaaaagtcgccataaccgtttgcttgtttg
 gtattgattgacgaatgctcaaaaataatctcattaatgcttagcgcagctctctctctctgaacccccgggtgcacctgtgccgaaacg
 caaatggggaaacaccctgttttggatgattatgcttccacattgatgcttccaagattctgggggaatactgctgatagcctaa
 cgttcatgatcaaaatftaactgttctaaccctacttgacagcaatataaaacagaaggaagctgccctgtcttaacctttttttatcatc
 attattagcttacttccataatgctgactggttccaattgacaagctttgattfaacgacttttaacgacaacttgagaagatcaaaaaaca
 ctaattattcgaaggatccaaacgatgagatttcttcaattttactgcagttttattcgcagcatcctccgattagctgctccagtcaca
 ctacaacagaagatgaaacggcacaatccggctgaagctgtcatcggttactcagatttagaaggggatttcgatgttctgttttgc
 atttccaacagcacaataacgggttattgtttataataactactattgccagcattgctgctaaagaagaaggggtatctctcgagaaaa
 gagaggctgaagcttacgtagaattctagcggccgccaccatggctactaaattgattttacttactggtttggfactgatccttaattt
gcaactaggttcagcctatcaattaacatgttattttactaactgggctcaatacagaccaggattgggttagattcatgcctgac
aatatagatccatgcttgtgtaccacttgatctatgcttttctggttagacaaaataatgaaatcactacaattgagtggaatga
tgtaactctgtaccaggcttcaatggactgaaaaacaagaactcacaactaaagacattgcttgaattggagggttggaaacttt
ggaactgctccttttacagctatggttagtacaccagaaaatagacaaacttctacttcaagtattaagttccttagacaat
gaatttgatggcctagactttgactgggaatatccaggctctagaggttccccctcaagacaagcatttggctactgtattagt
acaagagatgagagaagcttttgaacaggaggcaagcaaatcaaaaccaagattgatggttactgctgcagtagcagca
ggtatatctaataatcaatctggttatgaaatcccccaattgagcaataacttggattacatccatgtgatgacctatgacctacat
ggtagctgggaggatatactggagaaaatagtcattatacaagatacctactgatacaggttcaaatgctacttaaatgta
gattatgttatgaattattggaaagataatggtgctccagctgaaaagctgattgttggtttcccccttatggtcacaattttatc
tgagtaatcctccaacacaggtattggtgcccctacctctggagcaggaccagcaggtccatgccaaggaatctggaatat
gggcttactatgaaatctgactttcttgaagaatggtgctaccaggggtgggatgctcctcaggaagtgccttatgctatcaa
ggtaatgtttgggttgggtatgacaacattaaatcttttgatattaaggcccaatggttgaagcacaataagtttggaggcaat
ggtttgggctattgatcttgatgttttacaggtacattctgcaatcaaggaaaattcccccttaatatctactttgaagaaggcact
tgttttacagtctgctagttgacagctctgctcagcctattgaacctatcactgcagcaccctcaggatcaggtaatggatca
ggtcatcatcctctgggttctctggtggatctggtttctgtgctggttagagccaatggtttataaccagttgctaataatagga
atgcttttggcactgtgcaatggagttacttaccacaacaaattgccaggctgggttggattttgatacctcatgtgattgttga
ctgggcttaatgacgaattccctaggcggccgcgaattaatgccttagacatgactgttctcagttcaagttgggcacttacgag
 aagaccggtcttctagattctaataagaggatgctagaatgccatttgcctgagagatgcaggctcattttgatactttttatttgaac
 ctatatagtaggattttttgtcattttgttctctctctctgtagccttgcctgtagcctatctcgcagctgatgaatatcttggtagg
 ggttgggaaaatcattcgatttgatgttttcttggatttccactcctctcagagtacagaagattaagtgagaagttcgtttgtgcaag
 ctatcgataagcttaatgcggtagttatcacagttaaattgctaacgcagtcaggcaccgtgatgaaatcaacaatgcgctcatcgtc
 atcctcggcaccgtcacctggatgctgtagcatagccttggttatgccggtactgccgggctcttgcgggatatctccattccgac
 agcatcggcagtcactatggcgtgctgtagcctatgctgttgaatctatgcgacccgttctcggagcactgtccgaccgt
 ttggccgccagctctgctcgttctgctacttggagccactatcactacgcgatcatggcgaccacaccgtcctgtgatctatc
 gaatctaataatgtaagttaaataatcttaataaataagtcaccagtttccatacgaaccttaacagcattgcggtgagcatctagacct
 tcaacagcagccagatccatcactgcttggccaatatgtttcagtcctcaggagttactgttgaagtgatgaactctggaaggttgc
 agtgttaactccgctgattgacgggcatatccgtacgttggcaagtgtggttggtagcggaggagtaatctccacaactctctggaga
 gtaggccaacaaacacagatccagcgtgttactgatcaacataagaagaagcattctcgattgcaggatcaaggttcaggag
 cgtactgattggacatttccaaagcctgctcgtaggttgaaccgataggggttagaggtgcaatacactgcgtacaatttcaaccctt
 ggcaactgcacagcttgggtgtaacagcatcttaattctggcaagctccttctctcctatcgcagccaacagaatcacctgggaat

caataccatgttcagcttgagacagaaggctctgaggcaacgaaatctggatcagcgtatttatcagcaataactagaacttcagaaggcc
 cagcagggcatgtcaatactacacagggctgatgtcattttgaaccatcatcttggcagcagtaacgaactggttctcgaccaaaat
 tttgtcacacttaggaacagtttctgtccgtaagccatagcagctactgctgggcgctcctgctagcacgatacacttagcaccaacc
 ttgtgggcaacgtagatgacttctggggtaagggtaccatccttcttaggtggagatgcaaaaacaatttcttgaaccagcaactttgg
 caggaacaccagcagcaggggaagtgggaaggcagaattgcgggtccaccaggaatatagaggccaactttctcaataggtcttgc
 acgagagcagactacaccagggcaagctcaacttgaacgtctccggttaggtgagcttcatggaatttctgacgttatctatagagaga
 tcaatggctcttfaacgttatctggcaattgcataagtctccttgggaaaggagcttcaacacaggtgcttcaaacgcgactccatcaa
 cttggcagttagtctaaaagggttgcaccatttgacgaacattgctgacaattggttgactaattccaataatctgtccggtttctggat
 aggacgacgaagggtcatttctgtgaggaggccttagaaacgtcaattttgcacaattcaatagaccttcagaagggacttct
 ttagggttggattcttcttaggttctccttgggtatcctgcttggcatctccttctcttagtgacctttagggacttcatatccaggttct
 ctccacctgccaacgacaccgacttggcaccatctaactaatgcaaaaataaagtacgcacattcccaggctatcttcttgg
 atttagcttctgcaagttcagcttctcctcaattttagcgttcaacaaaacttctgctgcaataaccggttggataagaaccttctgga
 gcaattgcttctacgatcccacaagggtggcttccatggctcaagacctttgattggccaaaacaggaagtgcgttccaagtacagaaa
 ccaacacctgttgttcaaccacaaatttcaagcagctccatcacaatccaattcgataccagcaacttttgagttgctccagatgtagc
 accttataccacaaaccgtgacgacgagattggtagactccagtttgtgctctatagcctccggaatagactttttggacgagtacacca
 ggcccaacgagtaattagaagagtcagccaccaagtagtgaatagaccatcggggcggctagtagtcaagacgccaacaaaattt
 cactgacagggaaacttttgacatctcagaaagttcgtattcagtagtcaattgccgagcatcaataatggggattataaccagaagcaac
 agtggaaagtcacatctaccaactttgcggctcagaaaaagcataaacagtttactaccgccattagtgaacttttcaaatcggccagt
 ggagaagaaaaaggcagcagactagcattagcgggcaaggatgcaactttatcaaccagggctctatagataaccttagcgcct
 gggatcactccttggacaacttttgcgcaaatctaggtcgaatacacttcaattgataccattattgtacaacttgagcaagttgctgatca
 gctcctcaaatggctcctctgtaacggatgactcaacttgcacattactgaagctcagtcgattgagtgacttgatcagggttgcagc
 tggtcagcagcatagggaaacacggcttctaccacaaactcaaggaaatcaaaccttgcacacttgcgtatgacgtagcaaggg
 aatgctacttgaagtcggacagtgagtgtagctttagaaattctgaagccgtattttattatcagtgagtcagtcacagagatcct
 ctacgccggacgcatcgtggccgacctgcaggggggggggggggctgaggcttgcctcgtgaagaagggtgtgctgactcaacc
 aggcctgaatcggccatcatccagccagaagtgaggagccaggtttagtagagcttggtaggtggaccagttggtgattttg
 aacttttgccttggcaggaacggctcgttgcgggagatgctgtagcttcaactcagcaaaagttcgatttattcaacaag
 ccgccgtcccgtcaagtcagcgtaatgctctgccagtgtacaaccaattaaccaattctgattagaaaaactcagcagcatcaaatgaa
 actgcaatttattcatatcaggattatcaataccatattttgaaaaagccgttctgtaatgaaggagaaaactcaccgaggcagttccata
 ggatggcaagatcctggatcggctcgcattccgactgtccaacatcaatacaacctattaatttcccctcgtcaaaaataagggtatca
 agtgagaaatcaccatgagtgacgactgaatccgggtgagaatggcaaaagcttatgacttcttccagacttgttcaacagggccagcca
 ttacgctcgtcatcaaaatcactcgcacacaaaccgttattcattcgtgattgcgcctgagcagacgaaatcgcgacgctgttaa
 aaggacaattacaacaggaatcgaatgcaaccggcgcaggaacactgccagcgcacatacaaatatttccactgaaatcaggatattct
 tctaatactggaaatgctgtttcccggggtcgcagtggtgagtaaccatgcatatcaggagtagcggataaaatgctttaggtcggg
 agaggcataaattccgctcagccagtttagctgaccatctcatctgtaacatcattggcaacgctaccttggcatgttccagaacaactc
 ggcgcatcgggcttccatacaatcagatagttgctgcacctgattgccgacattatcgcgagcccatttataccatataaatcagcat
 ccatgttgaatttaacgcggcctcagcaagacgttcccgttgaataggctcataacacccttcttactgtttatgtaagcagaca
 gttttattgtcatgatgatataattttatcttgtgcaatgtaacatcagagattttgagacacaacgtggcttccccccccccccctgcaggtc
 ggcatcaccggcggccaggtgcgggttctggcgcctatcggcgacatcaccgatgggggaagatcgggctcggcacttccgggctc
 atgagcgttgtttcggcgtgggtatggtggcaggccccgtggccgggggactgttgggcgccatccttgcacaccattccttgc
 ggcggcgggtgctcaacggcctcaacctactctgggctgcttccatgacaggagtcgcataaggagagcgtcagatctatgattg
 gaagtatgggaatggtgatacccgaattctcagtgctttaggtctcctatcagattatgcccaactaaagcaaccggaggaggagatt
 catggtaaatttctgacttttggctatcagtagactcgaactgtgagactatctcggttatgacagcagaaatgtccttcttggagacagt
 aaatgaagtcaccacaataaagaatccttgtatcaggaacaaacttcttcttgaactttttcggcttgaactataaaatgtagagt
 ggatgctcgggttaggaatggagcgggcaaatgcttacccttggaccttcaagaggtatgtaggggtttagatactgatccaactt
 agtgacaacgttctatcttcaaacattccgaatccagagaatcaagttgttctactattgatccaagccagtgcggcttga
 actgacaatagtgctcgtgtttgaggtcatcttctgatgataaatctagtcttctgataaataatcttgcagcagcaagggcagataaata
 cccaaatcaaaactctttaaactgttaaaggacaagtagtctgctgattaaaccccaatcagctcgtagctgacccatcaact
 tgaggggcactatcttgttttagagaaatttgcggagatgcgatacgcagaaaaagggtacgctgattttaaactgaaatttctcaagat
 ctctgctcgcgcttccgtgatgacgggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttctgtgtaagcggatgc
 cgggagcagacaagcccgtcagggcgcgctcagcgggtgttggcgggtgctggggcgcagccatgaccagtcacgtagcagatag

cggagtgtatactggcttaactatcgggcatcagagcagattgactgagagtgcaccatatcggtgtgaaataccgcacagatgcgt
 aaggagaaaataccgcatcagggcgtctccgctcctcgtcactgactcgtcgcgctcggctggtcggcgagcggatca
 gctcactcaaaggcggaatacggftatccacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggc
 caggaaccgtaaaaagccgctggtgctggcgttttccataggtccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcag
 aggtggcgaaacccgacaggactataaagataaccagggctttccccctggaagctccctcgtcgcctcctcgttcgacctgccgt
 taccggatacctgtccgcttttcccttcgggaagcgtggcgtttctcaatgctcagcgtgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttc
 gctccaagctgggtgtgtgcacgaacccccgttcagcccaccgctgcgcttatccgtaactatcgtcttgagtccaaccggta
 agacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcgggtgctacagagttctgaagt
 ggtggcctaactacggctacactagaaggacagtttggatctcgtcgtctgctgaagccagttacctcggaaaaagagttgtagct
 cttgatccggcaaaacaaaccaccgctggtagcgggtggtttttgttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaa
 gatcctttgatcttttctacggggctgacgctcagtggaacgaaaactcacgtaagggattttggtcatgagattatcaaaaggatctc
 acctagatccttttaaaftaaaaatgaagtttaatacaatctaaagtatatatgagtaaaacttggtcgtgacagttaccaatgcttaacgtga
 ggcacctatctcagc gatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggccttaccat
 ctggccccagtgtgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccggaagggcc
 gagcgcagaagtgtcctgcaactttatccgctccatccagcttattaattgttgcgggaagctagagtaagtagttcggcagtttaata
 gtttgcgcaacgttgttccattgtcaggeatcgtggtgacgctcgtcgtttggtagtggcttcaatcagctccggttccaacgatca
 aggcgagttacatgatccccatgttgcaaaaaagcggtagctcctcggctcctccgatcgttgcagaagtaagttggccgagtg
 ttactactatggttatggcagcactgcataattcttactgctatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagt
 cattctgagaatagtgtatcgggcgaccgagttgctcttccccggcgtcaacacgggataataccgcgccacatagcagaacttaaaa
 gtgctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctggtgagatccagttc gatgtaaccactcgtgcac
 ccaactgatcttcagcatctttactttaccagcgtttctgggtgagcaaaaaacaggaaggcaaatgccgcaaaaaagggaataagg
 gcgacacggaaatgtgaataactatactcttcttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatattgaa
 tgtatttagaaaaataaacaatataggggtccgcgcacatttccccgaaaagtccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacatt
 aacctataaaaatagggctatcacgagggcccttcgtctcaagaatfaattctcatgtttgacagcttatcatcgataagctgactcatgtt
 gtattgtgaaatagacgcagatcgggaacactgaaaaataacagttattattcg