



Funktionella och strukturella studier av
kollagenbindande $\alpha 1$ och $\alpha 2$ integrin I-domäner

Pro gradu-avhandling

NaK Niklas Salo

40688-403-2015

nsalo@abo.fi

Utbildningsprogrammet i biokemi,
Fakulteten för naturvetenskaper och teknik,
Åbo Akademi
2021

Handledare:

Professor Tiina A. Salminen, Åbo Akademi

Docent Jarmo Käpylä, Åbo Universitet

Sammandrag

Integriner är heterodimera proteiner som består av en α -underenhet och en β -underenhet. De medverkar i cell-cell- samt cell-extracellulära matrixinteraktioner och har viktiga roller vid flera olika sjukdomar, såsom cancer, autoimmuna sjukdomar och infektioner. Det kollagenbindande integriner är avgörande för bindvävsmodelleringar, såsom sårhäkning, där de återställer samt organiserar vävnadsstrukturen. Kollagenbindande och leukocytintegriner har en I-domän som innehåller ett MIDAS-motiv, till vilket ligander binder till, dessa integriner är $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$ och $\alpha 11\beta 1$. Kollagenbindande integrinet $\alpha 3\beta 1$ har ingen I-domän, utan använder sig av en NC1-domän.

Målet med detta projekt var att forska funktionen och strukturen hos kollagenbindande $\alpha 1$ och $\alpha 2$ integrin I-domänerna. Integrin $\alpha 1\beta 1$ och $\alpha 2\beta 1$ föredrar att binda till olika kollagener, icke-fibrillärt kollagen IV och kollagen I. Ligandbindning till α I-domänen bryter saltbryggan mellan R287 och E317, vilket orsakar en stor konformationsförändring som öppnar α I-domänen, vilket möjliggör bindningen.

Därför är projektets hypotes att bindningsstyrkan för $\alpha 1$ I-E317A, $\alpha 1$ I-R287A, $\alpha 2$ I-E318A och $\alpha 2$ I-R288A mutanter är högre än bindningsstyrkan för vildtyp $\alpha 1$ och $\alpha 2$ I-domänerna. För att undersöka hypotesen användes flera olika metoder i projektet, såsom platsriktad mutagenes, proteinuttryck, proteinrening, bindningsanalys, samt protein-protein-interaktionstudier med olika typer av bindningsstudier för att jämföra bindningsstyrkan till kollagen IV och kollagen I mellan vildtypen och de muterade I-domänerna. Till slut gjordes kristallisering för bestämning av 3D-strukturen hos det muterade $\alpha 1$ I-R287A proteinet och hos $\alpha 1$ I-vildtypen.

Innehållsförteckning

Lista över förkortningar

1 Introduktion	1
1.1 Integrin bindning till kollagen	3
1.2 Signalering	5
1.2.1 Integrin aktivering.....	5
1.2.2 Signaleringskomplexer.....	7
1.3 I-domän	8
1.3.1 Inhibitorer	10
2 Målsättningar	11
3 Metoder	12
3.1 Platsriktad mutagenes.....	12
3.1.1 Klyvning av DPN-I	13
3.1.2 Beredning av kompetenta celler.....	14
3.1.3 Transformation.....	14
3.2 Proteinuttryck	15
3.3 Proteinrening	16
3.3.1 Dialys	16
3.4 Proteinbestämning	17
3.4.1 Bradford-analys.....	17
3.4.2 SDS och nativ gelelektrofores.....	18
3.5 Bindningsanalys.....	19
3.6 Kristallisering	19
4 Material och metoder	20
4.1 Platsriktad mutagenes (PCR).....	20
4.1.1 Klyvning och ligering.....	21
4.1.2 Transformation till DH5 α	21
4.1.3 Plasmidextraktion och sekvensering.....	21
4.2 Transformation till BL21 celler.....	22
4.3 Proteinrening.....	22
4.4 Bindningsstudier.....	23
4.4.1 Proteinbestämning (Bradford).....	23

4.4.2 Bindningsanalys för GST/ α 2I-domän.....	23
4.5 Kristallisering.....	23
5 Resultat	24
5.1 Bindningsanalys.....	24
5.2 Strukturanalys.....	27
5.2.1 Skillnader mellan aktiverad α 1- och öppen α 2-struktur.....	29
6 Diskussion	30
6.1 Bindningsanalys.....	30
6.2 Strukturanalys.....	31
6.3 Kristallisering.....	32
7 Slutord	32
8 Källor	33

Lista över förkortningar

Förkortning	Svenska	Engelska
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat	Arginine-Glycine-Aspartate
TGF- β	Transformerad tillväxtfaktor beta	Transforming growth factor beta
ECM	Extracellulär matris	Extracellular matrix
GFOGER	trippelhelikal sekvens	triple-helical sequence
NC1-domain	Icke-kollagen domän 1	Non-collagenous 1 domain
CD29	Integrin beta-1	
GPVI	Glykoprotein VI	Glycoprotein VI
DDR	Diskodoindomän receptortyrosinkinaser	Discoidin domain receptor family
LAIR-1	Leukocytassocierad immunoglobulinliknande receptor 1	Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1
OSCAR	Osteoklastassocierad immunoglobulinliknande receptor	Osteoclast-associated immunoglobulin-like receptor
GPR56	G-proteinkopplad receptor 56	G protein-coupled receptor 56
Ig	Antikropp	Immunoglobulin
DS	Diskoidin	Discoidin
G-proteiner	Guaninnukleotidbindande proteiner	Guanine nucleotide-binding proteins
FAK	Fokal adhesionskinas	Focal adhesion kinase
Src	Icke-receptortyrosinkinase	Non-receptor tyrosine kinase
GPCR	G-proteinkopplade receptorer	G protein-coupled receptors
GEF	Guaninnukleotidutbytesfaktor	Guanine nucleotide exchange factor
SFK	Src familj kinaser	Src family kinases
MIDAS	Metalberoende adhesionsställe	Metal ion-dependent adhesionsite

AQC2	Aerosoliserad monoclonal antikropp	Aerosolized monoclonal antibody
EMS16	ormgift från <i>Echis multiquamatus</i>	
PCR	Polymeraskedjereaktion	Polymerase chain reaction
E.coli	<i>Escherichia coli</i>	
Dpn1	<i>Diplococcus pneumoniae</i>	
PDB		Protein Data Bank
CBB		Coomassie brilliant blue
BSA	Bovint serumalbumin	Bovine serum albumin
SDS	Natriumdodecylsulfat	Sodium dodecyl sulphate
NMR	Kärnmagnetisk resonans	Nuclear magnetic resonance

1 Introduktion

Integriner är heterodimeriska proteiner som består av en α -underenhet och en β -underenhet (fig. 1). De finns i nästan varje cell i kroppen och de är celladhesionsmolekyler, som förmedlar cell-cell- samt cell-substrat-interaktioner (Barczyk m.fl., 2010). Integriner är nödvändiga för celltillväxt och cellfunktion. De fungerar som receptorer som förmedlar intracellulära signaler och har en stor roll i flera olika sjukdomar, som till exempel i cancer, trombos, autoimmuna sjukdomar samt infektioner (Brennan m.fl., 2014). Integrinerna kan vara i aktiv öppen eller inaktiv stängd konformation. Öppen konformation har högt affinitet för ligander, medan stängd konformation har låg affinitet. Dessa konformationer kan ändras med mutationer vid vissa integriner (Takagi och Springer, 2002). Ligand-bindningen till α I-domänen öppnar domänen och leder till förändringar, t.ex. α C-helix och helix 7 ändrar på sina positioner samt MIDAS-motivet ändrar på sig (Lahti m.fl., 2011).

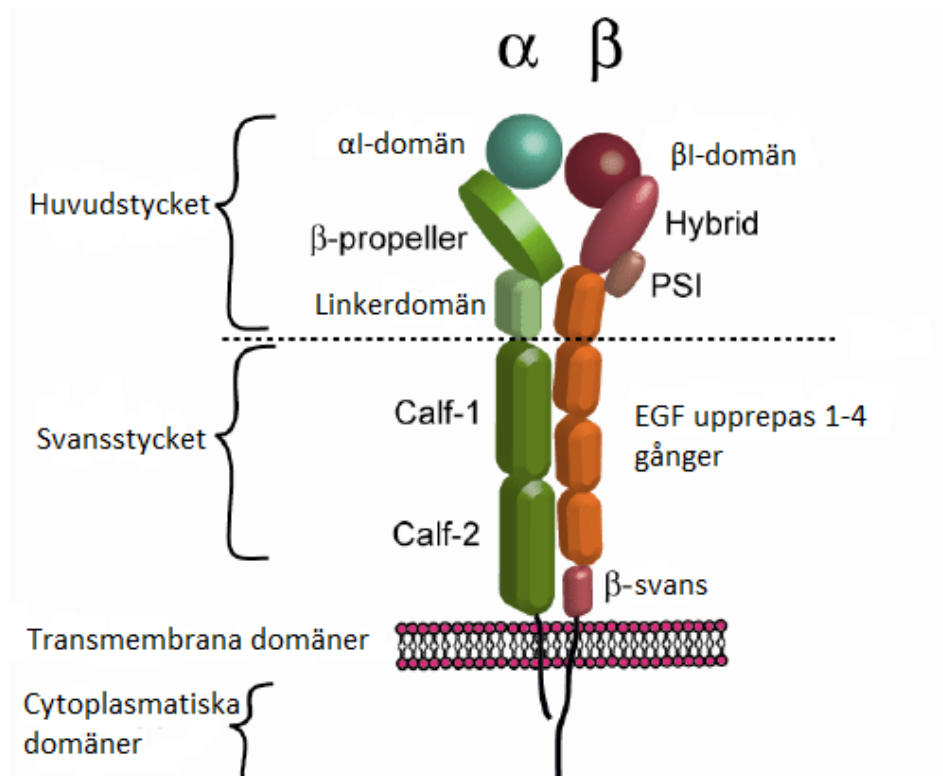


Fig. 1 Integriners struktur. Integrinet innehåller en α - samt β -enhet och delas i huvudstycket, svansstycket samt cytoplasmatiska domänet. Huvudstycket och svansstycket innehåller flera olika underenheter som t.ex. α I-domän samt β I-domän. (Nevo, 2021).

Det finns åtta olika β -underenheter och arton olika α -underenheter, som kan bilda tjugofyra olika integrinreceptorer (fig. 2). Eftersom det bara finns åtta β -underenheter, binder en β -underenhet till flera än en specifik α -underenhet. Integrin fungerar som receptorer till fyra olika proteiner: kollagen, Arg-Gly-Asp (RGD) sekvensen, laminin samt leukocyter (Brennan m.fl., 2014).

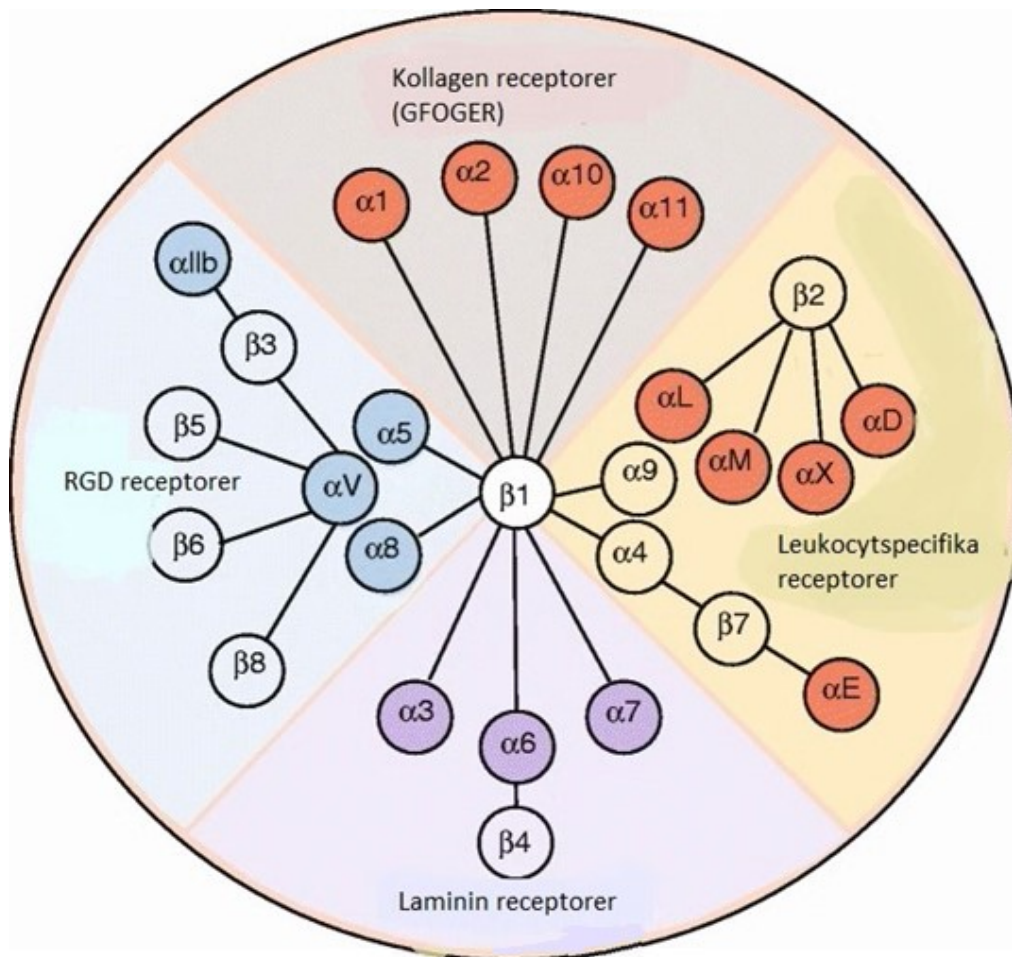


Fig. 2 Presentation av integrinfamiljen. Rygggradsdjuren har 24 heterodimera integriner. Vissa arter som genomgått genduplikation (t.ex. *Danio rerio*) har flera integriner. Mera utvecklade ryggradsdjur, har 24 prototypiska integriner (Barczyk m.fl., 2010).

De integriner, som binder till RGD-sekvensen vid kollagen α kedjan, har studerats mycket eftersom de har en stor betydelse för utvecklingen, angiogenesen och trombosen (Nevo, 2021). De har också en speciell roll vid aktivering av transformerad tillväxtfaktor beta (TGF- β) och fibros. De RGD-bindande integrinerna har använts som modeller för att förstå integrinernas funktioner och aktivering (Barczyk m.fl., 2010). Kollagenbindande integriner tillhör $\beta 1$ integrin underfamiljen (CD29). $\alpha 1\beta 1$,

$\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$ och $\alpha 11\beta 1$ kollagenbindande integriner har studerats mindre eftersom de har begränsade roller i embryonalutvecklingen och möss som saknar kollagenbindande integrin utvecklar milda fenotypproblem. Alla receptorerna känner igen extracellulär matris (ECM) och ligander på olika sätt. Eftersom α -underenheternas cytoplasmiska domäner är olika genererar de också unika inom-cellulära signaler (Heino, 2014). $\alpha 1\beta 1$ och $\alpha 2\beta 1$ integrinerna upptäcktes på aktiverade T-celler och har sedan dess hittats på flera olika celltyper, såsom blodplättar ($\alpha 2\beta 1$), kärlceller ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$), epitelceller ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$) och fibroblaster ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$) (Zeltz m.fl., 2016).

Kollagener är trippelspiralformade strukturella proteiner i ECM. Kollagens underenheter namnges från I till XXVII beroende på när de upptäckts. Vissa kollagener är transmembrana medan största delen bildar stora nätverk av fibriller i källarmembranet. Det har hittats 28 strukturellt och funktionellt olika kollagena underenheter i havssvampar, däggdjur och människor (Heino, 2014).

1.1 Kollagenbindande integriner

Integriner (fig. 3) kan binda till kollagen på två olika sätt: genom indirekt kollagenbindning (protein som linker) och direkt kollagenbindning (utan linker). Kollagenbindande integriner känner igen den tripelhelikala GFOGER-sekvensen i de viktigaste kollagenerna (Barczyk m.fl., 2010). Det finns fem olika integriner $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$ och $\alpha 11\beta 1$ (tabell 1) som binder direkt till kollagen, varav alla förutom $\alpha 3\beta 1$ innehåller I-domän och binds till kollagen IV samt VI med en kollagen NC1-domän (Heino, 2014). I-domänen som finns i α -underenheten kallas för alfa-I-domän (αI -domän), även β -underenheterna innehåller I-domän (βI -domän) (Gullberg och Lundgren-Åkerlund, 2002). $\alpha 1\beta 1$ finns i flera celltyper som till exempel endotelceller, fibroblaster, astrocyter, T-celler, naturliga mördarceller samt makrofager men inte i B-celler, och vid cytokinstimulering ökar uttrycksnivåerna av $\alpha 1\beta 1$ (Lahti m.fl., 2011). $\alpha 2\beta 1$ finns i blodplättar, epiteliala celler och många andra mesenkymala celltyper. Kollagenbindningen av $\alpha 1\beta 1$ och $\alpha 2\beta 1$ leder till olika cellulära funktioner. $\alpha 1\beta 1$ främjar cellproliferation och dämpar kollagensyntes, medan $\alpha 2\beta 1$ inhiberar tillväxt och främjar kollagensyntes (Heino, 2014). $\alpha 10\beta 1$ uttrycks i

kondrocyter, medan $\alpha 11\beta 1$ uttrycks i fibroblaster (Brennan m.fl., 2014). De föreslås ha endast en begränsad roll i vuxen bindvävshomeostas, vilket beror på begränsad tillgång till integrin bindningsställen i de mogna fibrillära kollagenmatriserna. Kollagenbindande integriner är dock mera avgörande för dynamiska vävnadsmodelleringar, som till exempel sårhäkning, där de kan organisera och återställa vävnadsstrukturen.

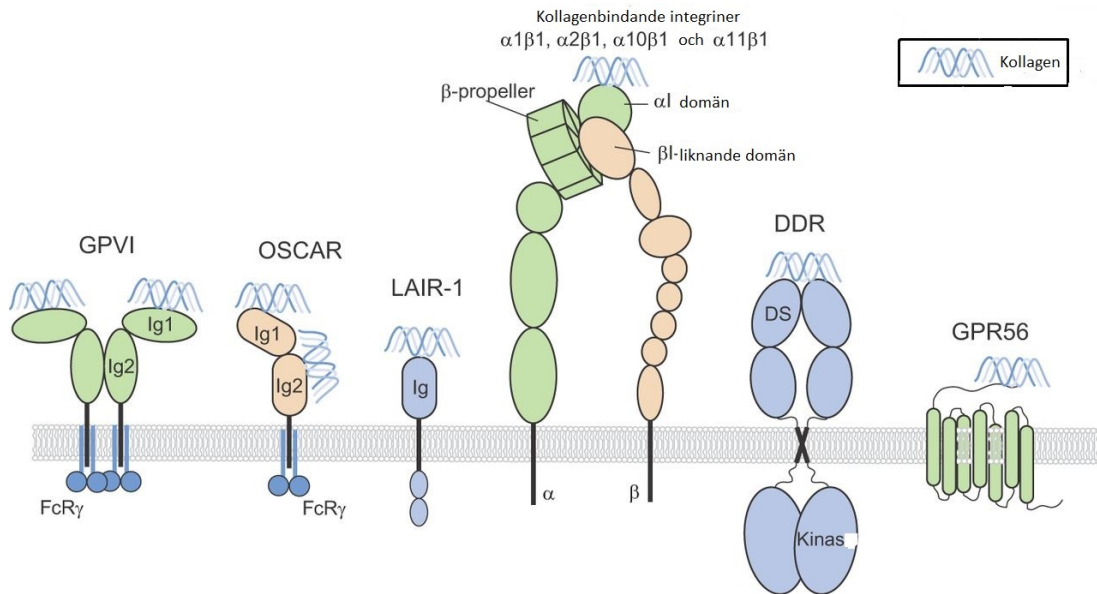


Fig. 3 Kollagenreceptorer. Integriner består av en α - och en β -underenhet. Kollagen binds till α I-domänen. GPVI och OSCAR består av två Ig-ektodomäner och binder med en dimerisk Fc receptor γ kedja vid cytoplasmiska ändan. Kollagen interagerar med Ig1-domänen och i OSCAR på både Ig1- och Ig2-domänen. LAIR-1 interagerar med kollagen genom dess Ig-ektodomän. DDR är homodimeriska kollagena receptorer; kollagen binds genom diskoidin (DS) ektodomän. GPR56 är en G-proteinkopplad receptor som består av sju transmembrana domäner och kollagen interagerar med den långa extracellulära N-terminala regionen av GPR56 (Zeltz m.fl., 2016).

Tabell 1. Kollagenbindande integrinerna.

Namn	I-domän	Uttryck	Funktion
$\alpha 1\beta 1$	Ja	Endotelceller, fibroblaster, astrocyter, T-celler, naturliga mördarceller samt makrofager	Främjar cellproliferation och minskar kollagensyntes
$\alpha 2\beta 1$	Ja	Blodplättar, epiteliala celler och flera mesenkymala celltyper	Inhiberar tillväxt och främjar kollagensyntes
$\alpha 10\beta 1$	Ja	Uttrycks i kondrocyter	
$\alpha 11\beta 1$	Ja	Uttrycks i fibroblaster	

$\alpha 3\beta 1$	Nej	Binder kollagen typ IV och VI genom kollagen NC1 domänen.	
-------------------	-----	---	--

Utöver de kollagenbindande integrinerna finns det andra proteiner som kan binda kollagen. Dessa proteiner är till exempel trombocytglykoprotein VI (GPVI), diskodoindomän receptortyrosinkinaser 1 och 2 (DDR1 och DDR2), leukocytassocierad immunoglobulinliknande (Ig) receptor 1 (LAIR-1), osteoklastassocierad immunoglobulinliknande receptor (OSCAR) och G-proteinkopplad receptor 56 (GPR56, gennamn ADGRG1) (fig.3). Integriner fungerar som mekanolänkar (*eng. mechanolinks*), medan de andra kollagenbindande receptoreorna har mera heterogen funktion och påverkar cellsignaleringen (Zeltz m.fl., 2016).

1.2 Signalering

1.2.1 Integrin aktivering

Mutationer i de viktiga delarna i integrinsignaleringsräckor kan orsaka defekt i organutvecklingen, immunbrist, cancer eller autoimmuna sjukdomar (Lahti, m.fl., 2011). Förståelse av signaleringshändelser, som driver aktiveringen och signaleringen av integriner, är därför avgörande för att avslöja de molekylära mekanismerna för dessa sjukdomar (Zhang, m.fl., 2011). Aktivering av integrin är en viktig mekanism som reglerar integriners funktion i celler genom att ändra på ligandaffiniteten både rumsligt och tidsmässigt. Strukturella och funktionella forskningar har påvisat att integriner har olika ligandaffinitetsformer: låg, mellanliggande och hög (fig. 4). Kristallstrukturer har avslöjat att integrin heterodimerer förekommer i inaktiva och böjda V-formade form med huvuddelen nära den membran-proximala regioner av svansstycket. Komplexet hålls med en α/β saltbrygga vid den inre membranregionen och helixpackning av transmembranområdet. Denna lågaffinitetsstruktur undergår snabba, reversibla konformations förändringar, som kallas aktivering, för att öka ligandaffiniteten (MBinfo, 2018). Den ligandbindade huvuddelen av integrinet är böjd och nära cellmembranet i den stängda konformationen, medan de cytoplasmiska svanser är nära varandra för att bilda en konformation med låg affinitet. När

cytoskelettprotein talin binder till svansen av β -underenheten, kommer epitoperna fram i stjälkområdena och genererar en konformation med mellanliggande affinitet. Konformationen med hög affinitet genereras när de cytoplasmiska svansarna av α - och β -underenheterna genomgår betydlig separation och de extracellulära delarna böjer sig uppåt (Zhang, m.fl., 2011). De strukturella kännetecknen för integrinaktivering är: a) fullständig förlängning av de extracellulära domänerna och b) separation av de cytoplasmiska bandomänerna. Denna process underlättar integrinförmedlad signalering och därmed mekanisk avkänning och sändning.

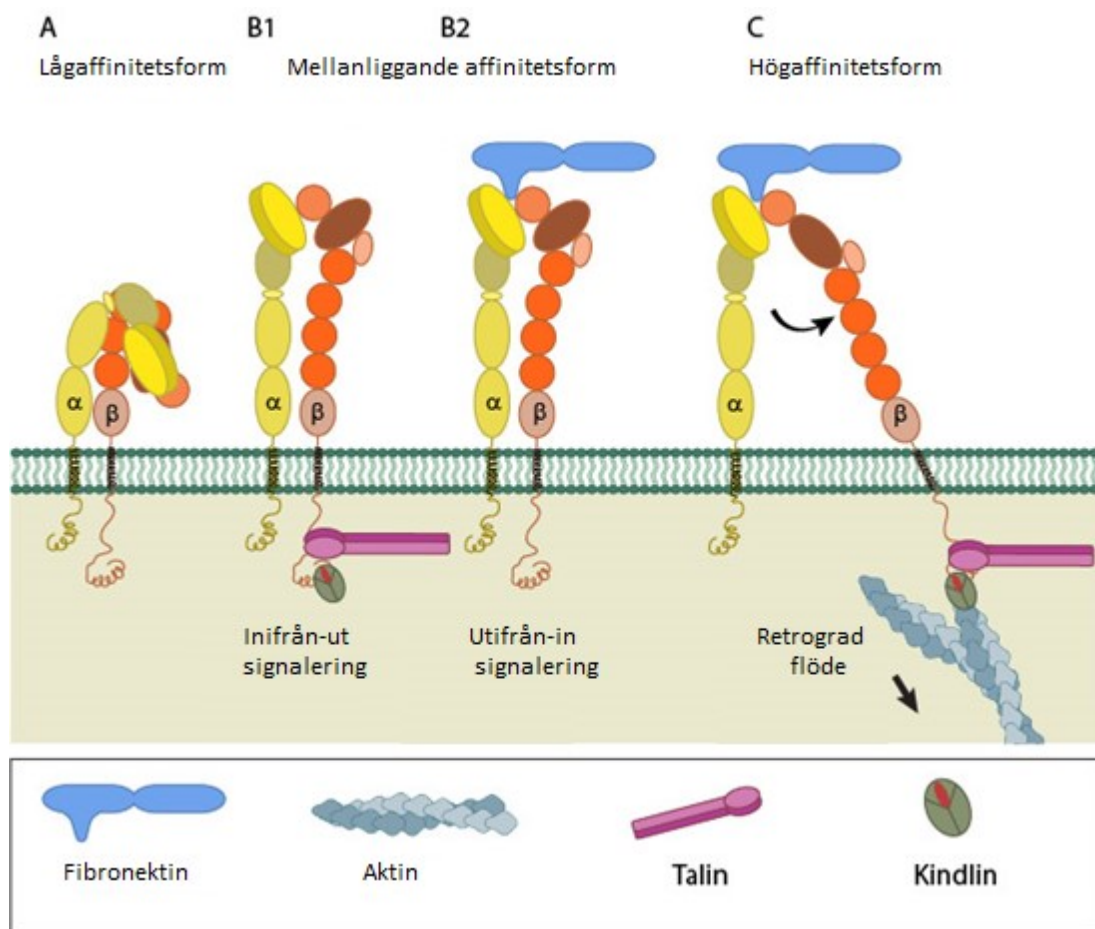


Fig. 4 Integrinets former och deras affinitet. A. Lågaffinitetsform, B. Mellanliggande affinitetsform och C. Högaffinitetsform. (MBinfo, 2018).

Integriner kan aktiveras genom att reglerande proteiner binder till dess cytoplasmiska svansar vilket leder till inifrån-ut signalering och genom att multivalent ligandbinding vilket som orsakar utifrån-in signalering (MBinfo, 2018). Talin och Kindlin är proteiner som har en viktig roll vid integrin aktiveringen och signaleringen.

Talin är ett cytoskelettprotein som består av en N-terminal FERM-domän (protein 4.1, ezrin, radixin och moesin) med tre underenheter (F1, F2, F3), vilka binder till integrins cytoplasmiska svansar och en stora C-terminala stångdomän (*eng. rod domain*) som binder aktin. F3-underenheten innehåller en fosfotyrosinbindande (PTB) domän som binder till integrin β -underenhet svansen. Talin påverkar som en bro mellan ECM och aktin skelettnätverket. Kindlin binder till integrin β -underenhetsvansen och aktiverar integrinet. kindlin familjen har tre medlemmar: kindlin-1 (Unc-112-relaterad protein 1, URP1), kindlin-2 (Mig2) och kindlin-3 (URP-2). Kindliner och taliner för sig själva kan inte inducera integriner till högaffinitetsformen (Zhang, m.fl., 2011). Den kombinerade verkan av dessa två händelser gynnar övergången från den stängda, låga affiniteten till den öppna, höga affiniteten hos integrin (MBinfo, 2018).

1.2.2 Signaleringskomplexer

Efter att integrinet når en högaffinitetsform kan flera olika proteinkomplex binda sig till integrinet och börja signalera. Focal adhesionkinas (FAK), ett fosforyleringsreglerat signalprotein, är viktigt för adhesionsmetabolism, aktivering av GTPaser i Rho-familjen, cellmotilitet och tvärprat mellan integrin- och tillväxtfaktorsignalering (Figur 5) (Nieuwenhuis, et al., 2018). Src-familjens proteintyrosinkinaser (SFK) aktiveras snabbt efter integrininteraktioner, och SFK-aktivitet är involverad i att förbättra första integrinmedierad adhesion genom att aktivera nedströms kinaser och adaptrar. SFK kan direkt binda till β -integrinsvansar på ett svans- och SFK-specifikt sätt, och denna interaktion är involverad i att aktivera kinas aktivitet och kontrollera cellproliferation (MBinfo, 2018). Integrinkopplat kinas (ILK) är en annan viktig komponent i integrinsignalering (Nieuwenhuis, et al., 2018). Liksom FAK är ILK ett viktigt protein som spelar en roll i signaleringsstället för integrinadhesion. ILK bildar ett heterotrimert komplex med LIM-domänproteinet PINCH och det aktin- och paxillinbindande proteinet parvin. Detta komplex fungerar som en modul i integrinsignaleringsnätverket. Hos däggdjur är komplexbildning nödvändig för korrekt inriktning av integrinadhesion, och komplexbildning skyddar också denna komponent från proteasomal nedbrytning. Det FAK- och ILK-bindande proteinet Paxillin är också en viktig komponent i signaltillståndet. Paxillin innehåller

flera distinkta protein–protein-interaktionsmoduler (leucinrika upprepningar, prolinrika regioner och LIM-domäner), och dess många fosforyleringsställen ger mer reglerade protein–protein-interaktionsställen. Tillsammans förmedlar de bindningen av kinaser, fosfataser, aktinbindande proteiner och regulatorer, såväl som effektorer av små GTPaser i Rho-familjen. Paxillin binder direkt till den cytoplasmatiska svansen av $\alpha 4$ -integrin, vilket leder till cellmotilitet och rekrytering av leukocyter till platser för inflammation. Vinkulin interagerar med flera olika fokala adhesionsproteiner och är viktigt för integrinmedierad celladhesion, och celler utan Vinkulin visade minskad proliferation, förbättrad fokal adhesionsnedbrytning och ökad slumpmässig rörelse. Arp2/3-vinkulininteraktion kan förklara vinkulins roll i cellproliferation. Flera andra integrinsignaleringsproteiner känns igen och flera olika knockouts har gjorts och analyserats (Harburger, et al., 2009).

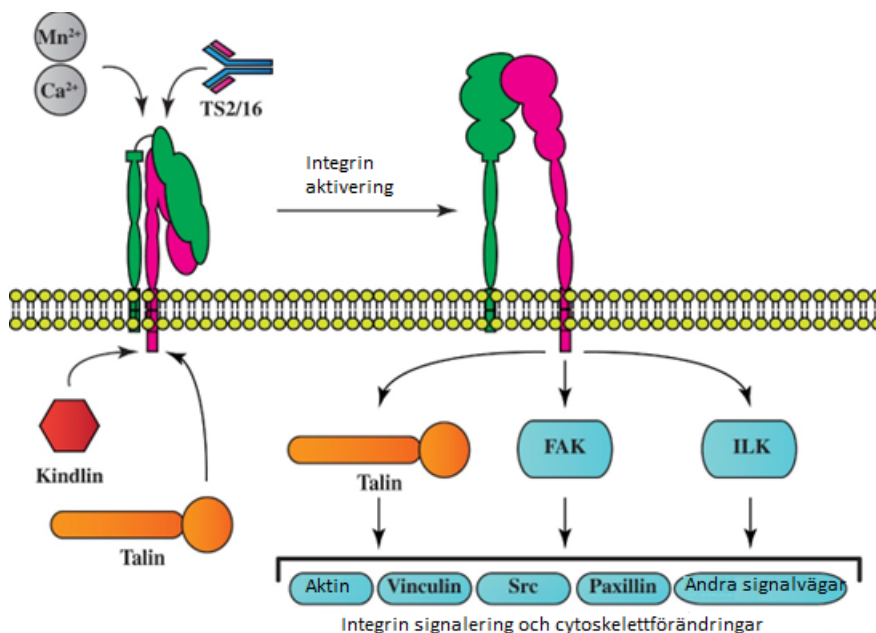


Fig. 5 Olika signaleringskomplex för integriner. Integrinet kan aktiveras utifrån med Mn^{2+} , Ca^{2+} eller TS2/16 samt innifrån med kindlin eller talin. Aktiverade integriner kan binda till flera olika signaleringskomplex, som ger flera olika reaktioner (Nieuwenhuis, m.fl., 2018).

1.3 I-domän

I-domän integriner är en undergrupp av integriner som innehåller en insatt I-domän mellan β -propellerdomän 2 och 3 på α -underenheten (fig. 6) (Barczyk m.fl., 2010). Integriner har också en I-liknande domän på sin β -kedja (Zeltz m.fl., 2016). På integrinernas I-domän finns ett bindningställe för metalljoner, som kallas MIDAS-motivet (*eng. metal-ion dependent adhesionsite*) där ligander binder. När liganden

binder till integrinet, sker aktiveringen genom att helixarna $\alpha 1$ och $\alpha 7$ rör på sig i I-domänen. Detta leder till allosteriska rörelser och efterföljande signelhändelser i integrinet. Integrinantagonister konkurrerar ofta med varandra, vilket leder till allosteriska förändringar, och de fungerar därför som delvisa agonister. Integrinerna kan vara i aktiv öppen eller inaktiv stängd konformation (fig. 7). Öppen konformation har högt affinitet för ligander, medan stängda konformationen har låg affinitet. Dessa konformationer kan ändras med mutationer vid vissa integriner (Takagi och Springer, 2002).

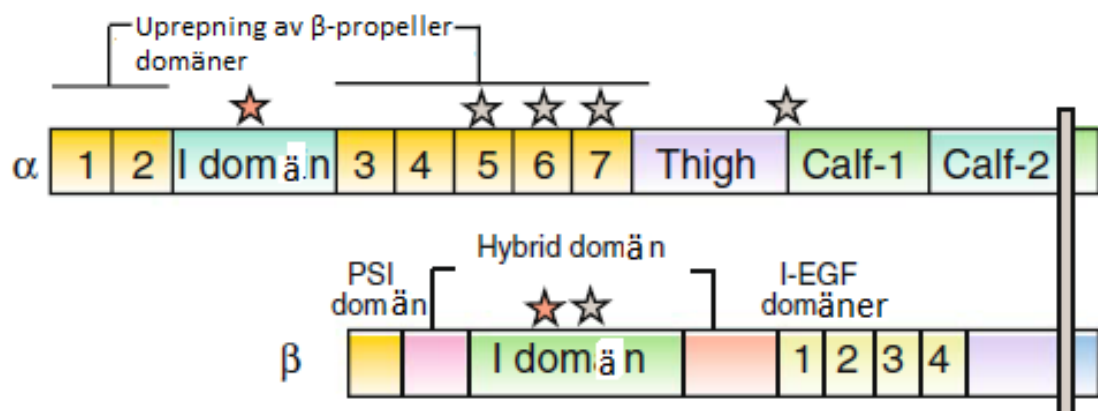


Fig. 6 Domän struktur hos I-domän integriner. Representation av domänerna i $\alpha 1$ -domäninnehållande integrin (stjärnor divalenta katjonbindande ställen) (Barczyk m.fl., 2010).

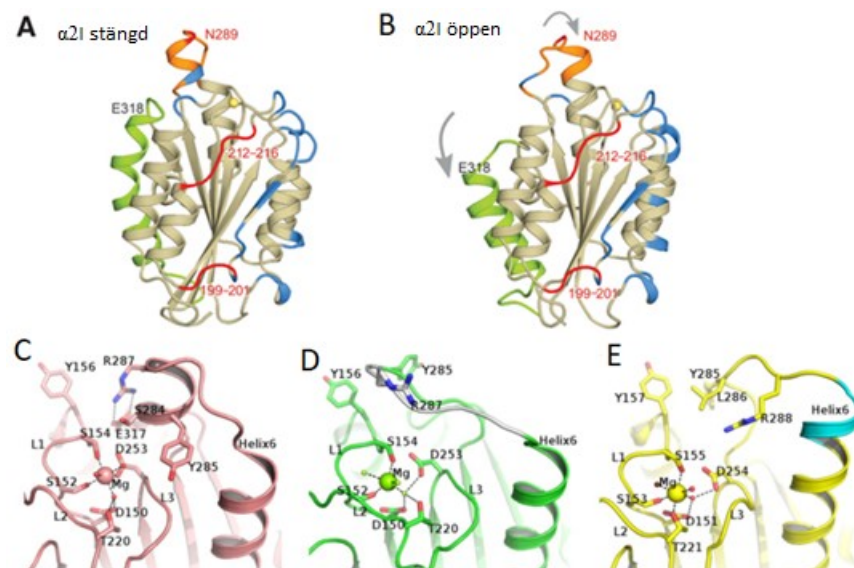


Fig. 7 Jämförelse av öppen och stängd konformation hos $\alpha 2$ I-domänerna samt aktiverad konformation hos $\alpha 1$ I-domänen. (A) Kristallstrukturen av $\alpha 2$ I-domänen i öppen konformation. (B) Kristallstrukturen av $\alpha 2$ I-domänen i stängd konformation (Jokinen, m.fl., 2009). (C) Stängd konformation av $\alpha 1$ I-

domänen. (D) Aktiverade konformation av $\alpha 1$ I-domänen. (E) Öppen konformation av $\alpha 2$ I-domänen. (Lahti, m.fl., 2011).

1.3.1 Inhibitorer

Det finns två olika kategorier av inhibitorer för integriner som har en I-domän: konkurrerande antagonister och allosteriska eller icke-koncurrerande antagonister (Bachmann, m.fl., 2019). Konkurrerande antagonister binder till MIDAS-region vid α I-domänen. Bara en del av de konkurrerande I-domäninhibitorerna har identifierats, såsom AQC2-antikropp och ormgift av *Echis multiquamatus* (EMS16) (Zeltz m.fl., 2016). AQC2-antikroppen binder till $\alpha 1\beta$ I-domänen, inhiberar den konkurrerande bindningen av kollagen, och upprätthåller I-domänens stängda konformation (Brennan, m.fl., 2016). EMS16 binder på konkurrerande sätt till ligandbindningsstället i $\alpha 2$ I-domänen och upprätthåller MIDAS i den stängda konformationen. Den konkurrerande antagonisten interagerar inte direkt med MIDAS-domänen, men blockerar dock steriskt ligandbindningen. Dessa inhibitorer visar att det är möjligt att utveckla hämmare för konkurrerande aktivering av I-domän integriner.

Vid rörelse av $\alpha 1$ - och $\alpha 7$ -helixarna vid ligandbindningen, kan en inhibitormolekyl allosteriskt hämma linkerdelens. I-domänen av αL -underenheten har kristalliserats med flera små molekyelhämmare som identifierar ett ställe för allosterisk hämning av I-domänen. Små molekyler binder till en plats i kontakt med $\alpha 7$ -helix på den motsatta sidan av molekylens från MIDAS-motivet. Denna region har visats vara viktig för ligandbindningen och funktionen. Bindningen av små molekyler vid motsatta sidan av MIDAS-motivet orsakar inga betydande förändringar i I-domänen, vilket tyder på att de inte aktiverar receptorn (Zeltz m.fl., 2016).

α och β I-domänerna växelverkar med varandra vid aktiveringen vilket leder till signalering. Detta har lett till utveckling av hämmare till linkerdelens (fig. 8) (Zeltz m.fl., 2016).

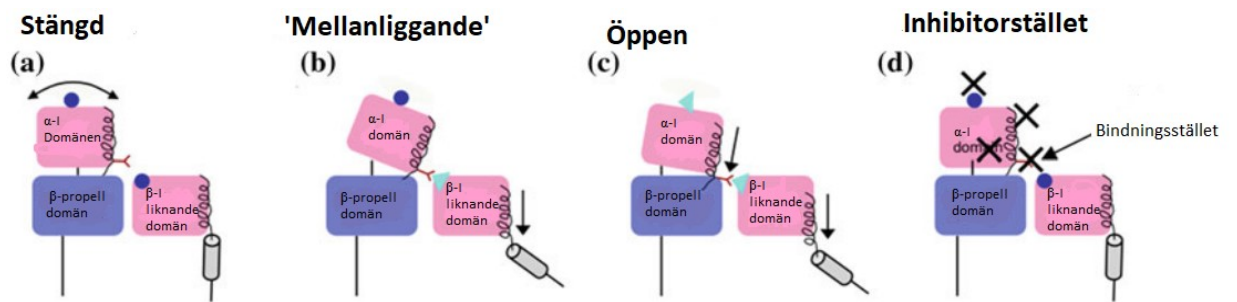


Fig. 8 Växelverkan mellan α och β I-domän vid ligandbindning. Figurerna a till c visar integrin konformationer baserat på den modell som föreslås för komplementreceptorn 4. Den stängda MIDAS-motivet är representerad som en blå cirkel och det öppna MIDAS-motivet med hög affinitet är representerad som en cyantriangel. (a) α I-domänen tänks ha en stor frihet i den stängda konformationen. (b) Aktivering av MIDAS-motivet för β I-domänen och interaktion mellan MIDAS och den sura resten (vid linkerdel) låser α I-domänen i en vinkel. (c) α 7 helixen rör sig neråt på grund av aktiveringen av α I MIDAS-platsen och minskar vinkeln för α I-domänen till β I-domänen. (d) Bindningsställen som har använts för att utveckla hämmare presenteras som svarta kryss (Brennan, m.fl., 2016).

Mängden av inaktiva integriner som har en böjd konformation kan stabiliseras eller ökas med inhibitorer. ICAP kan binda till svansen av β 1-integrin och hämmar på så vis aktiveringen. Filamin A inhiberar integrinets aktivering genom att bilda en tertiär komplex med α Ib- och β 3-integrin underenheter och förhindrar separeringen av integrinets underenheter (Bachmann, m.fl., 2019).

2 Målsättningar

Integrin α 1 β 1 och α 2 β 1 är kollagenreceptorer som är involverade i olika sjukdomstillstånd, såsom inflammation, vävnadsregeneration och tumörer (Zeltz and Gullberg, 2016). Båda proteinerna är troligtvis nödvändiga för en korrekt medfödd immunrespons i olika immunceller. Integrin α 1 β 1 och α 2 β 1 föredrar att binda till olika kollagener, icke-fibrillärt kollagen IV och kollagen I. Ligandbindningsstället i båda proteinerna finns i MIDAS-motivet i α I-domänen. Ligandbinding till α I-domänen bryter saltbryggan mellan R287 och E317, vilket orsakar en stor konformationsförändring som öppnar α I-domänen. 3D-strukturer för både den öppna och den stängda formen finns för båda α I-domänen. Utöver dessa två former kan α 1I-C139S/E317A-mutanten leda till en intermediär konformation där α C-helixen är otvinnad, även MIDAS-motivet har genomgått spatiala förändringar, men positionen

för den C-terminala helixen 7 är oförändrad. Mutanten kallas för den aktiverade formen eftersom den har en högre bindningsaktivitet än vildtyp $\alpha 1I$. Den aktiverade formen innehåller C139S mutationen som förhindrar onaturliga disulfidbindningar mellan två αI -domäner och därmed kallas även $\alpha 1I$ -C139S mutanten för vildtyp $\alpha 1I$. Analyser av de publicerade och de opublicerade strukturerna för vildtyp och muterade $\alpha 1I$ -C139S/E317A och $\alpha 2I$ -C140S/E318A visar att aktiveringsmekanismerna för dessa två αI -domäner kan skilja sig från varandra. Det har upptäckts att $\alpha 2I$ lätt kristalliseras i den öppna formen när antingen äppelsyra (*eng. malic acid*) eller bärnstenssyra (*eng. succinic acid*) från kristalliseringslösningen binder metalljonen som imiterar kollagenliganden, medan i $\alpha 1I$ -äppelsyrakomplexet binder liganden inte till MIDAS-motivet (opublicerad information). När kristaller växer i höga koncentrationer av natriummalonat är den aktiverade $\alpha 2I$ -C140S/E318A domänen i stängd konformation medan den aktiverade $\alpha 1I$ -C139S/E317A domänen har en intermediär konformation.

Peptidkomplexen visar att den konserverade E317 in $\alpha 1I$ och E318 in $\alpha 2I$ formar olika interaktioner i den öppna formen och E317 i $\alpha 1I$ verkar spela en mera signifikant roll i stabiliseringen av den öppna formen. För att klargöra den här hypotesen fokuserar det här arbetet på den andra partnern i den avbrutna saltbryggan, R287, genom att påvisa funktionella och strukturella detaljer i $\alpha 1I$ -C139S/R287A mutanten.

Projektets specifika målsättningar:

1. Producering av $\alpha 1I$ -C139S/R287A, $\alpha 1I$ -C139S/E317A och vildtyp $\alpha 1I$ -C139S samt $\alpha 2I$ -C140S/R288A, $\alpha 2I$ -C140S/E318A och vildtyp $\alpha 2I$ -C140S för kollagenbindningsstudier och kristallisering.
2. Jämförelse av kollagenbindningsegenskaperna för $\alpha 1I$ -C139S/R287A, $\alpha 1I$ -C139S/E317A varianter med vildtyp $\alpha 1I$ -C139S.
3. Kristallisering av $\alpha 1I$ -C139S/R287A och vildtyp $\alpha 1I$ -C139S.

3 Metoder

3.1 Platsriktad mutagenes

Platsriktad mutagenes används i stor utsträckning vid analys av genstruktur och funktion, och det finns för närvarande flera metoder för att erhålla enkla basparförändringar, -deletioner och -insättningar. Många av dessa procedurer kräver enkelsträngat DNA som mall för att uppnå höga nivåer av mutagenes, men med tanke på den enkla framställningen av DNA har användningen av dubbelsträngat DNA och polymeraskedjereaktion (PCR) -baserade metoder nyligen blivit mer och mer populära. PCR-baserade metoder kräver syntes av två komplementära oligonukleotider, som innehåller de önskade mutationerna, och dessa oligonukleotider kan användas för att initiera PCR på plasmid-DNA-templat (fig. 10) (Shenoy m.fl., 2003). Med PCR-metoden amplifierar man mängden DNA med tre steg, denaturering, hybridisering och förlängning. Under denatureringsprocessen öppnas DNA-templet till två enstaka strängar vid hög temperatur (90–95 °C). Efter hybridisering, när reaktionen svalnar, binder oligonukleotider komplementärt till templetets motsatta sida och 5' - till 3' -riktning till templetets andra sida. I det sista steget av förlängningen, när temperaturen förblir stabil, konstrueras oligonukleotiden från riktningen 5' till 3' och den optimala temperaturen är 68–72 °C (Wages Jr, 2005). Reaktionsblandningen klyvs med DpnI för att avlägsna DNA-templat och lämna kvar den nya syntetiserade dubbelsträngade mutanta PCR-produkten. Produkten används sedan för att transformera *Escherichia coli* celler. Denna metod kan uppnå högeffektiv mutagenes på relativt kort tid (Shenoy m.fl., 2003).

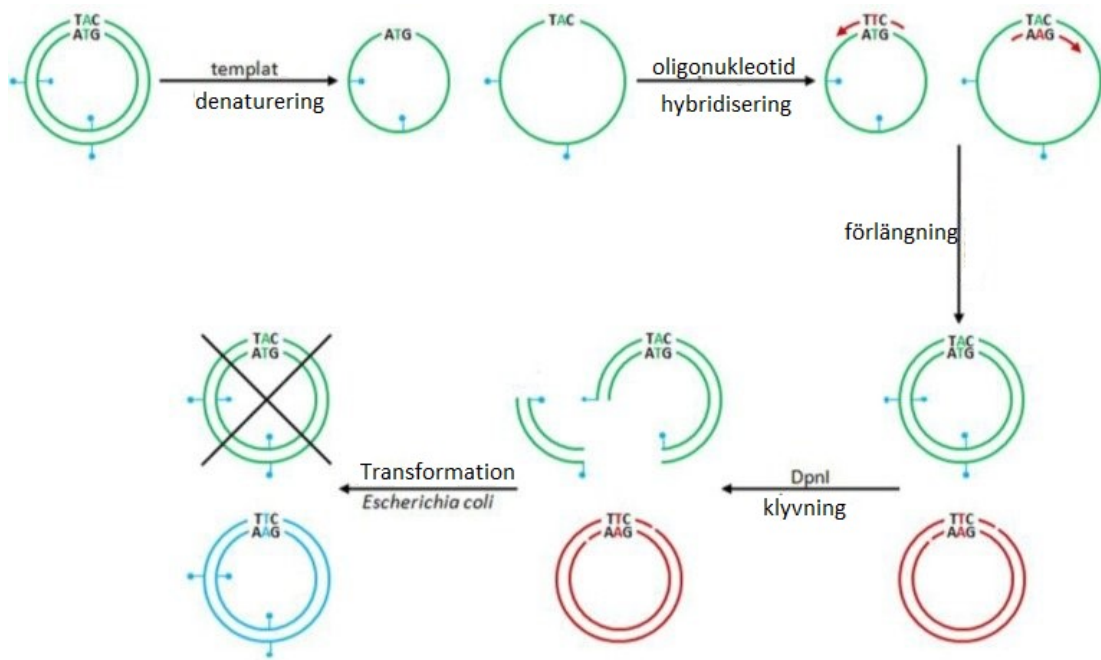


Fig. 10 Schematiskt diagram av PCR-baserad, platsinriktad mutagenesmetod. Efter syntes av mutanta DNA-strängar, blir PCR-blandningen utsatt för Dpn-I klyvning för att selektivt degradera bakterieintaget DNA, vilket skiljer sig från den nya syntetiserade PCR-produkten, genom att vara metylerad vid A rester i Dpn-I igenkännande sekvens dvs 5' GATC 3'. Den röda cirkeln är ny PCR-produkt, platser märkta med blått streck är metylgrupper, röda pilar är PCR-primer, grön cirkel är gammalt DNA-produkt och blå cirkel är mutant DNA från bakterier. PCR är lineärt och därför kan inte produkten fungera som templat samt man får lite produkt (Ahmadiankia m.fl., 2012).

3.1.1 Klyvning av Dpn-I

Dpn-I är ett 2M restriktionsendonukleas som känner igen metylerat DNA (Pingoud m.fl., 2001). Dpn-I tillhandahåller ett ovanligt restriktionssystem eftersom Dpn-I begränsar endonukleaser att endast skära dubbelsträngade metylerade 5'GmA / TC-3'-sekvenser i DNA. Celler som producerar Dpn-I behöver inte göra några ändringar i sitt DNA. Dpn-I består av en operon som innehåller två gener, *dpnC* och *dpnD*, som representeras av närvaron av två öppna läsramar i DNA-sekvensen som är specifika för celler som innehåller Dpn-I. Den första genen i operonen, *dpnC*, har visat sig koda för Dpn-I restriktionsendonukleas 30 kDa-protein. Den andra genen, *dpnD*, kodar för ett 18 kDa-protein med okänd funktion. När en stor mängd plasmid-templat måste användas i PCR-reaktionen kan Dpn-I användas för att klyva PCR-produkten för att få plasmidtemplet innan monteringsreaktionen sätts upp. Dpn-I klyver endast Dam-

metylerat plasmid-DNA, men inte PCR-produkter eftersom de inte är metylerade (de la Campa m.fl., 1988).

3.1.2 Beredning av kompetenta celler

DH5 α och BL21-kompetenta celler förbereds genom att låte dem växa i LB-medium över natten. Därefter flyttas cellerna över till ett större kärl för att växa tills absorbansen A600 blir 0,5. Cellerna centrifugeras och cellpelleten resuspenderas med 0,1 M MgCl₂. Metallen tillsätts för att neutralisera DNA och cellytans negativa laddningar och på detta sätt kan man få in DNA in till cellen. Sedan sätts cellerna på is och centrifugeras på nytt. Den här gången resuspenderas cellpelleten med 0,1 M CaCl₂ och sätts på is. Till slut centrifugeras cellerna igen, cellpelleten resuspenderas med 0,1 M CaCl₂ med 30 % glycerol och fraktionerna sätts i -85 °C.

3.1.3 Transformation

Bakteriell transformation är en av de viktigaste aspekterna av genteknik, särskilt inom forskning med hög genomströmning, såsom konstruktion av slumpmässiga bibliotek (Prakash m.fl., 2011). Efter transformation binder främmande DNA till cellytan och passerar genom väggmembrankomplexet. Transformation kan ske artificiellt eller i bakterier. (Rahimzadeh m.fl., 2016). Dessa bakterier kan till exempel vara *Micrococcus*, *Haemophilus* och *Bacillus*. De har proteiner på sin yttre yta och har funktionen att binda DNA i sin miljö och transportera det till celler (Panja m.fl., 2006). Vid artificiell transformation bör bakterieceller exponeras för vissa laboratorieförhållanden före transformation. Det finns två huvudmetoder för artificiell transformation av bakterier: CaCl₂-behandling följt av kort värmechock och elektroporation. Dessa två metoder har modifierats under det senaste århundradet för att uppnå högre omvandlingseffektivitet (Rahimzadeh m.fl., 2016). Elektroporation är ett lämpligt alternativ till laborietransformation. Elektroporation är dock dyrt och kräver ett saltfritt medium, hög spänning för omvandling och kontakt mellan elektroden och lösningen (Prakash m.fl., 2011).

3.2 Proteinuttryck

Flera olika värdar, såsom bakterier, jäst, insekter, växter och djur används vid produktionen av rekombination proteiner. Den populäraste metoden för produktion av rekombinant protein är användning av bakterien *E. coli*. Den har använts i flera årtionden för både eukaryota och prokaryota proteiner, eftersom den växer snabbt och är billig att använda. *E. coli* är på grund av sin snabba tillväxt en utmärkt val för vilken som helst mutant. *E. coli* är också väldigt effektiv på att ta emot (införliva) utomstående DNA och uttrycka rekombinanta proteiner på en väldigt hög nivå (Andersen, m.fl., 2002). För olika tillämpningar finns olika uttryckssystem. 80 % av proteinstrukturerna i 3D-strukturdatatabasen Protein Data Bank (PDB) har producerats med *E. coli* uttryckssystem (Kaur, m.fl., 2018). Den största utmaningen för detta uttryckssystem är att uttrycka ovanligt svåra/komplexa proteiner med sällsynta kodoner eller membran samt toxiska proteiner. Proteiner uttryckta i stora mängder eller hydrofobt uttryckta i naturen tenderar att bilda olösliga ämnen. Trots det korrekta uttryckssystemet uttrycks vissa proteiner i mycket låga nivåer eller inte alls. Att välja rätt uttryckssystem/-schema är viktigt för det grundläggande uttrycket av protein i dess ursprungliga form. Flera vektorer, kompatibla värdar och odlingsbetingelser kan användas för att uttrycka ett stort antal rekombinanta proteiner i sin naturliga form. Förutom att återställa den naturliga strukturen hos proteinet, kan bäraren med en fusionsmärkning/chaperon också främja expressionen av proteinet i den lösliga fraktionen och hjälpa proteinet att vikas korrekt. Återvinning av naturligt protein från olösliga inneslutningskroppar kan uppnås genom att optimera proteinvikningsförhållandena (Cereghino, m.fl., 2000).

Uttrycket av det rekombinanta proteinet kan åstadkommas genom flera olika steg, men de nödvändiga huvudkomponenterna är expressionsvektor och expressionsvärden/kompatibel värd. Expressionsvektor är utformad för att transkribera och/eller översätta genen som ska klonas. Den innehåller alla komponenter som används för att klona och uttrycka externa gener. Plasmidvektorer används vanligtvis som expressionsvektorer. När man uttrycker rekombinanta proteiner beror valet av en lämplig *E. coli* stam på vilken typ av vektor som används. När en gen uttrycks i en vektor innehållande en T7-promotor, föredras *E. coli* BL21-stam eftersom den producerar RNA-polymeras för denna promotor (Baneyx, 1999).

3.3 Proteinrening

α 2I-domänen renas som ett fusionsprotein. Cellväggarna söndras med sonikering och Triton X-100 tillsätts för att öka solubiliteten av proteinerna (Lahti, m.fl., 2011). Vid proteinreningen användes affinitetskromatografi, där en kort ineffektiv kolumn av hög selektivitet används, för att separera en eller flera lösningar av hundratals lösta ämnen (Walters, 1985). Cell rester avlägsnas med centrifugering och glutation sefaros tillsätts till supernatanten för att binda GST/ α 2I-domänen. Sefarosen flyttas över till en liten kolumn och matrixet tvättas försiktigt (Lahti, m.fl., 2011). Reducerad glutation tillsätts till kolumnen för att avlägsna GST/ α 2I-domänen som ett fusionsprotein. Glutation kan tas bort med hjälp av dialys (Tulla, m.fl., 2008).

3.3.1 Dialys

De två vanligaste metoderna för att separera fria bärare från fria prover är centrifugering och dialys. Det största problemet med centrifugering är att den utövar centrifugalkraft på partiklarna, vilket kan få provet att släppas för tidigt. När probbäraren inte utsätts för externa krafter kan detta resultera i mer provfrisättning än förväntat. Separationsmetoden för dialys är den mest populära och vanligtvis använda tekniken eftersom den inte kräver applicering av externa krafter. I dialys placeras lösningen som innehåller provet i en dialyskassett och placeras sedan i en behållare med känd volym (Moreno-Bautista m.fl., 2011).

Dialyskassetten Slide-A-Lyzer (Thermo Scientific, USA) består av två lågbindande regenererade cellulosodialysmembran, som är lufttätt förseglade på båda sidor av en silikonliknande packning i en inert plastram. Membran kan användas i en mängd olika metoder, såsom enkelt och effektivt avlägsnande av buffersalter och små föroreningar från proteiner och andra makromolekyler, avsaltning, balanserad dialys och provkoncentration (Khan m.fl., 2013).

3.4 Proteinbestämning

3.4.1 Bradford-analys

Metoderna för proteinisolering samt karakterisering behöver vara snabba och noggranna, för att uppskatta koncentrationen av protein i lösningen. Vid proteinrening används dock reagenser, som förhindrar användningen av en eller flera av dessa metoder. Rening av fastsittande membranproteiner ger ovanliga utmaningar för proteinbestämningsmetoder, eftersom dessa proteiner behöver oftast närvaro av rengöringsmedel och sulfhydrylreagenser för att bibehålla lösligheten och stabiliteten (Hill, m.fl., 1987).

Att jämföra enzymaktiviteten per mg protein mellan fritt enzym och immobiliserat enzym är det bästa sättet att hantera immobiliseringseffektiviteten. Indirekt beräkna proteinbelastningen på bäraren och mät den initiala och slutliga proteinkoncentrationen i supernatanten i immobiliseringsmediet. En metod baserad på ultraviolet / synlig spektroskopi kan användas för att erhålla proteininnehållet i det immobiliserade proteinet (Nicolas m.fl., 2017). Bland dem är Bradford-analysmetoden den mest använda metoden för total proteinkvantifiering med hjälp av Coomassie Brilliant Blue G-250-färgämne (CBB). CBB binds till proteinernas basiska aminosyror och uppger en blå färg vid stark bindning. CBB-proteinkomplexet absorberas vid 595 nm och bovint serumalbumin (BSA) används som standard. När man använde Bradford-metoden hittades allvarliga begränsningar vid kvantifiering av andra proteiner än BSA (Zor, m.fl., 1996). Molekylvikten, aminosyrasekvensen och den exponerade strukturen hos BSA i vattenlösning är mycket olika (eller kan vara olika) från molekylvikten, aminosyrasekvensen och den exponerade strukturen hos okända proteiner. Efter agitation och/eller långvarig kontakt med bufferten kan proteinaggregering förändras. Vanligtvis är rent målprotein inte tillgängligt. Den andra felkällan är interaktionen mellan färgämnet och kemikalien från bäraren.

Bradford-metoden är en av de mest använda metoderna och har inga uppenbara brister. Den klassiska Bradford-metoden inkluderar inte fullständig UV/synlig spektrumkontroll och interferensanalys (Nicolas m.fl., 2017).

3.4.2 SDS och nativ gelelektrofores

Sedan 1970-talet har natriumlaurylsulfatgelelektrofores blivit en mycket använd separationsmetod för utvärdering av molekylvikt och renhet i laboratorier för molekylärbiologi och biokemi (Filep m.fl., 2021). Med införandet av tvärbundna polyakrylamidgeler (SDS), baserat på förhållandet mellan proteinladdning och hydrodynamisk volym, blir denna metod nödvändig för snabb proteinanalys (Lane, 1978). Cirka 1,4 gram natriumlaurylsulfat och 1 gram protein kombinerades för att bilda en fririnnande lösning. Detta leder till behovet av en matris av lämplig storlek för att separera dem (Filep m.fl., 2021). I de flesta fall bidrar täckningen av SDS också lite till proteinets inneboende laddning. Korrekt denaturering av de upplösta proteinmolekylerna är mycket viktigt för att erhålla enhetlig och fullständig täckning av ytaktiva molekyler (Lane, 1978). Substitutioner orsakade av mindre eller ingen SDS-bindning till större hydrofila fläckar (såsom glykosylering) på polypeptidkedjan kan förändra dess elektroforetiska rörlighet, vilket kan leda till potentiellt felaktig toppidentifiering och storleksberäkning (Filep m.fl., 2021).

Nativ gelelektrofores är en analytisk metod för att separera proteiner eller nukleinsyror genom laddning, form, storlek och hydrodynamiska egenskaper (Elsasser, m.fl., 2005). Även om elektrofores i närvaro av natriumdodecylsulfat följer konventionella proteinrenings- och återveckningsmetoder, kan naturlig gelelektrofores användas för att övervaka den strukturella heterogeniteten hos proteiner eller proteinligandinteraktioner. Det är också delvis användbart för proteomik. I proteomik utförs tvådimensionell elektrofores på en proteinblandning för att separera blandningen från så många proteinfläckar som möjligt. I denna analys är den första dimensionen isoelektrisk fokusering eller naturlig gelelektrofores för att separera blandningen under naturliga förhållanden. Varken naturliga eller isoelektriska fokuserande polyakrylamidgeler som är kommersiellt tillgängliga från Invitrogen innehåller denatureringsmedel. Detta leder till att varje band oftast representerar en blandning av många proteiner, vilka sedan separeras enligt vikt under SDS-denatureringsförhållanden i andra dimensionens SDS-PAGE (Li m.fl., 2019).

3.5 Bindningsanalys

Beläggningen av högbindande 96 brunnarsplattor, görs med att tillsätta PBS, vilket som innehåller 5 µg/cm² kollagener (Käpylä, m.fl., 2004) eller BSA (3,75 %), som används för att blockera brunnarna (Lahti, m.fl., 2011). När man belägger kollagen I och IV på mikrotiterplattor är konditionerna så att kollagenet binds som monomerisk, trippelhelisk form. Tomma brunnar beläggs med 1:1 lösning av Delfia® Diluent II (Wallac) (BSA 3,75 %) och PBS. Resterande proteinabsorptionsställen på alla brunnar blockerades med 1:1 Delfia® Diluent II (Wallac) och PBS. Rekombinant proteiner (I-GST) tillsattes till de belagda brunnarna i olika koncentrationer i Delfia Assay Buffert och inkuberades vid rums temperatur. Europium märkta anti-GST antikroppar (Wallac) tillsattes 1:1000 och blandningen inkuberades 1 h vid rums temperatur. 2 mM MgCl₂ behövs vid alla inkubationerna. Delfia Enhancement Solution (Wallac) tillsätts till varje brunn (Käpylä, m.fl., 2004) och signalen mättes med tidsupplöst fluorescensspektrofotometer (Victor3 multilabel counter, PerkinElmer Life Sciences). Ett värde för dissociationskonstanten (K_d), räknades med ekvationen: uppmätt bindning = maximal bindning/(1+K_d/[α1]) (Lahti, m.fl., 2011). I vissa fall används en modifierad fastfasanalys, vilket som använder anti-GST och europium-märkt protein G i stället för europium-märkt anti-GST antikropp (Käpylä, m.fl., 2004).

3.6 Kristallisering

HT (high-throughput) kristallisering med användning av plattor med 96 brunnar, har drastiskt minskat på mängden protein som krävs för undersökning och därmed strukturbestämning (Morisette, m.fl., 2004). Robotiska kristallisationssystem kan avge nanoliter droppar (<100 nl) och där med öka antalet förhållanden som kan undersökas med en fast mängd proteinprov. Även tiden som krävs för att skapa ett kristalliseringsförsök minskas. Tusentals olika förhållanden med olika kristalliseringsparametrar (t.ex. pH, salter, temperatur) kan undersökas med 100 ml av proteinprov (Newman, m.fl., 2005). Kommersiellt tillgängliga kristalliseringsrobotar inkluderar t.ex. Honey Bee (Cartesian Microarray), Phoenix (Rigaku), Mosquito (Molecular Dimensions Limited) och Oryx (Douglas Instrumentation) (Choi, 2012). Klassiska metoderna för fysikalisk kemi används för att bestämma egenskaperna av mekanismer som organiserar samt binder stora biologiska molekyler till

kristallstrukturer. Makromolekylär kristallisering är i allmänhet en fråga om att söka så systematiskt som möjligt de individuella intervallparametrar som påverkar kristallbildningen, hitta en uppsättning eller flera uppsättningar av faktorer som ger någon form av kristaller och sedan optimera de individuella variablerna för att erhålla bästa möjliga kristaller. Detta uppnås vanligtvis genom att göra en omfattande serie eller en stor matris av kristallisationsförsök, utvärdera resultaten och använda vad information som erhålls för att förbättra förhållandena i följande försök (McPherson, m.fl., 2004).

4 Material och metoder

4.1 Platsriktad mutagenes (Polymeraskedjereaktion)

Först gjordes en mastermix innehållande vatten, klonad Pfu reaktionsbuffer (Thermo Scientific), 0,2 mM dNTPS, 50 ng DNA templat, 125 ng framåt primer, 125 ng omvänd primer och 2,5 U Pfu turbo DNA polymeras (Thermo Scientific). Denna mastermix sattes in i PCR maskinen med rätta inställningar (tabell 2) och körde i 1 h 25 min. Under tiden gjordes en 1 % agarosgel. För att få gelkonsistensen värmdes man upp agaroset pipetterade 3 µl DNA marker (1kb GeneRuler, Thermo Scientific) och höllde den i gelmontöret när agaroset blivit rumstemperatur. För PCR gelkörningen gjorde man ett 20 µl sampel med 2 µl fast digestion Green buffert, 3 µl PCR och resten vatten. Samplet samt 1 kb DNA ladder (GeneRuler, Thermo Scientific) pipetterades sedan på agarosgelet och körde PCR gelet med 70 V i 30 min.

Tabell 2 PCR inställningar.

Segment	Cykler	Temperatur	Tid
1	1	95 °C	30 sec
2	16 (en aminosyra förändring)	95 °C	30 sec
		55 °C	1 min
		68 °C	1 min/kb av plasmid längden

4.1.1 Klyvning och ligering

Före klyvningen så renades $\alpha 1$ WT med Gene JET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific), men i stället för 50 μ l elueringsbuffert användes 50 μ l vatten. PCR produkterna renades med Gene Jet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific), men använde i stället för 50 μ l elueringsbuffert användes 35 μ l vatten. För klyvningen användes BamH1 och EcoR1 (Thermo Scientific), som pipetterades i både PCR och Gex-2T vektor sampel. Båda av dessa sampel sattes på värmeblock med 37 °C för 50 min, så att klyvningen kan ske. Därefter sattes värmeblocket till 80 °C för 5 min, så att enzymreaktionen slutar. Efter klyvningen pipetterades T4-Ligas (Thermo Scientific) till slutvolym av 20 μ l och lät ligationen inkuberas för 10 min vid rumstemperatur.

4.1.2 Transformation till DH5 α

Efter ligeringen tillfördes ligeringsprodukten till en ner kyld 15 ml falcon rör och 75 μ l av kompetenta DH5 α -celler tillsattes. Sedan sattes rören på is för 20 min. Värmeblocken sattes på 42 °C och samplet värme shockades i 45 s. Värefter samplen lät kylas ner på is. Sedan tillsattes 1 ml SOC-medium och rören placerades i en skakare för 1 h vid 37 °C. Efter skakningen centrifugerades rören för 5 min med 3075 x g. Supernatanten hälldes ut och tillsatte cellpelleten på en 100 μ g/ml LA+AMP-platta. LA+AMP-plattan fördes i ett värmeskåp med 37 °C över natten. Nästa dag tillsatte man en koloni från LA+AMP-plattan i ett falcon rör med SOC-media samt AMP. Falcon röret placerades och skakas över natten med 37 °C.

4.1.3 Plasmidextraktion och sekvensering

Först centrifugerades falcon rören för 5 min med 3075 x g och supernatanten hälldes ut. Sedan renades reagenserna med Gene JET Plasmid Miniprep Kit (Thermo scientific), men i stället för 50 μ l elueringsbuffert användes 50 μ l vatten. Koncentrationen av renade plasmiderna mättes med Thermo fisher Nanodrop 2000 maskinen. För klyvningen användes BamH1 och EcoR1, som pipetterades i både PCR och Gex-2T vektor sampel. Båda av dessa sampel sattes på värmeblock med 37 °C för 50 min, så att klyvningen kan ske. Därefter sattes värmeblocket till 80 °C för 5 min, så

att enzymreaktionen slutar. Samplet samt 1 kb DNA-ladder (Thermo Scientific) pipetterades sedan på 1 % agarosgelen och körde plasmidextraktion gelet med 70 V för 30 min. Plasmiderna som lossnat från vektorn skickades för sekvenseringen enligt Eurofins Mix2Seq kit protokollen.

4.2 Transformation till BL21-celler

Först pipetterades 1 µl av plasmid och 100 µl av kompetenta BL21-celler till en ner kyld 15 ml falcon rör. Rören sattes på is för 20 min. Rören värme shockades på värmeblock för 2 min vid 42 °C och lät kylas ner på is. Sedan tillsattes 1 ml SOC-medium och rören placerades i en skakare för 1 h vid 37 °C. Efter skakningen förde man rörerna och centrifugerades för 5 min med 1968 x g. Supernatanten hälldes ut och tillsatte cellpelleten på en LA+AMP-platta. LA+AMP-plattan placerades i ett värmeskåp med 30 °C övernatten. En koloni per platta togs och sattes i 50 ml LB-medium samt 50 µl AMP. Röret sattes och skakas övernatten i 37 °C. Från över natten kultur togs 12 ml och 1 ml AMP till en 1L LB-medium flaska. Flaskan med 1 L LB-medium sattes och skakas vid 37 °C tills absorbansen var mellan 0.6–1. Sedan tillsattes IPTG, till slutkoncentration på 0,4 mM och lät skakas i 2h 50 min med 23 °C. Proven centrifugerades för 10 min med 3075 x g vid 4°C och cellerna skrapades och sattes i -20 °C övernatten.

4.3 Proteinrening

Cellerna löstes upp med 20 ml is-kallt 1xPBS och vortexande. Cellerna sonikerades 5x15 s med 15 s mellan varje sonikering. Tillsatte 2 ml 20 % Triton X-100 för en koncentration av 2 % och satte cellerna på agitation för 50 min vid 4 °C. Kombinationen av sonikeringen samt Triton behandlingen förstörde celmembranet och cellväggen. Sedan centrifugerades cellerna med 35541 x g för 10 min vid 4°C och tillförde supernatanten till en 50 ml falcon rör. 1,5 ml glutation sepharose pipetterades och rören sattes på agitation för 45 min vid 4 °C. Efter agitationen centrifugerades rören med 500 x g för 5 min och tillsatte sepharosen till en 10 ml kolumn. Tvättade kolumnen med två kolumnvolymer 1xPBS och lät kolumnen torka. Sedan tillsattes 3 ml elueringsbuffer till kolumnen och tog tillvara 0,5 ml fraktioner. Snabb Bradford

analys gjordes med 790 μl 1xPBS, 10 μl fraktion och 200 μl Bradford reagens. Fraktionerna med protein blev blåa. Fraktionerna innehållande protein kombinerades sedan och dialyserades med användning av en Slide-A-Lyzer-skiva. Skivan sattes sedan i 1xPBS för 2h 30 min. Provet avlägsnades från dialysskivan och togs till vara.

4.4 Bindningsstudier

4.4.1 Proteinbestämning (Bradford)

800 μl 1xPBS, 200 μl Bradford-reagens och 1 μl $\alpha 1$ R287A pipetterades i duplikat i två eppendorf rör. 800 μl 1xPBS, 200 μl Bradford-reagens och 1 μl $\alpha 2$ R288A pipetterades i duplikat i två eppendorf rör. En standardlinje för Bradford framställdes vid 0–10 $\mu\text{g/ml}$. Absorbansen mättes sedan vid A595 och Origin användes för att beräkna $\alpha 1$ -R287A och $\alpha 2$ -R288A proteinkoncentrationen.

4.4.2 Bindningsanalys för GST/ $\alpha 2\text{I}$ -domän

Col1 och Col4 pipetterades så att beläggning av brunnarna var 5 $\mu\text{g/cm}^2$. Diluent 2 och BSA pipetterades 1:1 och 100 μl /brunn. Plattan sattes för att inkubera över natten vid 4 °C. Plattan tvättades en gång och tillsattes 100 μl /brunn 1xPBS: BSA (1:1). Plattan inkuberades vid rumstemperatur under 1 h. Plattan tvättades en gång och prov av olika koncentrationer (2000 nM, 1300 nM, 1000 nM, 500 nM, 200 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM) tillsattes 100 μl /brunn. Plattan inkuberades 1 h vid rumstemperatur. Plattan tvättades sedan tre gånger och tillsatte 100 μl /brunn Eu-labelled anti GST antibody och 1xPBS blandning (1:1000). Plattan inkuberades 60 min vid rumstemperatur. Plattan tvättades sedan tre gånger och 100 μl /brunn förstärkare tillsattes. Plattan lästes sedan med Victor multilabel counter och bindningen beräknades per brunn.

4.5 Kristallisering

Proteinet pipetterades i en 10 ml kolumn och tvättades 3 gånger med 50 mM Tris-HCl. Efter det pipetterades 1 ml av matris, 50 μ l trombin och 20 μ l protein i en 2 ml eppendorf tub. Blandning fick stå 2 h i rumstemperatur varefter det pipetterades i kolumnen. Trombin klyvda proteinet som kom ut ur kolumnen togs tillvara. Proteinet koncentrerades med ett proteinkoncentrations kit från 0,534 mg/ml till 9,79 mg/ml, vilket som mättes med Thermo Fischer Nanodrop 2000 maskinet. 10 mM reducerad glutation i 50 mM Tris-HCl användes som buffert vid proteinkoncentrationet samt koncentrationsmätningen. Sedan användes Mosquito kristalliseringsroboten (SPT Labtech) för kristalliseringen och 5 μ l proteinlösning pipetterades till 3 proteinbrunnar och därfter tillsattes brunnslösning till varje proteinbrunn för att skapa 3 olika förhållanden av protein- och brunnslösningar mot varje kristalliseringsförsök på en 96 brunnsplatta (reservoar, tabell 3). Vid kristallisering användes kommersiella lösningar (JSCG+ screen, Molecular Dimensions) med olika buffert, salt och fällningsmedel för varje reservoar. Plattan sattes efter pipettering i ett inkuberingskåp som hade fotograferingsmöjlighet (RockImager, Formulatrix Inc.). Bilder togs med ett jämnt mellanrum.

Tabell 3 Förhållandet av proteinet.

1:1	1:2
2:1	reservoar

5 Resultat

5.1 Bindningsanalys

Kollagenbindningsstyrkan av α 1-vildtyp samt mutationen α 1-R287A studerades med bindningsanalys. α 1-R287A mutationen visade sig binda starkare till både kollagen 1 samt kollagen 4, än vad α 1-vildtyp. På basen av Kd värden binder α 1-vildtyp starkare till kollagen 1 (Kd=84 \pm 25 nM) än till kollagen 4 (Kd=229 \pm 18 nM), medan α 1-R287A

binder sig lika starkt till kollagen 1 ($K_d=32\pm 3$ nM) och kollagen 4 ($K_d=25\pm 2$ nM) (fig. 11, a-b), medan mutationen förstärker bindningen till kollagen 4. Med en annan reningsats visade sig att $\alpha 1$ -vildtypen binder sig starkare till både kollagen 1 samt kollagen 4, än vad $\alpha 1$ -R287A. På basen av K_d värdena binder $\alpha 1$ -vildtyp starkare till kollagen 1 ($K_d=76\pm 8$ nM) än till kollagen 4 ($K_d=94\pm 15$ nM), med samma bindningspreferens binder sig $\alpha 1$ -R287A starkare till kollagen 1 ($K_d=107\pm 5$ nM) än till kollagen 4 ($K_d=135\pm 9$ nM) (fig. 11, c-d). Vid första reningsatsen binder sig R287A sig bättre till kollagen 1 och 4 än vildtypen, medan i andra reningsatsen har R287A varit i dåligt skick, andra experiment med samma reningsats har uppvisat liknande resultat. Även den maximala bindningen (B_{max}) värdena var högre vid både kollagen 1 ($872,018\pm 41,516$) och 4 ($109,042\pm 13,563$) med $\alpha 1$ -vildtypen än med $\alpha 1$ -R287A kollagen 1 ($709,882\pm 14,892$) och 4 ($65,4545\pm 3,338$) vid första reningsatsen och tränden fortsatte med andra reningsatsen med motsvarande siffror.

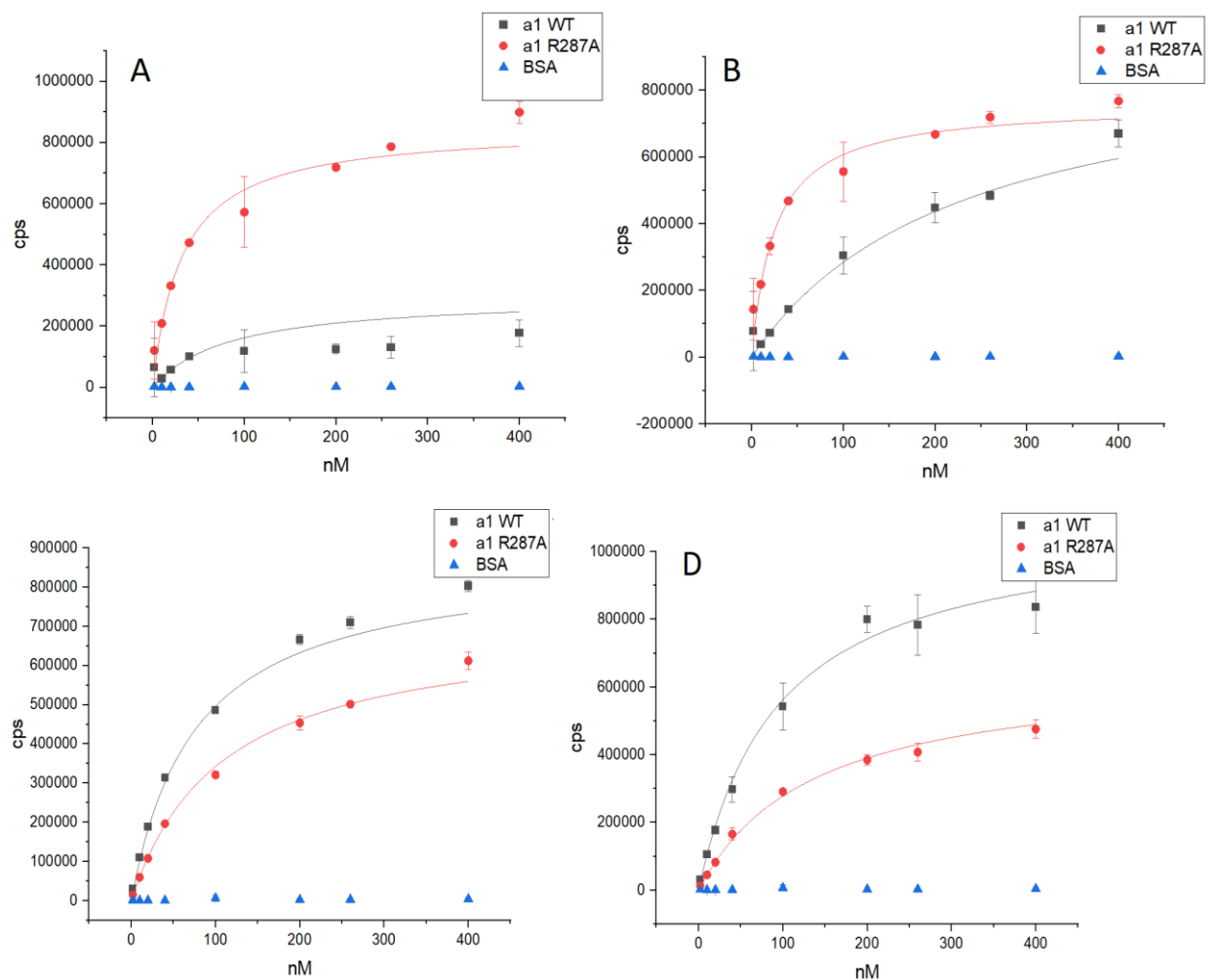


Fig. 11 Jämförelse av kollagenbindning av $\alpha 1$ -vildtyp mot $\alpha 1$ -R287A mutationen med kollagen 1 och 4. A, Kollagenbindning av $\alpha 1$ -vildtyp och -R287A till kollagen 1 (första reningsats). B,

kollagenbindning av $\alpha 1$ -vildtyp och -R287A till kollagen 4. C, kollagenbindning av $\alpha 1$ -vildtyp och -R287A till kollagen 1 (andra reningsatts). D, Kollagenbindning av $\alpha 1$ -vildtyp och -R287A till kollagen 4.

Kollagenbindningsstyrkan av $\alpha 2$ -vildtyp samt mutationerna $\alpha 2$ -R288A, -E318A studerades med bindningsanalys. $\alpha 2$ -R288A visade sig binda starkare till kollagen 1, än vad $\alpha 2$ -vildtyp och $\alpha 2$ -E318A, medan E318A visade sig binda starkare till kollagen 4, än vad $\alpha 2$ -vildtyp och $\alpha 2$ -R288A. På basen av K_d värden binder $\alpha 2$ -vildtyp starkare till kollagen 1 ($K_d=20\pm 2$ nM) än kollagen 4 ($K_d=170\pm 10$ nM), samma bindningspreferens kan ses med $\alpha 2$ -R288A som binder sig starkare till kollagen 1 ($K_d=2\pm 0,2$ nM) än kollagen 4 ($K_d=35\pm 4$ nM), medan $\alpha 2$ -E318A binder sig starkare till kollagen 4 ($K_d=17\pm 2$ nM) än kollagen 1 ($K_d=20\pm 2$ nM) (fig. 12, a-b). Med en annan reningsatts visade sig att $\alpha 2$ -R288A binder starkare till kollagen 1, än vad $\alpha 2$ vildtyp och $\alpha 2$ -E318A, medan $\alpha 2$ -E318A visade sig binda starkare till kollagen 4, än vad $\alpha 2$ -vildtyp och $\alpha 2$ -R288A. På basen av K_d värden binder $\alpha 2$ -vildtyp starkare till kollagen 1 ($K_d=13\pm 2$ nM) än kollagen 4 ($K_d=175\pm 32$ nM), samma bindningspreferens kan ses med $\alpha 2$ -R288A som binder sig starkare till kollagen 1 ($K_d=4\pm 1$ nM) än kollagen 4 ($K_d=23\pm 3$ nM), medan $\alpha 2$ -E318A binder sig starkare till kollagen 4 ($K_d=7\pm 0,7$ nM) än kollagen 1 ($K_d=8\pm 2$ nM) (fig. 12, c-d). Vid både första och andra reningsatts binder sig mutationerna starkare till både kollagen 1 och 4 än vildtypen. Mutanterna har även högre B_{max} värden än $\alpha 2$ -vildtypen vid både kollagen 1 och 4, vilket kan bero på mängden av bindningsställen eller så binder sig flera integriner till bindningsstället.

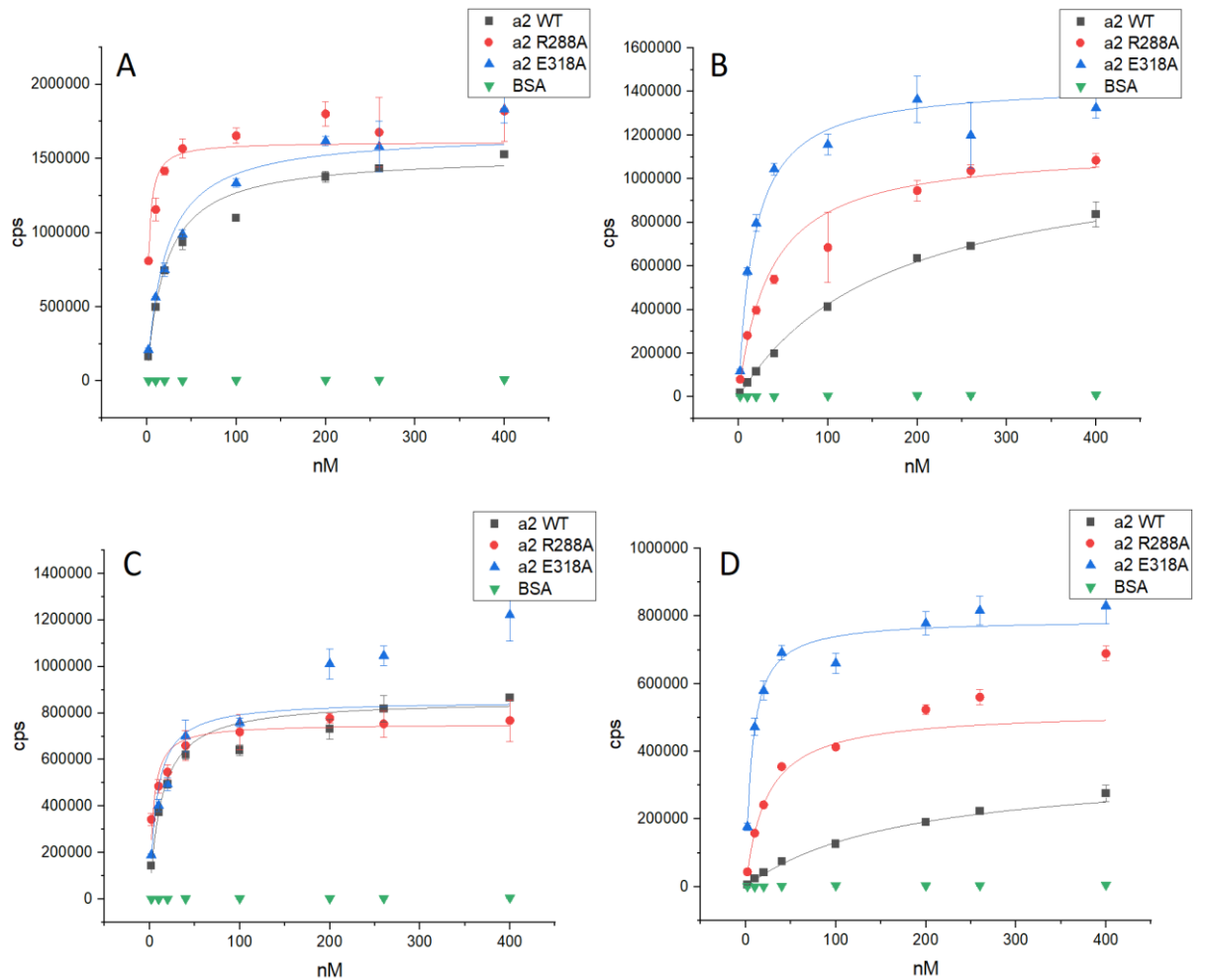


Fig. 12 Jämförelse av kollagenbindning av $\alpha 2$ -vildtyp mot $\alpha 2$ -288A samt $\alpha 2$ -E318A mutationerna med kollagen 1 och 4. A, Kollagenbindning av $\alpha 2$ -vildtyp, -R288A och -E318A till kollagen 1 (andra reningsats). B, kollagenbindning av $\alpha 2$ -vildtyp, -R288A och -E318A till kollagen 4. C, kollagenbindning av $\alpha 2$ -vildtyp, -R288A och -E318A till kollagen 1 (andra reningsats). D, Kollagenbindning av $\alpha 2$ -vildtyp, -R288A och -E318A till kollagen 4.

5.2 Strukturanalys

Strukturerna av de olika konformationerna av $\alpha 1I$ och $\alpha 2I$ studerades med Pymol programmet (version 2.4.1, Schrödinger LLC). Med detta program kan man visualisera hur de olika konformationerna ser ut. Även de olika muterade aminosyror kunde påvisas samt brytning av Arg-Glu-saltbryggan (fig. 13). Kollagenbindande I-domän utan ligand (fig. 14a) kan ses vara i stängda konformation. αC -helix hos $\alpha 1I$ stabiliseras av Arg288-Glu318-saltbryggan som öppnas då kollagenbindningen till MIDAS bryter ner Arg288-Glu318-interaktionen.

I $\alpha 1I$ har man detekterat en så kallad mellanform av kollagenbindande integriner (fig. 14b), denna form har inte detekterats i $\alpha 2I$. Man kan se att i denna form har αC -helix öppnat sig, saltbryggan mellan Arg287–Glu317 har brutits och ger upphov till bindningsmöjlighet. Jämförelse av kollagenbindningen till I-domänen, visar att $\alpha 1I$ binder till kollagenpeptiden på annorlunda sätt än till $\alpha 2I$ (fig. 14, c-d).

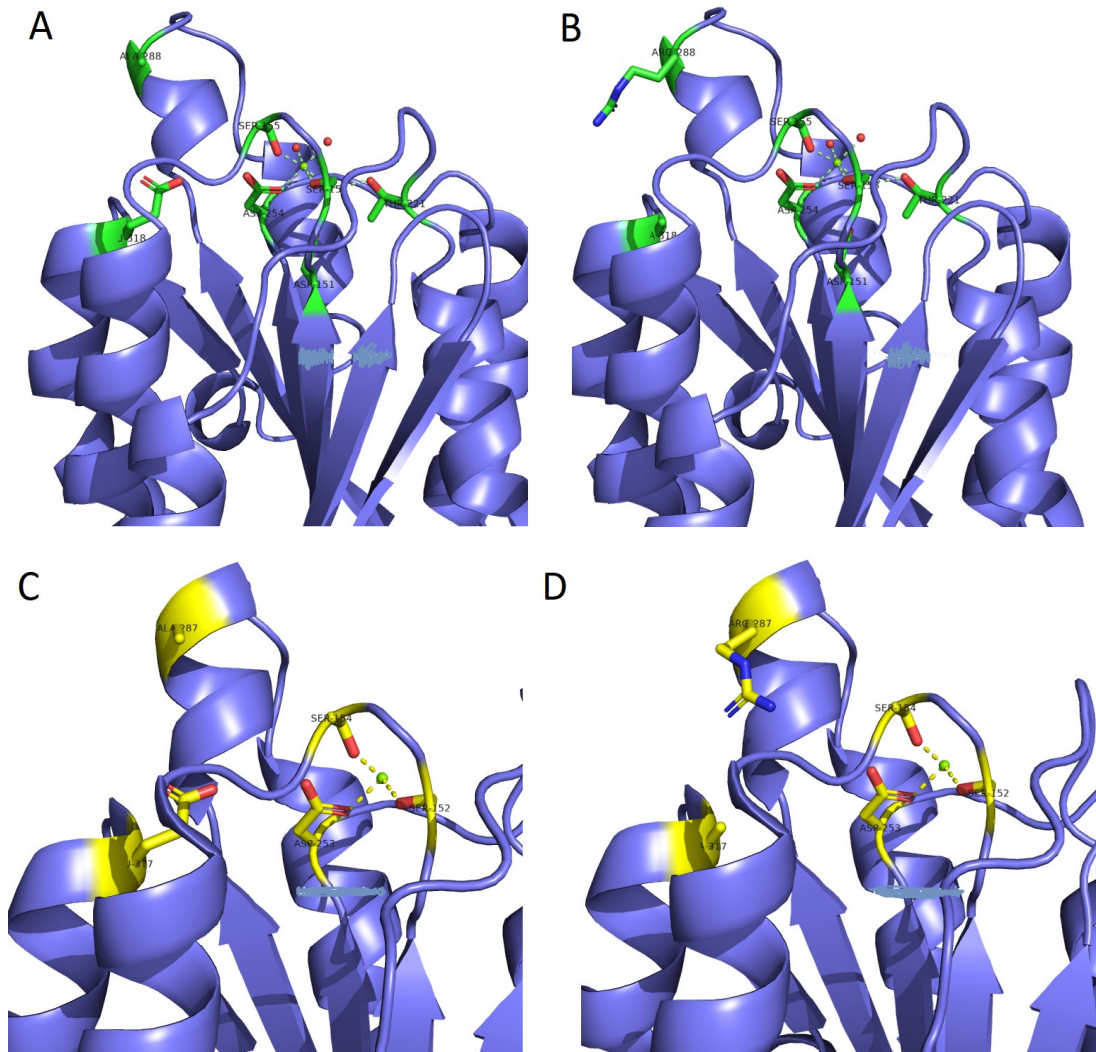


Fig. 13 Närbild av mutationerna R288A, E318A och MIDAS området hos $\alpha 2I$ samt R287A, E317A och MIDAS-motivett hos $\alpha 1I$. A, Närbild av MIDAS och mutation R288A. B, Närbild av MIDAS och mutation E318A. C, Närbild av MIDAS och mutation R287A. D, Närbild av MIDAS och mutation E317A.

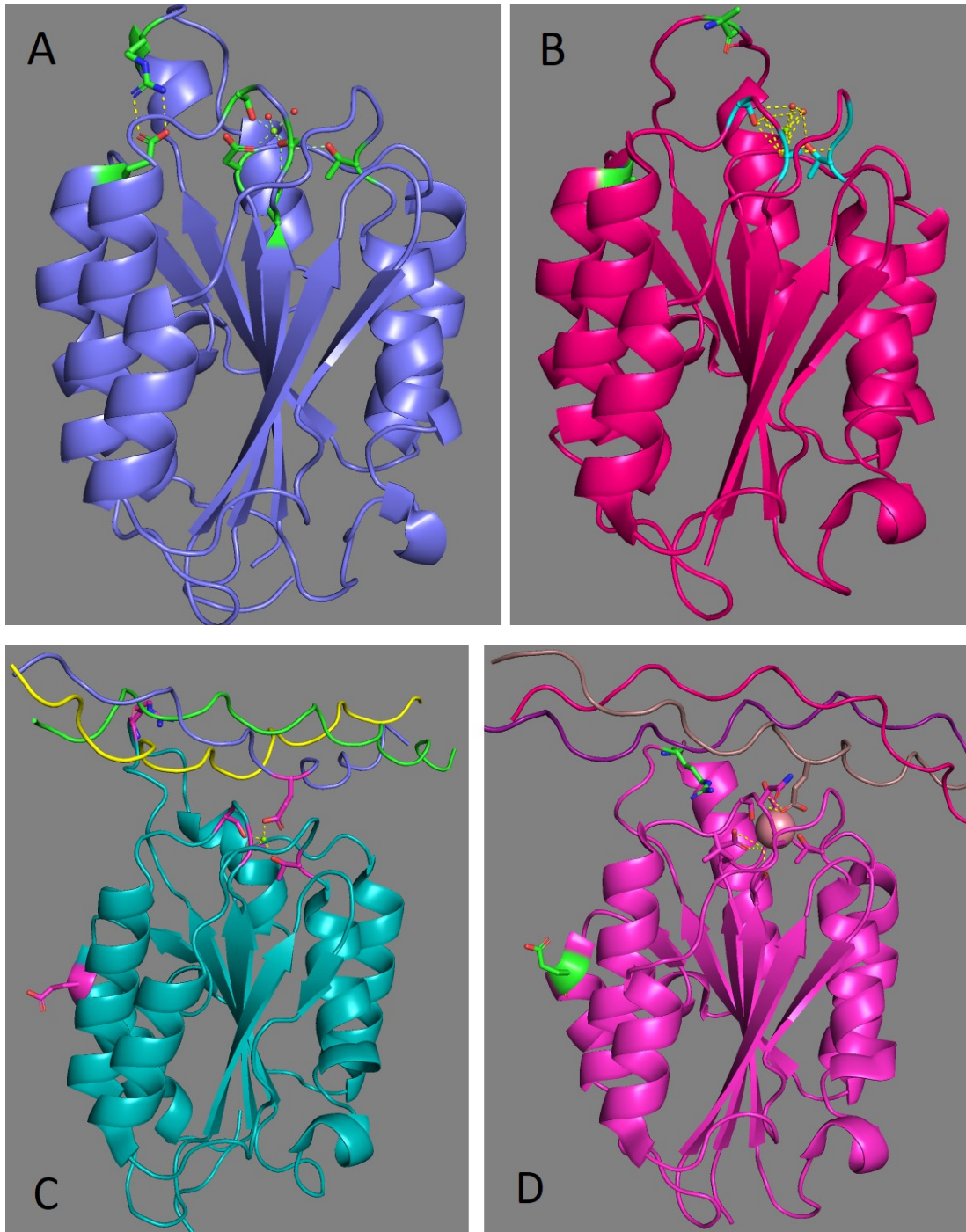


Fig. 14 Jämförelse av kollagenbindande I-domän utan ligand, med ligand och mellanform. A, $\alpha 2\text{I}$ i stängd konformation utan ligand (blå, PDB kod 1AOX). B, $\alpha 1\text{I}$ i mellanform utan ligand (röd, PDB kod 4A0Q). C, $\alpha 1\text{I}$ i aktiverad konformation med ligand (ljusblå, PDB kod 2M32). D, $\alpha 2\text{I}$ i aktiverad konformation med ligand (lila, PDB kod 1DZI).

5.2.1 Skillnader mellan aktiverad $\alpha 1$ - och öppen $\alpha 2$ -struktur

Den aktiverade strukturen hos $\alpha 1\text{I}$ är mycket lik den öppna strukturen hos $\alpha 2\text{I}$, dock är den olik till den öppna formen $\alpha 2\text{I}$ vid MIDAS, αC -helix, helix 6 och helix 7 (fig.

15). Vid aktivering av $\alpha 1\text{I}$ rör metallen sig mot L1, medan vid öppnandet av $\alpha 2\text{I}$ rör sig metallen mot L2. Rörelsen av metalljonen förorsakar att Thr220 i $\alpha 1\text{I}$ binder till metallen via en vattenmolekyl, medan Thr221 i $\alpha 2$ binder direkt till metallen. I både öppnar sig αC -helixen till en slinga. Aminosyrorna Ser284 och Tyr285 hos $\alpha 1\text{I}$ motsvarar Tyr285 och Leu286 hos $\alpha 2\text{I}$ fastän flera andra aminosyror nära MIDAS är konserverade. Ligandbundna $\alpha 2\text{I}$ -strukturen har ingen omsättningshelix 6, dessutom rör sig helix 7 neråt vid kollagenbindningen, vilket som troligtvis händer också vid $\alpha 1\text{I}$ -ligandbindningen (Lahti m.fl., 2011).

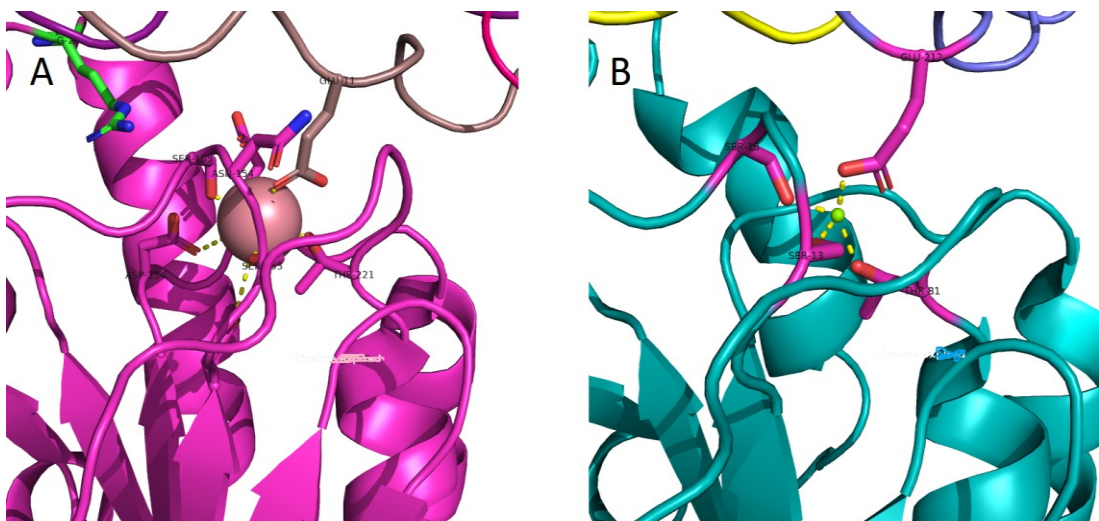


Fig. 15 Jämförelse av ligandbundna $\alpha 1\text{I}$ - och $\alpha 2\text{I}$ -integriner. A, $\alpha 1\text{I}$ i närbild på MIDAS (ljusblå), med närliggande aminosyror mot metalljonen. B, $\alpha 2\text{I}$ i närbild på MIDAS (lila), med närliggande aminosyror mot metalljonen.

6 Diskussion

6.1 Kollagenbindningsstudier

På basen av kollagenbindningsstudier kan man se att $\alpha 1\text{I}$ vildtypen binder starkare till kollagen 1 än kollagen 4, medan $\alpha 1\text{I}$ -R287A binder med ungefär samma styrka till kollagen 1 samt kollagen 4, med varierande K_d värden. Dessa studier visade också att $\alpha 1\text{I}$ -R287A binder sig starkare till kollagen 1 (32 ± 2 nM) samt kollagen 4 (25 ± 2 nM) i första reningssatsen, medan sämre till både kollagen 1 (107 ± 5 nM) samt kollagen 4 (135 ± 9 nM) i andra reningssatsen. Dessa värden visar att första reningssatsen varit bättre än den andra reningssatsen för mutationen. $\alpha 1\text{I}$ -vildtypens bindningsstyrka är

på ungefär samma nivå vid båda reningsatserna. Vid första reningsatsen är $\alpha 1I$ -R287A bindningsstyrkan större än $\alpha 1I$ vildtypens, medan vid andra reningsatsen är $\alpha 1I$ -R287A bindningsstyrkan ungefär lika med vildtypen. $\alpha 1I$ -vildtypens B_{max} värden är dock sämre vid första reningsatsen än vid andra reningsatsen. ($\alpha 1I$ -E317A var också med i experimentet men den uppvisade tyvärr väldigt dålig bindningskapacitet och togs inte med, men de publicerade K_d värdena för E317A är 33,9 nM för kollagen 1 och 8,4 nM för kollagen 4 (Lahti, m.fl., 2011)). I fig. 11 kan man se att kurvorna är inte så branta och mutationen påverkar inte så mycket på bindningsstyrkan. Dessa skillnader kan bero på hurdan denna proteinsats varit, misstag på vägen eller möjliga små kontaminationer. Med dessa resultat kan man inte säga ifall vildtypen eller mutanten som är bättre på kollagenbindningen, flera experiment behövs att få fram ett bättre resultat och svar på frågan.

På basen av dessa studier kan man se att $\alpha 2I$ -vildtypen samt $\alpha 2I$ -R288A binder starkare till kollagen 1 än kollagen 4, medan $\alpha 2I$ -E318A binder starkare till kollagen 4 än kollagen 1. Dessutom binder båda mutationerna starkare till både kollagen 1 samt kollagen 4, än vad $\alpha 2I$ -vildtypen. Båda av de nämnda experimenten uppvisade inte specifika olikheter mellan dem, bara en liten sjunkning eller höjning av K_d värden men inga stora förändringar. Experimentet med $\alpha 2I$ -vildtypen samt mutationen visade att mutationerna är bättre vid kollagenbindningen av kollagen 1 och 4. Vid kollagen 1 uppvisade $\alpha 2I$ -R288A en starkare bindning och $\alpha 2I$ -E318A en lite svagare bindning, medan kollagen 4 uppvisar $\alpha 2I$ -E318A en starkare bindning och $\alpha 2I$ -R288A en lite mildare bindning. I fig. 12 kan man se att kurvorna blev starkare med mutationerna än med vildtypen.

En sak som kunde påverka på dessa experiment är att $\alpha 1I$ - samt $\alpha 2I$ -vildtypen var av den långa varianten medan mutationerna var av den korta varianten. Detta kan ge en liten fel marginal och därmed kan resultaten vara lite olika än med korta variantens $\alpha 1I$ - och $\alpha 2I$ -vildtypen.

6.2 3D-strukturanalyser

Vid aktivering av $\alpha 1I$ och $\alpha 2I$ har upptäckts olika former för dem eftersom strukturen hos $\alpha 1I$ har kunnat kristalliseras utan ligand och strukturen hos $\alpha 2I$ med liganden. Därmed kunde inte motsvarande former för dem jämföras. När man jämför dessa nya strukturer med den publicerade $\alpha 1I$ -C139S/E317A strukturen (Lahti, m.fl., 2011), har

$\alpha 2\text{I-C140S/E318A}$ inte lyckats kristalliseras utan ligand och den är i öppen konformation med bunden ligand (syra) som förorsakar liknande konformationsförändring som kollagenpeptid. Man kan tydligt se skillnaden mellan mutationen samt vildtypen när saltbryggan bryts och ger möjlighet för större kollagenbindningskapacitet. $\alpha 1\text{I}$ och $\alpha 2\text{I}$ har liknande MIDAS-motiv med lite olika vinklar och placeringar av närliggande aminosyror. Strukturen hos R/A-mutationer har inte bestämts i avhandlingen, men projektets nästa steg är att lösa deras 3D-struktur.

6.3 Kristallisering

Kristalliseringen utfördes enbart två gånger i slutet av pro gradu arbetet och tyvärr bildades inga kristaller som kunde ha använts eller studerats vidare.

7 Slutord

Jobbandet med denna pro gradu-avhandling har varit en lärorik upplevelse, där jag lärt mig massor av nya tekniker och har använt nya maskiner. Till slut vill jag tacka mina handledare Docent Jarmo Käpylä Åbo Univeritet, som hjälpt till med labbarbetsprocessen av pro gradu-avhandlingen samt Professor Tiina A Salminen Åbo Akademi, som hjälpt till med strukturanalys och skrivande processen av pro gradu-avhandlingen.

8 Källor

Ahmadiankia N., Neshati V., Neshati Z., Swildens J., De Vries A. (2012). Generation of helper plasmids encoding mutant adeno-associated virus type 2 capsid proteins with increased resistance against proteasomal degradation. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 16.

Andersen D. C., Krummen L. (2002). Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 13 (2): 117-123.

Bachmann M., Kukkurainen S., Hytönen V. P., Wehrle-Haller B. (2019). Cell adhesion by integrins. *Physiological Reviews*. 99 (4), 1655-1699.

Baneyx F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*. 10 (5): 411-421.

Barczyk M., Carracedo S., Gullberg D. (2010). Integrins. *Cell Tissue Res*. 339 (269).

Brennan M., Cox D. (2014). The therapeutic potential of I-domain integrins. *Adv Exp Med Biol*. 819: 157–78.

Cereghino J. L., Cregg J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*. 24 (1): 45-66.

Choi K. H. (2012). Crystallization. *International Tables for Crystallography*. Vol. F (4.4): 142-143.

De la Campa A. G., Sprinhorn S. S., Kale P., Lacks S. A. (1988). Proteins encoded by the DpnI restriction gene cassette. Hyperproduction and characterization of the DpnI endonuclease. *J Biol Chem*. 263 (29): 14696-14702.

Elsasser S., Schmidt M., Finley D. (2005). Characterization of the Proteasome Using Native Gel Electrophoresis. *Methods in Enzymology*. 398: 353-363.

Filep C., Guttman A. (2021). Effect of the monomer cross-linker ratio on the separation selectivity of monoclonal antibody subunits in sodium dodecyl sulfate capillary gel electrophoresis. *Analytical Chemistry*. 93 (7): 3535-3541.

Gullberg D. E. och Lundgren-Åkerlund E. (2002). Collagen-binding I domain integrins – what do they do?. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*. 37 (1): 3-54.

Harburger D. S., Calderwood D. A. (2009). Integrin signalling at a glance. *Journal of Cell Science*. 122: 159-163.

Heino J. (2014). Cellular signaling by collagen-binding integrins. *Adv Exp Med Biol*. 819: 143-55.

Hill H. D., Straka J. G. (1988). Protein determination using bicinchoninic acid in the presence of sulfhydryl reagents. *Analytical Biochemistry*. 170 (1): 203-208.

Jokinen J., White D. J., Salmela M., Huhtala M., Käpylä J., Sipilä K., Puranen J. S., Nissinen L., Kankaanpää P., Marjomäki V., Hyypiä T., Johnson M. S., Heino J. (2009). Molecular mechanism of $\alpha 2\beta 1$ integrin interaction with human echovirus 1. *The EMBO Journal*. 29: 196-208.

Kaur Jas., Kumar A., Kaur Jag. (2018). Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: roadblocks and reinforcements. *International Journal of Biological Macromolecules*. 106: 803-822.

Khan M. A., Jeong K-H., Ahn H., Lee Y-J., Kim E-J., Glanville T. D., Kim J-H., Choi D-Y. (2013). Development of an avian influenza virus inactivation evaluation method using dialysis cassette in animal manure and mortality disposal systems. *Biosystems Engineering*. 114 (1): 60-64.

Kueng W., Silber E., Eppenberger U. (1989). Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Analytical Biochemistry*. 182 (1): 16–19.

Käpylä J., Jääliinoja J., Tulla M., Ylöstalo J., Nissinen L., Viitasalo T., Vehviläinen P., Marjomäki V., Nykvist P., Säämänen A-M., Farndale R. W., Birk D. E., Ala-Kokko L., Heino J. (2004). The fibril-associated collagen IX provides a novel mechanism for cell adhesion to cartilaginous matrix. *The Journal of Biological Chemistry*. 279 (49): 51677-51687.

Lahti M., Blight E., Niskanen H., Parkash V., Brandt A-M., Jokinen J., Partikainen P., Käpylä J., Heino J., Salminen T. A. (2011). Structure of collagen receptor integrin $\alpha 11$ domain carrying the activation mutation E317A. *The journal of biological chemistry*, 286 (50), 43343-43351.

Lane L. C. (1978). A simple method for stabilizing protein-sulfhydryl groups during SDS-gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*. 86 (2): 655-664.

Levites Y., O’Nuallain B., Puligedda R. D., Ondrejcek T., Adekar S. P., Chen C., Cruz P. E., Rosario A. M., Macy S., Mably A. J., Walsh D. M., Vidal R., Solomon A., Brown D., Rowan M. J., Golde T. E. Dessain S. K. (2015). A human monoclonal IgG that binds A β assemblies and diverse amyloids exhibits anti-amyloid activities *In Vitro* and *In Vivo*. *The Journal of Neuroscience*. 35 (16): 6265-6276.

Li C., Arakawa T. (2019). Agarose native gel electrophoresis of proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*. 140: 668-671.

MBinfo. (2018). MBinfo defining Mechanobiology. <https://www.mechanobio.info/what-is-mechanosignaling/what-is-the-extracellular-matrix-and-the-basal-lamina/what-is-integrin/how-is-integrin-activated/>.

McPherson A. Gavira J. A. (2013). Introduction to protein crystallization. *Structural Biology Communications*. 70: 2-20.

Moreno-Bautista G., Tam K. C. (2011). Evaluation of dialysis membrane process for quantifying the in vitro drug-release from colloidal drug carriers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 389 (1-3): 299-303.

Morisette S. L., Almarsson Ö., Peterson M. L., Remenar J. F., Read M. J., Lemmo A. V., Ellis S., Cima M. J., Gardner C. R. (2004). High-throughput crystallization: polymorphs, salts, co-crystals and solvates of pharmaceutical solids. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 56 (3): 275-300.

Nevo J. (2021). Novel Players in the Integrin Signaling Orchestra: TCPTP and MDGI. *Annales Universitatis Turkuensis*.

Newman J., Egan D., Walter T. S., Meged R., Berry I., Jelloul M. B., Sussman J. L., Stuart D. I., Perrakis A. (2005). Towards rationalization of crystallization screening for small- to medium-sized academic laboratories: the PACT/JSCG+ strategy. *Biological Crystallography*. D61: 1426-1431.

Nicolas P., Lassalle V. L., Ferreira M. L. (2017). Quantification of immobilized *Candida antarctica* lipase B (CALB) using ICP-AES combined with Bradford method. *Enzyme and Microbial Technology*. 97: 97–103.

Nieuwenhuis B., Haenzi B., Andrews M. R., Verhaagen J., Fawcett J. W. (2018). Integrins promote axonal regeneration after injury of the nervous system. *Biological Reviews*. 93 (3): 1339-1362.

Panja S., Saha S., Jana B., Basu T. (2006). Role of membrane potential on artificial transformation of *E. coli* with plasmid DNA. *Journal of Biotechnology*. 127 (1): 14–20.

Pingoud A., Jeltsch A. (2001). Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res*. 2001. 29 (18): 3705-3727.

Prakash G. D., Anish R. V., Jagadeesh G., Chakravorty D. (2011). Bacterial transformation using micro-shock waves. *Analytical Biochemistry*. 419 (2): 292-301.

Rahimzadeh M., Sadeghizadeh M., Najafi F., Arab S., Mobasheri H. (2016). Impact of heat shock step on bacterial transformation efficiency. *MBRC*. 5 (4): 257–261.

Shenoy A. R., Visweswariah S. S. (2003). Site-directed mutagenesis using a single mutagenetic oligonucleotide and DpnI digestion of template DNA. *Analytical Biochemistry*. 319: 335-336.

Takagi, J., Springer, T.A. (2002). Integrin activation and structural rearrangement. *Immunology reviews volume*, 186 (1), 141–163.

Tulla M., Lahti M., Puranen S., Brandt A-M., Käpylä J., Domogatskaya A., Salminen T. A. Tryggvason K., Johnson M. S., Heino J. (2008). Effects of conformational activation of integrin α 1I and α 2I domains on selective recognition of laminin and collagen subtypes. *Experimental Cell Research*. 314: 1734-1743.

Wages J. M. Jr. (2005). Polymerase chain reaction. *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*. p. 243-250.

Walters R. R. (1985). Affinity Chromatography. *Analytical chemistry*. 57 (11): 1099-1114.

Zhang Y., Wang H. (2011). Integrin signalling and function in immune cells. *Immunology*. 135 (4): 268-275.

Zeltz C., Gullberg D. (2016). The integrin-collagen connection--a glue for tissue repair? *J Cell Sci*. 129 (4): 653-64.

Zor T., Selinger Z. (1995). Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies. *Analytical Biochemistry*. 236 (2): 302-308.