

國立臺灣大學醫學院微生物學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Microbiology

College of Medicine

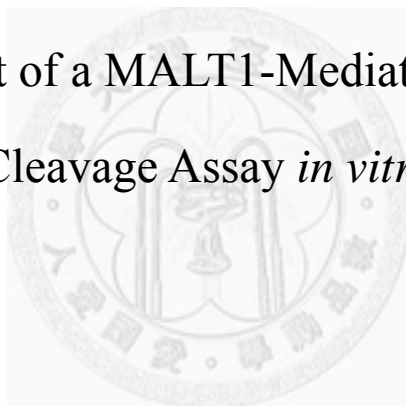
National Taiwan University

Master Thesis

在試管中 MALT1 蛋白質切割反應系統的建立

Establishment of a MALT1-Mediated Proteolytic

Cleavage Assay *in vitro*



張健治

Chien-Chih Chang

指導教授：董馨蓮 博士

Advisor: Shin-Lian Doong, Ph.D.

中華民國九十九年七月

July, 2010

目 錄

口試委員會審定書	i
中文摘要	ii
英文摘要	iv
第 1 章：序論	1
一、CBM 複合體參與在活化 NF- κ B	1
二、MALT1	2
三、BCL10	6
四、A20	8
第 2 章：研究目的	11
第 3 章：材料與方法	12
一、抗體來源	12
二、實驗使用之質體	12
三、製備勝任細胞	12
四、細胞轉形	13
五、小量質體製備	13
六、大量質體製備	13
七、細胞(cell lines)培養	15
八、細胞轉染	15
九、蛋白質濃度測定	15
十、SDS-PAGE	16
十一、西方墨點分析法	16
十二、免疫沉澱法與去磷酸酵素作用	17
十三、TPA/ionomycin treatment	17
十四、His-tag 融合蛋白質的自然方式純化	18
十五、His-tag BCL10 融合蛋白質的變性方式純化	18
十六、T7-tag MALT1 融合蛋白質的純化	19
十七、 <i>In vitro</i> cleavage of BCL10	20
十八、銀染色	20
十九、 <i>In vitro</i> 發射螢光 (fluorescence) 胜肽切割 assay	21
第 4 章：結果	22
一、BCL10 受 MALT1 誘導而產生切割現象 <i>in vivo</i>	22
二、BCL10 受 MALT1 誘導而產生切割現象 <i>in vitro</i>	22
第 5 章：討論	27
第 6 章：參考文獻	35
圖表附錄	40

圖表目錄

圖一、在真核細胞表現的 MALT1 constructs.....	40
圖二、BCL10 受 MALT1 誘導而產生切割現象.....	41
圖三、在細菌中可以表現完整的 MALT1 蛋白質.....	42
圖四、在細菌中可以表現完整的 BCL10 蛋白質.....	43
圖五、BCL10 蛋白質純化的純度.....	44
圖六、在 Paracaspase cleavage buffer A 中 MALT1 可以切割 BCL10.....	45
圖七、含有 MALT1 的 total lysate 可以切割 BCL10.....	46
圖八、T7-tag MALT1 蛋白質純化的純度.....	47
圖九、T7-tag 純化的 MALT1 可以切割 BCL10.....	48
圖十、His-tag MALT1 constructs.....	49
圖十一、在細菌中可以表現完整的 His-tag MALT1 蛋白質.....	50
圖十二、His-tag MALT1 蛋白質純化的純度.....	51
圖十三、純化的 His-tag MALT1 可以對 BCL10 進行切割.....	52
圖十四、MALT1 可以切割 BCL10 模擬 R228 切位胜肽 Ac-LRSR-AMC.....	53
附圖一、CBM 複合體參與在不同受體引起 NF- κ B 活化.....	54
附圖二、BCL10 Leucine225 對於 MALT1 誘導切割作用是重要的.....	55
附圖三、MALT1 的 CLD 和 C 端區域對於誘導 BCL10 切割非常重要.....	56
附圖四、pCMV6XL5-MALT1C464A-myc 質體構築.....	61
附圖五、pCMV6XL5-MALT1 Δ 644-679-myc 質體構築.....	62
附圖六、pET21-MALT1C464A-myc 質體構築.....	63
附圖七、pET21a-gyrBMALT1-His-tag 質體構築第一階段.....	64
附圖八、pET21a-gyrBMALT1-His-tag 質體構築第二階段.....	65
附圖九、pET21a-gyrBMALT1-His-tag 質體構築第三階段.....	66
附圖十、pET21a-gyrBMALT1-His-tag 質體構築第四階段.....	67

附圖十一、pET21a-gyrBMALT1-His-tag 質體構築第五階段.....68

表一、使用之表現質體.....69



國立臺灣大學 (碩) 博士學位論文

口試委員會審定書

中文題目：在試管中MALT1蛋白質切割反應
系統的建立

英文題目：Establishment of a MALT1-Mediated
Proteolytic Cleavage Assay in vitro

本論文係張健治君(學號R997445131)在國立臺灣大學微生物學所完成之碩(博)士學位論文，於民國99年7月16日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

張建治

(簽名)

(指導教授)

陳美如

周珠欒

系主任、所長

陳小翠

(簽名)

摘要

T-cell receptor(TCR)或B-cell receptor(BCR)在接受抗原刺激後，CARMA1和BCL10以及MALT1三種蛋白質形成的CBM複合體，會參與活化NF- κ B的訊息傳導，缺一不可。其中MALT1是一種paracaspase，其結構和序列和caspase有極高同源性及相似性，但是在生理功能上卻有著極大差異。在2000年時，Uren *et al.* 第一個報導MALT1的論文，指出MALT1無法切割caspase的已知受質，曾分析其3D立體結構，指出MALT1可能對於非帶價胺基酸有較好的專一性，而非caspase在P1位置上的帶負價胺基酸----天冬門胺酸(Asp)。長久以來，大家都不清楚MALT1是否真正具有蛋白酶切割能力，更不清楚其受質為何。

我們先前實驗室的研究發現，共同轉染BCL10和MALT1時，發現BCL10有被誘導切割的現象；利用一系列刪除構築(deletion constructs)來研究切割位置，發現BCL10一旦失去Leucine225這個胺基酸後就無法被切割，之後將Leucine225突變成天冬門胺酸(Aspartate)，同樣看不到被切割的現象，這樣的結果和Uren在2000年發表的論點吻合。但2008年有兩篇論文報導MALT1具切割BCL10和A20的能力，利用蛋白質序列比對(alignment)並說明MALT1能夠切割在P1位置帶正電胺基酸----精胺酸，雖然切割兩者的有無對於NF- κ B不會造成嚴重影響。

本篇論文主要目的是建立MALT1的*in vitro* cleavage assay，以BCL10當作切割模型，探討MALT1的生化切割特性。首先在*in vivo*下分別共同轉染MALT1、MALT1-H415、MALT1-C464、或MALT-C539與BCL10GFP入293T，確定MALT1及MALT-C539可以進行切割，一旦MALT1的catalytic diad (H415-C464)突變即失去蛋白切割活性。之後將系統移到細菌內，大量表現MALT1及BCL10，利用His-tag純化將MALT1及BCL10純化出來。為了assay MALT1的活性及其專一性，除了使用BCL10蛋白質，還有廣泛被拿來assay caspase活性的發射螢光胜肽，模擬BCL10L225或R228切割位置。我們發現，*in vitro*下MALT1必需要在1.0M ammonium citrate才能切割BCL10。

針對BCL10可能切割位置進行一系列點突變，構築並表現BCL10L225A、BCL10L225E、BCL10L225G、BCL10L225Q、BCL10L225R、BCL10L225T、BCL10R228G及BCL10R228I蛋白質。結果發現MALT1可以對BCL10L225R及BCL10L225T進行切割，但其他的突變蛋白質皆無法被切割。另一方面使用模擬BCL10切位L225的發射螢光胜肽 Ac-FLPL-AMC及R228 Ac-LRSR-AMC與MALT1作用進行實驗。實驗結果暗示著，MALT1似乎對於P1 site為正電胺基酸有較好的親和性，但是不論L225或R228對於切割與否都相當重要。

除了切點位置的突變構築外，也試圖在*in vitro*下探討，如果BCL10的CARD發生構形改變--BCL10L41R，或是BCL10失去和MALT1結合作用—BCL10 Δ 107~119對於MALT1切割的影響。在*in vivo*中，BCL10L41R及BCL10 Δ 107~119皆無法觀察到被MALT1切割的現象。實驗結果發現BCL10L41R及BCL10 Δ 107~119皆能夠被切割，暗示著BCL10的C端序列保持不變，在高鹽(1.0 M ammonium citrate)情況下，雖然切割能力下降許多，但MALT1都能夠進行切割。

關鍵詞：BCL10，NF- κ B，lymphoma，paracaspase，CBM複合體

Abstract

MALT1 (mucosa-associated-lymphoid-tissue lymphoma-translocation gene 1) acts as an adaptor protein with proteolytic activity that controls T/B-cell activation by regulating key molecules in T/B-cell-receptor-induced signaling pathways. It plays a central role in MALT lymphoma by its interaction with BCL10 and enforced activation of NF- κ B signaling.

Computer assisted amino acid sequence analysis indicated that MALT1 shared sequence similarity with caspases. However, MALT1 was not able to cleave substrates of caspases. It was, therefore, defined as a “paracaspase”. A 3D model of the “caspase-like domain” of MALT1 predicted its specificity toward uncharged residues in the P1 position.

Previous study in our laboratory demonstrated the proteolytic cleavage of BCL10 by MALT1 in 293T cells. Serial deletion constructs were constructed to map the probable cleavage site. Since deletion of single amino acid residue--Leu225 of BCL10 abolished its ability to be cleaved, suggesting a probable cleavage site at Leu225. The result was consistent with the hypothesis that MALT1 might show specificity toward uncharged residues in the P1 site. In 2008, MALT1 was reported to cleave A20 and BCL10 with specificity toward basic amino acid residue--Arginine.

In the present study, we would like to set up an *in vitro* proteolytic cleavage assay of MALT1 to characterize its substrate specificity. His-tag fusion constructs of full length MALT1 and catalytic inactive mutants (MALT1-H415A ; MALT1-C464A) were generated. Expression of His-tag MALT1 and mutants were performed in Arctic expression competent *E. coli* cell. Though major proportion of MALT1 were in insoluble inclusion bodies, we were able to purify sufficient soluble form of MALT1

with Ni-Column. Purified His-tag BCL10 proteins from BL21 *E. coli* expression system were utilized as substrates in the *in vitro* cleavage assay. Two reported assay buffers were tested (Buffer1 : 50mM MES pH 6.8 , 150mM NaCl , 10%(wt/vol) sucrose , 0.1%(wt/vol) CHAPS , 10mM dithiothreitol , 1 M ammonium citrate ; Buffer2 : 50 mM Tris-HCl , pH 7.4 , 60 mM NaCl , 10 mM KCl , 20 mM MgCl₂ , 100 mM CaCl₂ and 10 mM dithiothreitol). The reaction was performed at 30°C for 16 hours. BCL10 was found to be processed by wild-type MALT1 but not catalytic inactive mutants in buffer1. The removal of ammonium citrate completely abolish the reaction.

Site-directed mutagenesis was performed to investigate the role of amino acid residues Leu225 and Arg228 of BCL10 played as a substrate of MALT1. Degenerate primers were utilized to generate the following mutants : BCL10L225A 、 BCL10L225E 、 BCL10L225G 、 BCL10L225Q 、 BCL10L225R 、 BCL10L225T 、 BCL10R228G and BCL10R228I. MALT1 was found to be able to cleave BCL10L225R and BCL10L225T, albeit at a less efficient level as compared to wild-type BCL10. All the other mutants (BCL10L225A 、 BCL10L225E 、 BCL10L225G 、 BCL10L225Q 、 BCL10R228G and BCL10R228I) lost their abilities of being processed by MALT1. BCL10-derived fluorogenic peptides--Ac-FLPL-AMC and Ac-LRSR-AMC were also tested in the *in vitro* assay for being substrates. A time-dependent in the fluorescence intensity was observed in the reaction using Ac-LRSR-AMC but not using Ac-FLPL-AMC, suggesting its specificity toward basic amino acid residue in P1 position.

Caspase recruitment domain (CARD) mutant (BCL10L41R) of BCL10 failed to interact with other CARD-containing proteins. Deletion of amino acid residues 107~119 of BCL10 (BCL10 Δ 107~119) resulted in the poor interaction with MALT1. *In vivo*, MALT1 failed to cleave both mutants. However, in the presence of ammonium citrate,

incubation of purified MALT1 with BCL10L41R or BCL10 Δ 107~119 *in vitro* resulted in cleavage albeit at a less efficient level.

Key words : BCL10 , NF- κ B , lymphoma , paracaspase , CBM complex



第 1 章、序論

一、CBM 複合體參與活化 NF- κ B

CBM 複合體是由 CARD containing protein-BCL10-MALT1 三種蛋白質所組成的複合體，CARD-containing protein 的角色在不同組織分別由不同蛋白分子所扮演，CARMA1(CARD11 或 Bimp3)主要存在於血球細胞(hematopoietic cell)中；CARMA3(CARD10 或 Bimp1)則是廣為在非血球細胞(non-hematopoietic cell)中；有別於前兩者，CARD9 只有 N 端的 CARD domain 及 Coiled coil domain，主要分佈在骨髓系細胞。在不同細胞會選用不同 CARD-containing protein 組成 CBM 複合體來活化 NF- κ B(Bertin *et al.*, 2000；Wang *et al.*, 2001；Wegener *et al.*, 2007)。

CBM 複合體除了參與在淋巴系(T 細胞、B 細胞、NK 細胞)的免疫受體(immunoreceptors)引起的 NF- κ B 活化之外，也參與在一些 ITAM-containing receptor 及 GPCR 引起 NF- κ B 訊息徑途中，像是 myeloid 細胞、mast cell、dendritic cell。因此 CBM 複合體又分為淋巴系 L(lymphoid)-CBM、骨髓系 M(myeloid)-CBM 複合體、及在 GPCR(G-protein coupled receptor)的訊息傳導(附圖一)。

淋巴系的 CBM 複合體活化途徑中，TCR(T cell receptor)、BCR(B cell receptor) 及 NK 細胞受體接受到抗原刺激後，經由一系列的訊息傳遞引發酪胺酸激酶(tyrosine kinase)活化而去磷酸化下游分子，使 PLC- γ (phospholipase C- γ)能將細胞膜上的 PIP2(inositol phospholipids) 水解成 IP3(inositol triphosphates) 及 DAG(1,2-Diacylglycerol)。IP3 能夠增加細胞內鈣離子濃度，DAG 能夠活化 PKC，兩者能協同作用(synergize)達到 NF- κ B 活化高鋒。PKC 磷酸化 CARMA1 上的 linker，造成 CARMA1 構形發生改變，使得 CARMA1 的 CARD domain 攤開能與 BCL10 的 CARD domain 做相互作用，BCL10 又與 MALT1 有結合作用(association)，即形成 CBM 複合體。CBM 複合體形成後，透過 TRAF6 能在自身及 IKK γ (NEMO)做泛素化(ubiquitination)，吸引(recruit)TAB2/TAK1 將 IKK β 磷酸化造成 IKK 複合體活化(Wang *et al.*, 2001)，進而磷酸化 I κ B(inhibitor of κ B)，I κ B 降

解而使得 NF- κ B 進核表現下游基因(Rawlings *et al.*, 2006 ; Thome, 2008)。骨髓系的 CBM 複合體活化途徑中，C 則是另一個 CARD-containing protein，CARD9；而在 GPCR 活化 NF- κ B 途徑中的 CBM 複合體，C 則是 CARMA3。

二、MALT1

(Mucosa-Associated-Lymphoid-Tissue Lymphoma-Translocation Gene 1)

MALT1 的發現

MALT1 最早於 low-grade MALT lymphoma 病例中發現，由於病患發生基因轉位 t(11;18)(q21;q21)，造成 cIAP2(cellular inhibitor of apoptosis protein 2)基因的 N 端和 MALT1 C 端完整的 caspase-like domain 發生融合現象，形成 cIAP2-MALT1(Akagi *et al.*, 1999 ; Dierlamm *et al.*, 1999)。這樣的融合蛋白質 N 端具有三個完整 BIR (Baculovirus IAP repeat)domain，能夠藉由 N 端進行蛋白聚合(oligomerization)持續活化 NF- κ B，使得細胞不正常增生，這種 MALT lymphoma 病患對於抗生素治療沒有反應(Uren *et al.*, 2000 ; Zhou *et al.*, 2005 ; Lucas *et al.*, 2001)。

MALT1 的蛋白質組成與特性



MALT1 具有 824 個胺基酸，N 端包含一個 Death Domain(DD) (48-122 amino acid)，接著為兩個 Immunoglobulin-like domain (Ig-like domain)(128-194 及 231-295 amino acid)，一個 caspase like domain (CLD)(333-456 amino acid)，以及第三個 Ig-like domain 位置在 C 端(Zhou *et al.*, 2005)。

透過 two-hybrid 及共免疫沉澱(co-immunoprecipitation)實驗，得知 MALT1 和 BCL10 有相互作用(Uren *et al.*, 2000 ; Lucas *et al.*, 2001)，Ig-like domain 中的 139-330

amino acid 已知平時即可與 BCL10 (107-119 amino acid)結合(association)，當 TCR/BCR 接收刺激後，BCL10 藉此結合作用促使 MALT1 產生聚合反應(oligomerization)，活化下游蛋白質而調控 NF- κ B 活性(Lucas *et al.*, 2001)。Caspase-like domain 具有蛋白切割活性，目前已知的受質有 A20 以及 BCL10(後詳述)(Coornaert *et al.* 2008; Rebeaud *et al.* 2008)。第三個 Ig-like domain 已知可被泛蛋白化(ubiquitination)，做為一個吸引 IKK γ (NEMO)的 docking site。而 TRAF6 為 E3 ligase，可藉由 MALT1 C 端三個推論序列(Pro-X-Glu-X-X-aromatic/acidic)的 binding motif (Zhou *et al.*, 2005) (309-319, 651-657 以及 804-809 amino acid)與 MALT1 結合活化下游 IKK complex(Sun *et al.*, 2004)，至於 MALT1 其 Death Domain 目前功能未明。

MALT1 的分子機制

在 TCR 引起的 NF- κ B 訊息傳導中，MALT1 必需參與並形成 CBM 複合體，CBM 複合體能將 TCR-proximal 蛋白激酶(kinase)的活性分程傳遞(relay)至 IKK 複合體。IKK 複合體在 I κ B 上進行磷酸化作用，造成 I κ B 短暫降解並使得 NF- κ B 能夠進核表現下游基因，這也是所謂 NF- κ B 活化的 canonical 途徑。許多報導也顯示在 CBM-dependent 的 T 細胞活化中，MALT1 其扮演的 scaffold protein 功能及蛋白切割活性是相當重要的(Thome, 2008)。

MALT1 為一個 scaffold protein

在抗原刺激受體後，MALT1 透過 BCL10 和 CARMA1 形成 CBM 複合體，有可能 MALT1 直接和 CARMA1 的 coiled-coil domain 的相互作用使得 CBM 複合體的形成更加穩定。MALT1 的重要功能是扮演一個 scaffold protein，連接 CBM 複合體及吸引(recruit)下游 TRAF6，TRAF6 的泛素化活性能夠活化 IKK 複合體至 NF- κ B(Thome, 2008)。

MALT1 及泛素化對 IKK 複合體的活化

在 MALT1-dependent 的 IKK 複合體活化中，MALT1 因為 BCL10 而形成聚合反應，此時 MALT1 會吸引並活化 TRAF6 這個 E3 ligase，TRAF6 在 IKK γ (NEMO) 上進行泛素化而活化 IKK 複合體。除此之外，也有報導指出 MALT1 能促進 TRAF6 的自我泛素化(self-ubiquitylation)而活化 IKK 複合體。被泛素化的 TRAF6 也可吸引 TAB2(TAK-binding protein 2)和 TAK1，TAK1 在 IKK α 及 IKK β 進行磷酸化而活化 IKK 複合體(Sun et al., 2004)。

MALT1 也被報導能被 TRAF6 或內在的泛素酶活性所自我泛素化，C 端被泛素化的 MALT1 可以提供一個吸引 IKK γ 的 docking site 因此可以吸引 IKK 複合體。(Zhou et al., 2005)。

MALT1 蛋白質切割活性及 NF- κ B 的活性

Uren 等人一開始先以胺基酸序列做分析比對(alignment)，發現 MALT1 的胺基酸序列及 domain 結構和傳統 caspase 有相似性，在 caspase-like domain 上和 caspase 的 p20 次單位(subunit)更高達 80%的一致性(homology)。Caspase 為一種 cysteine protease，其 caspase domain 上有 Cys-His catalytic diad 做為 active site 來進行受質切割，在 catalytic pocket 中的鹼性胺基酸專一性地對 P1 site 為天冬門胺酸(Aspartate)的受質進行切割作用。雖然 MALT1 也具有 Cys-His catalytic diad(H415-C464)，但是在 3D 立體模式預測 MALT1 的 CLD 可能對於何種胺基酸有較好的專一性的實驗中發現，以胜肽(peptides)模擬進入 specificity pocket 發現其二級結構與傳統 caspase 的 caspase domain 不盡相同，根據模擬實驗結果的推測，MALT1 的 putative active site 可能對於 P1 site 為 uncharged residues 的受質有較好的親和力而非 caspase 專一性的天冬門胺酸(Aspartate) (Uren et al., 2000)。

傳統 caspase 活化必須經由自行裁切(autoprocessing)或受其他 caspase 的切割才能具有活性，進行細胞凋亡(apoptosis)；而 MALT1 無法切割已知的 caspase 受質，

亦無自行裁切 (autoprocessing) 的能力。另一方面，在細胞內表現完整的、有部分區域缺失的(truncated)或是人為強制聚合序列(artificially oligomerized form)的 MALT1 皆無法引起細胞凋亡，始稱為 paracaspase，也是人類目前已知的唯一 paracaspase(Uren *et al.*, 2000)。

Snipas 等人為了研究 MALT1 是否具有蛋白質切割活性，在細菌內只表現 MALT1 的 CLD(329~566 amino acid)的蛋白質，在 *in vitro* 實驗中發現只有 Leucine-based acyloxymethyl ketone probe 能夠與 putative catalytic site 共價結合，利用 MALDI-TOF 找出位於 CLD 上的 Cysteine 539 對於此共價結合是相當重要的。為了找出 MALT1 對於受質的專一性(specificity)，Snipas 利用 peptide substrate library 進行篩選(screening)，發現 MALT1 無法切割 library 中任何 peptide，MALT1 是否具有蛋白切割能力仍有待釐清(Snipas *et al.*, 2004)。

我們實驗室先前的研究發現，共同轉染 MALT1 及 BCL10GFP(BCL10 融合 GFP) 入 293T 細胞後，可以看到 BCL10 有被切割的現象(附圖二)。經由一系列的刪除構築(deletion constructs)發現 BCL10 一旦失去 Leucine225 這個胺基酸後就無法被切割，之後將 Leucine225 突變成天冬門胺酸(Aspartate)，同樣看不到被切割的現象，這與之前的報導認為 MALT1 對於 uncharged residue 有較好的親和力相當吻合。

MALT1 的蛋白質切割活性(proteolytic activity)一直到了 2008 年才真正被證實，Rebeaud 等人在刺激 TCR/BCR 後發現細胞內的 BCL10 有被 MALT1 切割現象，而切割位置位於 BCL10 的 C 端，利用胺基酸序列比對(alignment)推測並證實 BCL10 的切割位置發生在 Arg228 的 C 端，雖然切割 BCL10 的有無並不影響 NF- κ B 的活性，但切割 BCL10 卻可影響 T 細胞和抗原表現細胞 APC(antigen-presenting cell)的黏合作用(adhesion)及 T 細胞的移行(migration) (Rebeaud *et al.* 2008)。另一方面，Coornaert 等人同樣刺激 TCR 後發現細胞內 A20 也有被切割的現象，同樣使用胺基酸序列比對(alignment)推測並證實 A20 的切割位置發生在 Arg439 的 C 端，A20 被切割後同樣不會影響 NF- κ B 的活性(Coornaert *et al.* 2008)。

MALT1 可以對 A20 及 BCL10 進行切割，雖然切割兩者的有無並不嚴重影響 NF- κ B 的活性，但是，MALT1 的 catalytic diad 一旦被突變成 Alanine 或是抑制 MALT1 的蛋白質切割能力，會顯著降低 NF- κ B 的活性，減少 IL-2 的分泌，說明了 MALT1 的 CLD 在活化 NF- κ B 中扮演著不可或缺的重要角色(Coornaert *et al.* 2008)。

MALT1 的 Therapeutic implications

總括來說，MALT1 透過他的 adaptor protein 及蛋白酶的功能來調控 T 細胞活化，MALT1 的 catalytic diad 一旦被突變成 Alanine 或是抑制 MALT1 的蛋白質切割能力，顯著降低 NF- κ B 的活性，減少 IL-2 的分泌(Coornaert *et al.*, 2008)。因此在自體免疫(autoimmune)、發炎疾病(inflammatory diseases)，防止器官移殖的排斥性以及 B-cell lymphomas 像是 ABC-type DLBCLs 的治療上，抑制 MALT1 的蛋白質切割活性或是阻斷 MALT1 參與活化 NF- κ B 可能是有效的方法。

MALT1 在生物體的重要性

MALT1 基因剔除 (Knock out) 小鼠在胚胎發育上並無缺失，顯示胚胎發育過程中 MALT1 的表現並非必要。與野生型小鼠比較，*MALT1* 基因剔除小鼠血清中所有類型的免疫球蛋白數量均降低。Adaptive immune 功能不全，部分 B 細胞發育不良、BCR 及 LPS 反應缺陷，TCR 無法調控 NF- κ B 活化、減少 cytokine 的分泌、細胞增生能力受損 (Ruland *et al.*, 2003 ; Ruefli-Brasse *et al.*, 2003)。

三、BCL10 (B-cell Lymphoma 10)

BCL10 的發現

1999 年由 Willis 等人由 t(1;14)(p22;q32) 基因轉位的 low-grade MALT lymphoma(為一最常見的 extranodal B cell lymphoma)病人組織中發現的一個蛋白

質，因為最早是從 B cell lymphoma 中所發現，所以稱之為 BCL10(Willis *et al.*, 1999 ; Zhang *et al.*, 1999)。這樣的基因轉位造成基因重新排列，BCL10 的基因受到 Ig 加強子(enhancer) element 調控，導致不正常的表現(Liu *et al.*, 2004)。在 1999 年三個團隊為了找出參與在細胞凋亡的調控基因，利用基因資料庫找出人類 EST clone 中具有細胞凋亡相關的 CARD(caspase recruitment domain) domain 同源性(homology)基因，將找到的新蛋白質命名為 CIPER (CED-3/ICH-1 prodomain homologous, E10-like regulator)、CLAPs(CARD-like apoptotic proteins)、mE10(mammalian E10)，後來經由序列比對(alignment)後發現三者為同一種蛋白質。(Koseki *et al.*, 1999 ; Srinivasula *et al.*, 1999 ; Yan *et al.*, 1999)

BCL10 的蛋白質組成與特性



BCL10 具有 233 個胺基酸，在 N 端含有一個 CARD(caspase recruitment domain) domain(13-99 amino acid)，在 C 端則含有 Serine/Threonine-rich domain (99-233 amino acid)。

BCL10 的 CARD domain 可以和某些同樣具有 CARD domain 的蛋白質做相互作用(interaction)，調控細胞的訊息傳導如活化 NF- κ B 或細胞凋亡。透過 CARD-CARD domain 的相互作用可與一些 CARD-containing protein 如 CARMA1(CARD11)(Che *et al.*, 2004)、CARMA3(CARD10)及 CARD9 結合，達到活化 NF- κ B (Srinivasula *et al.*, 1999 ; Gaide *et al.*, 2001)。此外，在細胞內大量表現 BCL10 完整的 CARD domain，透過形成聚合物 oligomerizes 即具有活化 NF- κ B 能力(Willis *et al.*, 1999 ; Guet *et al.*, 2000)。但是在 HeLa、MCF7、293 等細胞株中大量表現 BCL10 卻可引發細胞凋亡(Koseki *et al.*, 1999 ; Willian *et al.*, 1999)。

Serine/Threonine-rich domain 與目前已知的蛋白質均不具相似性，在細胞大量

表現(overexpression)有高度磷酸化修飾的現象，並且能夠和某些蛋白質有相互作用。BCL10 的 3-12 amino acid 可和轉錄因子 TFIIB 做結合，參與在轉錄的 preinitiation(Liu *et al.*, 2004)；胺基酸 107-119 可和 MALT1 持續結合(constitutive association)(Lucas *et al.*, 2001)。BCL10 也能夠被其他蛋白質像是 CaMKII、IKK β 進行磷酸化(phosphorylation)，CaMKII 能夠在 Ser138 做磷酸化，降低 NF- κ B 的活性；IKK β 在 Ser81 及 Ser85 磷酸化，造成 BCL10 的降解、防止在核內聚集(accumulation)、減少 IL-2 的產生(Thome *et al.*, 2007)。

BCL10在生理功能上，研究最清楚的是它參與在TCR/BCR活化NF- κ B的過程當中，MALT1會切割BCL10。雖然切割BCL10不影響NF- κ B的活性，但切割BCL10卻可影響T細胞和APC(antigen-presenting cell)的黏合作用(adhesion)及T細胞的移行(migration)(Rebeaud *et al.*, 2008)。

BCL10 在生物體的重要性

BCL10 基因剔除小鼠，有30%因為神經管閉鎖缺陷而死於胚胎發育期(Ruland)，而存活下的小鼠有嚴重的免疫缺陷，T細胞及B細胞無法對外來的抗原進行辨識及增生活化。顯示BCL10在淋巴球的分化(differentiation)及存活扮演很重要的角色，但*BCL10*^{-/-}的細胞對於外來的細胞凋亡刺激卻和野生型相同(Ruland *et al.*, 2001；Xue *et al.*, 2003)。

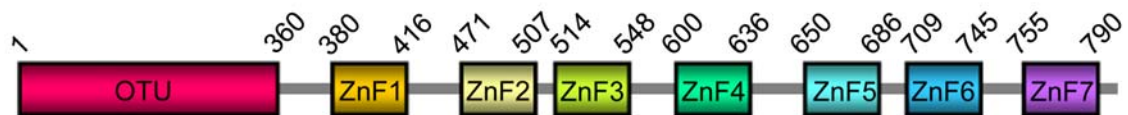
四、A20 (TNFAIP3)

A20的發現

轉錄因子NF- κ B是主要調控適應免疫(adaptive immune)及控制淋巴球活化、增生、及生存。但減弱NF- κ B的訊息傳導對於維持體內的平衡調控是必要的，很多研究團隊開始找尋NF- κ B的抑制者。Dixit等人首先發現A20參與在TNF引起的基因表現，是最早被討論也被認為是發炎反應的重要調控者(Dixit *et al.*, 1990)。

A20最早於人類臍帶(umbilical)靜脈內皮細胞中，TNF(tumor necrosis factor)提引基因表現所發現，又稱為TNFAIP3(TNF α -induced protein 3)。在TNF引起的細胞凋亡中，A20可以當作一個抑制細胞凋亡者(antiapoptotic molecule)，並可觀察到抑制磷脂酶A2 (phospholipase A2)的活化、ROS (reactive oxygen species)的減少、抑制粒腺體外膜的崩解(collapse)、caspase-3的活性下降。另一方面，大部份細胞不會持續表現A20，但在NF- κ B活化後能快速表現，已證實A20是一個NF- κ B負向調控者，以達到調節平衡(homeostasis) (Hymowitz *et al.*, 2010)。

A20的蛋白質組成與特性



A20具有790個胺基酸，在N端有一個OTU (ovarian tumor) domain，C端則包含了七個zinc-finger (Cys-Xaa₂₋₄-Cys-Xaa₁₁-Cys-Xaa₂-Cys)結構，兩者具相反的酵素活性。OTU domain具有去泛素化(de-ubiquitinating)的活性，能將受質去除泛素鏈(ubiquitin chain)，抑制原發炎(proinflammatory)基因的表現，減少NF- κ B的活性；zinc-finger則有ubiquitin ligase的活性。

在TNF經由TNF-R1(TNF receptor 1)活化NF- κ B過程中，TNF-R1在細胞質部份的DD(death domain)，可以和TRADD(TNF-receptor-associated DD protein)的DD做互相作用(interaction)，能夠吸引(recruit)TRAF2(TNF-receptor-associated factor 2)及RIP1(receptor-interacting protein)，TRAF2能夠快速在RIP1上做K63-linked的ubiquitin chain，活化下游IKK複合體，進而活化NF- κ B。隨後，A20的C端能夠和ubiquitin chain結合的能力，利用N端OTU切除RIP1上的K63-linked ubiquitin鏈，再利用C端zinc-finger進行K48-linked ubiquitin鏈，造成RIP1送至蛋白酶體(proteasome)進行降解，達到抑制NF- κ B (Li *et al.*, 2006；Beyaert *et al.*, 2000；

Komander *et al.*, 2008 ; Wertz *et al.*, 2004)。

而在 TCR/BCR 活化 NF- κ B 過程中，一旦 NF- κ B 活化後，A20 利用 C 端 zinc-finger 和已泛素化的 IKK γ (NEMO) 結合，再利用 OTU 的去泛素化活性，將 IKK γ 上的泛素去除，進而達到抑制 NF- κ B 活性，同時 MALT1 也會在 A20 的 R439 的位置(介於 ZnF1 和 ZnF2)切成兩個次單位成 A20p37 及 A20p50，但是 A20 的切割與否不造成嚴重 NF- κ B 活性改變(Coornaert *et al.*, 2008)。在 293T 細胞中即使大量表現缺乏完整 N 端 OUT domain 的 A20，仍然可以達到抑制 TNF 引起的 NF- κ B 活性，說明了 A20 的去泛素化能力可能對於 NF- κ B 的抑制不是完全必需的(Song *et al.*, 1996 ; Klinkenberg *et al.*, 2001 ; Heyninck *et al.*, 2005)。

A20 在生物體的重要性

大部份細胞不會持續性地(constitutively)表現 A20，而是在 NF- κ B 活化之後快速增加 mRNA 的表現。但在淋巴組織或是特定 T 細胞卻能夠持續性地表現 A20(Lee *et al.*, 2000 ; Tewari *et al.*, 1995)。在 *Tnfaip3* 基因剔除(knock out)的小鼠，對於 TNF- α 引起 IKK 複合體活性有延長的現象，而且不能終止(terminate)NF- κ B 基因的轉錄。因此，*Tnfaip3*^{-/-} 的小鼠會有全身性的發炎反應並且容易早夭。*Tnfaip3*^{-/-} 細胞對於 TNF- α 引起的程序性細胞凋亡(programmed cell death)也有較高的敏感性(sensitivity) (Lee *et al.*, 2000 ; Coornaert *et al.*, 2009)。

第 2 章、研究目的

首先，目前已知 MALT1 能夠切割的受質為 A20 及 BCL10，但是切割兩者的有無並不嚴重影響 NF- κ B 活性，一旦 MALT1 的 catalytic residue 突變或是活性受到抑制，NF- κ B 活性卻顯著下降，這代表 MALT1 可能還有未知的受質，而且切割未知的受質對 NF- κ B 是重要的。Activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma (ABC-DLBCL) 是人類的一種淋巴瘤，其存活和增生是極度依賴 MALT1 的蛋白切割活性，但目前尚無研究仔細探討 MALT1 的生化特性，因此本篇論文的主要目的是建立一個在試管中 (*in vitro*) MALT1 可以切割受質系統，以利對切割位置的探討，及對 MALT1 活性抑制劑的尋找。



第 3 章、材料與方法

抗體來源

一級抗體

- ✓ mouse anti-BCL10 monoclonal antibody 331.3 (Santa Cruz)
- ✓ mouse anti-His monoclonal antibody (Dr.王錦堂老師實驗室) (Amersham)
- ✓ mouse anti-His monoclonal antibody H3 (Dr.李財坤老師實驗室) (Santa Cruz)
- ✓ mouse anti-GAPDH polyclonal antibody H86504M (BioDesign international)
- ✓ mouse anti-Myc polyclonal antibody 9E10 (Dr.李財坤老師實驗室) (Santa Cruz)
- ✓ rabbit anti-MALT1 polyclonal antibody H-300 (Santa Cruz)
- ✓ rabbit anti-GFP polyclonal antibody (our lab)

二級抗體

- ✓ sheep anti-mouse IgG HRP antibody (Amersham)
- ✓ goat anti-rabbit IgG HRP antibody (Amersham)
- ✓ goat anti-mouse IgG HRP antibody (Jackson)

實驗使用之質體

- ✓ 見表一

製備勝任細胞 (Preparation of competent cells)

以無菌牙籤挑出大腸桿菌 DH5 α 單一菌落，置於 2 ml LB (10 mg/ml NaCl，10 mg/ml trypton，5 mg/ml yeast extract) 培養液中，於 37°C、150 rpm 培養箱過夜培

養。第二天將此 2 ml 的菌液加入 200 ml (1:100) 新鮮的 LB 培養液繼續培養，待細菌的 OD₆₀₀ 約至 0.3~0.5 時，放置冰上 10 分鐘，以 3,000 rpm (KUBOTA 1920)、10 分鐘、4°C 離心，吸去上清液，再以 40 ml TFBI (30 mM KOAc, 100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 15% glycerol pH 5.8) 完全沖散菌體，置於冰上 2~3 小時後，離心 3,000 rpm (KUBOTA 1920)、10 分鐘、4°C，吸去上清液，以 20 ml TFBII (10 mM MOPS, 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂, 15% glycerol pH 5.8) 將菌體完全沖散，分裝至 1.5 ml eppendorf tube，每一管 200μl，保存於-70°C 冰箱。

細菌轉形 (Transformation)

將質體 DNA 加入 100μl 勝任細胞(competent cell)，混合均勻勿激烈振盪，靜置共存冰上 30 分鐘，再置於 42°C 水浴 60 秒，立刻置於冰上 10 分鐘，加入 400ul 不含 ampicillin 的 LB 培養液，於 37°C、150 rpm 振盪培養 1 小時，取 200μl 均勻塗散在含 50μg/ml ampicillin 的 LB 瓊脂平板上，置於 37°C 培養箱培養 16~18 小時。

小量質體製備 (Mini-plasmid preparation)

用無菌牙籤挑出含有質體的單株大腸桿菌 DH5αF'，置於含有 50μg/ml ampicillin 的 3ml LB 培養液中，於 37°C、150rpm 的培養箱中培養 16 小時。第二天取出 1.5ml 菌液以 13,000 rpm、1 分鐘離心 (Heraeus Biofuge fresco)，去除上清液，以 High-Speed Plasmid Mini Purification Kit (Geneaid) 純化小量質體 DNA，置於 4°C 保存。

大量質體製備 (Maxi-plasmid preparation)

用無菌牙籤挑出含有質體的單株大腸桿菌 DH5αF'，置於 5 ml LB 且含 50μg/ml ampicillin 培養液中，於 37°C、150 rpm 的培養箱 16 小時。第二天將此菌液倒入 500 ml LB 含 50μg/ml ampicillin 培養液中繼續培養約 5~8 小時，待菌液的

OD₆₀₀ 約 0.8~1.0，再加入 2.5 ml chloramphenicol (34 mg/ml)，再繼續培養至隔天。第三天用 Beckman JA-10 rotor，6,000 rpm、4°C、離心 15 分鐘收集菌體，以 18 ml solution A (0.9% glucose，25 mM Tris pH 8.0，1 mM EDTA pH 8.0) 徹底打散菌液，再加入 2 ml solution B (4% lysozyme in solution A) 輕輕搖晃並靜置室溫 10 分鐘，之後加 40 ml solution C (0.8% NaOH，1% SDS) 輕輕搖晃至溶液呈透明黏稠狀，加 20 ml solution D (3 M potassium acetate，12% glacial acetic acid) 輕輕搖晃，此時可見白色棉絮狀物質產生，以 Beckman JA-10 rotor 9,000 rpm、4°C、20 分鐘離心，再用 4~5 層紗布過濾上清液，加 0.6 倍體積的 isopropanol，-20°C 沈澱 1 小時，以 Beckman JA-10 rotor 9,000 rpm、4°C、20 分鐘離心，棄上清液，以 10 ml solution E (200 mM Tris pH 8.0，70% EtOH) 沖散 DNA，轉移至 50ml corning tube 以 12,000 rpm、4°C、20 分鐘離心(KUBOTA 1920 離心機)，棄上清液，真空乾燥 DNA，再以 4 ml TE 8.0 回溶。加入 4.6 克 CsCl 及 350 μ l EtBr (10 mg/ml)，混合均勻後再轉移至 Beckman quick seal 的離心管中，開口處加熱封管，平衡需精確至小數點以下第二位，在 25°C 下以 55,000 rpm (Beckman VTi 80)、離心 16~20 小時，離心完成後，在 UV 照射下，約在離心管中央可見超螺旋質體 (supercoiled form)，於管頂以針頭戳入破真空，再以 18 號針頭抽出質體，置於 15ml corning tube，以等體積的 isopropanol (saturated with 5 M NaCl) 萃取 7~8 次，直到水層沒有 EtBr，再移至 50ml corning tube，加 3 倍體積 TE8.0 混合均勻，再加入 2 倍體積 100% 酒精，-20°C 作用 1 小時，以 12,000 rpm、4°C、離心 20 分鐘(KUBOTA 1920 離心機)，用 2 ml 70% 酒精洗 DNA，最後真空乾燥之，以 300~500 μ l TE8.0 回溶，再用光度比色計 (Beckman DU-64 spectrophotometer) 測定 OD_{260/280} 吸光度，1 OD₂₆₀ = 50 μ g/ml 之 DNA，可求得 DNA 濃度。

細胞(cell lines)培養

使用之細胞培養液中均添加 10% 胎牛血清(fetal bovine serum)、50 units/ml penicillin G、50µg/ml streptomycin、1.25µg/ml fungizone 或 amphotericin B 及 100 mM NEAA (non-essential amino acid)，稱為 complete medium。細胞置於 37°C、含 5% CO₂ 的培養箱中培養。

(1) 293T 細胞：會持續表現 SV40 large T antigen 的人類胚胎腎臟細胞，以 complete DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 培養液培養，待細胞長至 90%滿時進行繼代培養，以 PBS 清洗兩次，0.5% trypsin 將細胞打散，約 1：20 的比例繼代到新的培養液。

(2) Jurkat T cell：人類 CD4 T 細胞，以 complete RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 培養液培養，待細胞長滿以 1：8 的比例繼代到新的培養液。

細胞轉染 (Transfection)

分析各個質體在 293T 細胞株內的表現情況，轉染前一天，放置 2×10^5 顆細胞至 6-well plate 以 2ml 培養液培養。第二天進行轉染前將培養液換成 1ml，將欲轉染的質體量加入 125µl 0.5 M CaCl₂，再補水至 250µl，混合均勻，然後一滴一滴緩慢加入 125µl 的 2×HBS (0.28M NaCl, 1.5 mM sodium phosphate, 50 mM HEPES, pH 7.1)，並同時打入氣泡，加完後劇烈震盪 20 秒，室溫下靜置 15 分鐘。取 250µl DNA-calcium phosphate complex 溶液，均勻加入每個 plate，總計每個 plate 轉染 0.25~2.5µg 的表現質體量。細胞培養 16 小時後，以 PBS 清洗 2 次，加入新鮮培養液，繼續培養 24 小時後分析。

蛋白質濃度測定

將 5 倍 Bio-Rad protein assay reagent (BIO-RAD) 與水以 1:4 的比例稀釋後使

用。先取五管 1.5 ml 微量離心管，以 1mg/ml BSA 溶於 1 ml 1 倍 Bio-Rad reagent 於 OD₅₉₅ 測定吸光值，建立 0、2μg、4μg、8μg、16μg 的標準曲線，曲線之迴歸係數的平方值(R²) 要大於 0.995 為可信。取 2 μl 細胞萃取液溶於 1 ml 1 倍 Bio-Rad reagent 測定 OD₅₉₅ 的吸光值，並藉由標準曲線回推蛋白質濃度。

SDS-PAGE (Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

以 70% 酒精擦拭玻璃片及陶瓷片，架設好注膠裝置 (Hoefer)，先注入 15% separating gel (1.1ml 1.5M Tris pH 8.8，1.3 ml ddH₂O，2.5ml 30% acrylamide，50μl 10%SDS，50μl 10% ammonium persulfate，2μl TEMED) 約八分滿，再覆加入 ddH₂O，凝膠約 60 分鐘，倒掉 ddH₂O，以濾紙吸乾水分，再插入齒狀梳板並注入 5% stacking gel (500μl 0.5M Tris pH6.8，1.17ml ddH₂O，333μl 30% acrylamide，20μl 10% SDS，20μl 10% ammonium persulfate，3μl TEMED)，凝膠後取出齒狀梳板即可。將蛋白質樣品溶入 3X SDS sample buffer (15ml glycerol，9.4ml 1M Tris pH6.8，7.5ml 2-mercaptoethanol，15ml 20% SDS，37.5mg bromophenol blue，最後以 ddH₂O 將體積補至 50ml)，混合均勻後以 100°C 加熱 10 分鐘後使蛋白質變性(denature)，置於冰上 10 分鐘，以固定 100 伏特電壓進行電泳約 8 小時 (5 倍電泳液含有 15 g Tris，72 g glycine，50 ml 10% SDS，以 ddH₂O 將體積補至 1 升，使用前以二次水稀釋 5 倍)。待 sample dye 跑至底端，取 separating gel 進行西方墨點分析。

西方墨點分析法 (Western blot analysis)

電泳結束後，去除 stacking gel，將 separating gel transfer 到 Hybond-P membrane (Amersham Pharmacia)上，以 Hoefer electrophoretic transfer system、固定電流 250 mA 進行 2~4 小時 transfer。室溫下以 5% 脫脂牛奶的 PBS buffer blocking 室溫振搖 1 小時，再加入含 0.1% 脫脂牛奶的 PBS buffer 及一級抗體(rabbit anti-GFP antibody，1:5,000 倍稀釋；mouse anti-BCL10 antibody，1:3,000~5,000 倍稀釋；mouse

anti-GAPDH antibody, 1:40,000 倍稀釋), 4°C 反應 16 小時後, 於室溫以 TBS-T wash buffer (0.5% Tween-20 in TBS) 清洗三次, 每次 10 分鐘, 加入含 0.1% 脫脂牛奶的 PBS buffer 及二級抗體(donkey anti-rabbit IgG, 1:10,000 倍稀釋; sheep anti-mouse IgG, 1:10,000 倍稀釋, Amersham Pharmacia Biotech), 室溫作用 1 小時, 以 TBS-T wash buffer (0.5% Tween-20 in TBS) 清洗三次, 每次 10 分鐘, 再用二次水清洗 2 次, 各 10 分鐘, 取出 membrane 大致瀝乾水分後, 將 membrane 正面覆蓋於 ECL substrate 上反應 1 分鐘, 1 小時內完成 X-ray film 顯影。

免疫沉澱法 (Immunoprecipitation)與去磷酸酵素作用

細胞以 PBS 清洗三次後, 以 Modified RIPA buffer (50mM Tris-HCl pH7.4、1%NP-40、0.25% Na-deoxycholate、150mM NaCl、1mM EDTA、1mM PMSF、1μg/ml Aprotinin、leupeptin、pepstatin、1mM Na₃VO₄、1mM NaF)收取細胞蛋白質, 測定蛋白質濃度後, 取 1mg 蛋白質與 2~4μl 特定抗體於 4°C 旋轉作用 16 小時, 加入 50μl protein A 或 protein G beads 於 4°C 下旋轉反應 4 小時, 2,000 rpm 離心 5 分鐘, 去除上清液。用 Modified RIPA buffer 清洗三次、1X NEB buffer No.3 清洗兩次, 補充 1X NEB buffer No.3 至 100μl, 分成四等份。其中一等份可進行去磷酸酵素作用, 加入 1μl CIAP (phosphatase) 37°C 水浴作用 2~3 小時, 2,000 rpm 離心 5 分鐘, 去除上清液, 加入 3× SDS sample buffer 100°C 作用 10 分鐘後, 進行西方點墨分析法。

TPA/ionomycin treatment

TPA 作用濃度: 20ng/ml。Ionomycin 作用濃度: 1μM。直接添加於細胞培養液中, 作用時間完畢後立即以 1 × PBS 清洗三次, 再收取蛋白質。

His-tag 融合蛋白質的自然方式純化 (Purification of native form His-tag MALT1 protein)

以無菌牙籤挑出含有質體的大腸桿菌 Arctic Express™ RIL competent cell 單一菌落，置於 2 ml LB (10 mg/ml NaCl, 10 mg/ml trypton, 5 mg/ml yeast extract) 且含 50µg/ml ampicillin 培養液中，於 37°C、150 rpm 培養箱過夜培養。第二天下午將此 2 ml 的菌液加入 200 ml (1:100) 新鮮的 LB 培養液繼續培養，待細菌的 OD₆₀₀ 約至 0.3~0.5 時，加入 IPTG(BioShop) 使最後濃度為 1 mM 誘導蛋白質產生，於冷房 8°C 下、150 rpm 培養箱誘導蛋白質產生培養 48 小時。第四天早上將此 200ml 菌液放置冰上 10 分鐘，以 6,000 rpm (KUBOTA 1920)、10 分鐘、4°C 離心，吸去上清液，再以 4ml naturing lysis buffer (50mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole pH 8.0)完全沖散菌體，法式油壓(Thermo IEC FRENCH® Press Labotatory Press with Mini Pressure Cell Cat. No. FA-081A 120VAC, 60Hz) 使用 700psi 的壓力徹底破菌五次，離心 13,000 rpm (KUBOTA 1920)、10 分鐘、4°C，離心後吸取上清液重覆兩次，加入 200 µl Ni²⁺ NTA agarose beads (Qiagene), 4°C 下以旋轉輪作用 16 小時。以 swing 旋轉輪 4,000 rpm (KUBOTA 1920)離心一分鐘，去除上清液。加入 Wash buffer (50 mM NaH₂PO₄, 2M NaCl, 50 mM imidazole pH 8.0) 清洗六次，最後加入 Elution buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole pH 8.0) 洗提十次，將純化出的蛋白質用 PBS 進行透析(dialysis)過後，加入 100% glycerol 使最後濃度為 25%置-20°C 保存。

His-tag 融合蛋白質的變性方式純化 (Purification of denature form His-tag BCL10 protein)

以無菌牙籤挑出含有質體的大腸桿菌 BL21DE3 單一菌落，置於 2 ml LB (10 mg/ml NaCl, 10 mg/ml trypton, 5 mg/ml yeast extract) 且含 50µg/ml ampicillin 培養液中，於 37°C、150 rpm 培養箱過夜培養。第二天取 100µl 的菌液加入 10 ml (1:100)

新鮮的 LB 培養液繼續培養，待細菌的 OD₆₀₀ 約至 0.3~0.5 時，加入 IPTG (BioShop) 使最後濃度為 1 mM 誘導蛋白質產生，於 37°C 下、150 rpm 培養箱誘導蛋白質產生 4 小時。將此 10 ml 菌液放置冰上 10 分鐘，以 6,000 rpm (KUBOTA 1920)、10 分鐘、4°C 離心，吸去上清液，現配 4ml denaturing lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄，300 mM NaCl，10 mM imidazole，8 M urea pH 8.0) 完全沖散菌體，聲裂法(sonication) 徹底破菌，直到溶液澄清，離心 13,000 rpm (KUBOTA 1920)、10 分鐘、4°C，離心後吸取上清液重覆兩次，加入 50 μl Ni²⁺ NTA agarose beads (Qiagen)，4°C 下以旋轉輪作用 16 小時。以 swing 旋轉輪 4,000 rpm (KUBOTA 1920) 離心一分鐘，去除上清液。加入現配 Wash buffer (50mM NaH₂PO₄，2M NaCl，50mM imidazole，8 M urea pH 6.3) 清洗六次，最後加入現配 Elution buffer (50mM NaH₂PO₄，300mM NaCl，250mM imidazole，8 M urea pH 8.0) 洗提十次，將純化出的蛋白質用 PBS 進行透析(dialysis)後置-80°C 保存。

T7-tag 融合蛋白質的純化 (Purification of T7-tag MALT1 protein)

以無菌牙籤挑出含有質體的大腸桿菌 BL21DE3 單一菌落，置於 2 ml LB (10 mg/ml NaCl，10 mg/ml trypton，5 mg/ml yeast extract) 且含 50μg/ml ampicillin 培養液中，於 37°C、150 rpm 培養箱過夜培養。第二天下午取 1 ml 的菌液加入 100 ml (1:100) 新鮮的 LB 培養液繼續培養，待細菌的 OD₆₀₀ 約至 0.3~0.5 時，加入 IPTG(BioShop)使最後濃度為 0.04 mM 誘導蛋白質產生，於室溫下、150 rpm 培養箱誘導蛋白質產生 16 小時。將此 100 ml 菌液放置冰上 10 分鐘，以 6,000 rpm (KUBOTA 1920)、10 分鐘、4°C 離心，吸去上清液，再以 4ml T7-tag Bind/Wash buffer (4.29mM Na₂HPO₄，1.47 mM KH₂PO₄，2.7mM KCl，137mM NaCl，0.1% Tween-20mM，0.002% sodium azide pH 7.3) 完全沖散菌體，法式油壓(Thermo IEC FRENCH[®] Press Labotatory Press with Mini Pressure Cell Cat. No. FA-081A 120VAC, 60Hz) 使用 700psi 的壓力徹底破菌五次，離心 13,000 rpm (KUBOTA 1920)、10 分

鐘、4°C，離心後吸取上清液重覆兩次，加入 100 µl T7-tag Sepharose beads (Novagen)，4°C 下以旋轉輪作用 16 小時。以 3,000 rpm (KUBOTA 1920) 離心 3 分鐘，去除上清液。加入 T7-tag Bind/Wash buffer (4.29mM Na₂HPO₄，1.47 mM KH₂PO₄，2.7mM KCl，137mM NaCl，0.1% Tween-20mM，0.002% sodium azide pH 7.3) 清洗六次，最後加入 100µl 的 T7-tag Bind/Wash Buffer 將 beads 分裝成兩份，一份直接進行 *in vitro* cleavage assay，另外一份則以 T7-tag Elute buffer (100mM Citric acid pH 2.2) 洗提兩次，並以每毫升加入 150µl 的 Neutralization buffer(2M Tris base pH 10.4) 中和，將純化出的蛋白質置 4°C 保存。

***In vitro* cleavage of BCL10**

BCL10 以 pET21a 表現質體表現，以 T7 表現子(promoter)包含了人類基因轉錄的 BCL10。BCL10 純化後以 Bio-Rad (BIO-RAD) 定量後，取 50ng 的 BCL10 與 1µg 或 2µg 的 recombinant MALT1，如以 total lysate 進行實驗，則取含有相同量的 MALT1(相當於 5µl 或 10µl 的 25 倍濃縮菌液)，作用於 30°C，16 小時在最後體積 25µl 的 paracaspase assay buffer (50mM MES pH 6.8，150mM NaCl，10%(wt/vol) sucrose，0.1%(wt/vol) CHAPS，10mM dithiothreitol，1 M ammonium citrate)，蛋白質切割後的結果利用 SDS-PAGE 進行分析。

銀染色 (Silver staining)

將 SDS-PAGE 電泳後的膠片，先加入 50ml fixation buffer(10% acetic acid，50% methanol) 進行固定，固定時間大於 1 小時或過夜，於 4°C 下靜置。第二天以二次水清洗兩次，再以 50ml wash buffer(30% methanol) 清洗 15 分鐘，置於旋轉器。用二次水洗三次，各 5 分鐘，置於旋轉器。取 100µl 10% Na₂S₂O₃ · 5H₂O 加入 100ml 的二次水中配成 sensitizing buffer(0.01% Na₂S₂O₃ · 5H₂O) 精準兩分鐘之後，以二次水清洗 30 秒。加入 Rinse buffer(取 1ml 20% AgNO₃ 加入 50ml 二次

水配成 0.4% AgNO₃) 作用 25 至 30 分鐘於旋轉器，用二次水清洗三次，各 1 分鐘。加入 development buffer(取 1.5g Na₂CO₃，25 μl formaldehyde 於 50 ml 二次水)呈色 5 至 15 分鐘，呈色終止前以二次水潤洗一次，加入 stop buffer (1% glacial acetate) 終止反應。

***In vitro* 發射螢光 (fluorescence) 胜肽切割 assay**

取 His-tag 自然方式純化的 MALT1 及 MALT1C464A 1 μg 或 2 μg 加入最後濃度為 50 μM 的 BCL10 蛋白質模擬切位 L225 及 R228 四胜肽 (tetrapeptide) 衍生物 acetylated(Ac)-FLPL-AMC (fluorogen 7-amino-4-methylcoumarin) 及 Ac-LRSR-AMC (Neogene Biomedicals)，在 30°C，paracaspase assay buffer (50mM MES pH 6.8，150mM NaCl，10%(wt/vol) sucrose，0.1%(wt/vol) CHAPS，10mM dithiothreitol，1 M ammonium citrate) 最後反應體積 50 μl，置於 96well 白色定量盤中，每一小時測量一次發射螢光 (fluorescence) 連續四小時，MALT1 切割胜肽活性以激發波 (ex) 380nm，吸收波長 (em) 460nm 測定 (Spectra Max[®] M5)。

第 4 章、結果

一、BCL10 受 MALT1 誘導而產生切割現象 *in vivo*

BCL10 受 MALT1 誘導而產生切割現象

我們實驗室過去研究已知，在 293T 細胞中大量表現 BCL10GFP(BG)及 MALT1，可以觀察到 BCL10 有數種不同分子量的蛋白質形式，因為 BCL10 C 端為 Ser/Thr rich domain，推測 BCL10 被多重磷酸化的修飾，經免疫沉澱法 (immunoprecipitation) 與去磷酸酵素 (alkaline phosphatase) 作用後，較大分子量的 BCL10 即消失，可清楚判斷 BCL10 是否有被切割的現象。為了建立一個 *in vitro* 切割的系統，首先先在 *in vivo* 中也能重現這樣的現象。

將 MALT1 及不同 catalytic residue 突變(圖一) constructs 與 BG 送至 293T 細胞共同表現，觀察 BG 蛋白質切割的現象。結果顯示，BG 僅在與 MALT1、MALT1C539A 共同表現下才可以觀察到有數種不同分子量的蛋白質形式。

使用 GFP 抗體再次確認 MALT1 及 MALT1C539A 能將 BCL10 在 C 端切下，將 GFP 釋出。利用免疫沉澱法搭配去磷酸酵素作用，結果證實，MALT1-H415A 及 MALT1-C464A 各一個 catalytic diad 一旦突變，皆使得切割現象顯著下降(圖二)。

二、BCL10 受 MALT1 誘導而產生切割現象 *in vitro*

在細菌中可以表現完整的 MALT1 蛋白質

為了建立 *in vitro* cleavage assay，需要大量 MALT1 蛋白質，首先將系統置換至細菌 BL21DE3 表現 MALT1 質體(圖三 A)。

MALT1、MALT1-H415A 及 MALT1-C464A catalytic sites 突變 constructs 皆能夠在 IPTG 的誘導下產生蛋白質，MALT1 蛋白質的表現大部在 pellet form (inclusion body)，少量在 supernatant form。以 MALT1 抗體及 myc 抗體進行西方墨點分析及

Coomassie blue 染色呈現(圖三 B&C)。

在細菌中可以表現完整的 BCL10 蛋白質

另一方面，在細菌 BL21DE3 中 BCL10、BCL10L225A、BCL10L225E、BCL10L225G、BCL10L225Q、BCL10L225R、BCL10L225T、BCL10R228G、BCL10R228I、及 BCL10 Δ 107~119 表現質體(圖四 A)在 IPTG 誘導 BCL10 大量表現。BCL10 蛋白質的表現大部在 supernatant form，少量在 pellet form。以 His-tag 抗體進行西方墨點分析及 Coomassie blue 染色呈現(圖四 B)。

BCL10 的純化

pET21-BCL10 及 BCL10L225A、BCL10L225E、BCL10L225G、BCL10L225Q、BCL10L225R、BCL10L225T、BCL10R228G、BCL10R228I、BCL10 Δ 107~119、BCL10L41R 表現質體所表現的蛋白質為 His-tag 融合蛋白。利用 Ni²⁺ NTA agarose beads 進行蛋白質純化，純化過程是以 denature 方式做純化。純化的結果以 BCL10 抗體及 His-tag 抗體及 silver stain 呈現純度。(圖五)

在 Paracaspase cleavage buffer A 中 MALT1 可以切割 BCL10

MALT1 在 2008 由 Rebeaud *et al.*及 Coornaert *et al.*證實具有蛋白質切割活性，參考這兩篇報導所使用的 Paracaspase cleavage buffer。Coornaert 等人所使用的 cleavage buffer 稱為 Paracaspase buffer A (50mM MES pH 6.8，150mM NaCl，10%(wt/vol) sucrose，0.1%(wt/vol) CHAPS，10mM dithiothreitol，1 M ammonium citrate). (Coornaert *et al.* 2008)；Rebeaud 等人所使用的 cleavage buffer 稱為 Paracaspase cleavage buffer B (50 mM Tris-HCl，pH 7.4，60 mM NaCl，10 mM KCl，20 mM MgCl₂，100 mM CaCl₂ and 10 mM dithiothreitol (Rebeaud *et al.* 2008)。

已知在細菌表現 MALT1 不論 pellet 或 soluble form 皆有 MALT1 的表現(圖三

C), 所以先以 vector 及 MALT1 的 total lysate, 進行 *in vitro* cleavage assay。在我們的系統中, 只有在 Paracaspase cleavage buffer A 中 high salt (1M ammonium citrate) 情況下, 可以看到 BCL10(50ng) 可以被 MALT1 誘導切割現象(圖六), 所以往後的實驗將以此 Paracaspase cleavage buffer A 進行實驗。

含有 MALT1 的 total lysate 可以切割 BCL10

在圖七中, 使用 vector 及 MALT1 表現蛋白進行 *in vitro* cleavage assay, 已知 MALT1 的 total lysate 即可對於 BCL10 進行切割。為了想證實將 MALT1 的 catalytic diad 任一突變後, 即無法有切割活性, 將 vector、MALT1、MALT1-H415A、MALT1-C464A 的 total lysate 和純化過的 recombinant BCL10(50ng) 共存, 發現除了 MALT1 可以切割 BCL10 外, vector、MALT1-H415A 及 MALT1-C464A 皆無法對 BCL10 進行切割, 這和在 *in vivo* 的結果(圖二)互相吻合。

T7-tag MALT1 蛋白質純化的純度

在細菌 BL21DE3 中, MALT 及 MALT1H415A 表現質體在(圖三)IPTG 誘導下產生 T7-tag 的融合蛋白質, 以 T7-tag agarose beads 進行蛋白質純化。純化 MALT1 蛋白質的結果以銀染色(圖八上)及 MALT1 一級抗體進行西方墨點分析辨識呈現純度(圖八下)。

純化的 T7-tag MALT1 可以切割 BCL10

在細菌 BL21DE3 中, MALT、MALT1H415A 及 MALT1C464A 表現質體在 IPTG 誘導下所表現的 MALT1 為 T7-tag 的融合蛋白質, 以 T7-tag agarose beads 進行蛋白質純化。將和 T7-Sepharose binding 作用後的 vector、MALT1、MALT1-H415A、及 MALT1-C464A 的 Sepharose 直接和純化過的 recombinant BCL10(50ng) 共存, 在 Paracaspase cleavage buffer A 中對 BCL10 進行切割作用, 在 30°C 作用 16 小時, 蛋白質切割結果以 BCL10 一級抗體及 MALT1 一級抗體進行辨

識。結果發現也只有和 Sepharose binding 的野生型 MALT1 可以切割 BCL10，vector、MALT1-H415A 及 MALT-C464A 皆無法切割(圖九)，這和圖二的結果相當吻合。

His-tag MALT1 constructs

將 MALT1 及 MALT1-H415A、MALT1-C464A 及 MALT1-C539A 重新構築成為 His-tag constructs(圖十)。在 TCR 活化 NF- κ B 的過程當中，MALT1 的聚合作用(oligomerization)對於活化本身與下游蛋白質是重要的(Rawlins *et al.*, 2006)，為了探討在 *in vitro* 中，有聚合能力的 MALT1 對於受質切割活性是否會增加，參考 Coornaert 等人所使用的融合方法(Coornaert *et al.*, 2008)。重新構築 GyraseB 具有形成聚合作用的 domain，與有 2Ig 或無 2Ig domain 的 MALT1 進行融合，同樣具有 His-tag(圖十)。

在細菌中可以表現完整的 His-tag MALT1 蛋白質

MALT1、MALT1-H415A、MALT1-C464A、MALT1-C539A、GyraseB-MALT1 及 GyraseB- Δ 2IgMALT1 皆能夠在 IPTG 的誘導下產生蛋白質，MALT1 蛋白質的表現大部在 pellet form (inclusion body)，少量在 supernatant form。以 MALT1 一級抗體及 anti-His 一級抗體進行西方墨點分析及 Coomassie blue 染色呈現(圖十一)。

His-tag MALT1 蛋白質純化的純度

在 Arctic ExpressTM RIL 勝任細胞中，MALT 及 MALT1-H415A 表現質體(圖十一)在 IPTG 誘導下產生 His-tag 的融合蛋白質，以 Ni²⁺ NTA agarose beads 進行自然(native)形式的蛋白質純化。純化 MALT1 蛋白質的結果以銀染色，MALT1 一級抗體及 anti-His 一級抗體進行西方墨點分析辨識呈現純度(圖十二)。

純化的 His-tag MALT1 可以對 BCL10 進行切割

各取 1 μ g 及 2 μ g 純化後的 MALT1 及 MALT1-C464A 和純化過的不同 recombinant BCL10 mutants(50ng)共存，在 Paracaspase cleavage buffer A 中對 BCL10 進行切割作用，在 30°C 作用 16 小時，結果發現野生型 MALT1 可以切割 BCL10、BCL10L41R、BCL10 Δ 107~119、BCL10L225R、BCL10L225T in a dose-dependent way，MALT-C464A 則無法切割任何 recombinant BCL10(圖十三上)。統計量化 MALT1 與不同 recombinant BCL10 切割能力的結果(圖十三下)。

MALT1 可以切割 BCL10 模擬切位胜肽 R228 Ac-LRSR-AMC

已知 trypsin 可以切割帶正電胺基酸的 C 端如離胺酸(Lysine)及精胺酸(Arginine)，取 trypsin (2 nM)當作 positive control 切割 BCL10 的模擬切位胜肽 R228 Ac-LRSR-AMC(50 μ M)，在不同 pH 情況下(pH4~pH10)，測量 Ac-LRSR-AMC 被切割後的相對發射螢光值(RFU)。Trypsin 切割 Ac-LRSR-AMC 的相對發射螢光值隨著時間的增加也會隨之上升，而在 pH7~9 下，trypsin 有最好的作用效果，這個結果說明著 Ac-LRSR-AMC 是可以作用的。

已知 MALT1 的 total lysate 即可對於 BCL10 進行切割(圖七)。因此先使用 MALT1 及 MALT1-C464A 的 total lysate 對於 Ac-LRSR-AMC 進行 *in vitro* cleavage assay，雖然 Ac-LRSR-AMC 被切割後的相對發射螢光值也隨著時間的增加而增加，但是 MALT1 或 MALT1-C464A 的 total lysate 進行的切割現象並沒有顯著差異。

各取 1 μ g 及 2 μ g 純化後的 MALT1 及 MALT1-C464A 和 Ac-LRSR-AMC(50 μ M)作用，可以清楚觀察到，MALT1 可以切割 Ac-LRSR-AMC in a dose-dependent way，而 MALT1-C464A 卻無法切割。

第5章、討論

一、在細菌中表現完整的 MALT1 蛋白質

在我們實驗室先前的研究中，為了探討MALT1參與負責切割工作的是哪一個 domain，在293T細胞內表現各種不同的constructs，包含了MALT1 Δ N(具有127~824 a.a.，缺少了DD)、MALT1 1~548(具有1~548 a.a.，缺少了C端區域)、MALT1 Δ 498~548(缺少 CLD)、MALT1 Δ 199~498(缺少兩個 Ig domain 及 CLD)，以及 API2-MALT1(包含三個BIR domain及兩個Ig domain、CLD及C端區域)。分別將不同MALT1 constructs與BG送入293T細胞內大量表現，觀察到BG僅在與MALT1、MALT1 Δ N或API2-MALT1共同表現下才有被切割的現象發生，說明了MALT1的 CLD和C端區域對誘導BCL10切割非常重要。(附圖三)

Snipas 等人早期為了探討 MALT1 是否為一蛋白酶，嘗試在細菌 BL21DE3 中大量表現全長的 MALT1 或是 API2-MALT1，希望藉由 *in vitro* 的實驗來證實但是都失敗。原因有一是因為 MALT1 在細菌內大量表現時都呈現不溶性的 inclusion body，最後只表現了 MALT1 的 CLD(329~566 amino acid)。在他們的實驗中，利用 peptide substrate library 進行篩選(screening)，希望能找出 MALT1 對於何種胺基酸在 P1 site 有 specificity，即使在 1.0M ammonium citrate 下 MALT1 的 CLD 仍無法有活性切割 library 中任何 peptide。我們推測可能是因為只表現了 CLD 的緣故，MALT1 執行蛋白切割功能必需要和其他的 domain 一起作用，因此他們在 screening 時未能切割 library 中任何 peptide(Snipas *et al.*, 2004)。

在我的實驗中，曾以 BL21DE3 勝任細胞表現全長的 MALT1，不論是在 25°C、30°C 或是 37°C 下 IPTG 誘導表現時，MALT1 也大部份也都在 pellet form，少部份在 supernatant form。MALT1 蛋白質表現以 MALT1 或是 anti-myc 一級抗體進行西方墨點分析時，都可以清楚發現 truncated form 的 MALT1 非常明顯，即使純化後結果也是一樣。MALT1 有 824 個胺基酸，在細菌內表現又沒有轉譯後修飾(post-translational modification)，蛋白沒有適當的折疊很容易形成 inclusion body，

因此後來使用 Arctic Express™ RIL competent cell 來解決這個問題，這個勝任細胞中有 chaperonins 可以在低溫下(10~13°C)幫助較長的蛋白質折疊，或是降低 IPTG 濃度，增加 MALT1 的溶解及減少 truncated form 的問題。

二、MALT1 蛋白質的純化

因為 pET21a vector 上即有表現 T7-tag 的序列，所以最初 MALT1 蛋白質是 T7-tag 融合蛋白質。以 T7-Sepharose 進行純化過程中，發現有幾個問題。以 silver stain 染色表示純化的純度(圖八)，都可以清楚觀察到有其他蛋白質的污染；T7-tag 純化的 binding capacity 不好，所純化的 MALT1 產量不高(約 10ng/ μ l)，產量不夠做 *in vitro* cleavage assay。最後，以 elution buffer 洗提出的 MALT1 沒有活性，推測可能是因為 elution buffer 使用的是 pH 2.2 citric acid，即使使用 pH 10.4 Tris base 進行中和 (neutralization) 仍然失去活性 (data not shown)，推測劇烈的 pH 值將 MALT1 失活 (inactivation) 或是構形改變。但是以 T7-Sepharose 和 MALT1 進行結合作用後，直接和 recombinant BCL10 進行反應才能觀察到 BCL10 有被切割的現象(圖九)，之後改以 His-tag 進行蛋白質大量純化。

重新構築 His-tag 的 constructs 進行蛋白質純化(圖十)，發現 His-tag 純化的產量 (yield) 和品質 (quality) 都提高不少，產量粗估約 200ng/ μ l，而純化的純度以 silver stain 進行觀察，蛋白質表現主要為 MALT1 (圖十二)。

三、*in vitro* assay condition

受質-BCL10

在我們的系統中，BCL10 傾向以 supernatant form 的方式存在，而且較不會形成聚合物而沉澱於 pellet form。以 BCL10 當作一個 MALT1 的切割受質，使用 denature 的方式純化 BCL10 不影響 MALT1 的切割能力。

受質-胜肽

發色體的胜肽(Chromogenic peptide)被廣泛拿來 assay caspase 的 specificity 實驗，為了探討 MALT1 的 specificity，使用兩種模擬 BCL10 切割位置 Leucine 225 及 Arginine 228 的 tetrapeptide conjugated 發射螢光物質 AMC—Ac-FLPL-AMC 及 Ac-LRSR-AMC，一旦胜肽被切割後，可以測得 AMC 的相對發射螢光值(RFU)。

assay buffer condition

在 TCR 活化 NF- κ B 的途徑當中，CARMA1 透過 BCL10 和 MALT1 形成 CBM 複合體，CBM 複合體進一步聚合化，這樣聚合反應能夠使 CBM 複合的形成更加穩定 (Thome, 2008)。MALT1 的聚合反應繼而能活化下游 TRAF6 的活化 (Sun *et al.*, 2004)，除此之外，MALT1 的聚合反應對蛋白質切割活性也是非常重要 (coornaert *et al.*, 2008；Rebeaud *et al.*, 2008)。

Boatright 等人在探討 Caspase 的蛋白質在 *in vitro* 情況下，如何有最好的的蛋白質切割活性的實驗中發現，使用濃度高達 1.0M ammonium citrate，Caspase 無論是自行裁切的能力，或是以 peptide 探討對受質親和力的實驗中，都有加強其蛋白質切割活性。Ammonium citrate 屬於一種 kosmotropes，kosmotropes 是一些具有穩定蛋白質結構的鹽類，並且能夠促使酵素形成 dimerization 而有活性 (Boatright *et al.*, 2003；Schmidt *et al.*, 1997)。他們認為 Caspase 在一般 *in vitro* 情況下，蛋白質通常以單體酶原 (monomeric zymogens) 存在，少數能夠形成 dimer，但在有外力的幫助下，能夠大量形成 dimer 並且開始活化。

在我的實驗中，也嘗試過以兩篇報導 MALT1 切割受質的 buffer 當作參考進行 cleavage assay (Coornaert *et al.*, 2008；Rebeaud *et al.*, 2008)，只有在 1.0M ammonium citrate 存在的情況下，MALT1 蛋白質才具有切割 BCL10 的能力 (圖六A)。這或許可以解釋透過穩定蛋白質的 kosmotropes，MALT1 仍可以形成聚合物而達到切割蛋白的能力。

在 *in vitro* 的系統中可以觀察到，雖然 MALT1 在 high salt 情形下可以切割 BCL10，但切割野生型 BCL10 能力最好也差不多 50% (圖十三)。接下來可能以具有聚合反應 domain 的 MALT1 來探討，gyraseB 的 dimerization domain 融合蛋白質來探討在 *in vitro* 情況下，MALT1 是否具有更好的蛋白質切割活性 (Nöllmann *et al.*, 2007)。

另外在探討 assay buffer 中，何種離子對於 MALT1 的切割能力是重要的，我們觀察到，MALT1 切割 BCL10 絕對需要在 1.0M ammonium citrate 環境下，而是否仍需要其他離子的幫助有待探討。

四、MALT1 蛋白切割活性之探討

MALT1 切割 BCL10 *in vivo*

Uren 等人一開始先以胺基酸序列做分析比對 (alignment)，發現 MALT1 和 Caspase 皆有 Cys-His catalytic diad 做為 active site 來進行受質切割，MALT1 的 Cys-His catalytic diad 分別為 H415 及 C464。Snipas 等人為了研究 MALT1 是否具有蛋白質切割活性，在細菌內只表現 MALT1 的 CLD (329~566 amino acid) 的蛋白質，在 *in vitro* 實驗中發現只有 Leucine-based acyloxymethyl ketone probe 能夠與 putative catalytic site 共價結合，利用 MALDI-TOF 找出位於 CLD 上的 Cysteine 539 對於此共價結合是相當重要的。因此一開始為了在我的 *in vivo* 實驗中重現 MALT1 切割 BCL10 的能力，及 MALT1 失活的對照組，構築 MALT1、MALT1-H415A、MALT1-C464A、MALT1-C539A (圖一)。

共同轉染 MALT1、MALT1-H415A、MALT1-C464A、或 MALT1-C539A constructs 與 BG 送至 293T 細胞共同表現，觀察 BG 蛋白質切割的現象。結果顯示，BG 僅在與 MALT1、MALT1-C539A 共同表現下才可以觀察到有數種不同分子量的蛋白質形式，同時也能觀察到 GFP 被切割下來 (圖二)。而當處理 CIAP 後，MALT1 及 MALT1-C539A 與 BG 共同轉染的 BCL10 切割現象能夠更清楚觀察到。其實 MALT1-H415A 或是 MALT1-C464A 的切割能力雖然顯著下降，在處理 CIAP 過後仍

可發現BG有被切割。

這似乎暗示著在 *in vivo* 中，MALT1 可能缺乏其中一個 catalytic diad 仍有些許切割活性，可能要 double mutation 才能確定，抑或是 MALT1 有其他 residue 或是透過 adaptor 蛋白質來補償(compensate)切割活性。但是在 *in vitro* 的系統中，MALT1 只要各一 catalytic diad 突變後，便失去切割活性(圖七)。

MALT1 是否具有自行裁切(autoprocessing)能力

Metacaspase 為一種在植物、真菌、及原生動物內的 caspase like protease，Vercammen 等人探討 Metacaspase 的生化特性的報導中發現，在細菌內大量表現 Metacaspase，蛋白質表現以西方墨點法分析，能夠看到具有不同分子量的蛋白質產生，但是當 catalytic diad 被突變後，即顯著下降這樣的現象。Vercammen 等人認為，Metacaspase 和 Caspase 一樣，皆有自行裁切之能力，能夠成為有活性的兩個 subunit，進而對受質進行切割。利用蛋白質純化、Mass Spectrometry 及 Edman degradation sequencing，回推出 Metacaspase 切割位置在 P1 為 Arginine/Lysine (Vercammen *et al.*, 2004)。

雖然尚未有報導指出，MALT1 是否具有自行裁切之能力。在我們系統當中，不論是在細胞內大量表現，亦或是在細菌內大量表現 MALT1，只要 MALT1 的 CLD 與 C 端皆存在時，都可以利用 Coomassie Blue 或是 MALT1、anti-myc、及 anti-His 一級抗體辨識到 MALT1 有許多不同分子量的形式存在，這是否暗示著說 MALT1 可能也有自行切割能力，始有蛋白切割活性。但是不同分子量的 MALT1 之產生，也無法排除是經由細胞內或是細菌內其他蛋白酶進行切割。

MALT1 的 C 端對於切割 BCL10 是重要的

在先前實驗室的研究中已知道，在 *in vivo* 中 MALT1 的 CLD 和 C 端區域誘導 BCL10 切割非常重要。已知 MALT1 的 CLD 其 catalytic diad(H415-C464)的所在，

但是 C 端區域到底扮演什麼樣的角色，目前對於 C 端較為瞭解的功能是和 TRAF6 有結合作用，並且能夠被進行泛素化而活化下游蛋白質(Zhou et al., 2005)。已知 MALT1 的 C 端共有 11 個離胺酸(Lysine)可能被泛素化，為了要詳加 map MALT1 負責誘導切割 domain，構築了 MALT1 1-701-myc(表現 K644、K648、K661、K665、K677、K679)及 MALT1 Δ 644-679-myc(表現 K702、K709、K714、K724、K824)。分別將兩者 MALT1 constructs 與 BG 送入 293T 細胞內大量表現，觀察到 BG 僅在 MALT1 1-701-myc 共同表現下才有被切割的現象發生(data not shown)。而 MALT1 Δ 644-679 的位置正位於 MALT1 的第三個 Ig domain，這似乎暗示著除了 CLD 外，位於 C 端的第三個 Ig domain 對於 MALT1 切割 BCL10 非常重要。

五、MALT1 切割受質專一性的探討

Caspase 為一 Cysteine aspartyl-specific 蛋白酶，其切割受質專一性的研究已經非常透徹，catalytic diad 位於 large subunit 上，而 specificity pocket 中的 S1 subsite 是由 large 及 small subunits 共同形成，在 caspase-3 中分別為 Arg179、Gln283、及 Arg341；而 S2~S4 subsites 則主要由 small subunit 所成型，因此 caspase 的受質專一性是由於 small subunit 胺基酸序列上的變化(Denault and Salvesen 2002)。在探討 MALT1 對於受質專一性時，或許可以用蛋白質折疊的 3D 結構來解釋其偏好(prefer)的受質 P1~P4 胺基酸序列。

MALT1 切割 BCL10 專一性的探討

針對 MALT1 對於 P1 site 為何種胺基酸有較好的專一性切割，我們使用了 BCL10、BCL10L225A、BCL10L225E、BCL10L225G、BCL10L225Q、BCL10L225R、BCL10L225T、BCL10R228G、及 BCL10R228I(圖十三)試圖回答這個問題。MALT1 對於野生型 BCL10 具有最好的切割能力，其次為 BCL10L41R、BCL10L225R、BCL10 Δ 107~119、BCL10L225T。但對於 BCL10L225A、BCL10L225E、

BCL10L225G、BCL10L225Q、BCL10R228G、BCL10R228I 即使在西方墨點法 overexposure 的情況下仍然無切割現象被觀察到。

在 *in vivo* 的情況，BCL10 的 CARD 構形被破壞—BCL10L41R，或是 BCL10 無法和 MALT1 有結合作用—BCL10 Δ 107~119，CBM 複合體無法形成皆失去了 NF- κ B 的活性，也觀察不到 BCL10 被 MALT1 切割的現象(Lucas *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001)。但在 *in vitro* 的情況下，只要 BCL10 的 C 端胺基酸不做任何改變，不論是破壞 BCL10 的 CARD 構形的 BCL10L41R，或是無法和 MALT1 進行結合作用(association)的 BCL10 Δ 107~119，雖然切割能力下降，但是仍然可以進行切割。有可能是因為在 high salt (1.0M ammonium citrate)的情況下，蛋白質穩定且被動地靠近在一起，即使失去相互作用的 domain，也能夠有被切割的現象被觀察到。

但比較特別的是，BCL10L225R及BCL10L225T都有被切割的現象，Arginine 是一個支鏈帶鹼基的正電胺基酸，Threonine則是一個支鏈帶OH、極性不帶電的胺基酸，而Leucine為非極性(non-polar)、脂肪族(aliphatic)的胺基酸。這樣的結果暗示 MALT1可能對於帶正電的胺基酸在P1 site有較好的親和力，其次則為極性不帶電荷的胺基酸。

MALT1切割peptide-based Ac-LRSR-AMC專一性的探討

在圖十四B中以MALT1的crude lysate進行切割實驗可以觀察到，不論是在 MALT1或是MALT1-C464A在不同pH值下對於Ac-LRSR-AMC的切割情形，似乎沒有太大的差異性。除此之外，兩者的相對發射螢光值都非常高。我們推測的原因可能是，細菌內本身就有很多蛋白酶，能夠切割帶正電胺基酸的C端。

不過以1 μ g或是2 μ g純化過後的MALT1及MALT1-C464A與Ac-LRSR-AMC 進行反應時，MALT1可以切割Ac-LRSR-AMC值非常好，一旦MALT1的catalytic residue被突變後，切割Ac-LRSR-AMC幾乎無法偵測活性。

另外模擬 R228 的切割 peptide Ac-LRSR-AMC 比起 L225 Ac-FLPL-AMC 有較

高的相對發射螢光值。根據實驗結果推測，MALT1 可能對於鹼基胺基酸在 P1 site 有較好親和力，但 BCL10L225 這個位置對於 MALT1 的 specificity pocket 的辨識是重要的，也可能 C 端部份的胺基酸序列亦或是 3D 立體結構上對於 MALT1 的辨識切割是重要的，都有可能影響切割與否。



第 6 章、参考文献

Akagi, T., Motegi, M., Tamura, A., Suzuki, R., Hosokawa, Y., Suzuki, H., Ota, H., Nakamura, S., Morishima, Y., Taniwaki, M., *et al.* (1999). A novel gene, MALT1 at 18q21, is involved in t(11;18) (q21;q21) found in low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Oncogene* 18, 5785-5794.

Beyaert, R., Heyninck, K., and Van Huffel, S. (2000). A20 and A20-binding proteins as cellular inhibitors of nuclear factor-kappa B-dependent gene expression and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 60, 1143-1151.

Boatright, K.M., Renatus, M., Scott, F.L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I.M., Ricci, J.E., Edris, W.A., Sutherlin, D.P., Green, D.R., *et al.* (2003). A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 11, 529-541.

Che, T., You, Y., Wang, D., Tanner, M.J., Dixit, V.M., and Lin, X. (2004). MALT1/paracaspase is a signaling component downstream of CARMA1 and mediates T cell receptor-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 279, 15870-15876.

Coornaert, B., Baens, M., Heyninck, K., Bekaert, T., Haegman, M., Staal, J., Sun, L., Chen, Z.J., Marynen, P., and Beyaert, R. (2008). T cell antigen receptor stimulation induces MALT1 paracaspase-mediated cleavage of the NF-kappaB inhibitor A20. *Nat Immunol* 9, 263-271.

Coornaert, B., Carpentier, I., and Beyaert, R. (2009). A20: central gatekeeper in inflammation and immunity. *J Biol Chem* 284, 8217-8221.

Denault, J.B., and Salvesen, G.S. (2002). Caspases. *Curr Protoc Protein Sci* Chapter 21, Unit 21 28.

Dierlamm, J., Baens, M., Wlodarska, I., Stefanova-Ouzounova, M., Hernandez, J.M., Hossfeld, D.K., De Wolf-Peeters, C., Hagemeijer, A., Van den Berghe, H., and Marynen, P. (1999). The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21) associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Blood* 93, 3601-3609.

Dixit, V.M., Green, S., Sarma, V., Holzman, L.B., Wolf, F.W., O'Rourke, K., Ward, P.A., Prochownik, E.V., and Marks, R.M. (1990). Tumor necrosis factor-alpha induction of novel gene products in human endothelial cells including a macrophage-specific chemotaxin. *J Biol Chem* 265, 2973-2978.

Gaide, O., Martinon, F., Micheau, O., Bonnet, D., Thome, M., and Tschopp, J. (2001). Carma1, a CARD-containing binding partner of Bcl10, induces Bcl10 phosphorylation

and NF-kappaB activation. *FEBS Lett* 496, 121-127.

Guiet, C., and Vito, P. (2000). Caspase recruitment domain (CARD)-dependent cytoplasmic filaments mediate bcl10-induced NF-kappaB activation. *J Cell Biol* 148, 1131-1140.

Hara, H., and Saito, T. (2009). CARD9 versus CARMA1 in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 30, 234-242.

Heyninck, K., and Beyaert, R. (2005). A20 inhibits NF-kappaB activation by dual ubiquitin-editing functions. *Trends Biochem Sci* 30, 1-4.

Hymowitz, S.G., and Wertz, I.E. (2010). A20: from ubiquitin editing to tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 10, 332-341.

Kingeter, L.M., and Schaefer, B.C. (2010). Malt1 and cIAP2-Malt1 as effectors of NF-kappaB activation: kissing cousins or distant relatives? *Cell Signal* 22, 9-22.

Klinkenberg, M., Van Huffel, S., Heyninck, K., and Beyaert, R. (2001). Functional redundancy of the zinc fingers of A20 for inhibition of NF-kappaB activation and protein-protein interactions. *FEBS Lett* 498, 93-97.

Komander, D., and Barford, D. (2008). Structure of the A20 OTU domain and mechanistic insights into deubiquitination. *Biochem J* 409, 77-85.

Koseki, T., Inohara, N., Chen, S., Carrio, R., Merino, J., Hottiger, M.O., Nabel, G.J., and Nunez, G. (1999). CIPER, a novel NF kappaB-activating protein containing a caspase recruitment domain with homology to Herpesvirus-2 protein E10. *J Biol Chem* 274, 9955-9961.

Lee, E.G., Boone, D.L., Chai, S., Libby, S.L., Chien, M., Lodolce, J.P., and Ma, A. (2000). Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* 289, 2350-2354.

Li, H., Kobayashi, M., Blonska, M., You, Y., and Lin, X. (2006). Ubiquitination of RIP is required for tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 281, 13636-13643.

Liu, Y., Dong, W., Chen, L., Zhang, P., and Qi, Y. (2004). Characterization of Bcl10 as a potential transcriptional activator that interacts with general transcription factor TFIIB. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 1-6.

Liu, Y.C., Penninger, J., and Karin, M. (2005). Immunity by ubiquitylation: a reversible process of modification. *Nat Rev Immunol* 5, 941-952.

Lucas, P.C., Yonezumi, M., Inohara, N., McAllister-Lucas, L.M., Abazeed, M.E., Chen, F.F., Yamaoka, S., Seto, M., and Nunez, G. (2001). Bcl10 and MALT1, independent targets of chromosomal translocation in malt lymphoma, cooperate in a novel NF-kappa B signaling pathway. *J Biol Chem* 276, 19012-19019.

Nollmann, M., Crisona, N.J., and Arimondo, P.B. (2007). Thirty years of Escherichia coli DNA gyrase: from in vivo function to single-molecule mechanism. *Biochimie* 89, 490-499.

Rawlings, D.J., Sommer, K., and Moreno-Garcia, M.E. (2006). The CARMA1 signalosome links the signalling machinery of adaptive and innate immunity in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 6, 799-812.

Rebeaud, F., Hailfinger, S., Posevitz-Fejfar, A., Tapernoux, M., Moser, R., Rueda, D., Gaide, O., Guzzardi, M., Iancu, E.M., Rufer, N., *et al.* (2008). The proteolytic activity of the paracaspase MALT1 is key in T cell activation. *Nat Immunol* 9, 272-281.

Ruefli-Brasse, A.A., French, D.M., and Dixit, V.M. (2003). Regulation of NF-kappaB-dependent lymphocyte activation and development by paracaspase. *Science* 302, 1581-1584.

Ruland, J., Duncan, G.S., Elia, A., del Barco Barrantes, I., Nguyen, L., Plyte, S., Millar, D.G., Bouchard, D., Wakeham, A., Ohashi, P.S., *et al.* (2001). Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF-kappaB and neural tube closure. *Cell* 104, 33-42.

Ruland, J., Duncan, G.S., Wakeham, A., and Mak, T.W. (2003). Differential requirement for Malt1 in T and B cell antigen receptor signaling. *Immunity* 19, 749-758.

Schmidt, U., and Darke, P.L. (1997). Dimerization and activation of the herpes simplex virus type 1 protease. *J Biol Chem* 272, 7732-7735.

Snipas, S.J., Wildfang, E., Nazif, T., Christensen, L., Boatright, K.M., Bogoy, M., Stennicke, H.R., and Salvesen, G.S. (2004). Characteristics of the caspase-like catalytic domain of human paracaspase. *Biol Chem* 385, 1093-1098.

Song, H.Y., Rothe, M., and Goeddel, D.V. (1996). The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6721-6725.

Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Lin, J.H., Poyet, J.L., Fernandes-Alnemri, T., Tsichlis, P.N., and Alnemri, E.S. (1999). CLAP, a novel caspase recruitment domain-containing protein in the tumor necrosis factor receptor pathway, regulates NF-kappaB activation

and apoptosis. *J Biol Chem* 274, 17946-17954.

Sun, L., Deng, L., Ea, C.K., Xia, Z.P., and Chen, Z.J. (2004). The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol Cell* 14, 289-301.

Tewari, M., Wolf, F.W., Seldin, M.F., O'Shea, K.S., Dixit, V.M., and Turka, L.A. (1995). Lymphoid expression and regulation of A20, an inhibitor of programmed cell death. *J Immunol* 154, 1699-1706.

Thome, M. (2008). Multifunctional roles for MALT1 in T-cell activation. *Nat Rev Immunol* 8, 495-500.

Thome, M., Martinon, F., Hofmann, K., Rubio, V., Steiner, V., Schneider, P., Mattmann, C., and Tschopp, J. (1999). Equine herpesvirus-2 E10 gene product, but not its cellular homologue, activates NF-kappaB transcription factor and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 274, 9962-9968.

Thome, M., and Tschopp, J. (2003). TCR-induced NF-kappaB activation: a crucial role for Carma1, Bcl10 and MALT1. *Trends Immunol* 24, 419-424.

Thome, M., and Weil, R. (2007). Post-translational modifications regulate distinct functions of CARMA1 and BCL10. *Trends Immunol* 28, 281-288.

Uren, A.G., O'Rourke, K., Aravind, L.A., Pisabarro, M.T., Seshagiri, S., Koonin, E.V., and Dixit, V.M. (2000). Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell* 6, 961-967.

Vercammen, D., van de Cotte, B., De Jaeger, G., Eeckhout, D., Casteels, P., Vandepoele, K., Vandenberghe, I., Van Beeumen, J., Inze, D., and Van Breusegem, F. (2004). Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine. *J Biol Chem* 279, 45329-45336.

Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J., and Chen, Z.J. (2001a). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412, 346-351.

Wang, L., Guo, Y., Huang, W.J., Ke, X., Poyet, J.L., Manji, G.A., Merriam, S., Glucksmann, M.A., DiStefano, P.S., Alnemri, E.S., *et al.* (2001b). Card10 is a novel caspase recruitment domain/membrane-associated guanylate kinase family member that interacts with BCL10 and activates NF-kappa B. *J Biol Chem* 276, 21405-21409.

Wegener, E., and Krappmann, D. (2007). CARD-Bcl10-Malt1 signalosomes: missing link to NF-kappaB. *Sci STKE* 2007, pe21.

Wertz, I.E., O'Rourke, K.M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., Wu, P., Wiesmann, C., Baker, R., Boone, D.L., *et al.* (2004). De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* 430, 694-699.

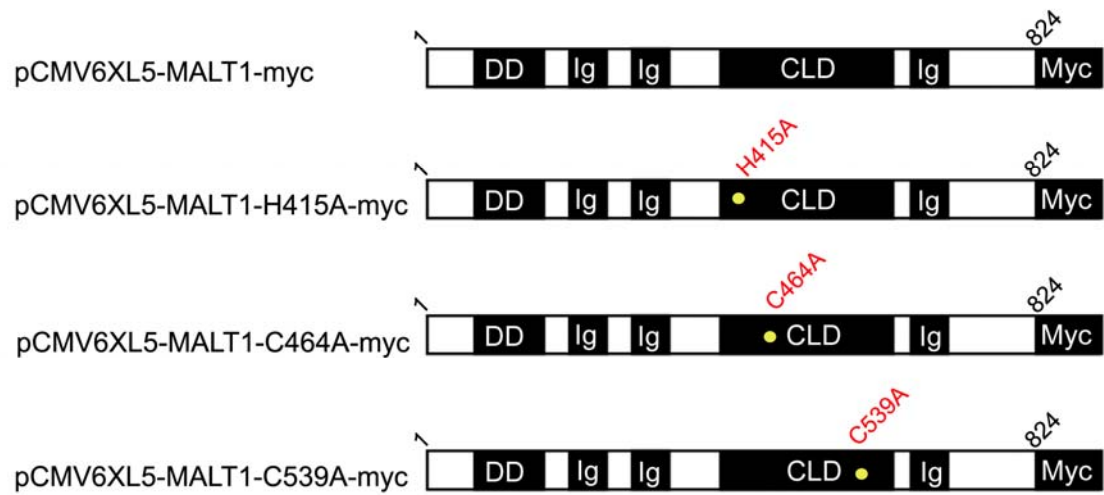
Willis, T.G., Jadayel, D.M., Du, M.Q., Peng, H., Perry, A.R., Abdul-Rauf, M., Price, H., Karran, L., Majekodunmi, O., Wlodarska, I., *et al.* (1999). Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell* 96, 35-45.

Xue, L., Morris, S.W., Orihuela, C., Tuomanen, E., Cui, X., Wen, R., and Wang, D. (2003). Defective development and function of Bcl10-deficient follicular, marginal zone and B1 B cells. *Nat Immunol* 4, 857-865.

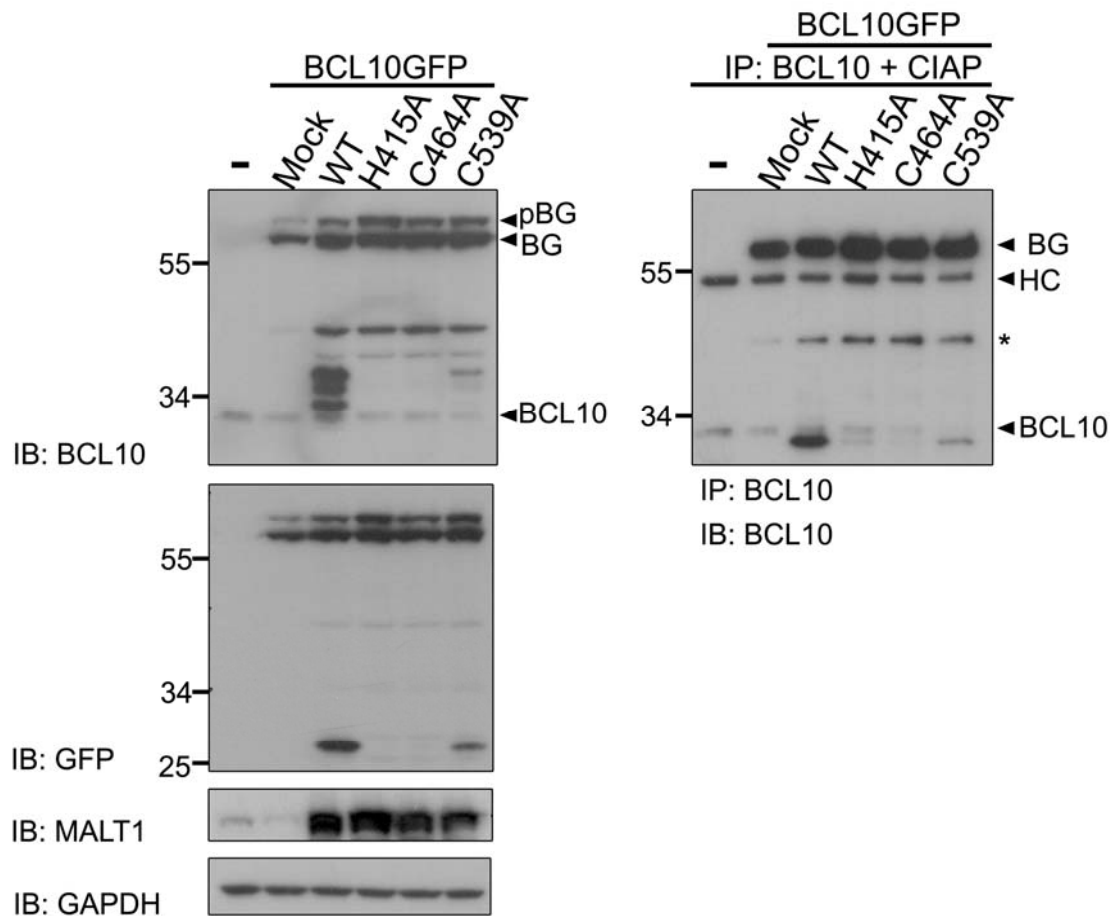
Yan, M., Lee, J., Schilbach, S., Goddard, A., and Dixit, V. (1999). mE10, a novel caspase recruitment domain-containing proapoptotic molecule. *J Biol Chem* 274, 10287-10292.

Zhang, Q., Siebert, R., Yan, M., Hinzmann, B., Cui, X., Xue, L., Rakestraw, K.M., Naeve, C.W., Beckmann, G., Weisenburger, D.D., *et al.* (1999). Inactivating mutations and overexpression of BCL10, a caspase recruitment domain-containing gene, in MALT lymphoma with t(1;14)(p22;q32). *Nat Genet* 22, 63-68.

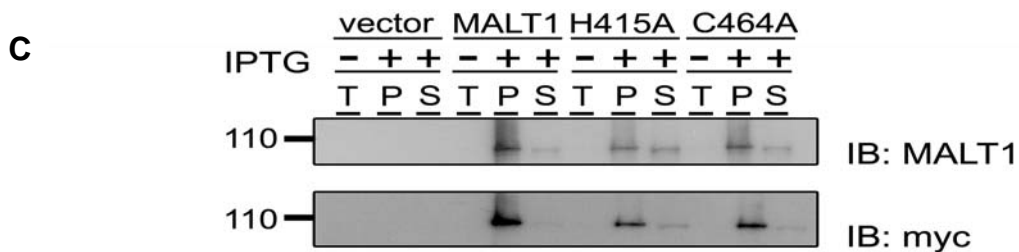
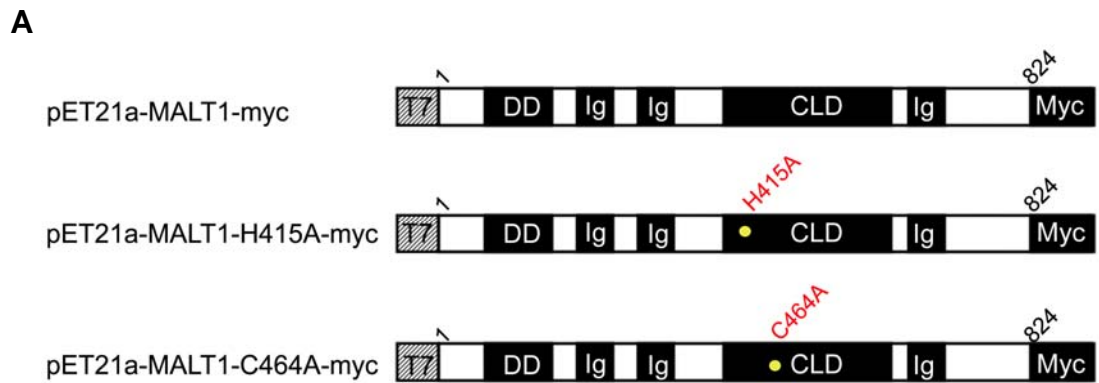
Zhou, H., Du, M.Q., and Dixit, V.M. (2005). Constitutive NF-kappaB activation by the t(11;18)(q21;q21) product in MALT lymphoma is linked to deregulated ubiquitin ligase activity. *Cancer Cell* 7, 425-431.



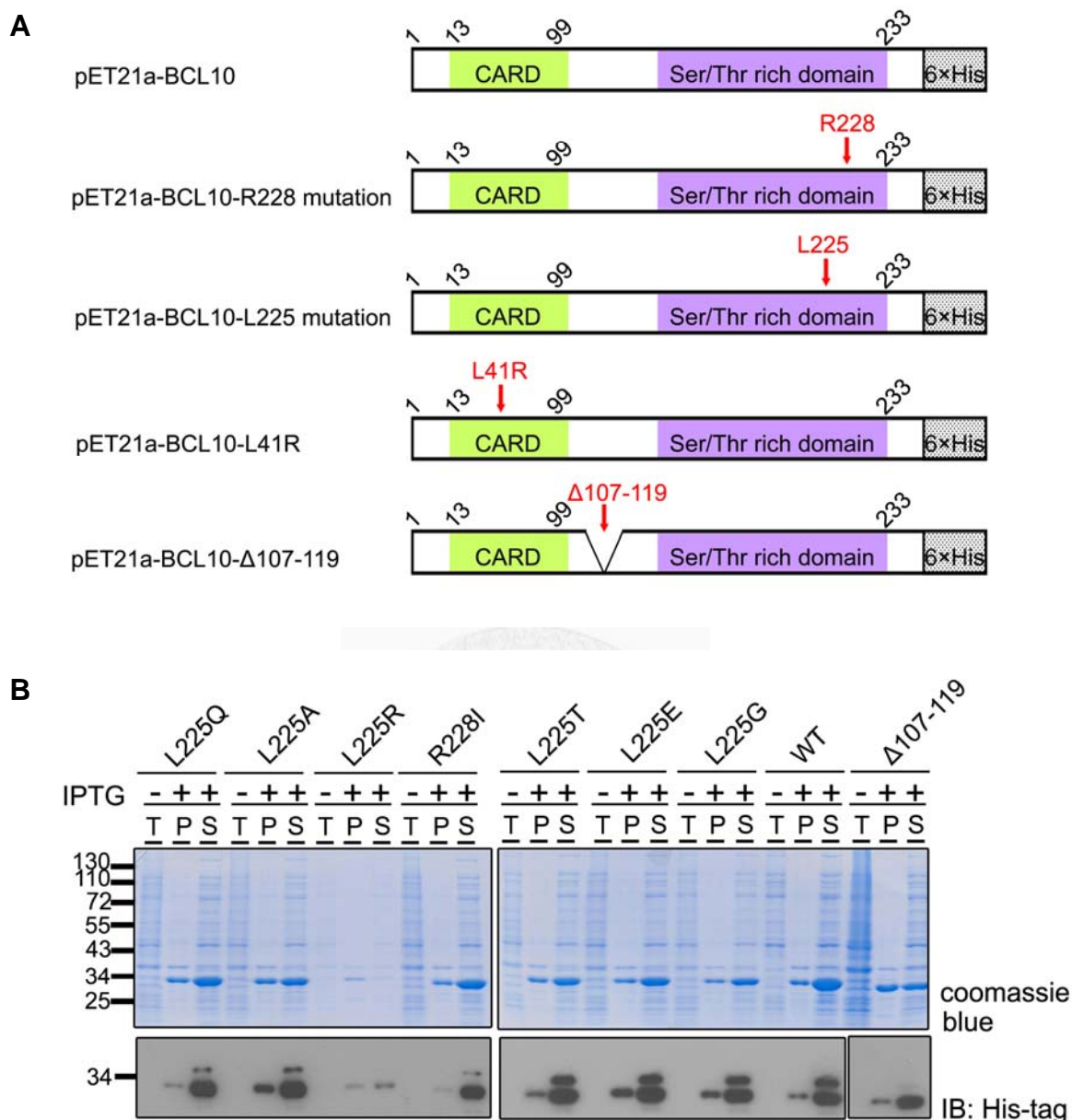
圖一、在真核細胞表現的 MALT1 constructs。表現質體骨架均為 pCMV6XL5 vector。DD：Death domain。Ig：Immunoglobulin like domain。CLD：Caspase like domain。Myc：Myc epitope tag。



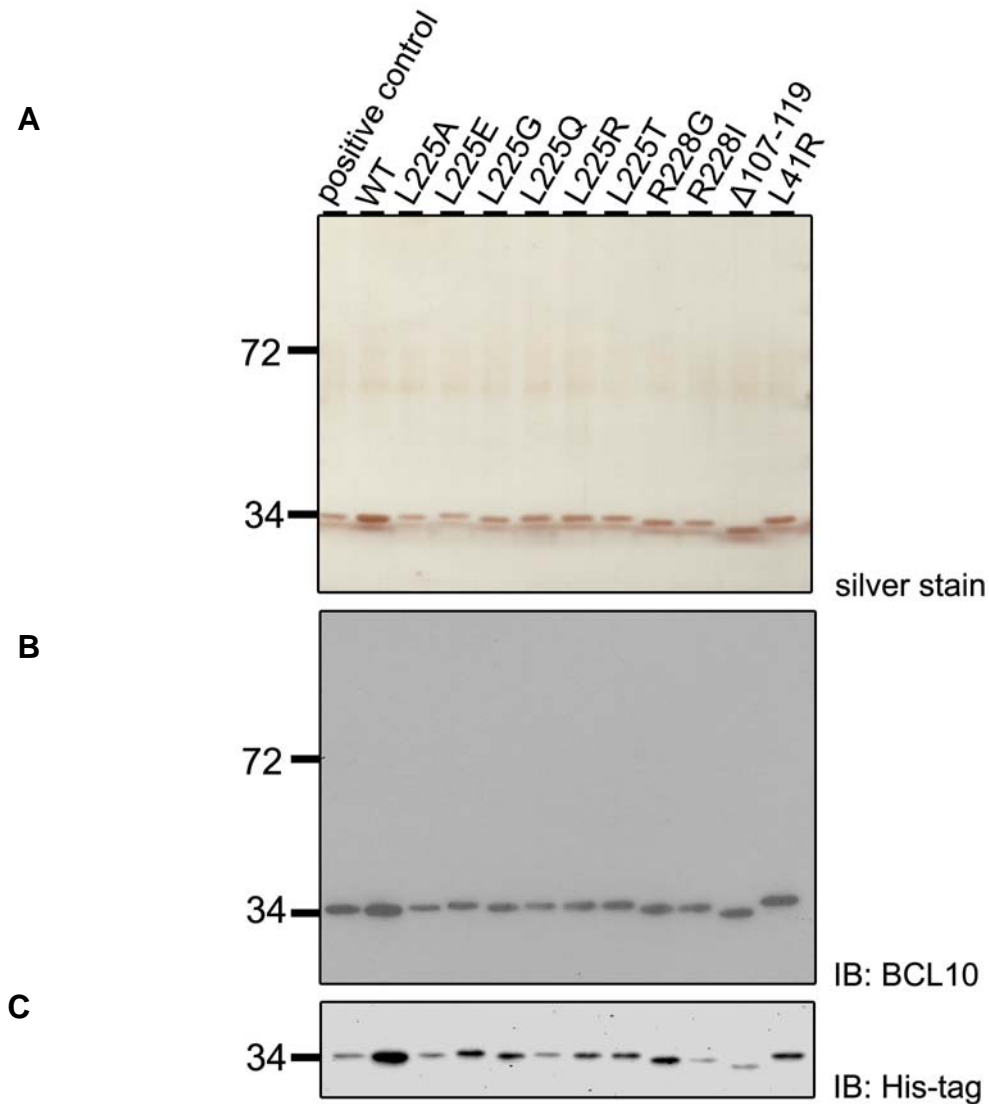
圖二、BCL10 受 MALT1 誘導而產生切割現象。分別將不同的 MALT1 constructs (2 μ g)與 BG(BCL10GFP) (0.25 μ g)共同轉染至 293T 細胞，蛋白質表現以西方墨點法分析，分別用 BCL10 一級抗體(左上方)或 rabbit-GFP 一級抗體辨識(左上二)。
 CIAP：Calf Intestine Alkaline Phosphatase)去磷酸酵素作用。HC：antibody heavy chain。*：non-specific binding。



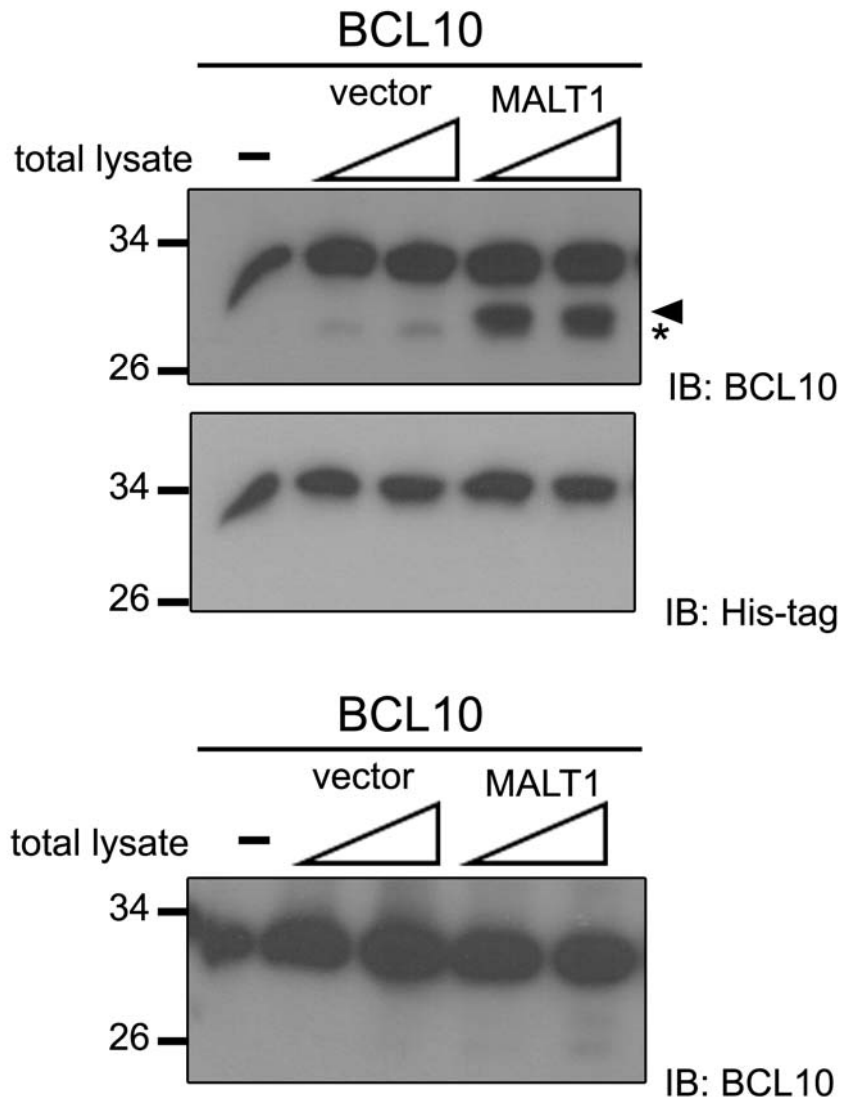
圖三、在細菌中可以表現完整的 MALT1 蛋白質。(A)使用的 MALT1 表現質體。(B)含有表現質體的細菌 BL21DE3 在 IPTG 誘導下能夠表現完整 MALT1、MALT1-H415A 及 MALT1-C464A，蛋白質表現以 Coomassie blue 染色呈現。(C)分析蛋白質表現為何種型式，西方墨點法分析，分別用 MALT1 一級抗體(上圖)或 myc 一級抗體辨識(下圖)。T：Total lysate。P：pellet form。S：supernatant form。表現質體骨架均為 pET21a vector。



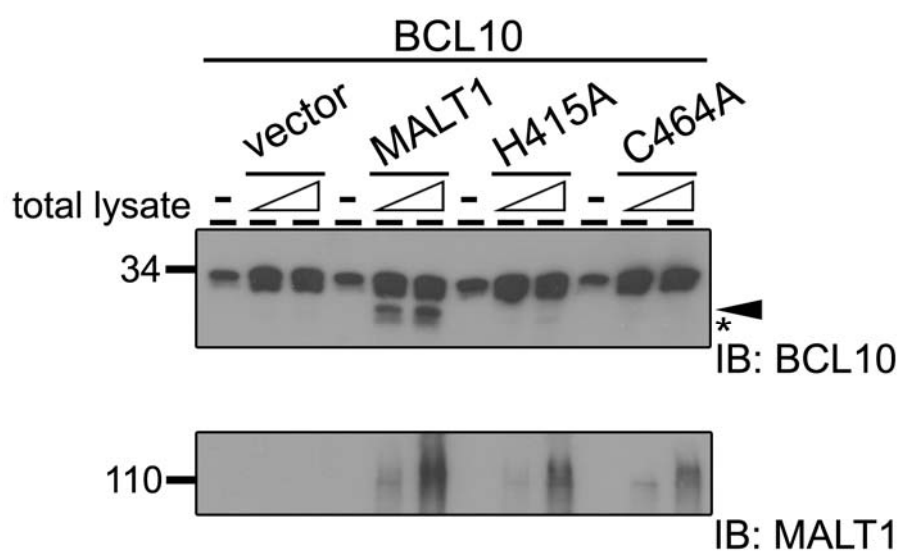
圖四、在細菌中可以表現完整的 BCL10 蛋白質。(A)使用的 BCL10 表現質體。(B)含有質體的細菌 BL21DE3 在 IPTG 誘導下能夠表現完整 BCL10、BCL10L225A、BCL10L225E、BCL10L225G、BCL10L225Q、BCL10L225R、BCL10L225T、BCL10R228I、及 BCL10 Δ 107~119，並分析蛋白質表現為何種型式，以 Coomassie blue 染色呈現(B 圖上)。進行西方墨點法分析，以 anti-His 一級抗體辨識(B 圖下)。T：Total lysate。P：pellet form。S：supernatant form。表現質體骨架均為 pET21a vector。



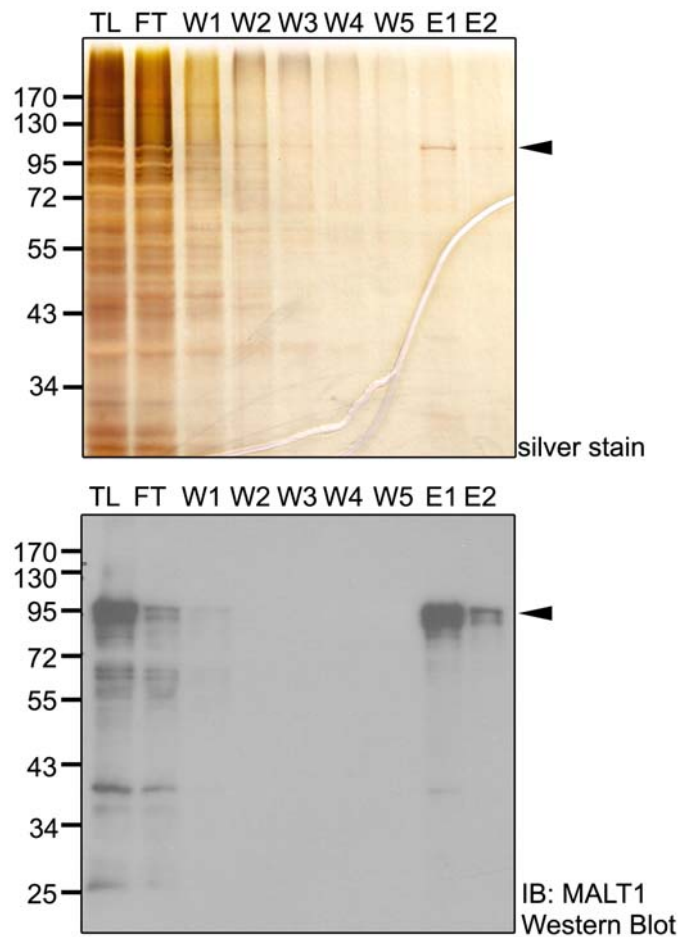
圖五、**BCL10** 蛋白質純化的純度。含有質體的細菌 BL21DE3 在 IPTG 誘導下能夠表現完整 BCL10、BCL10L225A、BCL10L225E、BCL10L225G、BCL10L225Q、BCL10L225R、BCL10L225T、BCL10R228G、BCL10R228I、BCL10 Δ 107~119 及 BCL10L41R，以 Ni²⁺ NTA agarose beads 進行 denature form 蛋白質純化，蛋白質純化結果以 silver stain 染色呈現(圖 A)。以西方墨點法分析，分別用 BCL10 一級抗體(圖 B)及 anti-His 一級抗體辨識(圖 C)。表現質體骨架均為 pET21a vector。



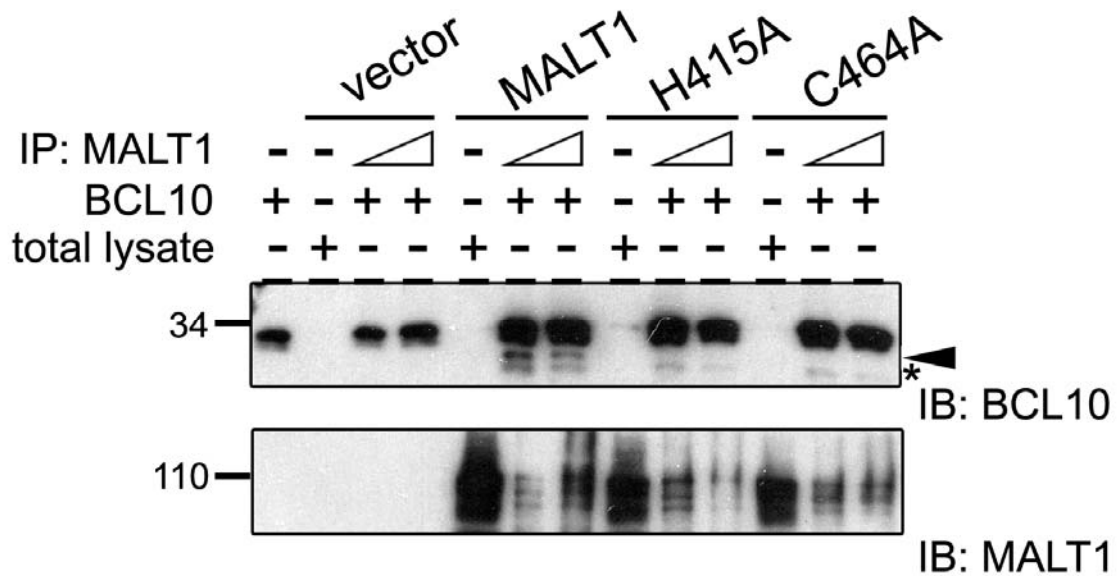
圖六、在 Paracaspase cleavage buffer A 中 MALT1 可以切割 BCL10。使用 vector 及 T7-tag MALT1 lysate 直接和純化的 recombinant BCL10 共存，在(A)Paracaspase cleavage buffer A(50mM MES pH 6.8 , 150mM NaCl , 10%(wt/vol) sucrose , 0.1%(wt/vol) CHAPS , 10mM dithiothreitol , 1 M ammonium citrate)或(B) Paracaspase cleavage buffer B(50 mM Tris-HCl , pH 7.4 , 60 mM NaCl , 10 mM KCl , 20 mM MgCl₂ , 100 mM CaCl₂ and 10 mM dithiothreitol)對 recombinant 純化的 BCL10(50ng) 進行切割作用，在 30°C 作用 16 小時，蛋白質切割結果以 BCL10 一級抗體及 anti-His 一級抗體進行辨識。total lysate：取用 total lysate 中含有相當於 1 μ g 及 2 μ g 的 MALT1 的量。◀：被切割後的 BCL10 蛋白質。*：non-specific binding。



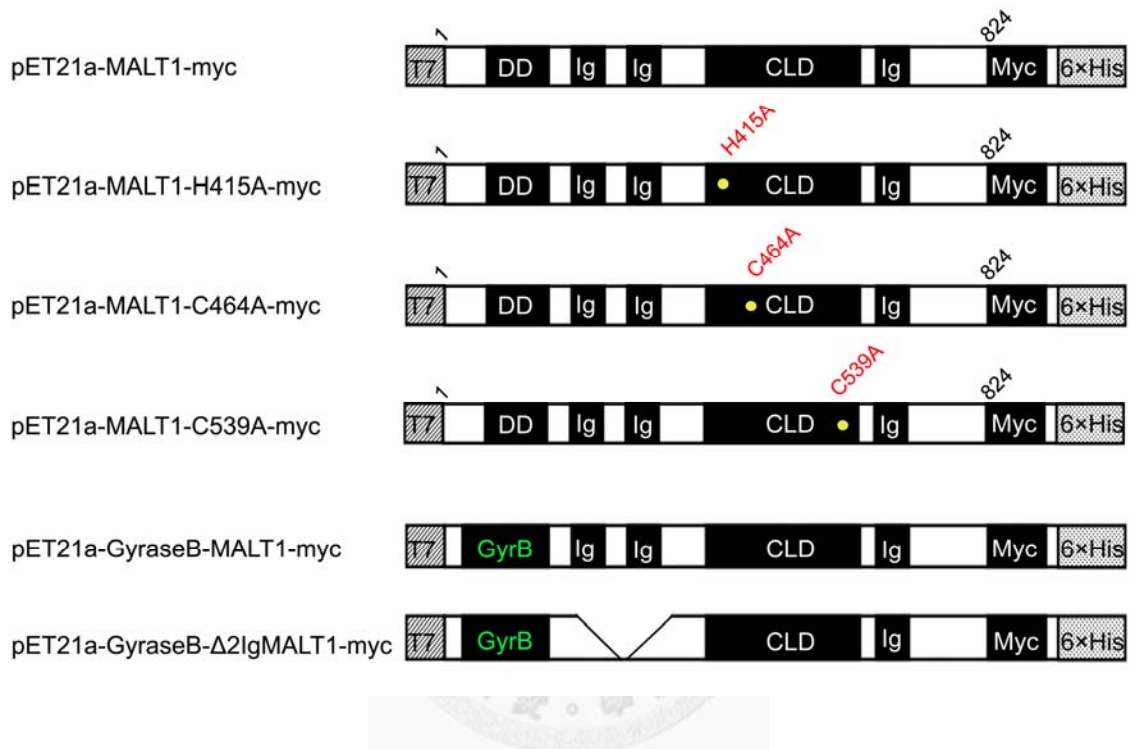
圖七、含有MALT1的total lysate可以切割BCL10。使用vector、MALT1、MALT1-H415A、MALT1-C464A lysate直接和純化過的recombinant BCL10共存，在Paracaspase cleavage buffer A中對BCL10(50ng)進行切割作用，在30°C作用16小時，蛋白質切割結果以BCL10一級抗體及MALT1一級抗體進行辨識。total lysate：取用total lysate中含有相當於1 μ g及2 μ g的MALT1的量。◀：被切割後的BCL10蛋白質。
*：non-specific binding。



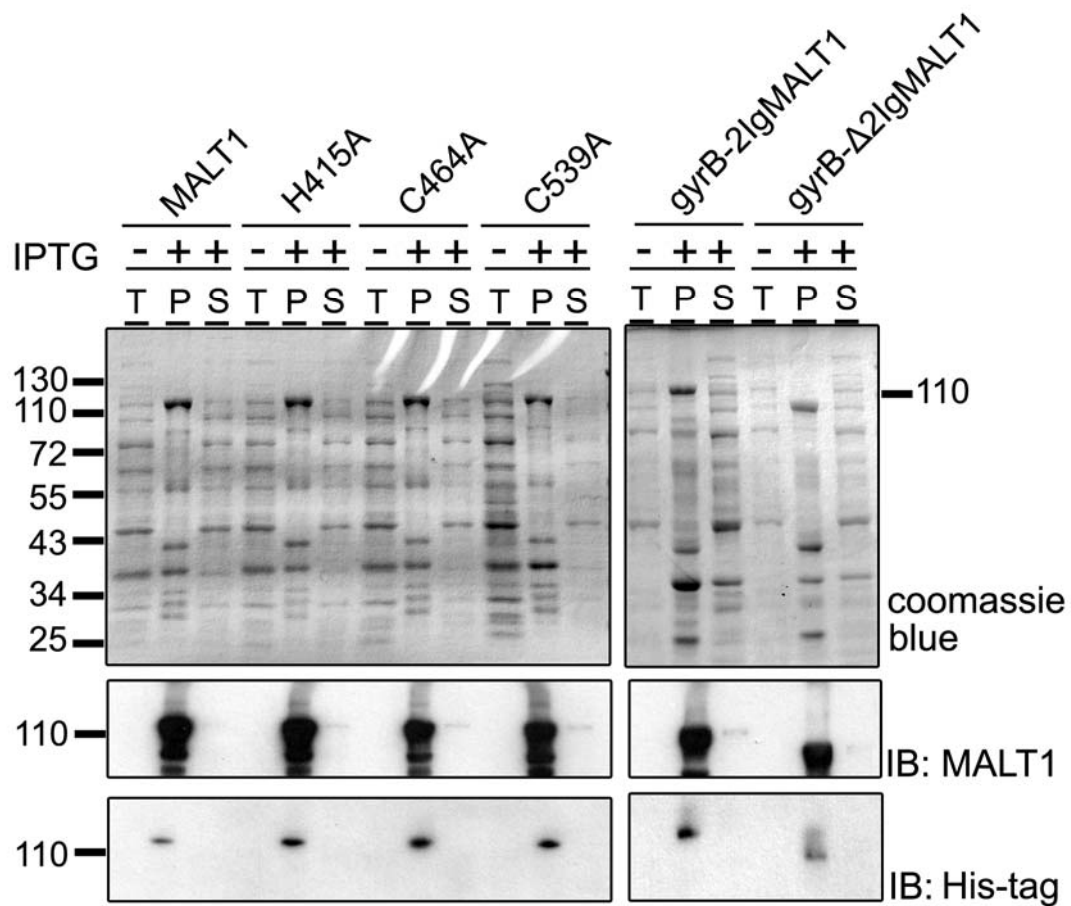
圖八、純化的 T7-tag MALT1 可以切割 BCL10。含有表現質體 MALT1 的細菌 BL21DE3 在 IPTG 誘導下能夠表現完整 MALT1，以 T7-tag agarose beads 進行蛋白質純化，蛋白質純化結果以銀染色呈現及西方墨點法分析，分別用 MALT1 一級抗體辨識。TL：total lysate。FT：flow through。W：wash。E：elution。



圖九、T7-tag純化的MALT1可以切割BCL10。將和T7-Sepharose binding作用後的vector、MALT1、MALT1-H415A、及MALT1-C464A的Sepharose直接和純化過的recombinant BCL10共存，在Paracaspase cleavage buffer A中對BCL10 (50ng) 進行切割作用，在30°C作用16小時，蛋白質切割結果以BCL10一級抗體及MALT1一級抗體進行辨識。◀：被切割後的BCL10蛋白質。*：non-specific binding。

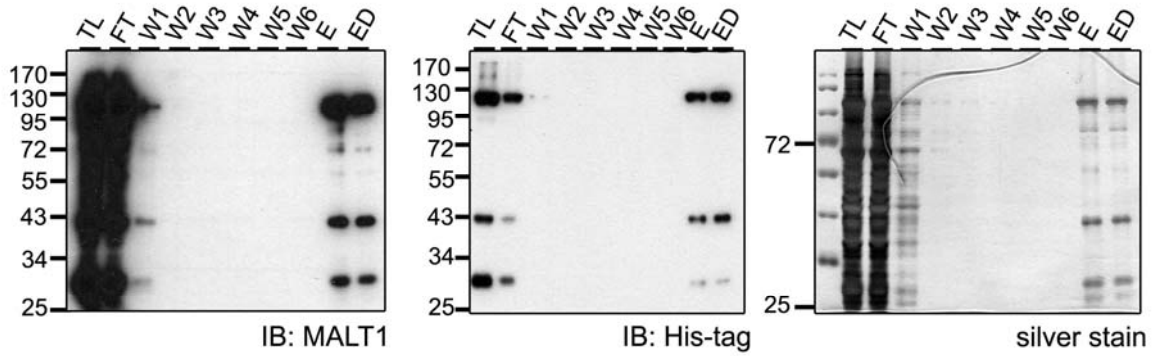


圖十、**His-tag MALT1 constructs**。表現質體骨架均為 pET21a vector。T7：T7-tag epitope。DD：Death domain。Ig：Immunoglobulin like domain。CLD：Caspase like domain。Myc：Myc-tag epitope。6His：His-tag epitope。GyrB：GyraseB dimerization domain。表現質體骨架均為 pET21a vector。

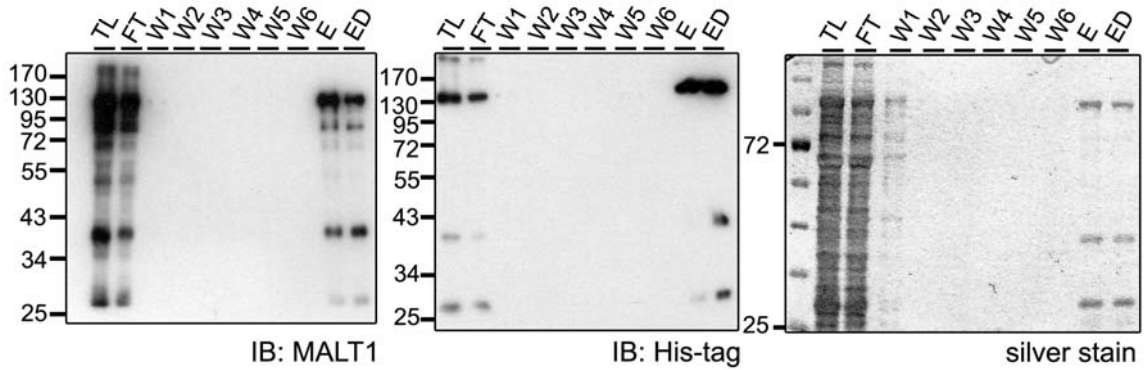


圖十一、在細菌中可以表現完整的 His-tag MALT1 蛋白質。含有表現質體的細菌 BL21DE3 在 IPTG 誘導下能夠表現完整 MALT1、MALT1-H415A、MALT1-C464A、MALT1-C539A、gyrB-MALT1、gyrB-Δ2IgMALT1，並分析蛋白質表現為何種型式，以 Coomassie blue 染色呈現(圖上)。進行西方墨點法分析，以 MALT1 一級抗體(圖中)及 anti-His 一級抗體(圖下)辨識。T: Total lysate。P: pellet form。S: supernatant form。

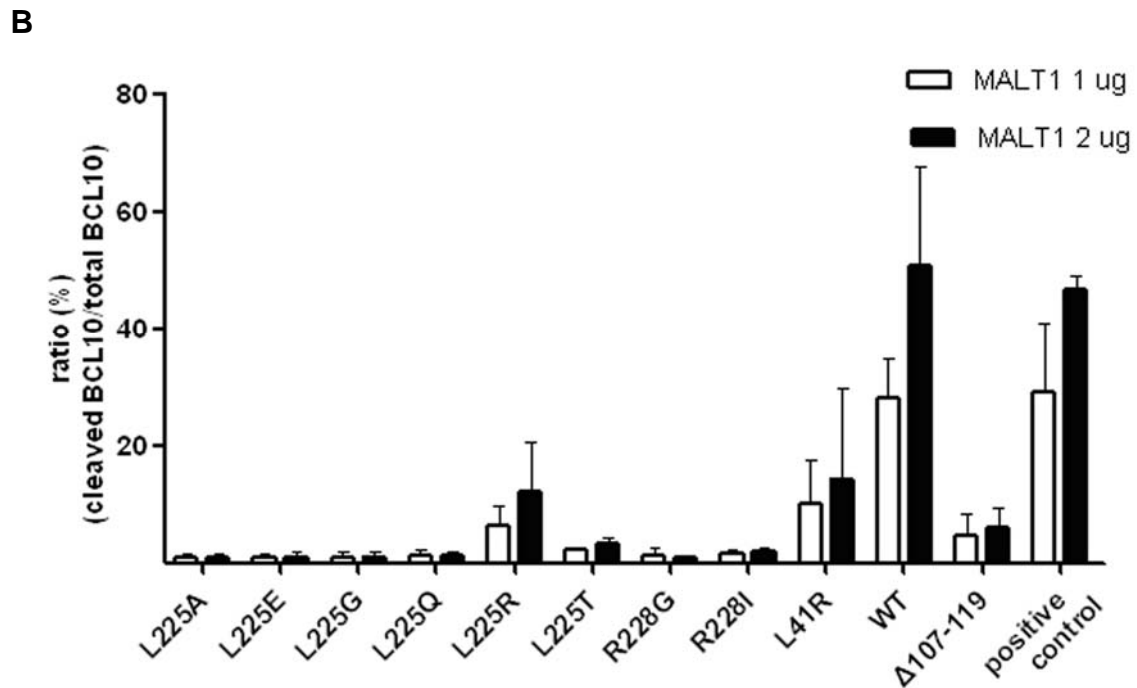
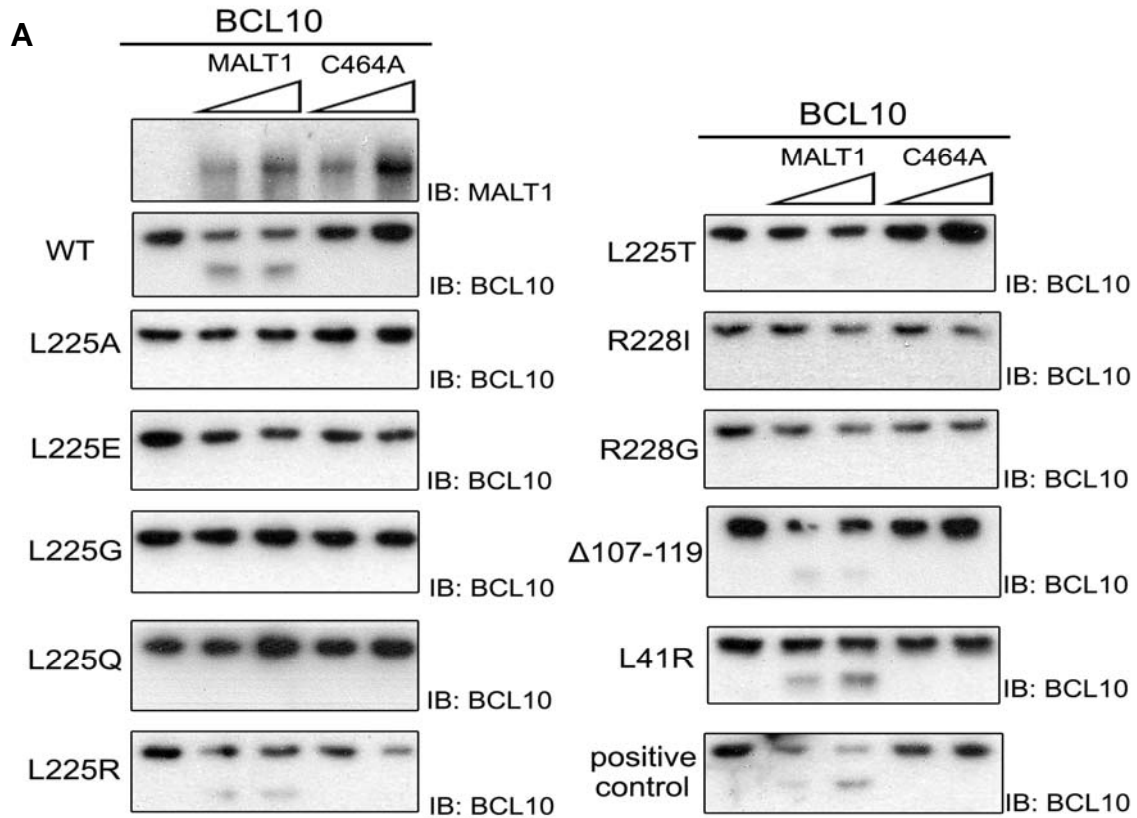
A. MALT1



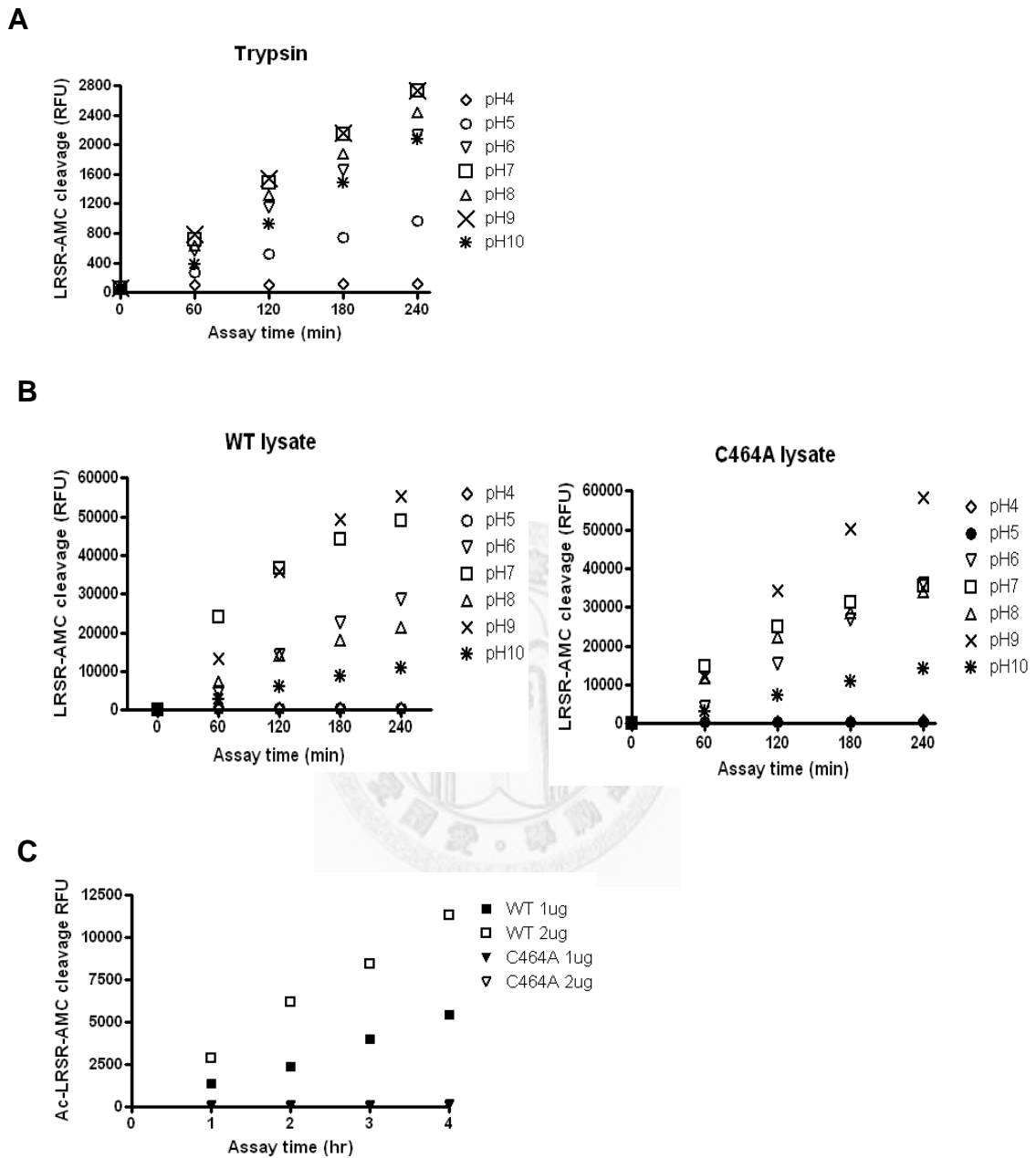
B. C464A



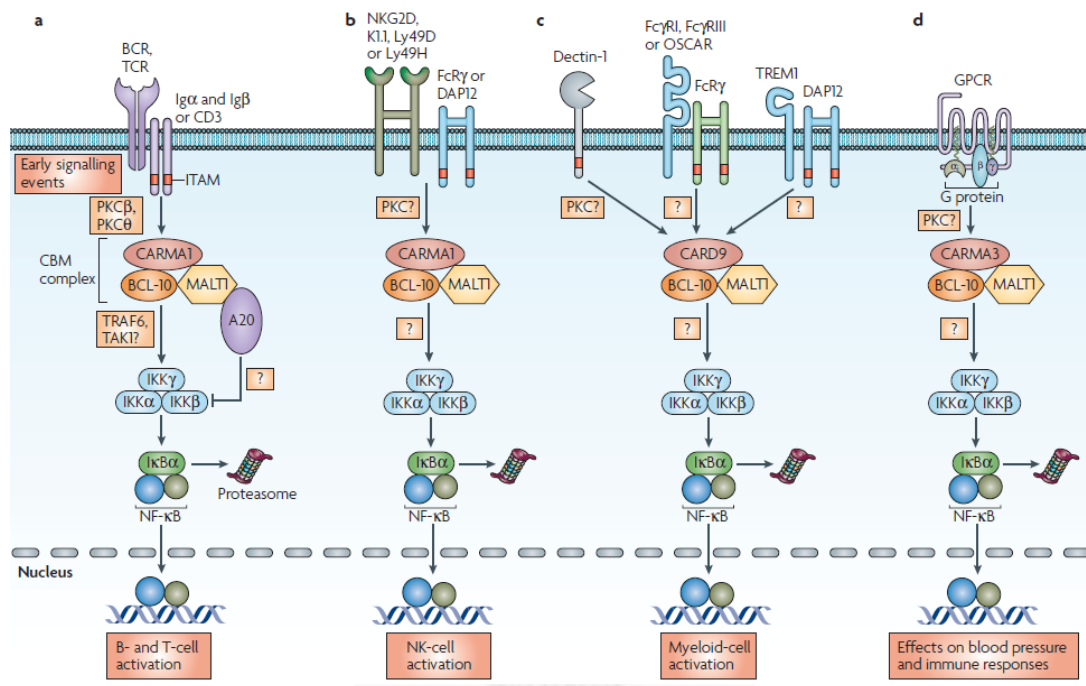
圖十二、His-tag MALT1 蛋白質純化的純度。含有表現質體 MALT1(圖 A)及 MALT1-C464A(圖 B)的 Arctic Express™ RIL 勝任細胞在 IPTG 誘導下能夠表現完整 His-tag MALT1，以 Ni²⁺ NTA agarose beads 進行蛋白質純化，蛋白質純化結果以銀染色呈現及西方墨點法分析，分別用 MALT1 一級抗體及 anti-His 一級抗體辨識。TL：total lysate。FT：flow through。W：wash。E：elution。ED：elution followed by dialysis。



圖十三、純化的 His-tag MALT1 可以對 BCL10 進行切割。(A)將純化過的 MALT1 與純化過的不同 recombinant BCL10(50ng)共存，在 Paracaspase cleavage buffer A 進行切割作用，30°C 作用 16 小時，蛋白質切割結果以 BCL10 一級抗體及 MALT1 一級抗體進行辨識。(B)統計量化 MALT1 與不同 recombinant BCL10 切割能力的結果。



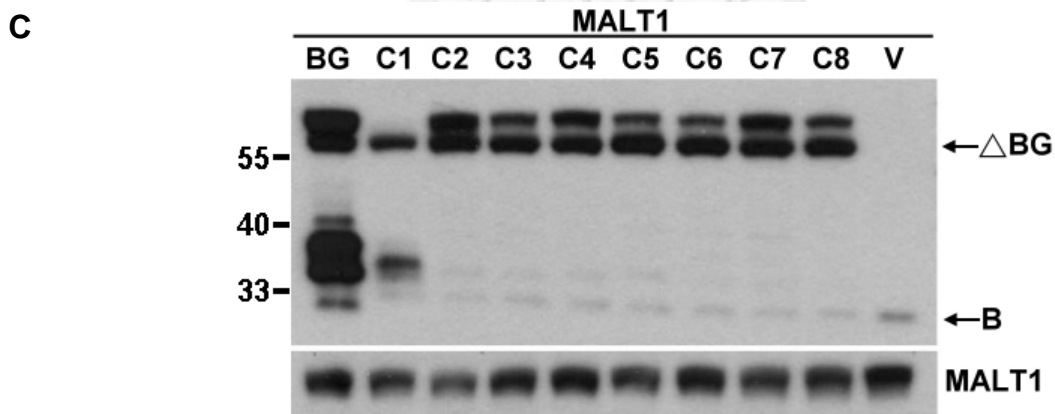
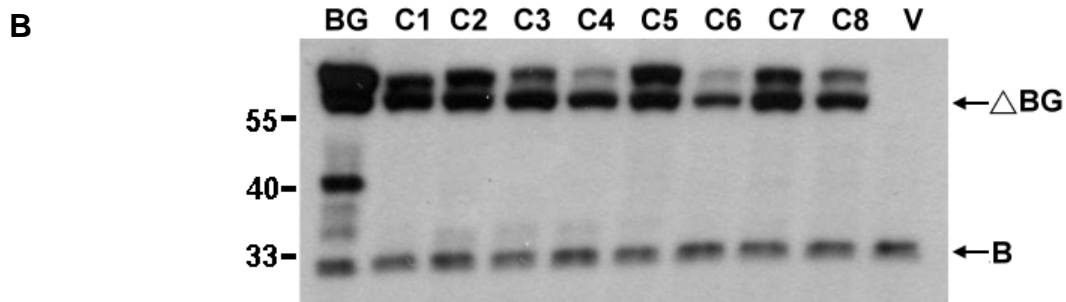
圖十四、MALT1 可以切割 BCL10 模擬 R228 切位胜肽 Ac-LRSR-AMC。(A)在不同 pH 情況下，2 nM trypsin 當作 positive control，對 50 μ M Ac-LRSR-AMC 進行切割，每一小時測一次相對發射螢光值(RFU)共四次。(B)將 MALT1 或 MALT1-C464A 的 lysate 直接和 50 μ M Ac-LRSR-AMC 進行切割，每一小時測一次相對發射螢光值共四次。(C)取 1 μ g 及 2 μ g 純化過的 MALT1 及 MALT1-C464A 與 50 μ M Ac-LRSR-AMC 進行切割，每一小時測一次相對發射螢光值共四次。



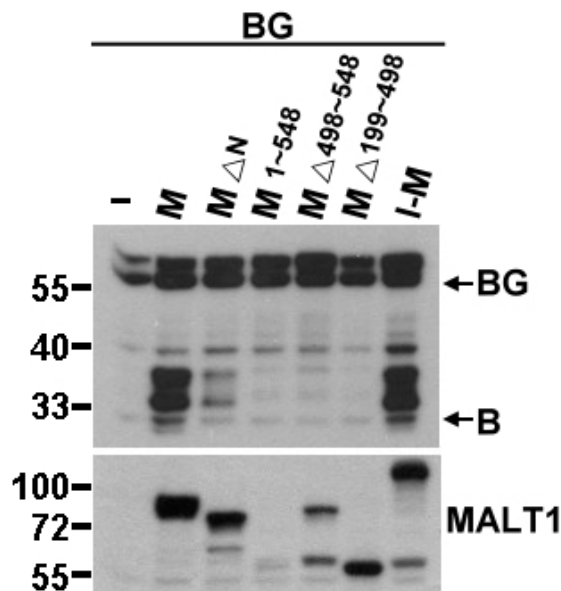
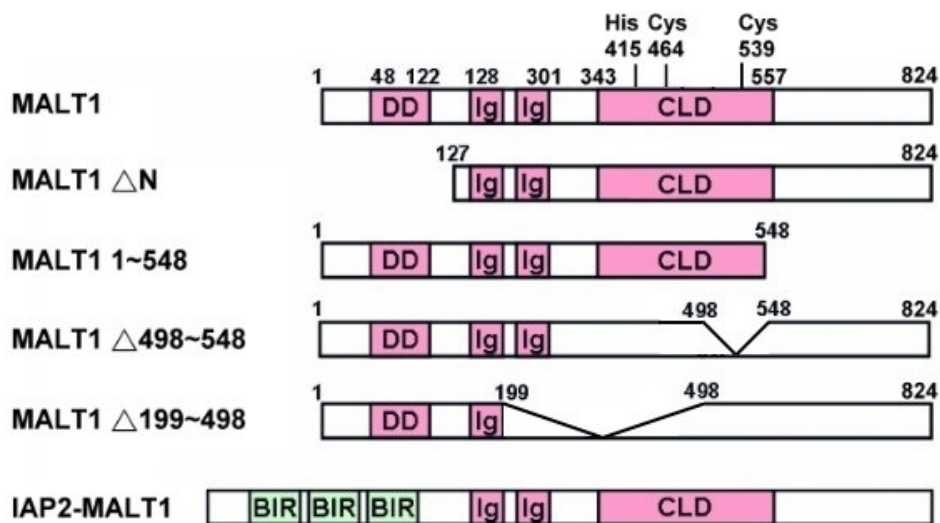
附圖一、CBM 複合體參與在不同受體引起 NF-κB 活化。CBM 複合體除了參與在淋巴系(T 細胞、B 細胞、NK 細胞)的免疫受體(immunoreceptors)，也參與在一些 ITAM-containing receptor 及 GPCR(G-protein coupled receptor)引起 NF-κB 訊息徑途中，像是 myeloid 細胞、mast cell、dendritic cell (Thome, 2008)。

A

constructs		預期切割位													
		218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231
		S	S	E	M	F	L	P	L	R	S	R	T	V	S
WT	NSSEMFLPLRSRTVSR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C1	N LRSRTVSR	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
C2	NS RSRTVSR	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
C3	NSS SRTVSR	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
C4	NSSE RTVSR	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
C5	NSSEM TVSR	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
C6	NSSEMF VSR	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
C7	NSSEMFL SR	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
C8	NSSEMFLP R	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-



附圖二、BCL10 Leucine225 對於 MALT1 誘導切割作用是重要的。(A) MALT1 誘導切割位預期結果(B) BCL10 deletion constructs C1~C8 (0.25 μ g) 轉染至 293T 細胞的表現情形。(C)C1~C8 (0.25 μ g)分別與 MALT1(2.25 μ g)共同轉染至 293T 細胞的表現情形。蛋白質表現以西方墨點法分析，利用 BCL10 一級抗體辨識。C1 (Δ 218~224 a.a.)、C2 (Δ 219~225 a.a.)、C3 (Δ 220~226 a.a.)、C4 (Δ 221~227 a.a.)、C5 (Δ 222~228 a.a.)、C6 (Δ 223~229 a.a.)、C7 (Δ 224~230 a.a.)、C8 (Δ 225~231 a.a.)。摘錄自周欣儀碩士論文圖十七。



附圖三、MALT1 的 CLD 和 C 端區域對於誘導 BCL10 切割非常重要。分別將不同的 MALT1 constructs 與 BCL10GFP 轉染至 293T 細胞，以西方墨點法觀察 BCL10 的切割情形，利用 BCL10 抗體辨識。M: MALT1、M Δ N: MALT1 Δ N(127~824 a.a.，缺少 Death domain)、M 1~548: MALT1 1~548(具有第 1~548 a.a.，缺少 C 端區域)、M Δ 498~548: MALT1 Δ 498~548 a.a. (缺少 caspase like domain CLD)。M Δ 199~498: MALT1 Δ 199~498 a.a. (缺少第二個 Ig domain 及 CLD)。I-M: IAP2-MALT1 (包含 IAP2 三個 BIR domain 及 MALT1 兩個 Ig domain、CLD 及 C 端區域)。摘錄自周欣儀碩士論文圖四及圖十八。

質體構築方式：

方法一：

- ✓ pET21a-BCL10L225A、pET21a-BCL10L225E、pET21a-BCL10L225G、pET21a-BCL10L225Q、pET21a-BCL10L225R、pET21a-BCL10L225T、pET21a-BCL10R228G、pET21a-BCL10R228I、pET21a-BCL10Δ107-119、pET21a-BCL10L41R 以 pET21a-BCL10 為模版

使用單股 primer(附表一)建構 constructs，primer 之設計使用 Stratagene Quick Cloning Site Directed Mutagenesis 原理。

步驟：

抽取小量質體 DNA 為模版(模版 DNA 上具有細菌修飾甲基化)

→以單股 primer 進行 PCR， T_m 值可以 $T_m=(A+T) \times 2 + (C+G) \times 4^\circ\text{C}$ ，以可黏上 primer 3' 區域的核苷酸計算

→PCR 步驟

質體模型 DNA (50ng/ μ l)	2 μ l
Primer 5 μ M (final 200 nM)	1 μ l
dNTP 1.25mM (final 200 μ M)	4 μ l
TURBO <i>Pfu</i> 2.5U/ μ l	1 μ l
10 \times <i>Pfu</i> buffer	2.5 μ l
二次水	14.5 μ l
Total	25 μ l

Temp	Time	Cycle
95°C separate	3 min	1
95°C separate	30 sec	
55°C annealing	1 min	16
68°C extension	10min	
68°C	10 min	1
4°C	∞	

備註：Extension 時間可根據 PCR products 長度決定，通常 1kb 需 1min

- PCR 結束後，在產物中加入 1 μ l (NEB 20U/ μ l)的限制酶 *Dpn* I，在 37°C 水浴作用 1-2 個小時，去除有甲基化的模版 DNA
- 作用完畢後取 4 μ l 產物 transform 入 200 μ l 的 DH5 α F' 勝任細胞
- 挑 clone 送定序確認

方法二：(以 pCMV6XL5MALT1C464A-myc 構築過程為例，流程如附圖四所示)

- ✓ pCMV6XL5- Δ 2IgMALT1H415A-myc、pCMV6XL5- Δ 2IgMALT1C464A-myc、pCMV6XL5- Δ 2IgMALT1C539A-myc 以 pCMV6XL5 Δ 2IgMALT1-myc 為模版
- 分別利用附表一所示之 primer 進行 PCR
- Apa* I & *Xba* I 切下 MALT1 片段
- ligate with 以 *Apa* I & *Xba* I 及 CIAP 處理過的 pCVM6XL5-MALT1-myc

方法三：(以 pCMV6XL5-MALT1 Δ 644-679-myc 構築過程為例，流程如附圖五所示)

- ✓ pCMV6XL5- Δ 2IgMALT1 Δ 644-679-myc、pCMV6XL5- Δ 2IgMALT1

1-701-myc 以 pCMV6XL5 Δ 2IgMALT1-myc 為模版為模版

→分別利用附表一所示之 primer 進行 PCR

→*EcoRI*、Klenow、及 *Xba I* 切下 MALT1 N 端片段

→ligate with *Sma I* & *Xba I* 處理過的 pCVM6XL5-MALT1-myc

方法四：(以 pET21a-MALT1C464A-myc 構築過程為例，流程如附圖六所示)

→*Sma I* & *Ale I* 切下 MALT1 片段

→ligate with 以 *Hind III*，Klenow，*Not I*，及 CIAP 處理過的 pET21a vector

註：pET21-MALT1H415A-myc、pET21-gyrBMALT1-myc、及 pET21-gyrB Δ 2IgMALT1-myc 質體構築方式相同

方法五：(以 pET21a-gyrBMALT1-His-tag 構築過程為例，流程如附圖七~十一所示)

- ✓ pET21a-gyrB-MALT1-His-tag、pET21a-gyrB- Δ 2Ig-MALT1-His-tag 融合蛋白質的 gyraseB 以 pRSFDuet-1 gyraseB 為模版
- ✓ pET21a-gyrB-MALT1、pET21a-gyrB- Δ 2IgMALT1 融合蛋白質的 MALT1 以 pCMV6XL5-MALT1 為模版
- ✓ pCMV6XL5 Δ 2IgMALT1delTA 以 pCMV6XL5 Δ 2IgMALT1 為模版
- ✓ pCMV6XL5 Δ 2IgMALT1 delTA GCmutation 以 pCMV6XL5 Δ 2IgMALT1delTA 為模版

→分別利用附表一所示之 primer 進行 PCR，將 gyraseB、MALT、 Δ 2IgMALT1 夾出 DNA 片段

→PCR 產物以 gel extraction 純化出來

→利用附表一所示之 primer 及純化出之 primer 再次進行 PCR，夾出完整片段

→PCR 產物 ligate with pGEM T Easy vector (TA vector)

→定序確認

→*Sma* I & *Xba* I 切下 *gyrB*MALT1 及 *gyrB*- Δ 2IgMALT1 片段

→ligate with 以 *Sma* I & *Xba* I 處理過的 pCMV6XL5- MALT1-myc vector

→*Xba* I & *Ale* I 切下 C 端片段

→ligate with *Xba* I & *Ale* I 處理過的 pCMV6XL5- Δ 2IgMALT1-Myc-del TA GC vector

→*Sma* I & *Not*I 切下 *gyrB*MALT1 及 *gyrB*- Δ 2IgMALT1 片段

→ligate with 以 *Hind* III, Klenow, *Not* I, 及 CIAP 處理過的 pET21a vector

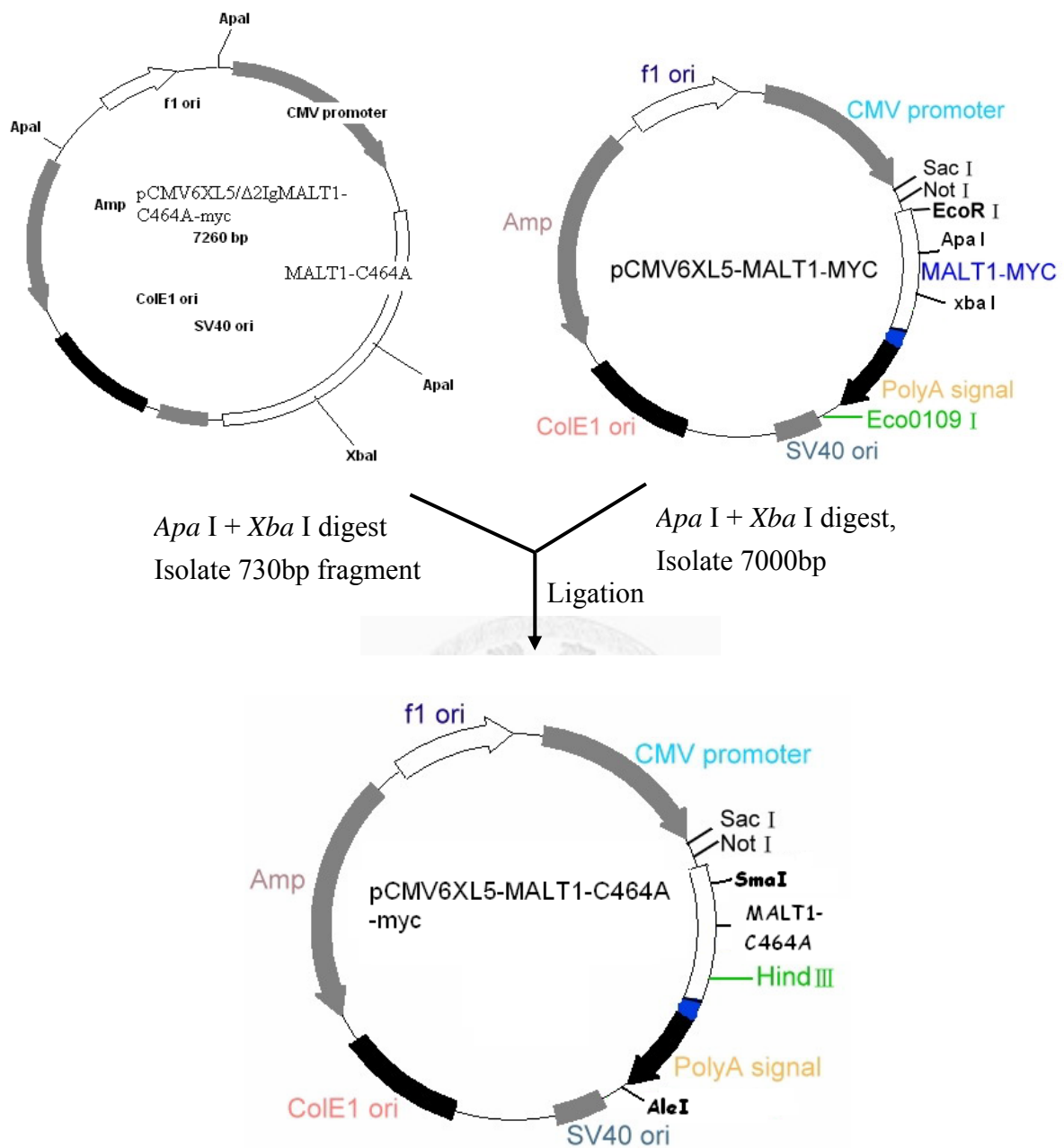
註：pET21-*gyrB* Δ 2IgMALT1-His-tag 構築方式相同

註：pET21-MALT1-His-tag、pET21-MALT1H415A-His-tag、

pET21-MALT1C464A-His-tag、pET21-MALT1C539A-His-tag 質體構築方式與流程

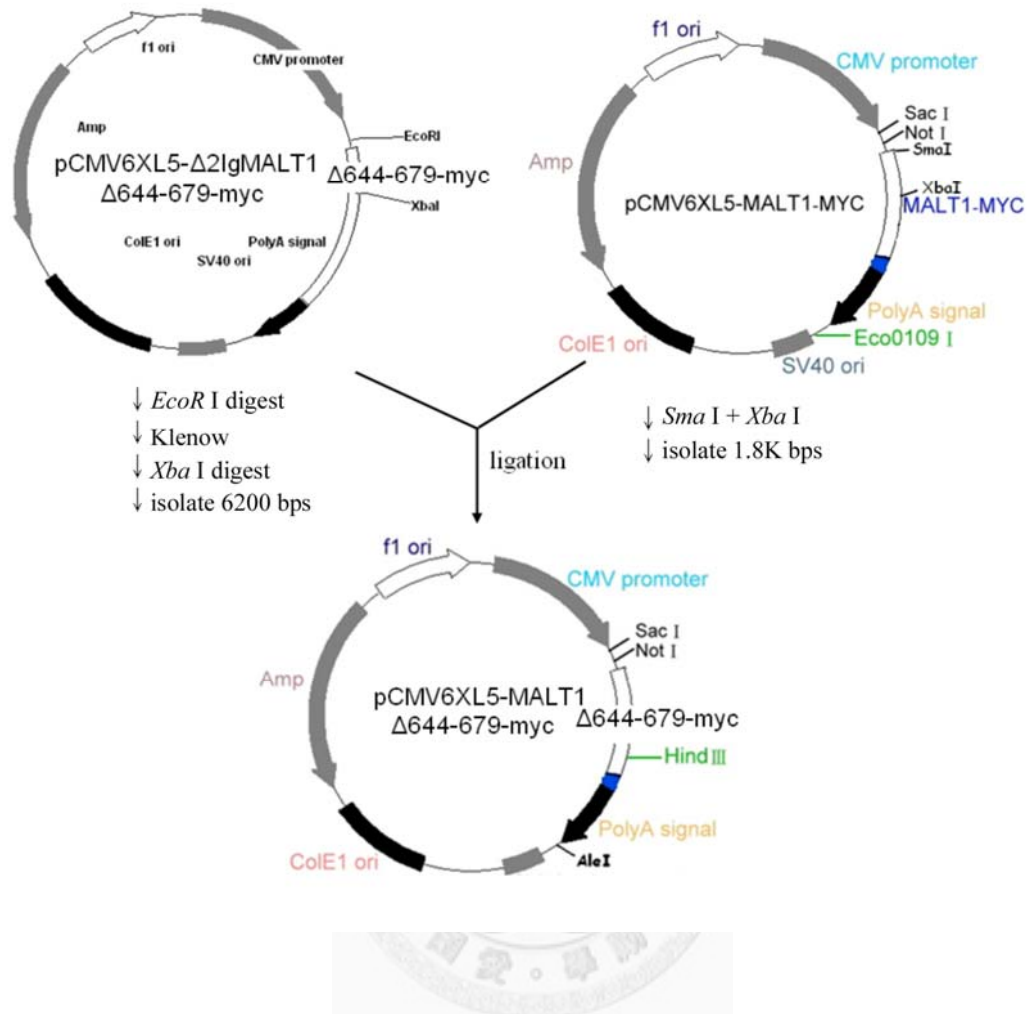
階段四之後相同。





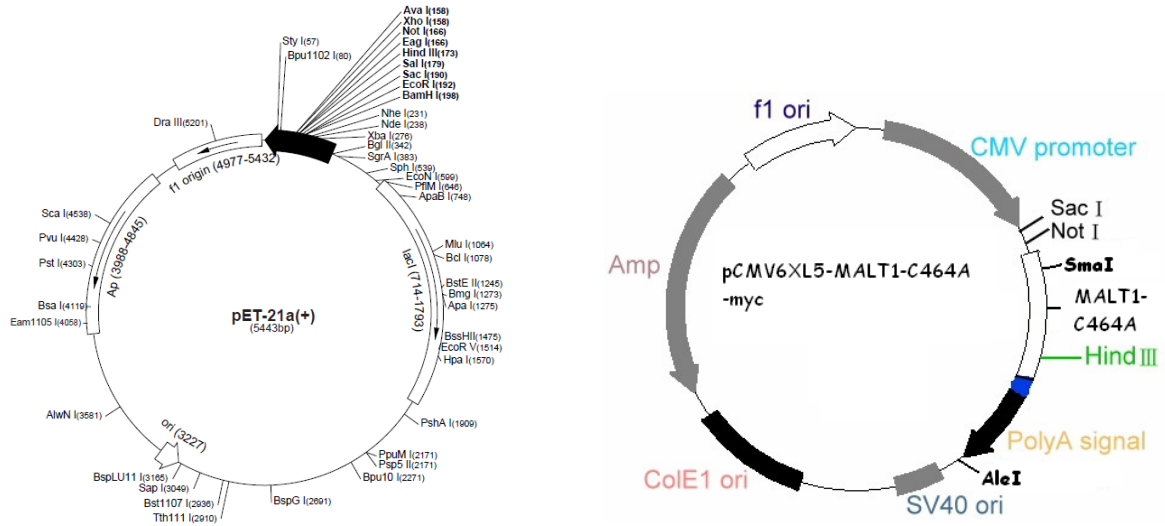
Construction of pCMV6XL5-MALT1C464A-myc

附圖四、pCMV6XL5-MALT1C464A-myc 質體構築。Apa I & Xba I 切下 pCMV6XL5-Δ2IgMALT1C464A-myc 質體上的 MALT1 片段，再與以 Apa I & Xba I 處理過的 pCMV6XL5-MALT1-myc vector 連接，成為 pCMV6XL5-MALT1C464A-myc。



Construction of pCMV6XL5-MALT1 Δ 644-679-myc

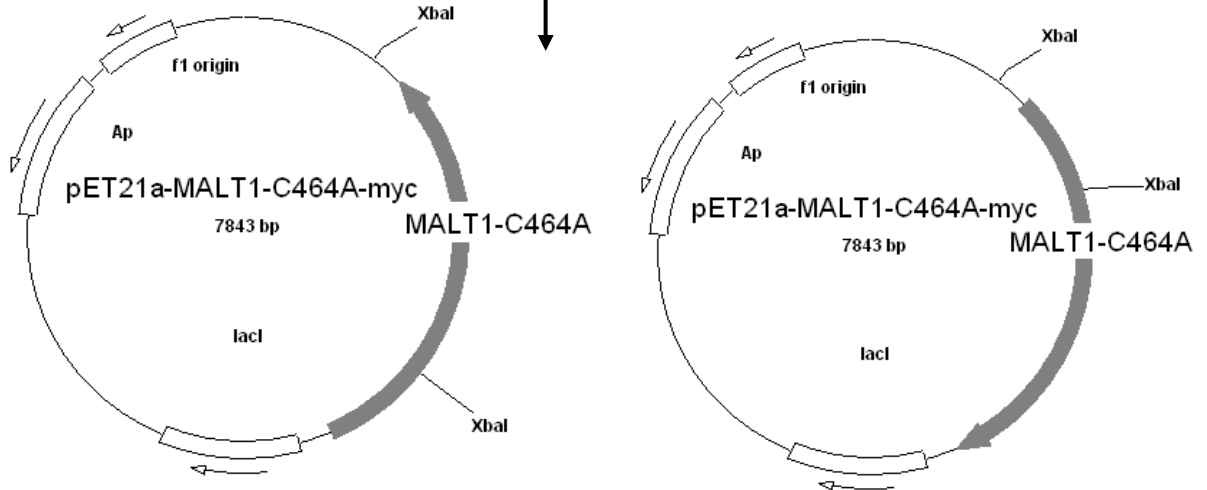
附圖五、pCMV6XL5-MALT1 Δ 644-679-myc 質體構築。EcoRI、Klnow、及 Xba I 切下 pCMV6XL5- Δ 2IgMALT1 Δ 644-679-myc 質體 MALT1 的 N 端片段，再與以 Sma I & Xba I 處理過的 pCMV6XL5-MALT1-myc vector 連接，成為 pCMV6XL5-MALT1 Δ 644-679-myc。



Hind III, Klenow, CIP
isolate 5443 bps

Sma I, *Ale* I
Isolate 2.4 Kb fragment

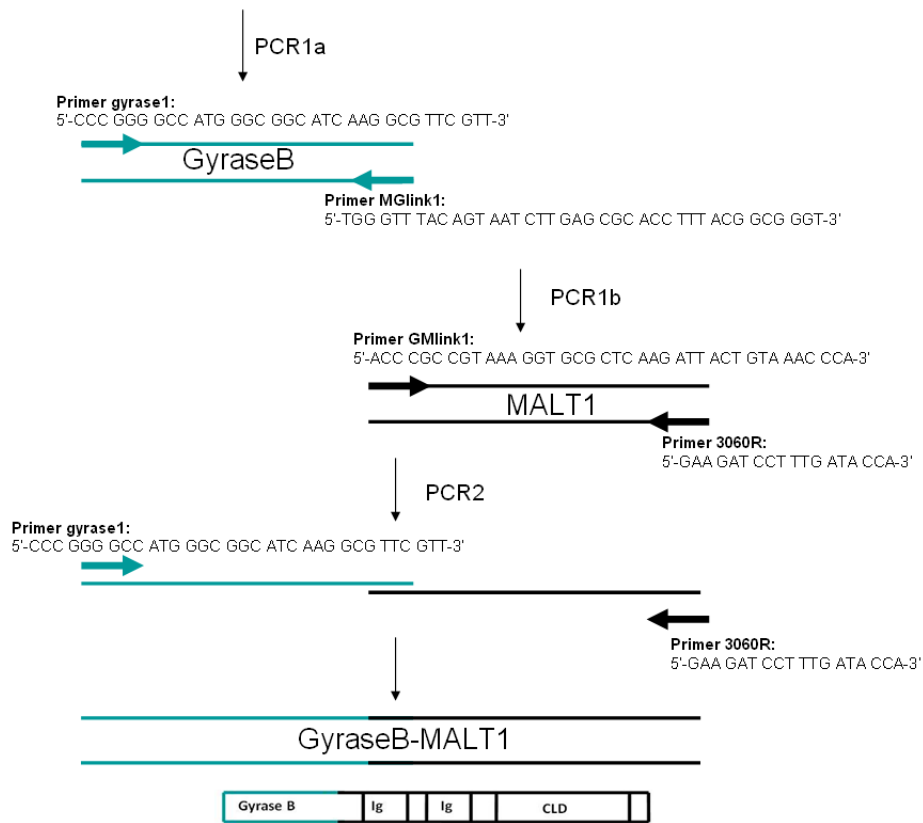
Ligation



XbaI check Forward : 1800bp ; 6000bp

Construction of pET21-MALT1C464A-myc

附圖六、pET21-MALT1C464A-myc 質體構築。Sma I & Ale I 切下 pCMV6XL5-MALT1C464A-myc 質體上的 MALT1 片段，再與以 *Hind* III、Klenow、及 CIAP 處理過的 pET21a vector 連接，成為 pET21-MALT1C464A-myc。



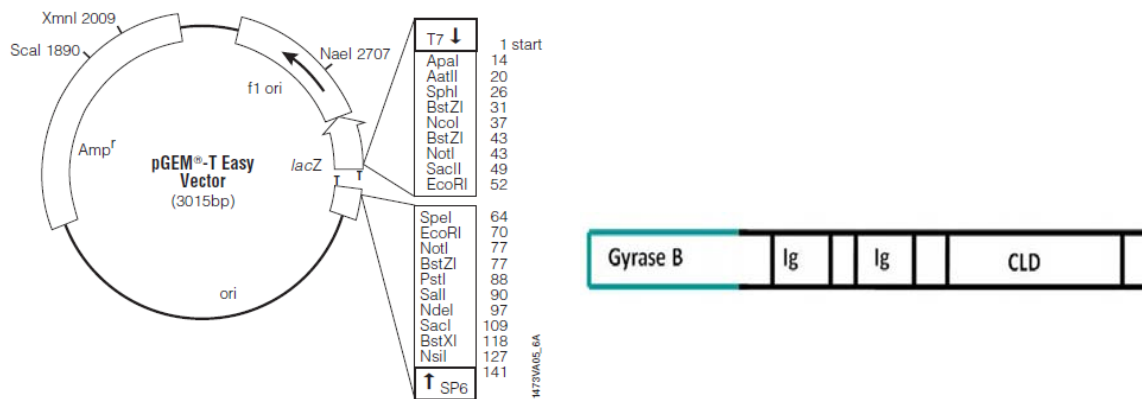
Primer gyrase1 : CCC GGG GCC ATG GGC GGC ATC AAG GCG TTC GTT

Primer Mlink1 : TGG GTT TAC AGT AAT CTT GAG CGC ACC TTT ACG GCG
GGT

Primer Glink1 : ACC CGC CGT AAA GGT GCG CTC AAG ATT ACT GTA AAC
CCA

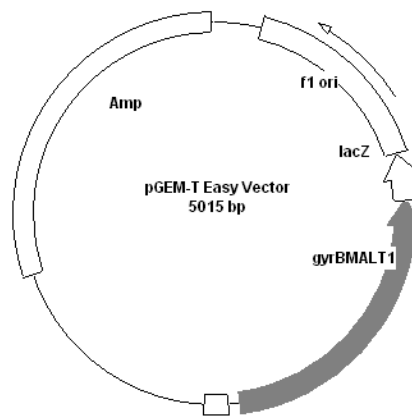
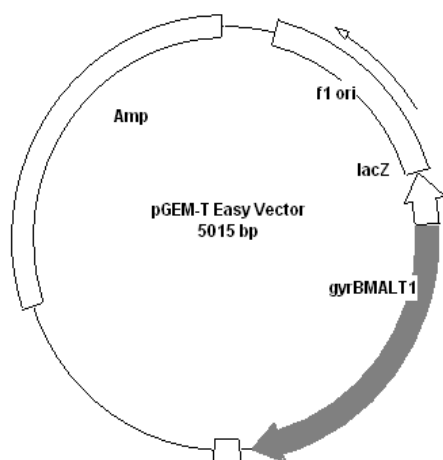
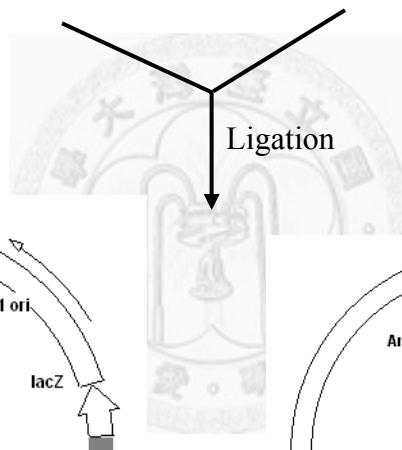
Primer 3060R : GAA GAT CCT TTG ATA CCA

附圖七、pET21a-gyrBMALT1-His-tag 質體構築第一階段。利用 PCR 方法將 gyraseB 及 MALT1 融合片段夾出，再利用 PCR 將兩者夾成完整片段。



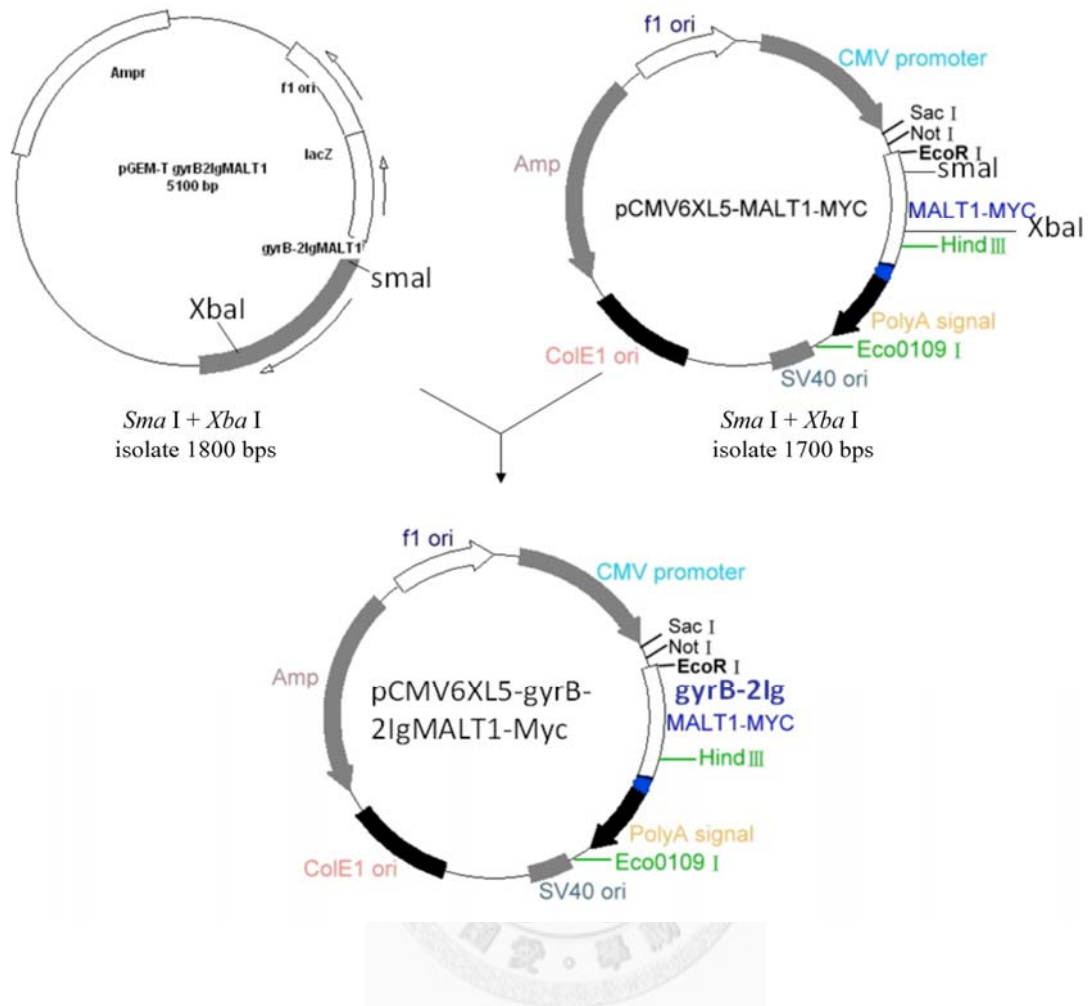
TA vector

PCR product 2000 bps



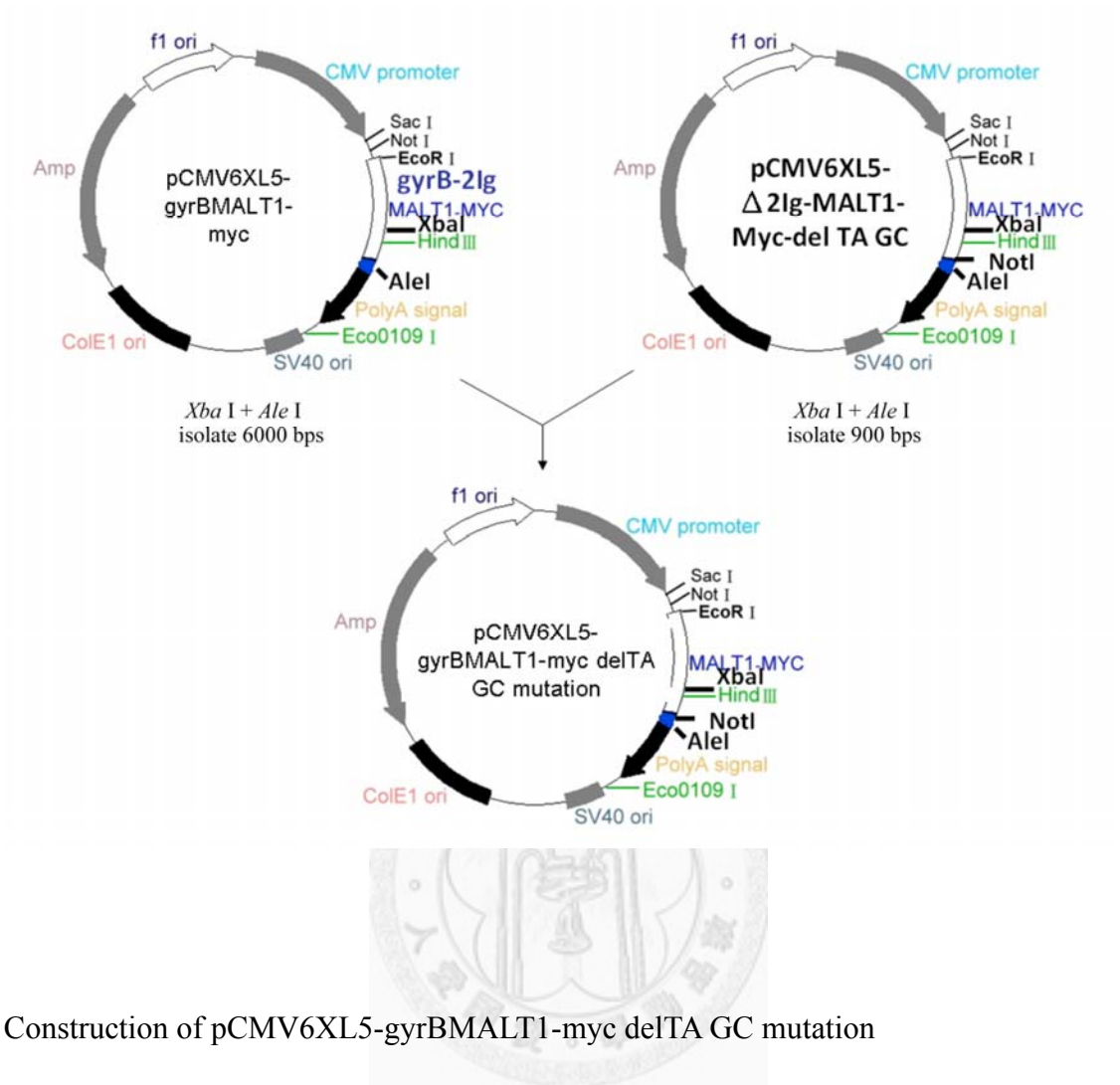
Construction of pGEM-T gyrBMALT1

附圖八、pET21a-gyrBMALT1-His-tag 質體構築第二階段。PCR 產物與 pGEM-T Easy vector(TA vector)連接，成為 pGEM-T gyrBMALT1。



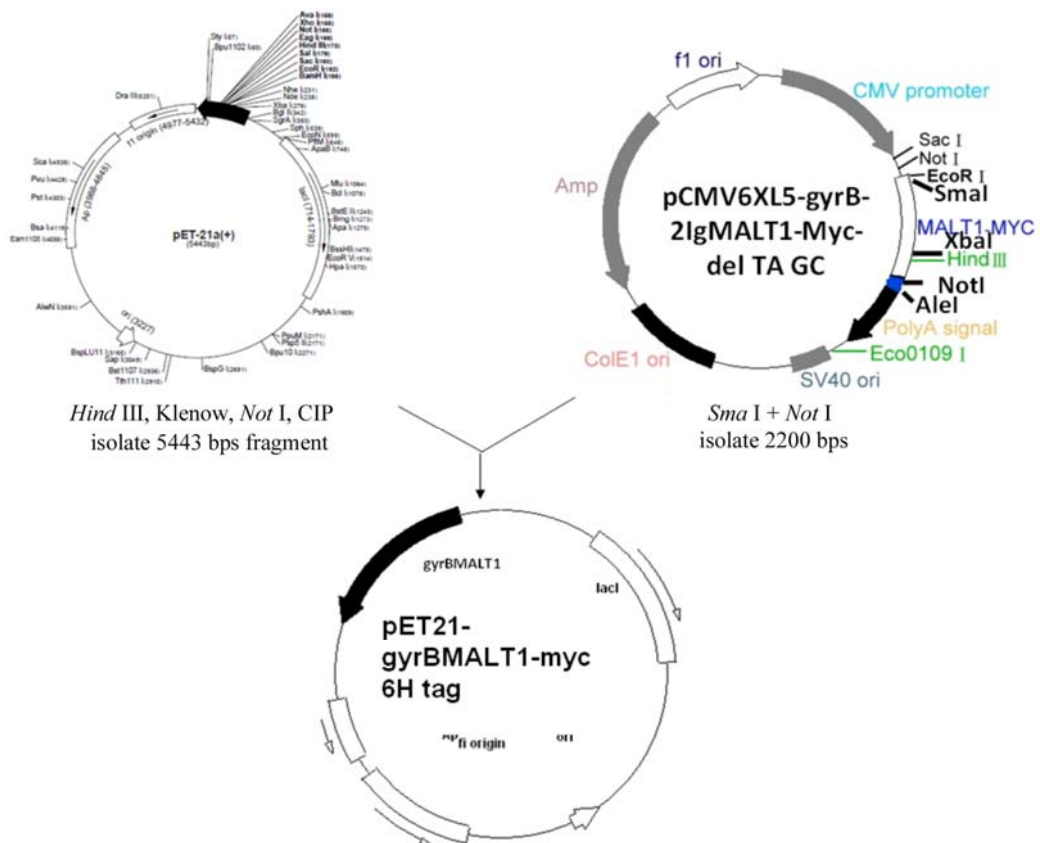
Construction of pCMV6XL5-gyrB-MALT1-myc

附圖九、pET21a-gyrBMALT1-His-tag 質體構築第三階段。Sma I & Xba I 切下 pGEM-T gyrbMALT1 質體上的 gyrb-MALT1 片段，再與以 Sma I & Xba I 切割過之 pCMV6XL5- MALT1-myc vector 連接，成為 pCMV6XL5-gyrBMALT1-myc。



Construction of pCMV6XL5-gyrBMALT1-myc delTA GC mutation

附圖十、pET21a-gyrBMALT1-His-tag 質體構築第四階段。Xba I & Ale I 切下 pCMV6XL5-gyrBMALT1-myc 質體上的 C 端片段，再與以 Xba I & Ale I 切割過之 pCMV6XL5-Δ2IgMALT1-myc delTA GCmutation vector 連接，成為 pCMV6XL5-gyrBMALT1-myc delTA GC mutation。



Construction of pET21a-gyrBMALT1 His-tag

附圖十一、pET21a-gyrBMALT1-His-tag 質體構築第五階段。Sma I & Not I 切下 pCMV6XL5-gyrBMALT1-myc delTA GC mutation 質體上的 gyrBMALT1 片段，再與以 Hind III、Klenow、Not I、及 CIP 處理過之 pET21a vector 連接，成為 pET21a-gyrBMALT1-His-tag。

附錄圖表

表一、使用之表現質體

Construct	Primer	By
pRC/CMV backbone		Invitrogen
pRC/CMV BCL10GFP		WH

pET21a backbone		Novagen
pET21a-BCL10		H.E
pET21a-BCL10 L41R		H.E
pET21a-BCL10 Δ 107-119		Kenji
pET21a-BCL10 L225A	TCT AGT GAG ATG TTT CTT CCC *VVA AGA TCA CGT ACT GTT TCA CG	Kenji
pET21a-BCL10 L225E	TCT AGT GAG ATG TTT CTT CCC VVA AGA TCA CGT ACT GTT TCA CG	Kenji
pET21a-BCL10 L225G	TCT AGT GAG ATG TTT CTT CCC VVA AGA TCA CGT ACT GTT TCA CG	Kenji
pET21a-BCL10 L225Q	TCT AGT GAG ATG TTT CTT CCC VVA AGA TCA CGT ACT GTT TCA CG	Kenji
pET21a-BCL10 L225R	TCT AGT GAG ATG TTT CTT CCC VVA AGA TCA CGT ACT GTT TCA CG	Kenji
pET21a-BCL10 L225T	TCT AGT GAG ATG TTT CTT CCC VVA AGA TCA CGT ACT GTT TCA CG	Kenji
pET21a-BCL10 R228G	GAG ATG TTT CTT CCC TTA AGA TCA *D*HT ACT GTT TCA CGA CAA GAA GCT AA	WH
pET21a-BCL10 R228I	GAG ATG TTT CTT CCC TTA AGA TCA DHT ACT GTT TCA CGA CAA GAA GCT AA	Kenji

V : A 、 C or G

D : A 、 G or T

H : A 、 C or T

pCMV6XL5 backbone		Origene
pCMV6XL5-MALT1 -myc		SW
pCMV6XL5- Δ2IgMALT1 -myc		SLD
pCMV6XL5-MALT1 ΔN-myc		Yagen
pCMV6XL5-MALT1 1-548-myc		SLD
pCMV6XL5-MALT1 Δ498-548-myc		SLD
pCMV6XL5-MALT1 Δ199-498-myc		SLD
pCMV6XL5-IAP2- MALT1 (2 Ig) -myc		SLD
pCMV6XL5-MALT1- H415A-myc		Kenji
pCMV6XL5-MALT1- C464A-myc		Kenji
pCMV6XL5-MALT1- C539A-myc		Kenji
pCMV6XL5-MALT1 Δ644-697-myc	CAC TTG ATC TAG ATA TTG ATC CAG AAC ATC TAG TCT TCA CAG TAT G	Kenji
pCMV6XL5-MALT1 1-701-myc	GAA GAT ACT GTA GAG GAC TAG CAG GAA GTG AAT GTT G	Kenji
pCMV6XL5- Δ2IgMALT1-myc delTA	ACC CGG CCG CTG CGG CCC CAT TCA G	Kenji
pCMV6XL5- Δ2IgMALT1-myc delTA GCmutation	CGC AGC GGC CGC GTG GCA TCC CT	Kenji

pET-21a backbone		Novagen
pET21a-MALT1-myc		Yagen

pET21a-MALT1-H415A-myc		Kenji
pET21a-MALT1-C464A-myc		Kenji
pET21a-MALT1-His-tag		Kenji
pET21a-MALT1-H415A His-tag		Kenji
pET21a-MALT1-C464A His-tag		Kenji
pET21a-MALT1-C539A His-tag		Kenji
pET21a-gyrB- Δ 2Ig MALT1-myc	Gyrase1 : CCC GGG GCC ATG GGC GGC ATC AAG GCG TTC GTT GMlink2 : ACC CGC CGT AAA GGT GCG CTC AAG AAG GTA GAA ATC ATC ATA MGlink2 : TAT GAT GAT TTC TAC CTT CTT GAG CGC ACC TTT ACG GCG GGT	Kenji
pET21a-gyrB-MALT1-myc	Gyrase1 : CCC GGG GCC ATG GGC GGC ATC AAG GCG TTC GTT GMlink1 : ACC CGC CGT AAA GGT GCG CTC AAG ATT ACT GTA AAC CCA MGlink1 : TGG GTT TAC AGT AAT CTT GAG CGC ACC TTT ACG GCG GGT	Kenji
pET21a-gyrB- Δ 2IgMALT1-His-tag		Kenji
pET21a-gyrB-MALT1 His-tag		Kenji