

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

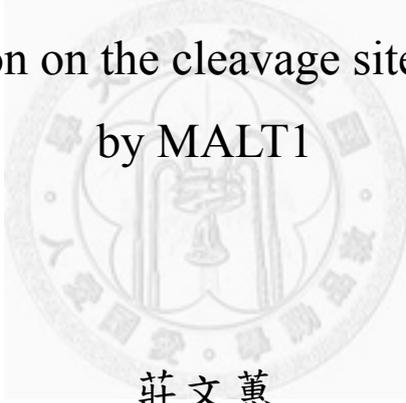
National Taiwan University

Master Thesis

MALT1 對 BCL10 切割的切點位置探討

Investigation on the cleavage site on BCL10

by MALT1



莊文蕙

Wen-Hui Chuang

指導教授：董馨蓮 博士

Advisor: Shing-Lian Doong, Ph.D.

中華民國 99 年 7 月

July, 2010

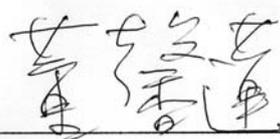
國立臺灣大學（碩）博士學位論文  
口試委員會審定書

中文題目：MALT1 對 BCL10 切割的切點位置探討

英文題目：Investigation on the cleavage site on  
BCL10 by MALT1

本論文係莊文蕙君（學號 R97445128）在國立臺灣大學微生物學所所完成之碩（博）士學位論文，於民國 99 年 07 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：



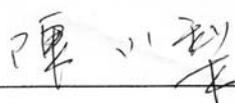
（簽名）

陳美如

（指導教授）

周球歆

系主任、所長



（簽名）

## 誌謝

二年的時間很快就過去了，在此最感謝的莫過於我的指導教授董馨蓮老師，打從我進入實驗室即很仔細的教導我所有實驗的細節，培養我獨立思考與樂觀的精神，實驗遇到困難也給予我許多的建議，能夠遇到老師，覺得自己相當幸運。另外要感謝陪伴二年的同學健治，帶給這裡許多歡笑，部分實驗也多虧你的協助我才能完成。還有感謝世昕學長、俊賢、飛龍、素心及怡潔你們在實驗上給予我的指導，怡琇及韻卉二位學妹的加入則讓我們實驗室多了許多的生氣，謝謝你們有時貼心的舉動讓我可以較為輕鬆的處理實驗室的工作，也感謝研究所的同學嘉琴及宛育不時的關心及實驗的協助。另外，感謝藥學所郭錦華老師與周綠蘋老師對於毛細管電泳與質譜儀技術的協助，及陳美如老師與周綠蘋老師對我碩士論文的一些指導。最後要感謝我的家人，雖然你們並不了解我的學習，但仍願意聽我在實驗室所遇到的挫折，因為有你們我才能夠堅持下去完成這二年的學業。



## 摘要

BCL10 與 MALT1 可互相結合且在許多的細胞之中皆有表現。在細胞受到刺激後可與不同的 CARD-containing 蛋白質形成 CBM 複合體，對於 NF- $\kappa$ B 引起的訊息傳導路徑中扮演不可或缺的角色。在本實驗室與他人之前的研究得知，利用 TPA (12-O-tetradecanoly-phorbol-13-acetate) 及 Ionomycin 刺激 Jurkat T cell 後，MALT1 可切割在 BCL10 的 C 端。本實驗室針對可疑的切點在 BCL10 GFP 做一連串的刪除實驗，推論切點位於 BCL10 第 225 個胺基酸白胺酸(Leucine)，不同於 2008 年被報導的切點第 228 個胺基酸精胺酸(Arginine)。因此，本篇論文將以數種方法釐清被切割的 BCL10 其確切的切割點，並研究 BCL10 被切割後 C 端的小片段胜肽在細胞內所在的位置，進一步去探討可能所扮演的角色。

首先，本篇論文以 DSS cross-linker 鍵結 BCL10 抗體與 protein G，用以純化產物，蛋白質來源為以 TPA 及 Ionomycin 刺激 Jurkat T 細胞的全長或內生性被切割的 BCL10，結果顯示每次以  $2 \times 10^8$  細胞數進行純化，80  $\mu$ g 的 BCL10 抗體僅能結合 5-10 ng BCL10。第二，構築質體 FlagBCL10 GFP 並與 MALT1 在 293T 細胞共同表現，以 FLAG 親和凝膠純化被切割的產物，結果顯示每 10  $\mu$ l 凝膠可以結合約 50 ng 的切割後產物。純化的蛋白以 LC-MS/MS 進行分析，並先利用 Asp-N 內切酶處理樣品。Asp-N 可切在 aspartate 的 N 端，針對 BCL10 被 MALT1 切割後可能出現的蛋白質處理 Asp-N，全長 BCL10、BCL10 1-225、BCL10 1-228 分別可得到 3196.5 daltons、2225.9 daltons 及 2625.2 daltons，皆可以 LC-MS/MS 準確分析結果。不幸的是，由於 Asp-N 切點前具有 proline，目前仍無法分析這些片段。毛細管電泳亦被應用於分析切割後的 C 端胜肽 RSRTVSRQ 與 TVSRQ，結果顯示雖然可以有效區分此 2 段 C 端胜肽，但靈敏度僅有 5 ppm。

針對可疑的切點，以 degenerate 引子對 Leu225 及 Arg228 進行單點突變得到以下融合蛋白 BCL10 L225A、BCL10 L225G、BCL10 L225Q、BCL10 L225K、BCL10 L225R、BCL10 L225E 及 BCL10 R228G，並在 293T 細胞中分別與 MALT1 共同表

現，以釐清 BCL10 Leu225 與 Arg228 對於切割能力有無所扮演的角色。結果顯示除了 BCL10 L225R 與 BCL10 L225K 以外，所有的 mutants 皆無被切割現象，指出 BCL10 Leu225 與 Arg228 對於切割是重要的。有趣的是，將融合蛋白 BCL10 L225R,R228G 與 MALT1 共同表現於細胞中，仍具有被切割的能力。另外在 BCL10 L225R 上針對 Phe222 及 Leu223 進行點突變以分析 BCL10 對 MALT1 切割能力的影響，結果顯示僅有 BCL10 F222A,L223T,L225R (FL-4) 仍舊保有被 MALT1 切割的能力，BCL10 F222H,L223E,L225R (FL-1)、BCL10 F222S,L223E,L225R (FL-2)、BCL10 F222E,L223A,L225R (FL-3)則無法被切割，對於這些融合蛋白影響 MALT1 的切割能力有無的機制將在內文中討論。

為了研究 BCL10 被切割後 C 端胜肽在細胞內所在的位置，我們欲直接將胜肽送入細胞以便觀察，但無法成功。因此在 GFP 的 C 端接上胜肽 RSRTVSRQ 得到融合蛋白 GFP-RSRTVSRQ，結果顯示 GFP-RSRTVSRQ 如同 GFP 的表現，均勻分布在細胞中。而共同表現 BCL10 與 GFP-RSRTVSRQ 並不影響由 BCL10 所引起的 NF- $\kappa$ B 的活性。

關鍵字：BCL10、MALT1、切割、白胺酸、精胺酸、胜肽

## Abstract

BCL10 and MALT1 interacted with each other and were present in many cells. Upon stimulation, they associated with various CARD-containing proteins to form CBM complexes which then mediated the activation of NF- $\kappa$ B signaling pathway. Previously, we and others demonstrated that BCL10 was cleaved in the C-terminus by MALT1 in Jurkat T cells treated with TPA and ionomycin. In 2008, amino acid residue Arg228 of BCL10 was reported to be the cleavage site. Different from what was reported, our serial deletion mutants of BCL10 suggested a probable cleavage site at Leu225. In the present study, several proteomic methods will be utilized to elucidate the discrepancy. The location and the function of the cleaved C-terminus peptides will also be investigated.

Firstly, anti-BCL10 antibodies were cross-linked to protein G sepharose chemically to generate an affinity column to purify either full length BCL10 or cleaved BCL10 from Jurkat T cells treated with TPA/Ionomycin or not. An average of 5-10 ng BCL10 could be generated from  $2 \times 10^8$  cells using an affinity column made from 80 $\mu$ g antibody. Secondly, fusion construct FlagBCL10 GFP was generated. Co-transfection of FlagBCL10 GFP and MALT1 in 293T cells would generate truncated FlagBCL10 which could then be isolated by commercially available FLAG affinity gel. An average of 50 ng purified products could be generated from 10  $\mu$ l packed gel. LC-MS/MS was utilized

to identify the cleavage site. Protease, Asp-N, cleaved at the N-terminus of the amino acid residue aspartate. Treatment of full length BCL10 or BCL10 cleaved at Leu225 or at Arg228 with Asp-N would generate polypeptides with M.W. of 3196.5 daltons, 2225.9 daltons and 2625.2 daltons, respectively. These fragments should be easily distinguished by LC-MS/MS. Unfortunately, LC-MS/MS failed to detect these fragments so far. It might be due to the proline residue right before the Asp-N cleavage site. Capillary Zone Electrophoresis (CZE) was utilized to analyze the C-terminus peptides RSRTVSRQ and TVSRQ. The two peptides could be efficiently separated by CZE. The detection sensitivity was estimated to be 5 ppm.

Site directed mutagenesis was employed 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 : BCL10 L225A, BCL10 L225G, BCL10 L225Q, BCL10 L225K, BCL10 L225R, BCL10 L225E, and BCL10 R228G. All mutant constructs were transfected into 293T cells along with the MALT1 expression vector and tested for their ability of being a proteolytic substrate. BCL10 L225K and BCL10 L225R could be processed by MALT1 as wild type BCL10. MALT1 failed to cleave the other mutants (BCL10 L225A, BCL10 L225G, BCL10 L225Q, BCL10 L225E, BCL10 R228G). These data suggested that both Leu225 and Arg228 were critical for cleavage. Interestingly, double mutants BCL10 L225R,R228G retained its

ability to be cleaved by MALT1. Mutation at the amino acid residues Phe222 and Leu223 of BCL10 L225R affected its ability of being a substrate of MALT1. While BCL10 F222A,L223T,L225R (FL4) retained its ability as wild type BCL10, mutants BCL10 F222H,L223E,L225R (FL-1), BCL10F222S,L223E,L225R (FL-2) and BCL10F222E,L223A,L225R (FL-3) were not able to be processed. The mechanisms by which these mutations affected MALT-1-mediated cleavage on BCL10 will be discussed in the text.

We failed to introduce the cleaved C-terminus polypeptides RSRTVSRQ into 293T cells. Therefore, the eight amino acid residues RSRTVSRQ at the C-terminus of BCL10 were fused at the C-terminus of GFP to investigate its effects. GFP-RSRTVSRQ showed a diffuse-distribution pattern as GFP. Expression of GFP-RSRTVSRQ did not have effect on BCL10-induced NF- $\kappa$ B activation.

Key words : BCL10 、 MALT1 、 cleavage 、 Leucine 、 Arginine 、 peptides

# 目 錄

口試委員會審定書 .....	i
誌謝 .....	ii
中文摘要 .....	iii
英文摘要 .....	v
目錄 .....	viii
第壹章 序論 .....	1
一、CBM complex 在 NF- $\kappa$ B 訊息傳遞路徑扮演的角色 .....	1
二、BCL10 .....	3
三、MALT1 .....	6
四、MALT1 誘導切割 BCL10 .....	7
第貳章 研究目的 .....	9
第參章 方法與材料 .....	10
一、抗體來源 .....	10
二、實驗使用之質體及質體構築 .....	10
三、製備勝任細胞 (Preparation of competent cells).....	11
四、細菌轉型 (Transformation).....	11
五、小量質體製備 (mini-plasmid preparation).....	11
六、大量質體製備 (maxi-plasmid preparation) .....	11
七、重組蛋白質的表現 (expression of recombinant proteins) .....	12
八、細胞培養 (Cell culture).....	13
九、細胞轉染 (Transfection) .....	13
十、TPA/Ionomycin treatment .....	14
十一、Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....	14
十二、西方墨點分析 (Western blot analysis) .....	14

十三、蛋白質染色法 (Protein Staining).....	15
十四、免疫沉澱 (Immunoprecipitation) 與去磷酸酵素作用.....	15
十五、蛋白質純化 (Protein purification).....	16
十六、胜肽純化 (Peptide purification).....	17
十七、螢光觀察與 Hoechst 染色.....	18
十八、冷光酵素測定 (Luciferase assay).....	18
十九、毛細管帶狀電泳分析 (Capillary zone electrophoresis analysis).....	18
二十、質譜樣品的製備 (Sample preparation for MS spectrometry) 與液態層析偶合 串聯式質譜儀分析 (LC-MS/MS analysis).....	19
第肆章 結果.....	21
一、找尋 BCL10 受 MALT1 誘導切割位置.....	21
二、探討 BCL10 受到切割後 C 端胜肽扮演的角色.....	24
第伍章 討論.....	26
第陸章 參考文獻.....	33
第柒章 結果圖表.....	40
第捌章 附錄圖表.....	54

## 圖表目錄

圖一、BCL10 site-directed mutants .....	40
圖二、BCL10 胺基酸序列 .....	40
圖三、以 Immobilized ProteinG (DSS-crosslinked) 管柱純化 TPA/Ionomycin 刺激 Jurkat T 細胞 2-3 小時的內生性 BCL10 蛋白質 .....	41
圖四、在 293T 細胞表現 BCL10、FlagBCL10、BCL10 GFP、FlagBCL10 GFP 與 MALT1 的情形 .....	42
圖五、以 FLAG 親和凝膠純化在 293T 細胞大量表現的切割形式的 BCL10 .....	43
圖六、以 LC-MS/MS 分析處理過內切酶 Asp-N 的蛋白質 BCL10.....	44
圖七、以毛細管電泳分析胜肽 RSRTVSRQ 及 TVSRQ.....	46
圖八、BCL10 L225DGFP 與 BCL10 R228GGFP 無法被 MALT1 誘導切割 .....	47
圖九、除了 BCL10 L225R 與 BCL10 L225K 以外，所有的 BCL10 L225 mutants 與 BCL10 R228G 均無法被 MALT1 誘導切割 .....	48
圖十、BCL10 L225R,R228G 可被 MALT1 誘導切割 .....	49
圖十一、除了 BCL10 F222A,L223T,L225R 以外，所有的 BCL10 F222,L223,L225R mutants 均無法被 MALT1 誘導切割.....	50
圖十二、在 293T 細胞中 FlagBCL10 GFP 受到 MALT1 誘導切割現象在轉染後 72 小時始明顯的下降 .....	51
圖十三、BCL10RFP 與 GFPBCL10 在有無 MALT1 於 293T 細胞的分布情形.....	52
圖十四、GFP-RSRTVSRQ 呈現均質的表現型且不影響 NF- $\kappa$ B 活性 .....	53
附圖一、以 pRcCMV-BCL10 做為模板在 Leucine225 進行單點突變 .....	54
附圖二、構築質體 pCMV-FlagBCL10 .....	57
附圖三、構築質體 pCMV-FlagBCL10 GFP .....	58
附圖四、構築質體 pRcCMV-GFP-RSRTVSRQ.....	59
附圖五、CBM 複合體在 NF- $\kappa$ B 訊息傳遞路徑所扮演的角色 .....	62

附圖六、T 細胞受器受到刺激後所引起的 NF- $\kappa$ B 訊息傳遞路徑.....	62
附圖七、BCL10 Leucine225 對於 MALT1 誘導切割是重要的.....	63
附圖八、以 P/I 刺激 Jurkat T 細胞的活化可造成 BCL10 的切割.....	64
附圖九、BCL10 受到 MALT1 誘導切割的有無不影響 NF- $\kappa$ B 的活性 .....	64
附表一、本篇論文其它使用的質體 .....	65



## 第壹章、序論

### 一、CBM complex 在 NF- $\kappa$ B 訊息傳遞路徑扮演的角色

不同種類的細胞(包括淋巴系細胞、骨髓性細胞、自然殺手細胞、上皮細胞等)皆含有 CBM 複合體，在 NF- $\kappa$ B 的訊息傳遞扮演重要的角色，利用小鼠基因剔除實驗，將 CBM 複合體中去除其中 1 個蛋白質會導致部分刺激引起 NF- $\kappa$ B 的訊息傳導路徑受到抑制。CBM 複合體是由 CARD (caspase-recruit domain)-containing 蛋白質、BCL10 與 MALT1 所組成，CARD-containing 蛋白質包含 CARD9、CARMA1 (CARD11) 及 CARMA3 (CARD10, Bimp1)、分別在骨髓系、淋巴系與自然殺手細胞 (nature killer cells, NK cells)、及非免疫細胞扮演傳遞 NF- $\kappa$ B 訊息傳遞的蛋白質 (Bertin *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001; Wegener *et al.*, 2007)。其中免疫細胞在受到特定刺激後，其受器會去吸引帶有 ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs, 具高度保留性的序列, YxxL-x<sub>6-8</sub>-YxxL) 的分子，ITAM 受到 Src 激酶磷酸化後，吸引其下游分子進一步將訊息傳遞下去 (Isakov, 1998; Samelson, 2002)，目前被鑑定出的 ITAMs 在 T/B 細胞為 CD3 與 Ig $\alpha$ 、Ig $\beta$ ，NK 細胞與骨髓系細胞為 FcR $\gamma$  及 DAP12，不同的受器會吸引不同的 ITAMs 分子。非免疫細胞的受器為 GPCR (G-protein couple receptor)，主要是利用活化 G protein 中不同種類的 G $\alpha$  去活化下游的 NF- $\kappa$ B (Thome, 2008, 附圖五)。近幾年在不同細胞此條路徑所參與的分子已陸續被鑑定出來，其中尤以 T、B 細胞受到抗原刺激所誘導產生的 NF- $\kappa$ B 訊息傳遞被研究的最為透徹。

#### 以抗原刺激 T 細胞的 NF- $\kappa$ B 訊息傳遞路徑

當 T/B 細胞受到抗原刺激後 (Thome, 2008, 附圖六)，促使 CD3 的 ITAMs 的 Tyr 受到磷酸化，吸引 tyrosine kinase, Lck 及 ZAP70 (zeta-chain-associated protein 70 kD) 並活化 PLC $\gamma$  (Kane *et al.*, 2000)，活化的 PLC $\gamma$  可將 PIP<sub>2</sub> (inositol phospholipid)

水解成 IP<sub>3</sub> (inositol triphosphate) 及 DAG (1,2-diacylglycerol)，使細胞質的 Ca<sup>2+</sup> 濃度上升，活化 PKC $\theta$  (B 細胞為 PKC $\beta$ )，PKC $\theta$  磷酸化 CARMA1 linker 上的 Ser552、Ser637 與 Ser645 (Matsumoto *et al.*, 2005; Sommer *et al.*, 2005) 使其結構打開，以其 CARD domain 與 BCL10 的 CARD domain 結合，促進 MALT1 oligomerization，並利用 CARMA1 的 MAGUK domain 吸引至脂閥 (lipid raft)。MALT1 以其 C 端部分與 TRAF6 (tumor-necrosis factor receptor-associated factor 6) 結合，TRAF6 為 E3 ligase，可在 IKK $\gamma$  (IkB-kinase, NEMO) 上進行 K63-ubiquitylation，此外，TRAF6 的 autoubiquitylation 可結合 TAB2 (ubiquitin 結合蛋白質)，吸引 TAK1，進一步在 IKK $\beta$  磷酸化 (Wang *et al.*, 2001)。IKK 複合體的 ubiquitylation 與磷酸化共同促使 IKK 活化，在 IkB 上磷酸化可使其進行 K48-ubiquitylation，送至 proteasome 進行降解，NF- $\kappa$ B 即可從細胞質進入細胞核，結合在其目標基因上，轉錄出許多與細胞增殖、抑制細胞凋亡及細胞激素的相關產物 (Rawling *et al.*, 2006; Thome, 2008)。然而，在細胞被活化後，對於 IKK 複合體如何被吸引至 CBM 複合體仍有待解答，目前的研究認為 MALT1 與 BCL10 的 ubiquitylation 可能是吸引 IKK $\gamma$  (具有 ubiquitin sensing domain) 至此複合體的關鍵因素 (Oeckinghaus *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2008)。近來研究亦發現在受刺激的 Jurkat T 細胞及 primary T 細胞的脂閥上，Caspase-8 與 BCL10、MALT1、TRAF6 及 IKK 複合體具有結合能力 (Su *et al.*, 2005; Misra *et al.*, 2007; Kawadler *et al.*, 2008)，可促進 NF- $\kappa$ B 的活化。COP9 signalosome (CSN) 過去已知可以調控 T 細胞的抗原反應，其中 CSN 對於 IkB $\alpha$  的降解是必須的，近期發現 CSN 可與 MALT1 及 CARMA1 結合，並穩定 BCL10 的表現 (Welteke *et al.*, 2009)。

### 自然殺手細胞與骨髓系細胞在 NF- $\kappa$ B 的訊息傳遞路徑

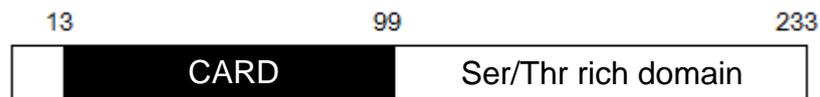
自然殺手細胞與骨髓系細胞 (monocytes, DCs) 屬於先天性免疫的一環，二者所參與的 CARD-containing 蛋白質分別是 CARMA1 及 CARD9。對於 ITAM 相關

受器其下游 CBM 複合體所引起的 NF- $\kappa$ B 訊息傳導已經了解 (Hara, *et al.*, 2007)，但那些分子參與在他們的上下游並不如淋巴球了解的透徹。目前僅知 CBM 複合體在自然殺手細胞中對其產生細胞激素是必須的，毒殺能力並非依靠此條路徑 (Gross *et al.*, 2008)。此外，除了由 ITAM 相關的受器所引起的訊息傳遞，Dong 等人在 2006 以 Raw 264.7 細胞 (macrophage) 指出 BCL10 與 MALT1 亦參與在 LPS-TLR4 的訊息傳遞之中 (Dong *et al.*, 2006)，但 CARD9 是否有在 TLR 訊息傳遞扮演仍舊頗受爭議 (Gross *et al.*, 2006; Hara *et al.*, 2007)。

### 以特定抗原刺激非免疫細胞在 NF- $\kappa$ B 的訊息傳遞路徑

GPCR 的下游已知具有 CARMA3-BCL10-MALT1 (Klemm *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007)，被研究的較為清楚的路徑為 LPA 與 angiotensin II 所刺激 GPCR 的訊息傳遞，在 LPA 刺激 GPCR 後，會活化下游的 PKC 蛋白，活化 MEKK3 進而在 IKK $\beta$  磷酸化，此外亦吸引  $\beta$ -arrestin 2 (Sun *et al.*, 2007) 將 CBM 複合體與 TRAF6 (Grabiner *et al.*, 2007) 吸引至受器，最後活化 NF- $\kappa$ B，促使細胞的增生、活化。

## 二、BCL10



BCL10 最初是在 MALT lymphoma t(1;14)(p22;q32)所分離出來的，因此命名為 B cell lymphoma 10 (Wills *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999)，別名為 CIPER, CLAP, mE10, CARMEN。BCL10 蛋白質共有 233 個胺基酸，分子量約為 26.2 kD，其結構可分為 N 端的 CARD domain 及 C 端的 Ser/Thr rich domain。N 端的 CARD domain 目前已知可與其他具有 CARD domain 的蛋白質有結合能力，促進 oligomerization 以達到訊息傳遞的目的，例如 CARMA1。若將 CARD domain 上具高度保留性的胺基酸變異，則失去與其他蛋白質結合的能力，抑制 NF- $\kappa$ B 的活化，C 端富含 Serine 及 Threonine 的序列則與 BCL10 的磷酸化具有關聯性。

## BCL10 磷酸化與 NF- $\kappa$ B 訊息傳遞的關係

BCL10 在特定刺激下可與 CARD-containing 蛋白質及 MALT1 結合形成複合物將訊息傳遞以活化 NF- $\kappa$ B，過去對於在 T 細胞經抗原刺激後 BCL10 會有磷酸化或降解的現象，其生理意義及磷酸化位點皆不清楚。截至 2008 年為止，許多研究陸續指出 BCL10 可經由磷酸化與 ubiquitylation 以負向或正向調控 classical NF- $\kappa$ B 的訊息傳遞，近年則發現 BCL10 的磷酸化亦參與在 alternative NF- $\kappa$ B 的訊息傳遞 (Bhattacharyya *et al.*, 2010)。

IKK $\beta$  可在 Ser134、Ser136、Ser138、Ser141、Ser144 進行磷酸化，使 BCL10 與 MALT1 分離而負向調控由 TCR 所引起的 NF- $\kappa$ B 訊息傳遞 (Wegener *et al.*, 2006)。Lobry 亦指出 IKK $\beta$  可對 CARD domain 上的 Thr81 及 Ser85 磷酸化，使 BCL10 被  $\beta$ -TrCP ( $\beta$ -transducin repeat-containing protein) 辨識而受到降解，抑制 NF- $\kappa$ B 的活化 (Lobry *et al.*, 2007)，針對這些磷酸化位點進行變異，會導致細胞激素 (cytokines) 的增加 (Wegener *et al.*, 2006; Lobry *et al.*, 2007)。Ishiguro 更指出 CaMKII (Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent kinase II) 可在 Ser138 進行磷酸化，以負向調控 NF- $\kappa$ B 的能力 (Ishiguro *et al.*, 2007)。

BCL10 磷酸化影響 NF- $\kappa$ B 的正調控作用目前僅知有 IKK $\beta$ ，IKK $\beta$  除了可負向調控 NF- $\kappa$ B 的能力之外，對於穩定初始 CBM 複合體的存在與結合是必須的 (Wegener *et al.*, 2006)。Ruefli-Brasse 等人發現 Ser/Thr 激酶 RIP2 可與 BCL10 結合 (Ruefli-Brasse *et al.*, 2004)，而在 RIP2<sup>-/-</sup> 老鼠中，由 TCR 所引起的 NF- $\kappa$ B 訊息傳遞會受到抑制 (Kobayashi *et al.*, 2002)，顯示 BCL10 的磷酸化可能具 NF- $\kappa$ B 訊息傳遞正調控的作用，但目前仍無法在試管外發現 RIP2 可對其進行磷酸化 (Lobry *et al.*, 2007)。

## BCL10 磷酸化和 actin polymerization 及進核的關係 與 BCL10 ubiquitylation

actin polymerization 對於免疫細胞延展 (spreading) 及吞噬能力很重要，Rueda 等

人指出 Ser138 磷酸化對於 T 細胞的 actin polymerization 具有促進的作用，並影響突觸的形成 (conjugate formation) (Rueda *et al.*, 2007)。在 TNF- $\alpha$  的刺激之下，Akt 可對 BCL10 Ser218 及 Ser231 進行磷酸化促使 BCL10 與 BCL3 結合，使其進核 (Yeh *et al.*, 2006)，但核內的 BCL10 扮演何種角色仍有待研究，但在兩種型式 MALT 淋巴瘤 t(1;14)(p22;q32) 及 t(11;18)(q21;q21) (MALT Lymphoma) 皆可發現 BCL10 進核。目前認為核內的 BCL10 可能具有負調控作用，核內的 BCL10 會被降解 (Lobry *et al.*, 2007)，此外，核內的 BCL10 亦可結合 TFIIB，做為轉錄活化因子 (Liu *et al.*, 2004)。其他對於 BCL10 的後修飾作用包括 ubiquitylation，可經 NEDD4、Itch、cIAP2 對其 ubiquitylation 使其降解而抑制 NF- $\kappa$ B 的活性 (Scharschmidt *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2006)。2007 年 Wu 等人則指出 BCL10 可在 CARD domain 上的 Lys31 與 Lys63 進行 K63-ubiquitylation，可被 NEMO 結合，對於活化 NF- $\kappa$ B 是重要的 (Wu *et al.*, 2007)。

在細胞中單獨大量表現 BCL10 可發現有高度磷酸化的現象、絲狀構造的出現及活化 NF- $\kappa$ B 的能力，將 CARD domain 上高度保留性的氨基酸變異，則上述所有現象皆無法被觀察到 (Guiet *et al.*, 2000; Schaefer *et al.*, 2004)，顯示絲狀構造與活化 NF- $\kappa$ B 的能力可能具有某種關聯性。目前絲狀構造僅在 BCL10 大量表現才觀察到，而這樣的構造可在使用 actin depolymerization 藥物受到抑制，顯示與細胞骨架有相連性 (Guiet *et al.*, 2000)。

基因剔除 BCL10 小鼠實驗顯示小鼠免疫功能嚴重缺失，且 BCL10<sup>-/-</sup> 淋巴球無法在抗原或是 TPA (12-O-tetradecanoly-phorbol-13-acetate) / Ionomycin 刺激下進行活化，促使細胞增生，顯示抗原所誘導的 NF- $\kappa$ B 訊息傳遞路徑發生了缺失，但對於 MAPK、AP-1 及 Ca<sup>2+</sup> 訊息傳遞路徑則不受影響 (Ruland *et al.*, 2003; Ruefil-Brasse *et al.*, 2003)。此外 BCL10 的缺失並不影響細胞凋亡，顯示 BCL10 雖含有 CARD domain 但並非參與細胞凋亡 (Ruland *et al.*, 2001)。對於 BCL10 所扮演的角色多著重在 classical NF- $\kappa$ B 訊息傳遞路徑，近期則有研究指出 BCL10 參與 alternative NF- $\kappa$ B 及 JNK-2 的訊息傳遞路徑，可能與先天免疫相關 (Blonska *et al.*, 2007)。大量表現

BCL10 會活化 NF- $\kappa$ B，而在 MALT1<sup>-/-</sup> 鼠胚胎纖維母細胞 (mouse embryonic fibroblast) 中大量表現 BCL10 發現會大幅降低 NF- $\kappa$ B 的活化，顯示 MALT1 可與 BCL10 共同促進 NF- $\kappa$ B 的活化能力 (Ruefil-Brasse *et al.*, 2003)。

### 三、MALT1



MALT1 的全名為 mucosa-associated-lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1，具有 824 個胺基酸，分子量約為 92kD，包含 1 個 death domain (DD)，3 個 Ig domain 及 1 個 caspase-like domain (CLD)，其中 Ig domain 可與 BCL10 胺基酸序列 107-119 結合，促使 MALT1 oligomerization 而活化 NF- $\kappa$ B (Lucas *et al.*, 2001)，DD 所扮演的角色目前仍舊不清楚，有研究指出 DD 可與 BCL10 的 CARD domain 結合 (Langel *et al.*, 2008)。目前多數人認為 MALT1 是藉由 BCL10 的 CARD domain 去吸引 CARMA1 形成 CBM 複合體，而 MALT1 亦可直接與 CARMA1 的 coiled-coil domain 結合穩定這個複合物，以利訊息傳遞 (Che *et al.*, 2004)。TRAF6 可與第 2 個 Ig domain (309-319 a.a.) 及 CLD 後段序列結合 (651- 657 a.a., 804-809 a.a.)，吸引 IKK complex 而活化 NF- $\kappa$ B (Sun *et al.*, 2004; Noels *et al.*, 2007)。CLD 目前已知對於 MALT1 切割其已知受質 BCL10 與 A20 的能力是必須的，若將其序列上具高度保留性的 His415、Cys464 進行變異，則切割能力消失，且降低 NF- $\kappa$ B 活化的能力 (Coornaert *et al.*, 2008; Rebeaud *et al.*, 2008)。Zhou 等人發現 MALT1 的 C 端會被 ubiquitylation (Zhou *et al.*, 2007)，可以作為 1 個 scaffold protein 以進行下游分子的訊息傳遞。

基因剔除 MALT1 小鼠實驗顯示由 T 細胞抗原受體與 B 細胞抗原受體所活化的 NF- $\kappa$ B、JNK、p38 訊息傳遞路徑會完全受到抑制，但不影響 ERK 訊息傳遞路徑與 Ca<sup>2+</sup> 在細胞質的濃度變化 (Ruland *et al.*, 2003)。此外，T 細胞及部分 B 細胞 (Marginal zone B cell, B1 cell) 會有發育不良的現象，其表型與 BCL10 基因剔除小

鼠相似 (Ruland *et al.*, 2003; Ruefli-Brase *et al.*, 2003)。但單獨大量表現 MALT1 無法引起 NF- $\kappa$ B 的活化，顯示 MALT1 的 oligomerization 對 NF- $\kappa$ B 訊息傳遞路徑相當重要。若與 BCL10 共同表現於細胞株，則 NF- $\kappa$ B 的活化程度加倍。

#### 四、MALT1 誘導切割 BCL10



MALT1 由於與哺乳類的 caspase 有高度相似度，皆具有高度保留的 Cys-His diad，因此又被稱為 paracaspase (Uren *et al.*, 2001)，是哺乳類唯一的 paracaspase。MALT1 對於所有已知的 caspase 受質皆無法進行切割，因此，並沒有明確的研究指出 MALT1 是否為蛋白酶。過去 Uren 等人根據電腦模擬 3D 結構分析預測其受質 P1 位置可能為疏水性胺基酸，同樣的預測結果也在 Snipas 等人的實驗中發現，完全不同於 caspase (負電性胺基酸)。過去我們實驗室的研究中發現，以 TPA/Ionomycin 刺激 Jurkat T 細胞，可以發現有一種 BCL10 的分子量小於內生性 BCL10。而共同表現 BCL10 GFP 與 MALT1 在 293T 細胞並佐以去磷酸化酵素處理，亦可發現 1 種較小分子量的 BCL10，顯示 BCL10 受到 MALT1 的誘導切割，進一步在 BCL10 的 C 端做一連串的刪除突變實驗 (附圖七)，以檢測其可能切割位置，認為第 225 個胺基酸白胺酸(Leu225) 可能是其切割位置。2008 年 Rebeaud 等人發表於 *Nature Immunology* 指出 BCL10 可受 MALT1 誘導切割，顯示 MALT1 確實為一種蛋白酶，但切割位置位於第 228 個胺基酸精胺酸(Arg228)，不同於我們所認定的疏水性胺基酸 (Rebeaud *et al.*, 2008)。

#### BCL10 在各種細胞受到 MALT1 誘導切割的現象

BCL10 受到 MALT1 誘導切割的現象目前僅在 T 淋巴球、B 淋巴球、自然殺手細胞中發現 (Rebeaud *et al.*, 2008；our lab)，其他的骨髓性細胞、內皮細胞及上皮

細胞則尚未發現，目前指向可能是與 CARMA1 相關，但對於其切割的機制仍尚待釐清。

### MALT1 誘導切割對細胞的影響

BCL10 在 TCR/BCR 下游所引發的 NF- $\kappa$ B 訊息傳遞扮演不可或缺的角色，然而 BCL10 有無受到切割並不影響 NF- $\kappa$ B 活化程度，但會促進 integrin 誘導 T 細胞的附著反應 (adhesion)，對於後天免疫相當重要 (Rebeaud *et al.*, 2008)；A20 (去掉 ubiquitin 的蛋白質) 被鑑定出為 MALT1 的另外一個受質，A20 可藉由移除 K63-ubiquitin 以負向調控 NF- $\kappa$ B 活化程度，而 A20 受到切割後，會使其抑制 NF- $\kappa$ B 活化的能力稍微受到影響，猜測可能因為切割後其含 deubiquitinating OTU domain 的片段會受到降解 (Coornaert *et al.*, 2008)。但將 MALT1 的酵素活化位置變異 (C464A, H415A)，NF- $\kappa$ B 訊息傳遞路徑會受到抑制，顯示 MALT1 的受質不僅這 2 個，這部分仍有待研究。

### MALT1 在治療上的應用

許多的淋巴瘤都是由於 NF- $\kappa$ B 的持續活化所造成，因此過去對於這類型的腫瘤治療是以抑制 NF- $\kappa$ B 訊息傳遞路徑為首要目標 (Baud *et al.*, 2009)，包括嘗試抑制 IKK $\alpha$ 、IKK $\beta$ 、 $\beta$ TrCP 等。但由於這些訊息傳遞分子亦有參與其他的路徑，因此長期使用可能會造成免疫功能的下降。2008 年 Rebeaud 等人與 Coornaert 等人鑑定出 MALT1 為蛋白酶，且其是否具有切割能力會影響 NF- $\kappa$ B 活化的能力，因此提出抑制 MALT1 酵素活化位置，或許可作為一個新的藥物標的。2009 年分別有 2 篇研究指出利用胜肽抑制 MALT1 的酵素活化位，成功抑制了 NF- $\kappa$ B 的活化且殺除了腫瘤 (ABC DLBCL, activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma)，對於其他路徑所引發的腫瘤則不具毒性，例如 GCB DLBCL (germinal center B-cell-like) 為 NF- $\kappa$ B-independent 不受影響，顯示其專一性。因此也許可治療其他 NF- $\kappa$ B 持續活化的腫瘤 (Ferch *et al.*, 2009; Hailfinger *et al.* 2009)。

## 第貳章、研究目的

對於 BCL10 受 MALT1 誘導切割其切點位置與切割後對細胞的影響及生理意義仍有待釐清。因此，本篇論文欲以多種方法去探討 BCL10 確切切割位置與 C 端被切割後的小段胜肽在細胞的分布位置，以進一步分析其可能扮演的角色。



## 第參章、材料與方法

### 一、抗體來源：

一級抗體	
Mouse anti-BCL10 monoclonal antibody	(Santa Cruz, 331.3)
Rabbit anti-BCL10 monoclonal antibody	(Santa Cruz, H-197)
Rabbit anti-MALT1 polyclonal antibody	(Sana Cruz, H-300)
Rabbit anti-GFP polyclonal antibody	(Our lab)
Mouse anti-GAPDH antibody	(BioDesign international, H86504M)
Mouse anti-Flag monoclonal antibody	(Sigma)
Mouse anti-Flag polyclonal antibody	(濁水溪)
二級抗體	
Goat anti-mouse IgG antibody	Jackson
Goat anti-rabbit IgG antibody	Jackson

### 二、實驗使用之質體 (附表一) 及質體構築 (附圖)：

☼ BCL10 constructs : pRcCMV-BCL10, pRcCMV-BCL10 GFP, pCMV-FlagBCL10 (附圖二), pCMV-FlagBCL10 GFP(附圖三), pET21a-BCL10-His

☼ BCL10 mutants : pRcCMV-BCL10 L225DGFP, pRcCMV-BCL10 R226GGFP, pRcCMV-BCL10 R228GGFP, pRcCMV-BCL10 L225A, pRcCMV-BCL10 L225E, pRcCMV-BCL10 L225R, pRcCMV-BCL10 L225K, pRcCMV-BCL10 L225Q, pRcCMV-BCL10 L225G, pRcCMV-BCL10 R228G, pRcCMV-BCL10 L225R,R228G, FL1, FL-2, FL-3, FL-4 (附圖一), pET21a-BCL10 1-225, pET21a-BCL10 1-228

☼ MALT1 constructs : pRcCMV-MALT1-myc, pCMV6XL5-MALT1

☼ p-NF- $\kappa$ B-Luc

☼ p-CMV-Renilla-Luc

☼ pRcCMV-GFP-RSRTVSRQ (附圖四)

☼ pGFP, pGFPemd-bm

### 三、製備勝任細胞 (Preparation of competent cells)

以無菌牙籤挑出大腸桿菌 DH5 $\alpha$  的單一菌落，置於 2 ml 的 LB 培養液 (10 mg/ml NaCl, 10 mg/ml trypton, 5 mg/ml yeast extract) 中，於 37°C、150 rpm 培養箱中過夜培養。第二天將此 2 ml 的菌液加入 200 ml 的 LB 培養液繼續培養，待細菌的 OD<sub>600</sub> 約至 0.3-0.5 (2-3 小時)，放置冰上 10 分鐘，以 3,000 rpm (KUBOTA 1920) 在 4°C 離心 10 分鐘，吸去上清液，再以 40 ml TFBI (30 mM KOAc, 100 mM RbCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% glycerol, pH=5.8) 完全沖散菌體，置於冰上 2-3 小時後，以 3,000 rpm 在 4°C 離心 10 分鐘，吸去上清液，以 20 ml TFBII (10 mM MOPS, 10 mM RbCl<sub>2</sub>, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% glycerol, pH=5.8) 將菌體完全沖散，分裝至 1.5 ml eppendorf tube，每管 100 或 300 $\mu$ l，保存於 -80°C 冰箱。

### 四、細菌轉型 (Transformation)

將質體 DNA 加入 100  $\mu$ l 勝任細胞 (competent cells)，混合均勻，置於冰上 30 分鐘，再置於 42°C 水浴 1 分鐘後，立刻置於冰上 10 分鐘，再加入 400  $\mu$ l 不含 Ampicillin 的 LB 培養液中，於 37°C、150 rpm 震盪培養 1 小時，取 200  $\mu$ l 均勻塗抹在含 50  $\mu$ g/ml 的 LB 瓊脂平板上，置於 37°C 培養箱培養 16-18 小時。

### 五、小量質體製備 (mini-plasmid preparation)

使用無菌牙籤挑出含有質體的單株大腸桿菌 DH5 $\alpha$ ，置於含有 50  $\mu$ g/ml ampicillin 的 2 ml LB 培養液中，於 37°C、150 rpm 震盪培養 16 小時，第二天取出 1.5 ml 菌液以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，去除上清液，使用 mini-plasmid kit (Geneaid) 抽取質體 DNA，抽取好的質體保存於 4°C。

### 六、大量質體製備 (maxi-plasmid preparation)

使用無菌牙籤挑出含有質體的單株大腸桿菌 DH5 $\alpha$ ，置於含有 50  $\mu$ g/ml

ampicillin 的 5 ml LB 培養液中，於 37°C、150 rpm 震盪培養 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 OD<sub>600</sub> 約至 0.8-1.0，再加入 2.5 ml 的 chloramphenicol (34 mg/ml)，繼續培養至隔天。第三天以 Beckman JA-10 rotor，7,000 rpm，4°C 離心 15 分鐘收集菌體，以 18 ml solution A (0.9% glucose, 25 mM Tris pH8.0, 1 mM EDTA pH8.0) 徹底打散菌體，再加入 2 ml solution B (4% lysozyme in solution A) 輕輕搖晃並靜置室溫 10 分鐘，而後加入 40 ml solution C (0.8% NaOH, 1% SDS) 輕輕搖晃至溶液呈透明黏稠狀，再加入 20 ml solution (3M potassium acetate, 12% glacial acetic acid) 輕輕搖晃並置於冰上 10 分鐘，此時可見白色棉絮狀物質產生。再以 Beckman JA-10 rotor，9,000 rpm，4°C 離心 20 分鐘後，以 4-5 層紗布過濾上清液，加 0.6 倍體積的 isopropanol 於 -20°C 沉澱 1 小時，再以 Beckman JA-10 rotor，9,000 rpm，4°C 離心 20 分鐘，棄上清液，以 10 ml solution E (200 mM Tris pH8.0, 70% EtOH) 沖散 DNA，並移至 50 ml corning tube 以 11,000 rpm、4°C 離心 25 分鐘 (KUBOTA 1920)，棄上清液，真空乾燥 DNA，再以 4 ml TE8.0 回溶。加入 4.6 g CsCl 及 350 µl 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 15 ml corning tube，以等體積的 isopropanol (saturated with 5M NaCl) 萃取 7-8 次，直到水層沒有 EtBr，再移至 50 ml corning tube 並加入 3 倍體積 TE8.0 混合均勻，再加入 2 倍體積 100% 酒精於 -20°C 作用 1 小時。而後以 11,000 rpm、4°C 離心 25 分鐘 (KUBOTA 1920)，再用 25 ml 70% 酒精清洗 DNA，最後真空乾燥之，以 400-800 µl TE8.0 回溶，並以分光光度計 (GeneQuant) 測定 OD<sub>260/280</sub> 吸光值，以求得 DNA 濃度。(1 OD<sub>260</sub>=50 µg/ml DNA)

## 七、重組蛋白質的表現 (expression of recombinant proteins)

將帶有表現重組蛋白質的質體轉型 (transform) 至 BL21DE3，接種至含有 50

µg/ml ampicillin 的 3 ml LB 培養液中，待 OD 至 0.5-0.8，加入 IPTG(1 mM)以誘導重組蛋白質的表現，3 小時後，加入 400 µl lysis buffer (50 mM HEPES pH=7.9, 1 mM EDTA, 300 mM NaCl, 0.1% NP40) 並進行超音波震盪 (sonication)，以 13,000 rpm 離心 15 分鐘分成上清液及沉澱物，沉澱物加入 400 µl 3× sample buffer 並進行超音波震盪，視蛋白質的特性其表現會出現在不同部分。

## 八、細胞培養 (Cell culture)

使用的細胞培養液皆須添加 10%胎牛血清(fetal bovine serum)及 1×的抗生素和抗黴菌劑 (100 µg/ml streptomycin, 0.25 µg/ml amphotericin B, 50 µg/ml penicillin G, GIBCO)，稱為 complete medium。細胞置於 37°C、含 5% CO<sub>2</sub> 的培養箱培養。

### ☼ 293T cell :

會持續表現 SV40 large T antigen 的人類胚胎腎臟細胞 (human embryonic kidney cell line)，以 complete DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, GIBCO) 培養，待細胞長至 80-90%，進行繼代培養，以 1% PBS 清洗 2 次、0.25% trypsin 將細胞打散，約 1:10 的比例繼代到新的培養液。

### ☼ Jurkat T cell :

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

## 九、細胞轉染 (Transfection)－磷酸鈣沉澱法 (Calcium phosphate precipitaton) :

轉染前一天，放置  $2 \times 10^5$  細胞至 3.5cm dish 以 2 ml 培養液培養。第二天進行轉染前將培養液換成 1.5 ml，將欲轉染的質體 (0.25-2.5 µg) 加入 125 µl 0.5 M CaCl<sub>2</sub>，補水至 250 µl，混合均勻，並 1 滴 1 滴緩慢加入 250 µl 的 2×HBS (0.28 M NaCl, 1.5 mM sodium phosphate, 50 mM HEPES, pH=7.1)，並同時打入氣泡，加完後震盪約

20 秒，室溫下靜置 15-20 分鐘，取 250  $\mu$ l 均勻加入細胞中。培養 16 小時後，以 1  $\times$  PBS 清洗 2 次，並加入新鮮的培養液 2 ml，繼續培養 24 小時後分析。使用的培養液體積及轉染質體會依據使用的培養盤底面積有所調整。

## 十、TPA/Ionomycin treatment

將 TPA (50 ng/ml) 及 Ionomycin (1  $\mu$ M) 直接加入細胞培養液並處理 2-3 小時，以 1  $\times$  PBS 清洗 2 次，再收取蛋白質。

## 十一、Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis

### (SDS-PAGE)

以 70% 酒精擦拭玻璃片及陶瓷片，架設好注膠裝置(Hoefer)，先注入 12% separating gel (1 ml 1.5 M Tris pH8.8, 1.35 ml ddH<sub>2</sub>O, 1.63 ml 30% acrylamide, 40  $\mu$ l 10% SDS, 33  $\mu$ l 10% ammonium persulfate, 4.5  $\mu$ l TEMED) 約八分滿，再覆加入 1 ml ddH<sub>2</sub>O，凝膠約 30 分鐘後，倒掉二次水，以濾紙吸乾水分，再加入齒狀梳板並注入 5% stacking gel (500  $\mu$ l 0.5 M Tris pH6.8, 1.17 ml ddH<sub>2</sub>O, 333  $\mu$ l 30% acrylamide, 20  $\mu$ l 10% SDS, 20  $\mu$ l 10% ammonium persulfate, 3  $\mu$ l TEMED)，凝膠後取出齒狀梳板即可。將 25  $\mu$ g 的蛋白質樣品溶入 3 $\times$  SDS sample buffer (15 ml glycerol, 9.4 ml 1M Tris pH6.8, 7.5 ml 2-mercaptoethanol, 15 ml 20% SDS, 37.5 mg bromophenol blue, 以 ddH<sub>2</sub>O 補至 50 ml)，混合均勻後以 100 $^{\circ}$ C 加熱 10 分鐘，立刻置於冰上，以 80-100 伏特電壓進行電泳約 2-3 小時 (電泳液 1 升含有 3 g Tris, 18.8 g glycine, 10 ml 10% SDS)。待 sample dye 跑至底端，取 separating gel 進行染色或西方墨點分析。

## 十二、西方墨點分析 (Western blot analysis)

電泳結束後，將 separating gel 上的蛋白質轉漬至 PVDF membrane (Hybond-P, GE Healthcare)，以 Hoefer electrophoretic transfer system、固定電流 300 mA 進行 1-3 小時 transfer。室溫下以 5% non-fat milk 的 1 $\times$  PBS blocking 1 小時，再加入含 1% non-fat milk 的 1 $\times$  PBS 及一級抗體 (rabbit anti-GFP antibody, 1:10,000 稀釋；mouse

anti-BCL10 antibody, 1:3,000 稀釋；rabbit anti-BCL10 antibody, 1:10,000 稀釋；rabbit anti-MALT1 antibody, 1:1,000 稀釋；mouse anti-GAPDH antibody, 1:40,000 稀釋)，在 4°C 反應 16 小時後，於室溫以 wash buffer (0.5% Tween-20 in 1×PBS) 清洗 3 次，每次 10 分鐘，再加入含 0.1% non-fat milk PBS buffer 的二級抗體 (goat anti-rabbit IgG, goat anti-mouse IgG, 皆以 1:10,000 稀釋, 抗體上為 peroxidase-linked, Jackson)，於室溫作用 1 小時，以 wash buffer 清洗 3 次，每次 15 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 上並反應 1 分鐘，1 小時內完成 X-ray film 顯影。

### 十三、蛋白質染色法 (Protein Staining)

電泳結束後，取 separating gel 進行染色，待染色完成後可以玻璃紙進行封膜保存或是切膠以進行原位膠體酵素消化反應(in-gel digestion)。

#### ☼ Coomassie blue stain :

將膠體浸泡在 Coomassie blue 溶劑中 (0.1 g Coomassie blue 溶於 400 ml 甲醇，100 ml 醋酸，補水至 1000 ml 備用)，100 rpm、室溫搖晃 30 分鐘，回收染劑，以退染液(10% methanol, 7% acetic acid) 進行退染至隔天，再以 ddH<sub>2</sub>O 清洗 3 次即可。

### 十四、免疫沉澱(Immunoprecipitation)與去磷酸酵素作用(Phosphatase reaction)

以 RIPA (50 mM Tris-HCl pH7.4, 1% NP40, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, leupeptin, pepstatin, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM NaF) 收取細胞蛋白質，在測定蛋白質濃度後，取 1 mg 蛋白質加入 2-4 µl 特定抗體 (anti-mouse BCL10 Abs: 4µl; anti-rabbit BCL10 Abs: 2µl) 在 4°C 反應 16 小時後，再加入 20 µl protein G beads 於 4°C 反應 3-4 小時，以 3,000 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，以 modified RIPA buffer (RIPA + 0.25% Na-deoxycholate) 清洗 3 次、1×NEB buffer No.3 清洗 2 次，加入 100 µl 1×NEB buffer No.3，分成 2 等份，其中 1 份進行去磷酸酵

素作用，並加入 1  $\mu$ l 去磷酸酵素(cIAP, calf alkaline phosphatase) 在 37°C 反應 1-2 小時，4°C、3,000 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，加入 3 $\times$  sample buffer 在 100°C 作用 10 分鐘，始進行西方墨點分析。

## 十五、蛋白質純化 (Protein purification)

☀ 以 DSS 共價鍵結 anti-BCL10 antibody 與 proteinG 之親合管柱 (PIERCE, Seize<sup>®</sup> X ProteinG immunoprecipitation kit)

### ➤ 蛋白質來源：

以 TPA/Ionomycin 刺激約 2-3 小時的 Jurkat T cell，其內生性被誘導切割的 BCL10。

### ➤ 建立 anti-BCL10 antibody 與 proteinG 之親合管柱：

取出 200  $\mu$ l protein G 以 6,400 rpm 離心 3 分鐘去除上清液並以 500  $\mu$ l B/W buffer (140 mM NaCl, 8 mM sodium phosphate, 2 mM potassium phosphate, 10 mM KCl, pH7.4) 清洗 2 次，加入 400  $\mu$ l (80  $\mu$ g) anti-BCL10 antibody (331.3, Santa Cruz) 在室溫下反應 2 小時，去除上清液，以 400  $\mu$ l B/W buffer 清洗 2 次後，加入 400  $\mu$ l B/W buffer 及 25  $\mu$ l DSS 在室溫下反應 1 小時，以 500  $\mu$ l elution buffer (1M glycine-HCl, pH2.8) elute 5 次，將未共價鍵結的抗體與反應剩餘的 DSS 去除乾淨，再以 500  $\mu$ l B/W buffer 清洗 2 次後，以 1 $\times$ BSA(bovine serum albumin, 1 mg/ml) 500  $\mu$ l in B/W buffer 在 4°C 進行 blocking 16 小時，以 100  $\mu$ l elution buffer elute 5 次，500  $\mu$ l B/W buffer 清洗 2 次後，即可進行目標蛋白質的純化或是保存於 4°C 冰箱中。本法最大特色在於抗體並不會在進行 elution 步驟時連同抗原一同被 elute，以達到蛋白純化的目的，且此根管柱可以重複使用。

### ➤ 純化方法：

每次皆以  $2-4 \times 10^8$  細胞數進行純化，以 RIPA 收取細胞蛋白質後，加入等量的 B/W buffer 與處理好的管柱混合均勻，在 4°C 反應 16 小時後，以 6,400 rpm 離心

3 分鐘去除上清液，使用 B/W buffer 清洗 4 次，1×NEB buffer No.3 150 μl 清洗 2 次，加入 100-200 μl 1×NEB buffer No.3 及 2 μl cIAP 在 37°C 反應 2 小時後，以 B/W buffer 清洗 3 次，每次 300 μl，再以 100 μl elution buffer elute 3-5 次，最後再以 300 μl 的 B/W buffer 清洗 2 次，親合管柱保存在 4°C 冰箱，收集的蛋白質以透析及冷凍乾燥的方式進行濃縮，保存於-80°C 冰箱。

※ DSS: disuccinimidyl suberate，須溶於 DMSO 或是 DMF 中。

#### ☀ 以 FLAG 親合凝膠純化被切割的 BCL10 (Sigma)

##### ➤ 蛋白質來源：

將表現質體 0.5 μg pCMV-FlagBCL10 GFP 與 2 μg pRcCMV-MALT1-myc 轉染至 10-cm 盤子的 293T 細胞，48 小時後收取細胞蛋白質。

##### ➤ 純化方法：

以 RIPA 收取細胞蛋白質，在測完蛋白質濃度後，取 5 mg 蛋白質加入 20 μl anti-flag M2 affinity gel (Sigma)(10 μl packed gel)在 4°C 反應 16 小時後，以 500 μl TBS (50mM Tris pH=7.4, 150 mM NaCl)清洗凝膠，以每次 30-60 秒、離心 8,600 rpm 並靜置 3-4 分鐘再去除上清液的步驟，共清洗 3 次，而後以 1×NEB buffer No.3 100 μl 清洗 2 次，再加入 100 μl NEB buffer No.3 及 3-5 μl cIAP 以進行去磷酸化，37°C 反應 2 小時後，以 500 μl TBS 清洗 3-5 次，再加入 100μl 的 elution buffer(0.1M glycine-HCl, pH=3.5) 靜置 5 分鐘，離心 8,600 rpm 並靜置 3-4 分鐘，收集上清液，以 10 μl neutralization buffer (0.5 M Tris pH7.4, 1.5 M NaCl)進行中和後，儲存於-80°C 冰箱，使用過後的膠體再以 500 μl TBS 清洗 2 次後，以 50%甘油儲存於-20°C 冰箱。

## 十六、胜肽純化 (Peptide purification)

以 RIPA 收集細胞蛋白質，加入 1-2 倍體積的 acetonitrile (ACN)以去掉大部份蛋白質，vortex 2 分鐘後在冰上靜置 15 分鐘，在 4°C 以 6,000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液以 Speed Vac 抽乾 ACN，以 PepClean™ C-18 Spin Columns (PIERCE) 進行

胜肽純化。

## 十七、螢光觀察與 Hoechst 染色

將培養在 18mm × 18mm 蓋玻片上有表現螢光的細胞以 1×PBS 清洗 3 次，每次 5 分鐘，再加入 100% 丙酮(acetone)固定並打洞，在室溫下作用 10 分鐘後，加入 Hoechst 33342 (1:1,000 稀釋於 PBS)在避光環境下反應 30 分鐘，以 1×PBS 清洗 3 次，每次 5 分鐘，取出蓋玻片，瀝乾水分，以 mounting fluid 包埋倒蓋於載玻片上，指甲油封片，保存於-20°C。結果以螢光顯微鏡或是徠卡雷射共軛焦顯微鏡 (LEICA Confocal Laser scanning microscope) 觀察並擷取影像 (Hoechst: 405nm, GFP: 488nm, RFP: 543nm)。

## 十八、冷光酵素測定 (Luciferase assay)

將 p-NF-κB-Luc 0.1 μg，pCMV-Renilla-Luc 0.05 μg 及欲探討其對 NF-κB 活化能力的表現質體 (0.05-0.5 μg) 轉染至 293T 細胞 (培養在 24 well plate)，48 小時後去除培養液，以 110 μl 不含抗生素及血清的培養液打散細胞，取出 30 μl 至 96 well 黑色定量盤，加入 30 μl Dual-Glo<sup>TM</sup> Luciferase Assay Buffer I (Promega)室溫作用 10 分鐘，1 小時內以冷光測定儀測定得 DG1 值，再加入 30 μl Dual-Glo<sup>TM</sup> Luciferase Assay BufferII 室溫反應 10 分鐘，1 小時內測定得 DG2 值。將實驗組之 DG1/DG2 數值除以空質體之 DG1/DG2 數值，所得之數值及為相對 NF-κB 活化能力。

## 十九、毛細管帶狀電泳分析 (Capillary zone electrophoresis analysis)

☀ 儀器設備：

熔融石英毛細管(uncoated fused silica)，50 μm I.D.，320 μm O.D. (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA)，全長 75 cm，偵測長度 60 cm，偵測窗長度 1 cm；高電壓電源及樣品進樣裝置：PRINCE (Laner labs, Emmen, the Netherland)；檢測器：Dynamax UV-C absorbance detector (Rainin, Emeryville, CA, USA)；資料處理：EZchrom Chromagrophy Data system (Scientific software, San Ramon, CA, USA) 與

個人桌上型電腦搭配操作。

#### ☀ 毛細管電泳系統操作：

裝設好毛細管後，首先進行毛細管的前處理，以 2 M NaOH、ddH<sub>2</sub>O、BGE (100mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH=2.48) 分別處理 10 分鐘後，注入標準品 (9.6 秒)，在室溫以 20 kV 進行電泳 20 分鐘，偵測波長設為 200 nm。待標準品電泳結束，樣品即可上機以進行電泳。在樣品跟樣品之間，毛細管以 2 M NaOH, 3 分鐘、ddH<sub>2</sub>O, 2 分鐘、BGE, 8 分鐘進行清洗。

#### ☀ 標準品配製及樣品前處理：

標準品為合成的胜肽 (TVSRQ、RSRTVSRQ, GeneScript)，濃度為 1-100 ppm 並溶於適當的溶劑當中。樣品以 RIPA 收集細胞蛋白質後，加入等量的 ACN，vortex 2 分鐘後在冰上靜置 15 分鐘，離心 6,000 rpm、10 分鐘，取上清液以 Speed Vac 抽乾 ACN，上機前以 0.22 μm, 13 mm PVDF 過濾膜 (filter, millipore) 過濾液體，再進行電泳。上機的體積至少需 40 μl。

## 二十、質譜樣品的製備 (Sample preparation for MS spectrometry) 與液態層析耦合串聯式質譜儀分析 (LC-MS/MS analysis)

#### ☀ 原位膠體酵素消化反應 (In-gel digestion)：

以解剖刀切下含有目標蛋白的膠體 (Coomassie blue 染色) 置於 1.5 ml 的 eppendorf tube 中，加入 500 μl 0.2 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>/50% ACN 於 37°C、150 rpm 搖晃 1 小時以進行退染，直到膠體變為透明，再加入 100 μl 100% ACN 以進行脫水至膠體變白，再以 Speed Vac 將之抽乾。而後加入酵素緩衝液 (50 mM NH<sub>4</sub>HPO<sub>3</sub>, pH8.0) 與酵素 (Asp-N, E/S=1/10, Roche)，在冰上作用 1 小時使膠體進行復水 (re-hydration)，再重新加入酵素緩衝液於 37°C、150rpm 反應 16-18 小時。

#### ☀ 萃取胜肽片段 (Peptide extraction)：

吸出酵素緩衝液後，加入 100 μl 1% TFA 於冰上超音波震盪 (sonication) 30 分

鐘，取出萃取液至新的 eppendorf tube，再加入 100  $\mu$ l 0.1% TFA/60%ACN 於冰上超音波震盪 30 分鐘，取出萃取液，而後利用 Speed Vac 將之抽乾(約需 2 小時)，以 buffer A 回溶後，可進行質譜分析。

☀ **LC/MS/MS 結果數據分析：**

利用 Mascot 軟體分析蛋白質的序列及身分鑑定。



## 第肆章、結果

### 一、找尋 BCL10 受 MALT1 誘導切割位置

過去在我們實驗室的研究中已發現 BCL10 可受 MALT1 誘導切割，並進一步在 C 端做一連續的 deletion constructs，猜測切點疑似為第 225 個胺基酸 Leucine 的 C 端 (附圖七)，但 Rebeaud 等人卻認為是第 228 個胺基酸 Arginine (Rebeaud *et al.*, 2008)，因此，我們欲以質譜儀的技術去分析切割後的胺基酸序列以釐清切點，所需的量理想值至少需 1-15 pmol (40-400 ng)。蛋白質的來源有二：第一為受到 TPA/Ionomycin 刺激的 Jurkat T 細胞，內生性被切割的 BCL10；第二為在 293T 細胞大量表現 FlagBCL10 GFP 與 MALT1 的狀況下，FlagBCL10 GFP 受到切割後的產物。

#### A. 純化內生性被切割的 BCL10

過去我們已知利用 TPA/Ionomycin 刺激 Jurkat T 細胞，約 60 分鐘後可見內生性的 BCL10 會受到 MALT1 的切割 (附圖八)。我們欲分析的部分是受到切割的 BCL10，因此以受到刺激 2-3 小時後的 Jurkat T 細胞其 BCL10 以進行純化。為了得到純化的 BCL10，使用 DSS cross-linker 去鍵結 BCL10 抗體 (Santa Cruz, 331.3) 與 protein G，避免抗體與蛋白質一同被 elute 出來。每次以  $2-4 \times 10^8$  細胞數進行純化，操作時以一般的免疫沉澱做為正控制組，結果顯示必須進行免疫沉澱與去磷酸酶的作用，才可在細胞中偵測受到刺激後被切割的 BCL10 訊號 (圖三 A)。此外亦沒有在自行製作的純化管柱中 elution 的部分偵測到抗體的存在 (圖三 A)。我們以細菌表現的 BCL10-His 定量蛋白質的回收量，結果顯示純化內生性受切割的蛋白質，每  $2-4 \times 10^8$  細胞數其 BCL10 回收量約為 5-10 ng (圖三 B)。

#### B. 純化在 293T 細胞大量表現 FlagBCL10 GFP 與 MALT1 的狀況下，受到切割後的產物

由於純化內生性被切割的蛋白質效率不高，因此我們欲以在細胞大量表現 BCL10 與 MALT1 的狀況下進行純化。我們可以發現在共同轉染 BCL10 與 MALT1、BCL10 GFP 與 MALT1、FlagBCL10 GFP 與 MALT1 三種狀況下，進行免疫沉澱並佐以去磷酸酶處理，可以偵測到 BCL10 被切割的訊號 (圖四)。但我們無法在共同表現 FlagBCL10 與 MALT1 的狀況下，將切割後的 FlagBCL10 與 FlagBCL10 在 SDS-PAGE 上進行分離 (圖四)。因此我們以在細胞表現 FlagBCL10 GFP 與 MALT1 的系統下，以 FLAG 親和性凝膠(Sigma)進行蛋白質的純化，elution 部分使用 pH=3.5 的緩衝液，使用 2 次的 elution 及在清洗凝膠後再 elute 1 次，皆是為了確保 BCL10 可以完全被 elute，以便下一次可以達到最佳的結合量。由於被切割的產物具有磷酸化修飾，必須處理去磷酸酶以避免造成質譜儀分析的困擾，我們以細菌表現的 BCL10-His 定量蛋白質的回收量，結果顯示每 10  $\mu$ l 的凝膠，加入  $1 \times 10^7$  細胞數(約 5 mg) 約可回收 50 ng 被切割的 BCL10 (圖五)。處理的緩衝液 NEB buffer No.3 因含有 DTT 會減弱 BCL10 與 FLAG 親和凝膠的鍵結，因此在處理去磷酸酶的狀況下會有少量的喪失 (圖五)。

### C. 以 LC-MS/MS 分析被切割的 BCL10 片段

在分析純化切割形式的 BCL10 以前，我們使用在細菌表現的 BCL10-His、BCL10 1-225、BCL10 1-228 蛋白質作為正控制組 (圖六 A)，其中先取約 1.5  $\mu$ g 的 truncated BCL10 1-228 蛋白質進行一維電泳，再以內切酶 Asp-N 進行 in-gel digestion。Asp-N 可以特異性切割在 Aspartate 的 N 端，切割下來的片段再以 LC-MS/MS 的方法去分析。先以 ExPASy proteiomic server 預測可能出現的片段，我們欲得到的序列為從第 206 個胺基酸至第 228 個胺基酸，分子量約為 2625.2 daltons (圖六 B)。結果發現使用 Asp-N 所切出的肽段集中在 BCL10 的 N 端 (圖六 C)，我們期待看到的肽段偵測不到。使用 Asp-N 的原因在於肽段介於 800-4000 daltons，其序列較能夠被分析，在我們所認為的切點 (第 206 個胺基酸至第 225 個胺基酸:2225.9

daltons)或是 Rebeaud 等人認定的切點及未切割 BCL10 (3196.5 daltons)，皆可準確分析分子量以斷定切點的位置。

#### D. 以毛細管電泳分析 BCL10 被切割後 C 端的小段胜肽

毛細管電泳可以根據蛋白質或是胜肽的分子量與帶電性的不同，進行蛋白質或是胜肽的快速分離。因此我們有興趣利用此種方法去分析此段胜肽以釐清切割點。首先以合成的標準品胜肽 RSRTVSRQ 與 TVSRQ 進行毛細管電泳分析，其差距達 4 分鐘，可以有效辨別 2 種胜肽 (圖七 A)。然而毛細管電泳的靈敏度僅為 5 ppm (5 ng/μl)(圖七 B)，換算成上機所需最小的總量約為 350 ng，應用於我們的細胞實驗其靈敏度顯然太低。此外，我們欲以 C18 管柱進行濃縮胜肽的試驗，結果顯示 C18 管柱無法結合胜肽 (圖七 C)，多在 flow-through 偵測到胜肽的訊號，分析 C 端被切割後的胜肽片段，顯示 RSRTVSRQ 及 TVSRQ 其疏水性胺基酸所佔比例甚低，代表其親水性較高，且 pI 值高於 9，因此無法藉由這樣的方式純化。

#### E. BCL10 Leucine225 與 BCL10 Arginine228 對於切割是重要的

在 BCL10 GFP 上進行單點突變，結果發現將第 225 個胺基酸 Leucine 與第 228 個胺基酸 Arginine 分別置換成 Aspartate 與 Glycine 時，切割的現象皆不復見。若將第 226 個胺基酸置換成 Glycine，切割的程度下降且磷酸化的現象不同於 wt (圖八)。由於 BCL10 與 GFP 的分子量皆約為 26 kD，因此為了排除結構上對於 MALT1 切割的影響，我們直接在 BCL10 上針對可疑的切割點均進行單點突變 (圖一)，得到 pRcCMV-BCL10 R228G，且利用 degenerate primer 設計 BCL10L225 的 mutants 得到 pRcCMV-BCL10L225A、pRcCMV-BCL10 L225G、pRcCMV-BCL10 L225Q、pRcCMV-BCL10 L225K、pRcCMV-BCL10 L225R 與 pRcCMV-BCL10 L225E，並將這些質體與 MALT1 共同表現在 293T 細胞，進行免疫沉澱試驗與去磷酸酵素的作用，結果發現除了 BCL10 L225K 與 BCL10 L225R 之外，在這 2 個胺基酸所進行的變異皆不能被 MALT1 切割 (圖九)，顯示 Leu225 與 Arg228 對於切割現象是重

要的。有趣的是，共同表現 BCL10 L225R,R228G 與 MALT1 於 293T 細胞，並進行免疫沉澱試驗與去磷酸酶的作用，發現這樣的蛋白質是可以被 MALT1 切割(圖十)，暗示我們在 BCL10 L225R 上所看到的切割現象其切點可能產生了變化。

#### **F. BCL10 Phenylalanine222 與 Leucine223 在 Leucine225 突變成 Arginine225 是重要的**

BCL10 L225K 與 BCL10 L225R 可以被切割的現象，根據 BCL10 末端的氨基酸序列(圖二)及我們原本的假設，疏水性胺基酸是較好的受質。我們猜測切點可能移至前面的疏水性胺基酸 Phe222 或 Leu223，因此以 BCL10 L225R 為骨架，在 Phe222 與 Leu223 進行突變，結果發現此 2 點其一置換成其他胺基酸，即不能被 MALT1 切割，但若將 Leu223 突變成 Thr223 仍舊可以被切割(圖十一)，顯示在 Leu225 突變成 Arg225，Phe222 與 Leu223 對於切割現象可能是重要的。

## **二、探討 BCL10 受到切割後 C 端胜肽扮演的角色**

### **A. FlagBCL10 GFP 受到切割後，可以偵測到被切割的訊號**

在共同表現 FlagBCL10 GFP 與 MALT1 的情形下，可以偵測到被切割後 C 端胜肽-GFP 的訊號(圖十二)，而且這樣的 C 端胜肽-GFP 的訊號在細胞中即使是轉染過後 72 小時仍舊是相當穩定，但受到磷酸化被切割的 BCL10 量有減少的趨勢，暗示胜肽可能因為接上 GFP 訊號相當穩定，亦或是代表了這段胜肽在細胞可能是具有功能的。

### **B. BCL10 被切割後的胜肽，均勻分布在細胞之中**

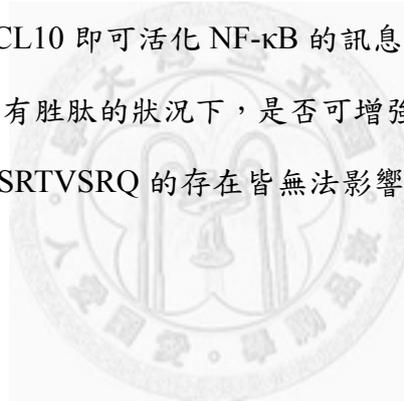
Guilet 在 2000 年首先指出在細胞中大量表現 BCL10 的狀況下會出現絲狀的構造，若將 BCL10 上的 CARD domain 高度保留性的胺基酸變異，則絲狀構造消失且失去活化 NF- $\kappa$ B 的能力。利用此種絲狀構造及 BCL10 可以依其 CARD domain 進行 oligomerization 的特性，我們在 293T 細胞共同表現 GFPBCL10、BCL10RFP

與 MALT1 期待看出有不同的形式 (圖十三 A)，若 BCL10RFP 有被切割，應該可以看到有紅色的單獨螢光出現。然而，在有無 MALT1 的情形下於共軛焦顯微鏡下觀察螢光，其樣子仍舊呈現絲狀或點狀構造，並無單色螢光出現 (圖十三 B)。

為了確定被切割後的 C 端胜肽位置是否具有特異性，我們在 GFP 的後端接上胜肽得到 GFP-RSRTVSRQ，並利用轉染的方式送入 293T 細胞，結果顯示 GFP-RSRTVSRQ 的螢光表現為均質型 (diffuse)，與 GFP 表現的螢光相同，加入 MALT1 並不影響均質型的螢光表現，但會穩定螢光的表現(圖十四 A)。

### C. BCL10 被切割後的胜肽不影響 NF- $\kappa$ B 的活性

我們在細胞中單獨轉染 GFP-RSRTVSRQ 與 GFP 皆無法活化 NF- $\kappa$ B (圖十四 B)。過去已知單獨表現 BCL10 即可活化 NF- $\kappa$ B 的訊息傳導路徑 (Schaefer *et al.*, 2004)。因此我們想知道在有胜肽的狀況下，是否可增強或是減弱 NF- $\kappa$ B 活化的能力，結果顯示有無 GFP-RSRTVSRQ 的存在皆無法影響 NF- $\kappa$ B 的活性(圖十四 B)。



## 第五章、討論

### 一、找尋 BCL10 受 MALT1 誘導切割位置

#### A. 純化內生性被切割的 BCL10

我們已知在利用 TPA/Ionomycin 刺激 Jurkat T 細胞與在 293T 細胞共同表現 BCL10 與 MALT1 的狀況下，可以觀察到 BCL10 被切割，因此對此 2 種來源的蛋白質皆進行純化。然而在使用 DSS cross-linker 鍵結 BCL10 抗體與 protein G 的管柱欲純化內生性被切割的 BCL10，其抓住 BCL10 的能力不佳 (圖三)，遠低於預測的結合量 ( $2 \times 26.2 / 150 \times 80 = 27 \mu\text{g}$ )，猜測可能是進行 DSS 的鍵結時，DSS 沒有 elute 乾淨(利用酸性環境，pH=2.8)，導致而後加入的 BCL10 與抗體也產生了鍵結，促使結合能力下降。

#### B. 純化在 293T 細胞大量表現 FlagBCL10 GFP 與 MALT1 的狀況下，受到切割後的產物 FlagBCL10

在共同表現 FlagBCL10 GFP 與 MALT1 進行免疫沉澱並處理去磷酸酵素的狀況下，不論是利用 BCL10 或是 Flag 抗體進行西方墨點分析，皆可發現有 2 個較小的片段(圖四 B 右圖)，其中一為切割後的片段，另 1 個片段是否暗示了有其他的切點亦或是受到了其他的後修飾作用呢？然而其他的質體表現例如 BCL10 與 BCL10 GFP 並沒有觀察到多於切割形式 BCL10 的片段(圖四 B)，因此這部分可能須以質譜儀的方式去分析多出的片段代表了什麼意義，是否與 MALT1 切割其受質的結構有關，則仍需待進一步研究。

#### C. 以 LC-MS/MS 分析被切割的 BCL10 片段

根據 Rebeaud 等人在 2008 年的研究指出 BCL10 可受 MALT1 切割，他們利用在 BCL10 的 Arg228 上進行點突變與 MALDI-TOF MS 的方法鑑定出 Arginine 是較好的切割位。然而這與我們實驗室過去研究認定疏水性胺基酸是較好的切割受

質有所出入，因此我們下一步是利用 LC-MS/MS 的方式去分析確切的切割位來釐清切點。可惜的是，我們所利用的酵素 Asp-N 無法觀察到 C 端的胜肽 (圖六)，即使將蛋白質的量提高亦無法偵測到(data not shown)。利用內切酶與質譜儀的技術去分析胺基酸的序列，必須考量內切酶並不能切出所有預測的序列，這與蛋白質的結構具有關聯，根據 Keil rule，若 trypsin 的切割受質 Arg 與 Lys 的 C 端具有 proline，則切割現象不會發生 (Keil, 1992)，顯示內切酶並不喜歡切在有 proline 序列附近，且 proline 由於具有較為特殊的環狀構造，不易提供質子 (protonation) 較不會被打成片段 (fragmentation) 以分析序列，對照 BCL10 的序列與欲看到的片段，第 204 與第 205 個胺基酸均為 proline，Asp-N 可能不會切在第 206 個胺基酸的 N 端，因此我們無法偵測到欲觀察到的片段。而使用與 Rebeaud 等人相同的酵素 Glu-C (特异性切割在 glutamate 的 C 端) 去分析蛋白質，目前仍無法得到與他們相同的結果 (data not shown)，可能是尚無法得到最佳的酵素反應條件所致。為了解決這個問題，除了繼續找尋最佳的條件之外，有鑑於切割點位於 BCL10 的 C 端，我們可以在 C 端加上 tag 進行大量純化，並利用 N 端序列鑑定 (N terminal sequencing) 的方法以鑑定其序列。

#### D. 以毛細管電泳分析被切割的 BCL10 片段

在毛細管的實驗當中，我們欲分析被切割下來的片段以鑑定切點，但由於其靈敏度僅為 5 ppm (圖七 B)，考量到樣品的處理過程與試驗的重複性，在 293T 細胞共同轉染 BCL10 與 MALT1 的狀況下，必須收集超過 50 盤 10-cm 盤子的細胞，才有可能達到 350 ng 的被切割胜肽，因此這方法並不是相當適用胜肽來源源自於細胞。此外我們無法得知這樣具有高 pI 的胜肽在細胞是否穩定存在，且位於什麼樣的位置都是個未知數，即使能夠在共同表現 BCL10GFP 與 MALT1 的狀況下偵測到 C 端胜肽-GFP 的訊號 (圖八 A)，但這樣的訊號很有可能是因為 GFP 本身的穩定表現所造成，因此選擇適合的溶液去萃取這段胜肽是需要被考量的。雖然無法

以 C18 管柱去濃縮 C 端胜肽，但根據胜肽高度帶有正電的特性，可以利用陽離子交換樹脂來達到這個目的。

#### E. BCL10Phe222、Leu223、Leu225、Arg228 與切割位置的關係

在目前無法使用質譜儀的方式找尋出切點之外，我們利用在 BCL10 或是 BCL10 GFP 上進行點突變的實驗皆得到 Leu225 與 Arg228 對於切割作用的產生是必須的 (圖八、圖九)，然而我們實驗室與 Rebeaud 等人都是參考比對 caspase 與 metacaspase 的序列去猜測切割點可能帶有的電性，再對可疑的胺基酸進行突變的實驗得到的結果，差別僅在於我們缺乏質譜儀的數據應證我們的論點，但即使對 BCL10 C 端進行再多的突變，結構上的變化是需要考量的。即便如此，我們發現 Leu225 突變成鹼性胺基酸 Arg 與 Lys，切割現象可再度出現，相對的在 BCL10 GFP 將 Arg226 突變成 Gly 則切割現象相對減弱 (圖八、圖九)，這可能暗示含正電胺基酸的環境對於切割作用的產生是重要的。此外在保留 Leu225 突變成 Arg 的狀況下，對 Arg228 進行突變 (BCL10 L225R,R228G)，卻發現切割現象仍舊存在 (圖十)，同樣在保留 Leu225 突變成 Arg 的狀況下，同時突變 BCL10 Phe 222 與 BCL10Leu 223，除了 BCL10 F222A,L223T,L225R (FL-4)，皆不能看到 BCL10 被切割 (圖十一)。根據這樣的結果，與實驗室之前的研究顯示(附圖七)，即使刪除掉第 224 個胺基酸之前(包含)的疏水性胺基酸，仍舊具有切割現象，顯示在表現 FL-4 蛋白質所看到的切割現象必定產生了改變。因此推論出 Leu225 突變成 Arg 或是 Lys 時因為前面仍舊有疏水性胺基酸故仍有切割能力，根據過去對蛋白酶切割受質的機制我們提出下列 2 種可能的狀況，第一種為切割受質為正電性胺基酸，但疏水性的環境是重要的，切割位是突變成 Arg 的第 225 個胺基酸；第二種為切割受質為疏水性胺基酸，受質附近帶有的正電性環境胺基酸是重要的，切割位為第 223 個胺基酸 Leu。然而 Leu 與 Thr 2 種胺基酸就結構而言並不類似，為何出現此種狀

況仍舊不得而知。將這部分的結果與實驗室之前對於切割點的研究發現 BCL10 GFP 刪除 C 端序列實驗(附圖七), Leu225 的存在與否, 決定是否會引起切割現象。

酵素與受質之間的關係可以 S(酵素)及 P(受質)表示, 從 P1 的 N 端標為 P2, P3, ..., C 端則為 P1', P2', ...以此類推, 相對應的即為 S。一般而言, 酵素對其受質的特異性取決於酵素的 pocket (S1), 其相對應的 P1 即為受質, 但 S2, S3, ...或是 S1', S2' 的氨基酸組成亦會影響其切割受質的能力。以 caspase 為例, 其 S1 上為鹼性胺基酸, P1 則為酸性胺基酸, 不過在 S2-S4 的胺基酸卻會影響切割是否可以產生, 而改變受質的特異性 (P2-P4) (Denault and Salvesen, 2001; Fuentes-Prior and Salvesen, 2004)。而 Uren 等人與 Snipas 等人分別在 2000 與 2004 年提出 paracaspase 其受質 P1 為疏水性胺基酸, Rebeaud 等人與 Coornaert 等人則鑑定為是鹼性胺基酸, 因此在本篇論文中所探討的 BCL10 確切的切割點, 我們在各種 mutants 觀察到的切割現象產生與否, 必須一併考量切點附近的序列, 因此在上述討論中才會提出了 2 種說法, 若以 caspase 與 paracaspase 的高度相似性, 較為支持第一種說法, 切割受質為正電性胺基酸, 但疏水性環境是重要的。

至目前為止被報導為 MALT1 的受質僅有 BCL10 及 A20 (Coornaert *et al.*, 2008), A20 是利用在胺基酸進行突變得到切割點為正電性胺基酸, 但其序列前端亦有疏水性胺基酸 Leu, 為了釐清這樣的現象除了使用質譜儀的方式確認之外, 找出 MALT1 喜好的切割位特異性需要的, 近來我們實驗室也成功建立 *in vitro* system 可以去分析受質的特異性, 藉此可以找出其他的受質, 因為 MALT1 的酵素活化位失去活性後, NF- $\kappa$ B 訊息傳導路徑會受到抑制, 但 BCL10 與 A20 切割與否並不影響此條路徑, 顯示仍舊有別的受質可受 MALT1 切割去影響 NF- $\kappa$ B 的活性 (Rebeaud *et al.*, 2008; Coornaert *et al.*, 2008), 藉此研究其受質的特異性, 可以做為未來藥物研發的依據。

## 二、探討 BCL10 受到切割後所扮演的角色

## A. BCL10 被切割後的胜肽，均勻分布在細胞之中

為了了解 BCL10 受到切割後所扮演的角色，我們首先想知道 C 端胜肽是否有任何的細胞位置特異性，由於具許多 Arg 的胺基酸 (RSRTVSRQ)，因此我們將合成的胜肽 (RSRTVSRQ-FITC 及 TVSRQ-FITC) 直接加入培養液中，可惜的是無法觀察到任何螢光 (data not shown)，可能由於其 Arg 的重複性及數目並不夠先前報導已知的 Arg- penetrating peptides 這種可以直接穿透細胞膜的胜肽序列，而後我們嘗試利用各種轉染細胞的方式將這段胜肽送入細胞 (例如：磷酸鈣沉澱、Lipofectamine、電穿孔法等) 仍舊無法成功 (data not shown)。因此，利用 BCL10 可利用其 CARD domain 與其他 CARD-containing 蛋白質結合，與在細胞大量表現時所形成的絲狀構造 2 種特性，在細胞中共同表現 BCL10RFP、GFPBCL10 與 MALT1，期待看出不一樣的型態，然而，或許是 MALT1 切割 BCL10 的能力效率不高所致，因此無法在顯微鏡下觀察到不同的型態 (圖十三)。即使能夠在西方墨點法偵測到 C 端胜肽-GFP 的訊號 (圖十二)，也有可能是因為 GFP 的穩定表現所致。有趣的是，當我們在細胞中表現 GFP-RSRTVSRQ 這樣的蛋白時，呈現的型態是擴散型 (圖十四 A)，與 GFP 相同，那麼為何無法在共同表現 BCL10RFP、GFPBCL10 與 MALT1 的細胞中發現相同的情形呢？是否因為 GFP-RSRTVSRQ 表現量太高遮蔽了他真正的細胞位置，則有待驗證。

## B. BCL10 被切割後的胜肽不影響 NF- $\kappa$ B 的活性

由於在 BCL10<sup>-/-</sup>細胞中，T 細胞與 B 細胞經由抗原刺激所引起的 NF- $\kappa$ B 訊息傳導路徑會完全受到抑制，因此我們想知道 BCL10 的切割是否影響此條路徑，我們在 BCL10 1-225 與 BCL10 1-228 上皆沒有看到任何的影響 (附圖九)；在本篇研究中亦發現 GFP-RSRTVSRQ 並不影響 NF- $\kappa$ B 的活性 (圖十四 B)，但其實更好的方法是直接送入胜肽再觀察細胞的變化，藉此避免 GFP 可能造成的影響；然而，目前仍無法找到 1 個適合送入細胞的方法可以去分析其可能扮演的角色。

### C. BCL10 受到切割後所扮演的角色

由於切割現象晚於 NF- $\kappa$ B 的訊息傳導，因此其切割現象所影響的部分可能是晚期 T 細胞的表現，而 Rebeaud 等人在 2008 年更進一步指出 BCL10 受到切割主要是影響免疫細胞的附著作用(adhesion)，附著的重要性在於 T 細胞可藉由其表現的  $\beta$ 1-integrin (主要是  $\alpha$ <sub>4</sub> $\beta$ <sub>1</sub> 與  $\alpha$ <sub>5</sub> $\beta$ <sub>1</sub>) 與 fibronectin 及 VCAM-1 進行附著，對於 T 細胞的移行與穩定 T 細胞與抗原呈現細胞(APC)之間所形成的免疫突觸 (immune synapse) 相當重要，而過去對於在 T 細胞受到活化後與 integrin 的活化已知是與 GTPase 相關，GTPase Rap1 能夠藉由穩定 integrin 的活化結構來增強 integrin 與其他分子的附著能力(Bertoni *et al.*, 2002; Cantrell *et al.*, 2002)，若缺乏 Rap1，則附著能力消失；近期發現 ADAP (Adhesion and degranulation-promoting adapter protein) 可以去調控 T 細胞的活化與附著反應，且在 T 細胞中可以與 CARMA1 結合進而調控 CBM (CARMA1-BCL10-MALT1) 複合體的形成，影響 NF- $\kappa$ B 訊息傳遞路徑 (Medeiros *et al.*, 2007)，然而，ADAP 去調控 T 細胞的活化與附著反應是可以分開的，CBM complex 不形成並不影響 integrin 的訊息傳遞路徑，而在 Medeiros 等人的研究，主要探討的部分在突觸形成的部分 (conjugate formation)，是由  $\beta$ 2-integrin 所主導 (Brandon *et al.*, 2008)。那麼切割後的 BCL10 是如何對  $\beta$ 1- integrin 的訊息傳遞有所影響，仍舊不是相當清楚，有待進一步的研究；此外，除了淋巴球之外，單核球亦含有  $\beta$ 1-integrin 可移行至發炎組織進行附著，然而，就目前的研究得知，骨髓系細胞並不會受到 MALT1 切割，這是否代表在骨髓系細胞是由另 1 個蛋白質在執行增強附著能力這個動作就不得而知。

我們在實驗中針對於可能切點進行突變時，將 BCL10 Arg226 突變成 Gly、Leu225 突變成 Arg 及表現 BCL10 1-225，並且與 MALT1 共同表現時，發現其磷酸化的型態與 wt 並不相同 (圖八、圖九、附圖九)，這讓我們猜測 Arginine 是否具有後修飾作用導致磷酸化型態改變。過去的研究中有發現 histone 蛋白質的 Arg 可受到甲基化(methylation)，與 RNA processing、transport 及 chromatin remodeling 相

關 (Najbauer *et al.*, 1993)。隨著質譜儀技術的成熟發展，也發現了 non-histone 蛋白質的甲基化 (Ong *et al.*, 2004)。可以催化甲基化的酵素統稱為 PRMTs (protein arginine methyl transferases)，受質的特異性仍舊沒有定論，但多為 Glycine 與 Arginine 組成的序列，甲基化的蛋白質並不影響其本身的帶電性，但被認為與蛋白質之間的交互作用及訊息傳遞有密切關聯。近來已發現甲基化參與 T 細胞的 CD28 訊息傳遞路徑 (Blanchet *et al.*, 2005)、NFAT 與 STAT 轉錄因子的活化 (Mowen *et al.*, 2004 ; Weber *et al.*, 2009)、發炎反應等，若將 T 細胞的 PRMT 抑制，會有免疫抑制的現象出現。而在我們的實驗數據中顯示，BCL10L225R 切割能力相當於 wt，BCL10R226GGFP 切割能力下降，會不會是因為有無甲基化的後修飾造成 BCL10 與 MALT1 及其他激酶之間的結合能力受到影響，造成磷酸化不同與切割能力的強與弱呢，但 BCL10 C 端序列並沒有 RXG 序列 (除了我們所建構的質體 pRcCMV-BCL10 R228G)，若要明瞭並釐清這個問題，可能必須先去證明 BCL10 可以被甲基化再作日後的研究。

## 第陸章、參考文獻

- Akagi, T., Motegi, M., Tamura, A., Suzuki, R., Hosokawa, Y., Suzuki, H., Ota, H., Nakamura, S., Morishima, Y., Taniwaki, M., and Seto, M. (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.
- Baud, V., and Karin, M. (2009) Is NF- $\kappa$ B a good target for cancer therapy? Hopes and Pitfalls. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 33-40.
- Bertin, J., Guo, Y., Wang, L., Srinivasula, S.M., Jacobson, M.D., Poyet, J.L., Merriam, S., Du, M.Q., Dyer, M.J., Robison, K.E., DiStefano, P.S., and Alnemri, E.S. (2000) CARD9 is a novel caspase recruitment domain-containing protein that interacts with BCL10/CLAP and activates NF- $\kappa$  B. *J. Biol. Chem.* **275**, 41082-41086.
- Bertin, J., Wang, L., Guo, Y., Jacobson, M. D., Poyet, J. L., Srinivasula, S. M., Merriam, S., DiStefano, P. S. and Alnemri, E. S. (2001) CARD11 and CARD14 are novel caspase recruitment domain (CARD)/membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) family members that interact with BCL10 and activate NF- $\kappa$ B. *J. Biol. Chem.* **276**, 11877-11882.
- Bertoni, A., S. Tadokoro, K. Eto, N. Pampori, L.V. Parise, G.C. White, and S.J. Shattil. (2002) Relationships between Rap1b, affinity modulation of integrin  $\alpha$  IIb $\beta$ 3, and the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* **277**, 25715–25721.
- Blanchet, F., Cardona, A., Letimier, F.A. Hershfield, M.S. and Acuto, O. (2005) CD28 costimulatory signal induces protein arginine methylation in T cells. *J. Exp. Med.* **202**, 371-373.
- Blonska, M., Pappu, B., Matsumoto, R., Li, H., Su, B., Wang, D., and Lin, X. (2007) The CARMA1-Bcl10 signaling complex selectively regulates JNK2 kinase in the T cell receptor-signaling pathway. *Immunity* **26**, 55-66.
- Burbach, B.J., Srivastava, R., Medeiros, R.B., O’Gorman, W.E., Peterson, E.J., and Shimizu, Y. (2008) Distinct regulation of intergrin-depedent T cell conjugate formation and NF-B activation by the adapter protein ADAP. *J. Immunol.* **181**, 4840-4851.
- B. Keil. (1992) Specificity of Proteolysis. Springer-Verlag Berlin, Germany
- 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- $\kappa$ B 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- $\kappa$ B inhibitor A20. *Nat. Immunol.* **9**, 263-271.
- Denault, J. and Salvesen, G.S. (2001) Caspase. *Curr. Protoc. Protein Sci.* Chapter 21, unit 21.8
- Dong, W., Liu, Y., Peng, J., Chen, L., Zou, T., Xiao, H., Liu, Z., Li, W., Bu, Y., and Qi, Y. (2006) The IRAK-1-BCL10-MALT1-TRAF6-TAK1 cascade mediates signaling to NF- $\kappa$ B from Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* **281**, 26029-26040.
- Felicia, D. L., Nidhi, A J., Jeremy, S. R., Lara, M. K., Anuj, K. K., and Brian, C. S. (2008) Multiple protein domains mediate interaction between Bcl10 and Malt1. *J. Biol. Chem.* **283**, 32419-32431.
- Ferch, U., Kloo, B., Gewies, A., Pfander, V., Duwel, M., Peschel, C., Krappmann, D., and Ruland, J. (2009) Inhibition of MALT1 protease activity is selectively toxic for activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J. Exp. Med.* **206**, 2313-2320.
- Fuentes-Prior, P., and Salvesen, G.S. (2004) The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem. J.* **384**, 201-232.
- 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- $\kappa$ B activation. *FEBS Lett.* **496**, 121-127.
- Grabner, B.C., Blonska, M., Lin, P.C., You, Y., Wang, D., and Sun, J. (2007) CARMA3 deficiency abrogates G protein-coupled receptor-induced NF- $\kappa$ B activation. *Genes Dev.* **21**, 984-996.
- Gross, O., Gewies, A., Finger, K., Schafer, M., Sparwasser, T., Peschel, C., Forster, I., and Ruland, J. (2006) CARD9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* **442**, 651-656.
- Gross, O., Grupp, C., Steinberg, C., Zimmermann, S., Strasser, D., Hanneschlagger, N., Reindl, W., Jonsson, H., Huo, H.R., Littman, D.R., Peschel, C., Yokoyama, W.M., Krug, A., and Ruland, J. (2008) Multiple ITAM-coupled NK-cell receptors engage the Bcl10/Malt1 complex via Carma1 for NF- $\kappa$ B and MAPK activation to selectively control cytokine production. *Blood* **112**, 2421-2428.

- Hailfinger, S., Reveaud, F., and Thome, M. (2009) Adaptor and enzyme functions of protease in T-cell activation. *Immunol. Rev.* **232**, 334-347.
- Hailfinger, S., Lenz, G., Ngo, V., Posvitz-Fejfar, A., Reveaud, F., Guzzardi, M., Penas, E.M., Dierlamm, J., Chan, W.C., Staudt, L.M., and Thome, M. (2009) Essential role of MALT1 protease activity in activated B cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 19946-19951.
- Hara, H., Ishihara, C., Takeuchi, A., Imanishi, T., Xue, L., Morris, S.W., Inui, M., Takai, T., Shibuya, A., Saijo, S., Iwakura, Y., Ohno, N., Haruhiko, K., Hiroki, Y., Penninger, J.M., and Saito, T. (2007) The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **8** 619-629.
- Hara, H. and Saito, T. (2009) CARD9 versus CARMA1 in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* **30**, 234-242.
- Hu, S., Du, M.Q., Park, S.M., Alcivar, A., Qu, L., Gupta, S. Tang, J., Baens, M., Ye, H., Lee, T.H., Marynen, P., Riley, J.L., and Yang, X. (2006) cIAP2 is a ubiquitin protein ligase for BCL10 and is dysregulated in mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *J. Clin. Invest.* **116**, 174-181
- Isakov, N. (1998) Role of immunoreceptor tyrosine-based activation motif in signal transduction from antigen and Fc receptors. *Adv. Immunol.* **69**, 183-247.
- Ishiguro, K., Ando, T., Goto, H., and Xavier, R. (2007) BCL10 is phosphorylated on Ser138 by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *Mol. Immunol.* **44**, 2095-2100.
- Kane, L.P., Lin, J., and Weiss, A. (2000) Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 242-249.
- Kawadler H., Gantz MA., Riley JL., and Xiaolu Y. (2008) The paracaspase MALT1 controls caspase-8 activation during lymphocyte proliferation. *Cell* **31**, 415-421.
- Klemm, S., Zimmermann, S., Peschel, C., Mak, T.W., and Ruland, J. (2007) BCL10 and MALT1 control lysophosphatidic acid-induced NF- $\kappa$ B activation and cytokine production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 134-138.
- Langel, F.D., Jain, N.A., Rossman, J.S., Kingeter, L.M., Kashyap, A.K. and Schaefer, B.C. (2008) Multiple protein domains mediate interaction between BCL10 and MALT1. *J. Biol. Chem.* **283**, 32419-32431.

- Lobry, C., Lopez, T., Israel, A., and Weil, R. (2007) Negative feedback loop in T cell activation through I $\kappa$ B kinase-induced phosphorylation and degradation of BCL10. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 908-913.
- Liu, Y., Dong, W., Chen, L., Xiang, R., Xiao, H., De, G., Wang, Z., and Qi, Y. (2004) BCL10 mediates lipopolysaccharide/toll-like receptor-4 signaling through interaction with Pellino2. *J. Biol. Chem.* **279**, 37436-37444.
- Malarkannan, S., Regunathan, J., Chu, H., Kutlesa, S., Chen, Y., Zeng, H., Wen, R., and Wang, D. (2007) BCL10 plays a divergent role in NK cell-mediated cytotoxicity and cytokine generation. *J. Immunol.* **179**, 3752-3762.
- Matsumoto, R., Wang, D., Blonska, M., Li, H., Kobayashi, M., Pappu, B., Chen, Y., Wang, D., and Lin, X. (2005) Phosphorylation of CARMA1 plays a critical role in T cell receptor-mediated NF- $\kappa$ B activation. *Immunity* **23**, 575-585.
- Medeiros, R. B., Burbach, B. J., Mueller, K. L., Srivastava, R., Moon, J. J., Highfill, S. E., Peterson, J. and Shimizu, Y. (2007) Regulation of NF- $\kappa$ B activation in T cells via association of the adapter proteins ADAP and CARMA1. *Science* **316**, 754-758.
- Misra, R.S., Russell, J.Q., Koenig, A., Hindhaw-Makepeace, J.A., Wen, R., Wang, D., Huo, H., Littman, D.R., Ferch, U., Ruland, J., Thome, M., and Budd, R.C. (2007) Caspase-8 and c-FLIPL associate in lipid rafts with NF- $\kappa$ B adaptors during T cell activation. *J. Biol. Chem.* **282**, 19365-19374.
- Mowen, K.A., Schurter, B.T., Fathman, J.W., David, M and Glimcher, L.H. (2004) Arginine methylation NIP45 modulates cytokine gene expression in effector T lymphocytes. *Cell* **15**, 559-571.
- Najbauer, J., Johnson, B., Young, A., and Aswad, D. (1993) Peptides with sequence similar to glycine, arginine-rich motifs in proteins interacting with RNA are efficiently recognized by methyltransferase(s) modifying arginine in numerous proteins. *J. Biol. Chem.* **269**, 10501-10509.
- Noels, H., Loo, G., Hagens, S. Broeckx, V., Beyaert, R., Marynen, P., and Baens, M. (2007) A novel TRAF6 binding site in MALT1 defines distinct mechanisms of NF- $\kappa$ B activation by API2-MALT1 fusions. *J. Biol. Chem.* **282**, 10180-10189.
- Oeckinghaus, A., Wegener, E., Welteke, V., Ferch, U., Arslan, S.C., Ruland, J., Scheidereit, C., and Krappmann, D. (2007) Malt1 ubiquitination triggers NF- $\kappa$ B signaling upon T-cell activation. *EMBO J.* **26**, 4634-4645.
- Ong, S.E., Mittler, G. and Mann, M. (2004) Identifying and quantifying in vivo

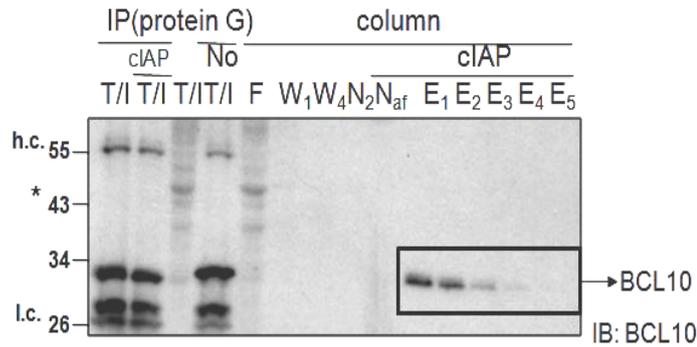
- methylation sites by heavy methyl SILAC. *Nat. Methods* **1**, 119-126.
- Parry, R.V., and Ward, S.G. (2010) Protein arginine methylase: a new handle on T lymphocytes? *Trends Immunol.* **31**, 164-169.
- Rawlings, D.J., Sommer, K., and Moreno-Garcia, M.E. (2006) The CARMA1 signalosome links the signaling 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., Fasel, N., and Thome, M. (2008) The proteolytic activity of the paracaspase MALT1 is key in T cell activation. *Nat. Immunol.* **9**, 272-281.
- Rueda, D., Gaide, O., Ho, L., Gewkowicz, E., Niedergang, F., Hailfinger, S., Reveaud, F., Guzzardi, M., Conne, B., Thelen, M., Delon, J., Ferch, U., Mak, T.W., Ruland, J., Schwaller, J., and Thome, M. (2007) Bcl10 controls TCR- and FcγR-induced actin polymerization. *J. Immunol.* **178**, 4373-4384.
- Ruefli-Brasse, A.A., French, D.M., and Dixit, V.M. (2003) Regulation of NF-κB-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., and Mak, T.W. (2001) BCL10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF-κB 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.
- Samelson, L.E. (2002) Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adaptor proteins. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 371-394.
- Scharschmidt, E., Wegener, E., Heissmeyer, V., Rao, A., and Krappmann D. (2004) Degradation of BCL10 induced by T-cell activation negatively regulates NF-κB signaling. *Mol. Cell Biol.* **24**, 3860-3873.
- Schaefer, B. C., Kappler, J.W., Kupfer, A., and Marrack, P. (2004) Complex and dynamic redistribution of NF-κB signaling intermediates in response to T cell receptor stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 1004-1009.
- Sixt, M., Bauer, M., Lammermann, T., and Fassler, R. (2006) β1-integrins: zip codes

- and signaling relay for blood cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 482-490.
- Snipas, S.J., Wildfang, E., Nazif, T., Christensen, L., Boatright, K.M., Bogyo, M., Stennicke, H.R. and Salvesen, G.S. (2004) Characteristics of the caspase-like catalytic domain of human paracaspase. *Biol. Chem.* **385**, 1093-1098.
- Sommer, K., Guo, B., Pomerantz, J.L., Bandaranayake, A.D., Moreno-García, M.E., Ovechkina, Y.L., and Rawlings, D.J. (2005) Phosphorylation of CARMA1 linker controls NF- $\kappa$ B activation. *Immunity* **23**, 561-574.
- Su, H., Bidere, N., Zheng, L., Cubre, A., Sakai, K., Dale, J., Salmena, L., Hakem, R., Straus, S., and Lenardo, M. (2005) Requirement for caspase-8 in NF- $\kappa$ B activation by antigen receptor. *Science* **307**, 1465–1468.
- 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. *Cell* **14**, 289-301.
- Sun, J., Lin, X. (2008) Aarrestin 2 is required for lysophosphatidic acid-induced NF- $\kappa$ B activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 17085-17090.
- Sun, W., and Yang, J. (2010) Molecular basis of lysophosphatidic acid-induced NF- $\kappa$ B activation. *Cell Signaling* [Epub ahead of print]
- Thome, M. (2008) Multifunctional roles for MALT1 in T cell activation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 495-500.
- 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. *Cell* **6**, 961-967.
- 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., and Bertin, J. (2001) 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.
- Wang, D., You, Y., Lin, P.C., Xue, L. Morris, S.W., Zeng, H., Wen, R., and Lin, X. (2007) Bcl10 plays a critical role in NF- $\kappa$ B activation induced by G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 145-150.
- Wang, P., Wu, X., Chen, W., Liu, J., and Wang, X. (2007) The lysophosphatidic acid

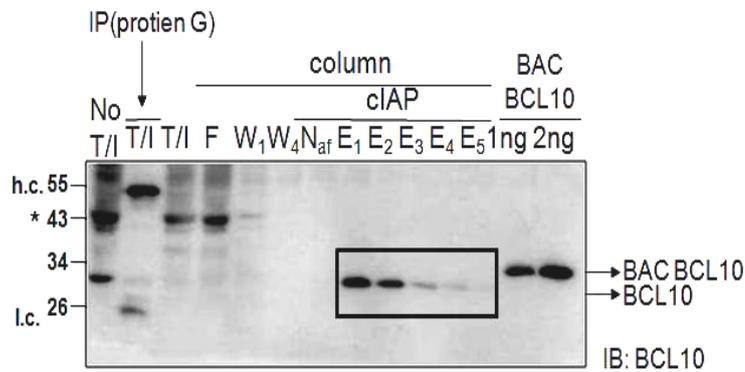
- (LPA) receptors their expression and significance in epithelial ovarian neoplasms. *Gynecol. Oncol.* **104**, 714-720.
- Weber, S., Maass, F., Schuemann, M., Krause, E., Suske, G. and Bauer, U.M. (2009) PRMT1-mediated arginine methylation of PIAS1 regulates STAT1 signaling. *Gene Dev.* **23**, 118-132.
- Wegener, E., and Krappmann, D. (2007) CARD-BCL10-MALT1 signalosomes: missing link to NF- $\kappa$ B. *Sci. STKE.* **384**, pe21
- Wegener, E., Oechinghaus, A., Papadopoulou, N., Lavitas, L., Schmidt-Supprian, M., Ferch, U., Mak, T.W., Ruland, J., Heissmeyer, V., and Krappmann, D. (2006) Essential role for I $\kappa$ B kinase beta in remodeling Carma1-Bcl10-Malt1 complexes upon T cell activation. *Cell* **23**, 13-23.
- Welteke, V., Eitelhuber, A., Düwel, M., Schweitzer, K., Naumann, M. and Krappmann, D. (2009) COP9 signalosome controls the Carma1-Bcl10-Malt1 complex upon T-cell stimulation. *EMBO report* **10**, 642-648.
- Wills, T. G., Jadayar, D.M., Du, M.Q., Peng, H., Perry, A. R., Abdul-Rauf, M., Price, H., Karran, L., Majekodunmi, O., Wlodarsda, I., Pan, L., Crook, T., Hamoudi, R., Isaacson, P.G., and Dyer, M. J. (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.
- Wu, C.J., and Ashwell, J.D. (2008) NEMO recognition of ubiquitinated Bcl10 is required for T cell receptor-mediated NF- $\kappa$ B activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 3023-3028.
- Zhang, Q., Siebert, R., Yan, M., Hinzmann, B., Cui, X., Xue, L., Rakestraw, K.M., Naeve, C.W., Beckmann, G., Weisenburger, D.D., Sanger, W.G., Nowotny, H., Vesely, M., Callet-Bauchu, E., Salles, G., Dixit, V.M., Rosenthal, A., Schlegelberger, B., and Morris, S.W. (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.



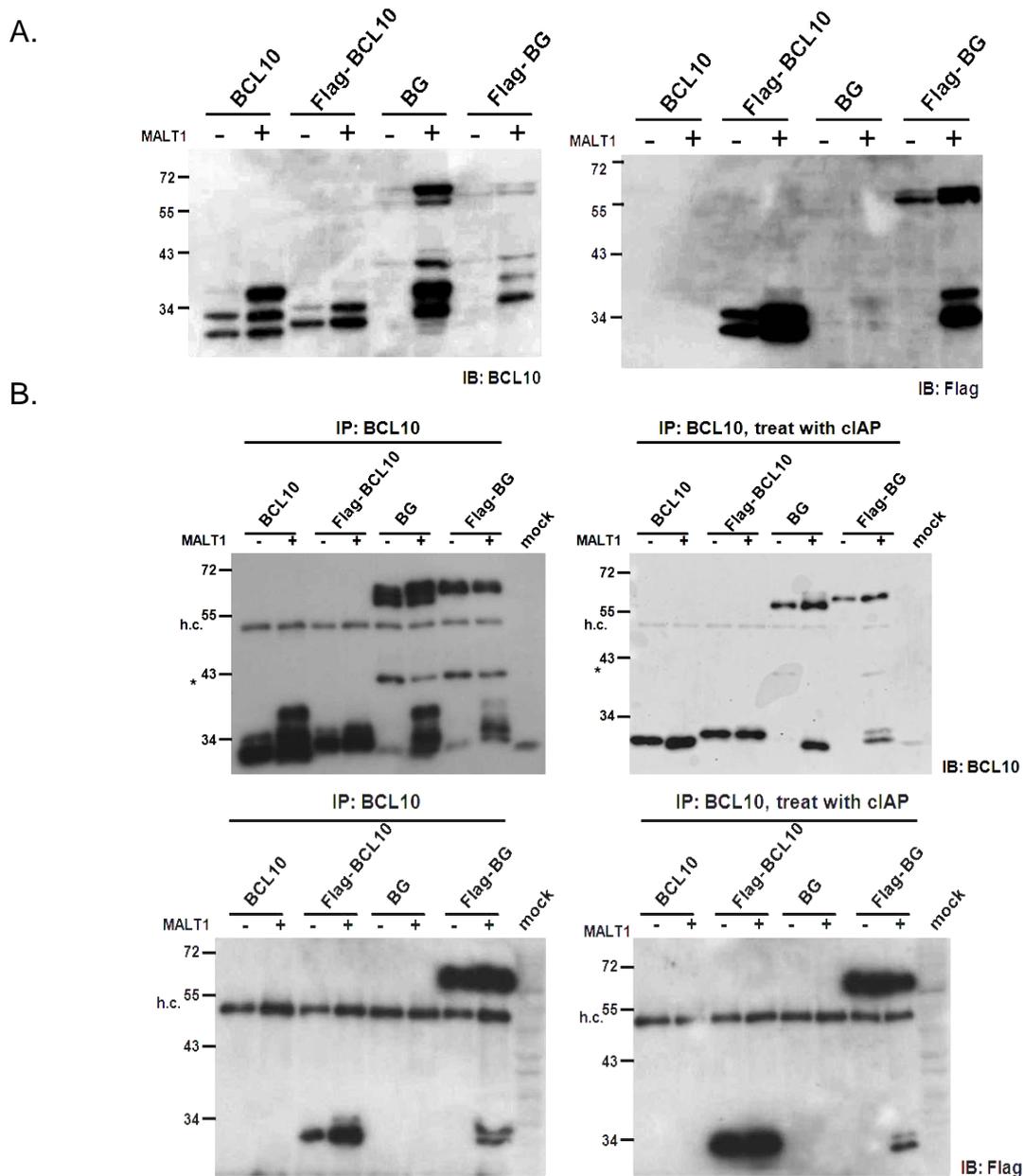
A.



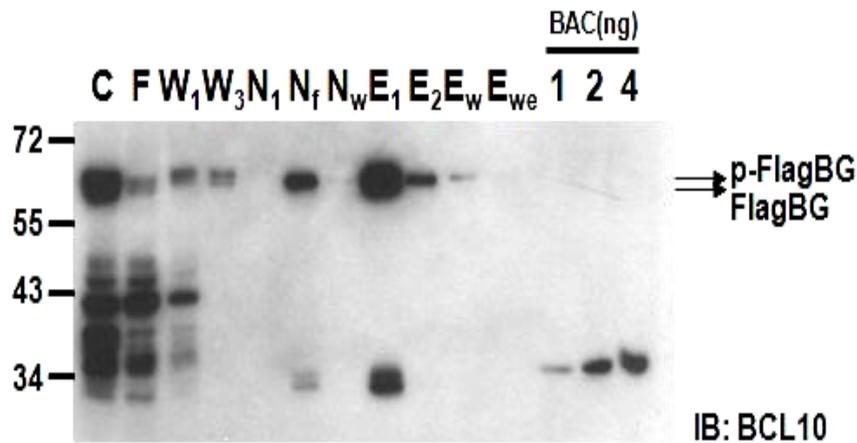
B.



圖三、以 Immobilized ProteinG (DSS-crosslinked) 管柱純化 TPA/Ionomycin 刺激 Jurkat T 細胞 2-3 小時的內生性 BCL10 蛋白質。 A.取處理過 TPA/Ionomycin Jurkat T 細胞  $2-4 \times 10^8$  進行純化後，以 wash buffer 清洗 4 次，NEB buffer No.3 清洗 2 次，cIAP 2  $\mu$ l 處理 2 小時，wash buffer 清洗 3 次，elution buffer elute 5 次，同時取 500 $\mu$ g 蛋白質加入 2  $\mu$ l BCL10 Abs 並以 protein G 進行免疫沉澱作為正控制組。 B.以細菌重組蛋白質 BCL10-His 估計 elution 部分(20/100)的濃度。結果顯示每次純化蛋白質約可回收 5-10 ng 的受切割內生性蛋白質，方框顯示純化蛋白質 BCL10 的位置。 No T/I: total lysate (un-stimulated Jurkat T 細胞)； T/I： total lysate (TPA/Ionomycin stimulated Jurkat T 細胞)； F： flow-through； W： wash buffer； E： elution buffer； N： NEB buffer No.3； N<sub>af</sub>：處理完 cIAP 後的 flow-through；數字代表清洗或是 elute 的次數； cIAP： calf intestinal alkaline phosphatase 去磷酸酶； column： Immobilized ProteinG 管柱 (DSS-crosslinked)； BAC： bacteria。 h.c.： heavy chain； l.c.： light chain。

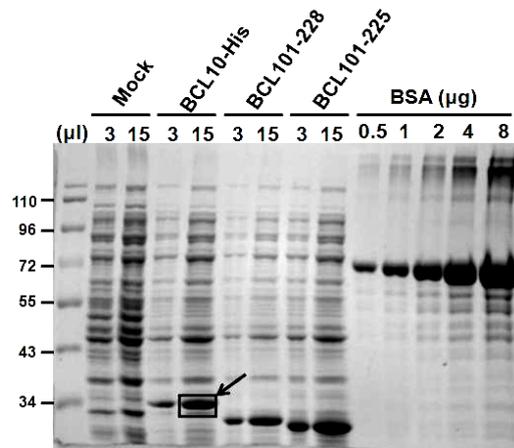


圖四、在 293T 細胞表現 BCL10、FlagBCL10、BCL10 GFP、FlagBCL10 GFP 與 MALT1 的情形。A.轉染 pRcCMV-BCL10、pRcCMV-FlagBCL10、pRcCMV-BCL10 GFP、pRcCMV-FlagBCL10 GFP (0.5  $\mu$ g) 與 MALT1 (4  $\mu$ g) 的表現質體至 293T 細胞，48 小時後收取蛋白質並以西方墨點法分析，使用 BCL10 與 Flag 一級抗體進行辨識。B.收取後的蛋白質以 BCL10 抗體進行免疫沉澱並處理去磷酸酶 2 小時，以西方墨點法分析結果。結果顯示當 FlagBCL10 與 MALT1 共同表現時，無法發現有被切割的 BCL10。h.c. : heavy-chain ; \* : non-specific band ; BG : BCL10 GFP ; cIAP: calf intestinal alkaline phosphatase。



圖五、以 FLAG 親和性凝膠純化在 293T 細胞大量表現的切割形式的 BCL10。在 293T 細胞轉染 0.5  $\mu\text{g}$  pCMV-FlagBCL10 GFP 與 4  $\mu\text{g}$  pRcCMV-MALT1-myc，48 小時後收取蛋白質，加入 10  $\mu\text{l}$  FLAG 親和性凝膠，16 小時後以 TBS 清洗 3 次，NEB No.3 buffer 清洗 2 次，cIAP 5  $\mu\text{l}$  處理 2 小時，TBS 清洗 3 次，elution buffer elute 2 次，並以細菌重組蛋白質 BCL10-His 估計 elution 部分的濃度(6/110)，結果以西方墨點法分析；FlagBCL10GFP 濃度約為 1  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ，切割形式的 FlagBCL10 濃度約為 0.5  $\text{ng}/\mu\text{l}$ 。C: total lysate；F：flow-through；W：wash buffer；N<sub>1</sub>：NEB buffer No.3 洗第一次；N<sub>f</sub>：處理完 cIAP 後的 flow-through；N<sub>w</sub>：處理完 cIAP 後清洗；E：elution buffer；E<sub>w</sub>：elution 之後的 wash；E<sub>w</sub>e：再進行一次 elution；cIAP：calf intestinal alkaline phosphatase；p-FlagBG：phosphorylated FlagBCL10GFP；FlagBG：FlagBCL10GFP。BAC: bacteria。

A.



B.

BCL10 1-228

mass	position	MC	Peptide sequence
3879.1173	19-50	1	DALENLRVYLCEKIIAERHF DHLRAKKILSRE
3689.9860	70-100	1	DYLQENPKGLDTLVESIRRE KTQNFLIQKIT
3596.9765	39-69	1	DHLRAKKILSREDTEEISCR TSSRKRAGKLL
3466.6617	197-228	1	DPGAPPLPPDLQLEEEGTCA NSSEMFLPLRSR
3307.7063	51-79	1	DTEEISCR TSSRKRAGKLLD YLQENPKGL
3245.7350	12-38	1	DLTEVKKDALENLRVYLCEK IIAERHF
2996.6059	101-126	0	DEVLKLNRNIKLEHLKGLKCS SCEPFP
<b>2625.2283</b>	<b>206-228</b>	<b>0</b>	<b>DLQLEEEGTCA NSSEMFLPL RSR</b>
2532.4144	80-100	0	DTLVESIRREKTQNFLIQKI T
2432.2754	19-38	0	DALENLRVYLCEKIIAERHF
2150.1346	51-69	0	DTEEISCR TSSRKRAGKLL
2017.9998	1-18	1	MEPTAPSLTEEDLTEVKK
1465.8597	39-50	0	DHLRAKKILSRE
1235.5611	127-138	0	DGATNNLSRSNS
1204.5402	1-11	0	MEPTAPSLTEE
1176.5895	70-79	0	DYLQENPKGL
860.4512	197-205	0	DPGAPPLPP
832.4774	12-18	0	DLTEVKK

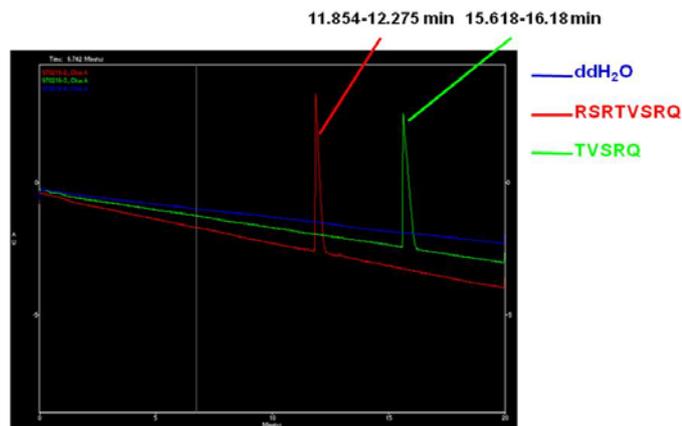
MC: missed cleavages

C.

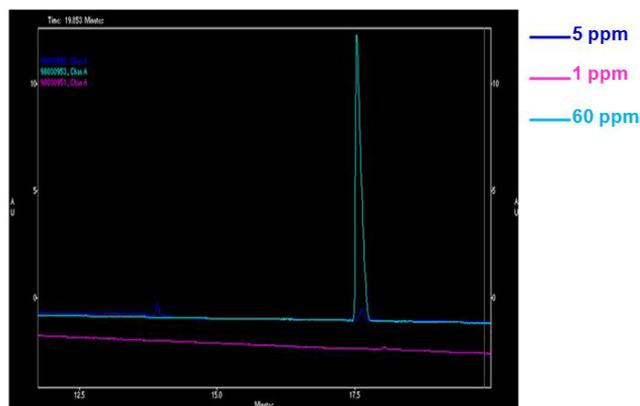


圖六、以 LC-MS/MS 分析處理過內切酶 Asp-N 的蛋白質 BCL10。A. 在細菌 BL21 表現 BCL10-His, BCL10 1-228, BCL10 1-225 蛋白質，以 lysis buffer 打破細菌並收取上清液，取適當的體積並使用 BSA 估計蛋白質表現濃度，結果以 Coomassie blue 染色表示。BCL10-His: 100 ng/μl, BCL10 1-228: 100 ng/μl, BCL10 1-225: 135 ng/μl。B. 使用 ExPASy proteomic server 預測 Asp-N 處理 BCL10 1-228 後可能出現的片段 (肽段範圍設在 800-4000 daltons)，欲看到的片段以粗體所示。C. 取重組蛋白質 BCL10 1-228 1.5 μg (如圖 A 黑框所示) 進行 Asp-N in-gel digestion (Enzyme/Substrate = 1/10) 18 小時，萃取肽段後以 LC-MS/MS 分析蛋白質，並利用 Mascot 軟體分析蛋白質的序列及身分鑑定，結果顯示肽段片段的出現集中在 BCL10 的 N 端 (劃線所示)。

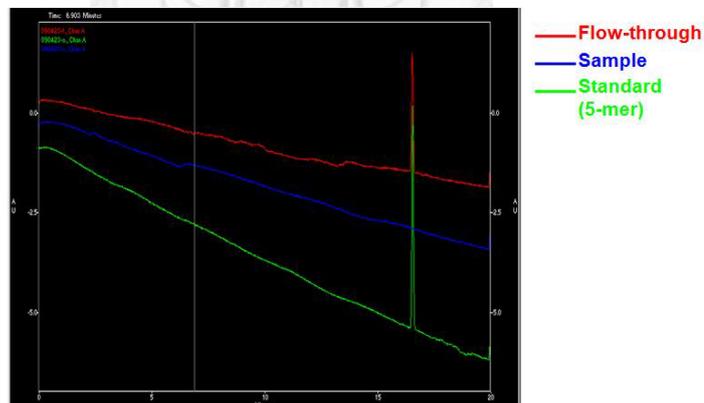
A.



B.

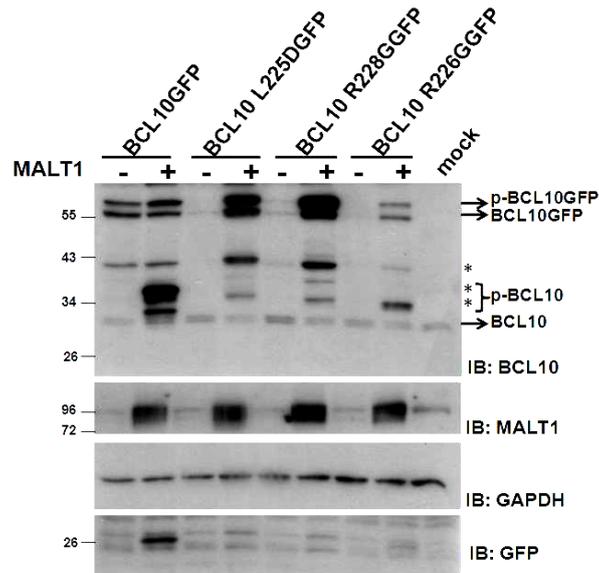


C.

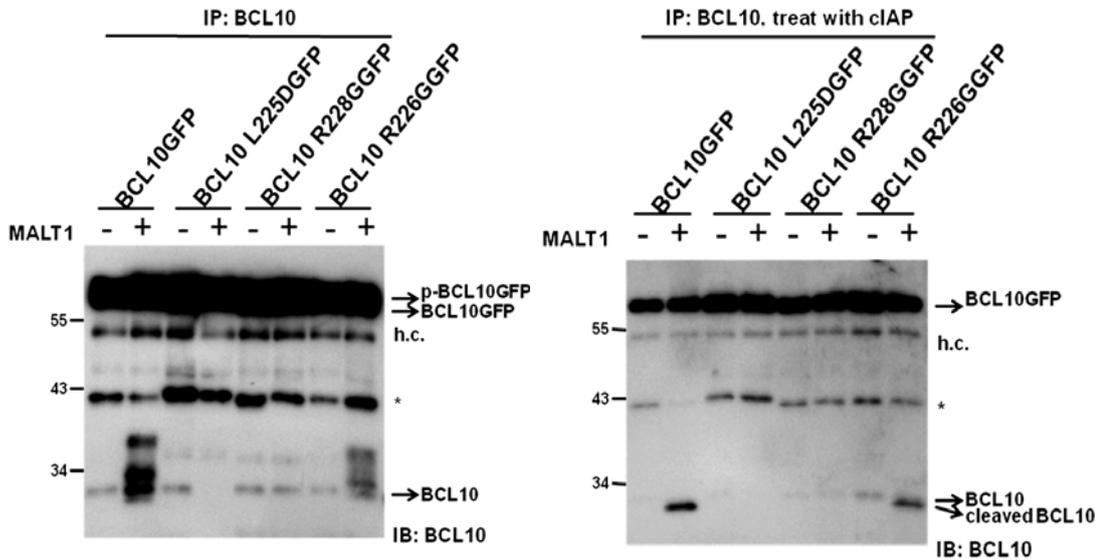


圖七、以毛細管電泳分析胜肽 RSRTVSRQ 及 TVSRQ。 A.將標準品胜肽 RSRTVSRQ 與 TVSRQ 分別取 100 ppm 溶於水中進行毛細管電泳分析，2 種胜肽間隔時間約為 4 分鐘。 B.取不同濃度的標準品胜肽 TVSRQ 1 ppm、5 ppm、60 ppm 進行毛細管電泳分析，靈敏度約為 5 ppm。 C.將標準品 TVSRQ 60 ppm 溶於水中後，利用 C18 管柱純化胜肽，再進行毛細管電泳分析，結果顯示 C18 管柱無法與標準品胜肽進行結合。Standard：加入的標準品 60 ppm，尚未通 C18 管柱；Flow-through：通過 C18 管柱的濾液；Sample：通過 C18 管柱後的 elution 部分。

A.

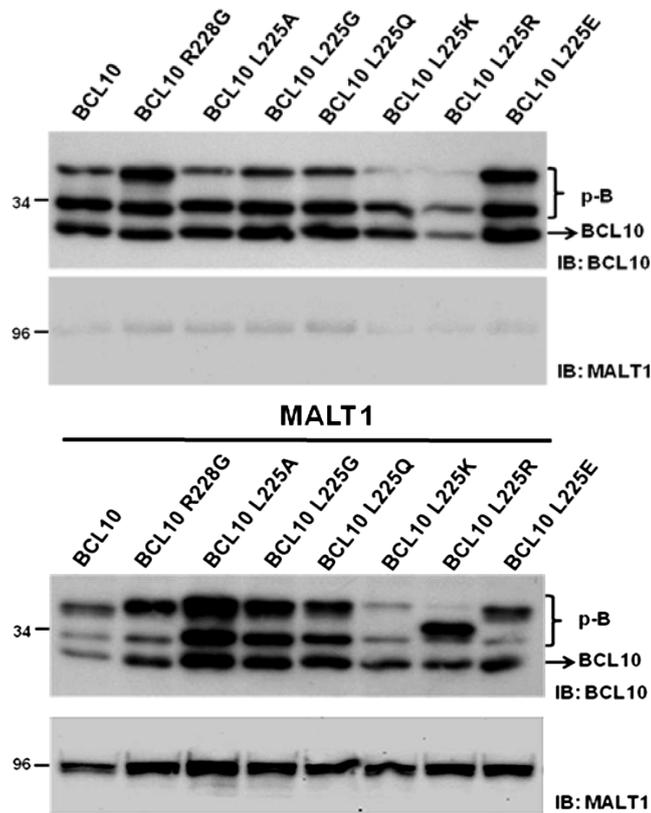


B.

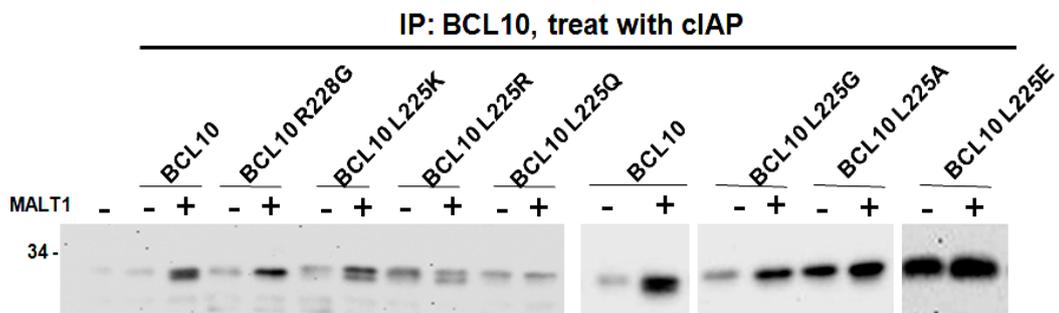


圖八、BCL10 L225DGFP 與 BCL10 R228GGFP 無法被 MALT1 誘導切割。A. 分別轉染 0.5  $\mu$ g pRcCMV-BCL10 GFP、pRcCMV-BCL10 L225DGFP、pRcCMV-BCL10 R226GGFP、pRcCMV-BCL10 R228GGFP 與 4  $\mu$ g pRcCMV-MALT1-myc 至 293T 細胞於 10-cm dish 上，48 小時後收取蛋白質並以西方墨點法分析，分別使用 BCL10、MALT1、GFP、GAPDH 一級抗體辨識蛋白質。B. 收取蛋白質並以 BCL10 抗體進行免疫沉澱並處理去磷酸酶 2 小時後，以西方墨點法分析結果。p-BCL10GFP: phosphorylated BCL10 GFP ; p-BCL10 : phosphorylated BCL10 ; cIAP : calf intestinal alkaline phosphatase ; h.c: heavy chain ; \*: non-specific band 。

A.

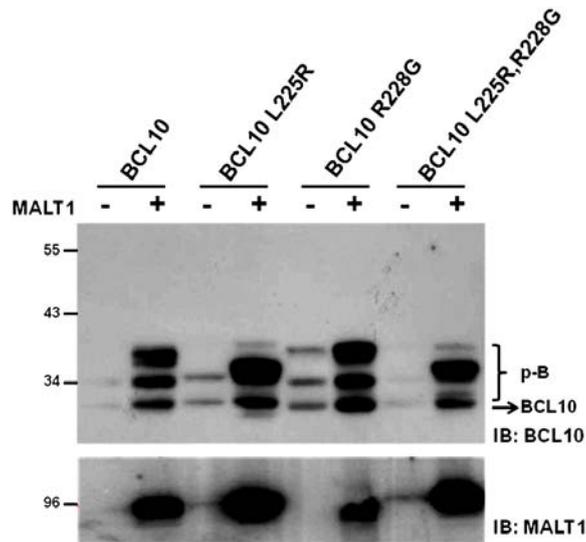


B.

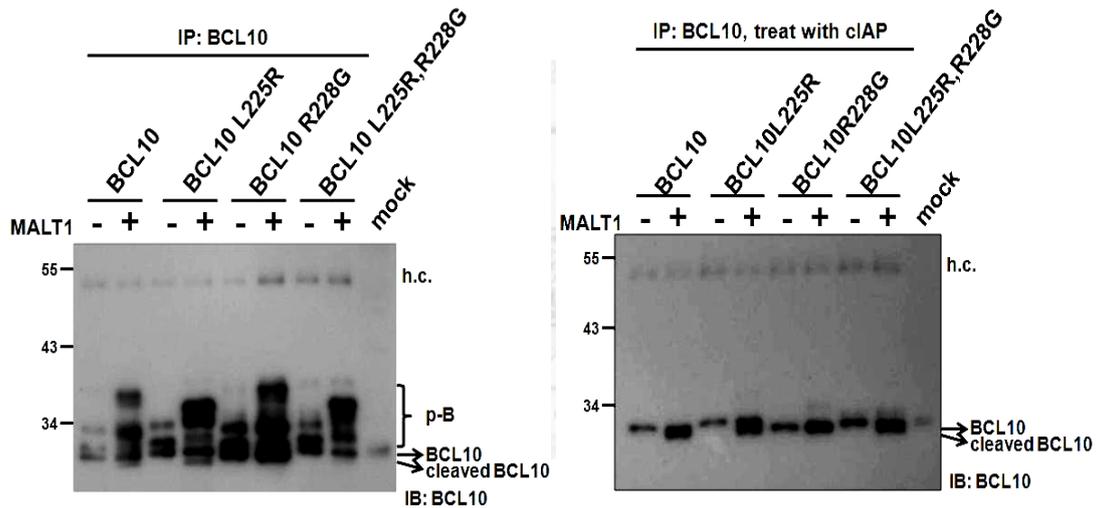


圖九、除了 BCL10 L225R 與 BCL10 L225K 以外，所有的 BCL10 L225 mutants 與 BCL10 R228G 均無法被 MALT1 誘導切割。 A.分別轉染 0.5  $\mu$ g pRcCMV-BCL10、pRcCMV-BCL10 L225 mutants、pRcCMV-BCL10 R228G 與 4  $\mu$ g pRcCMV-MALT1-myc 至 293T 細胞於 10-cm dish 上，48 小時後收取蛋白質並以西方墨點法分析，分別使用 BCL10 與 MALT1 一級抗體辨識蛋白質。 B.收取蛋白質並以 BCL10 抗體進行免疫沉澱並處理去磷酸酶 2 小時後，以西方墨點法分析結果。 cIAP：calf intestinal alkaline phosphatase；p-B：phosphorylated BCL10。

A.

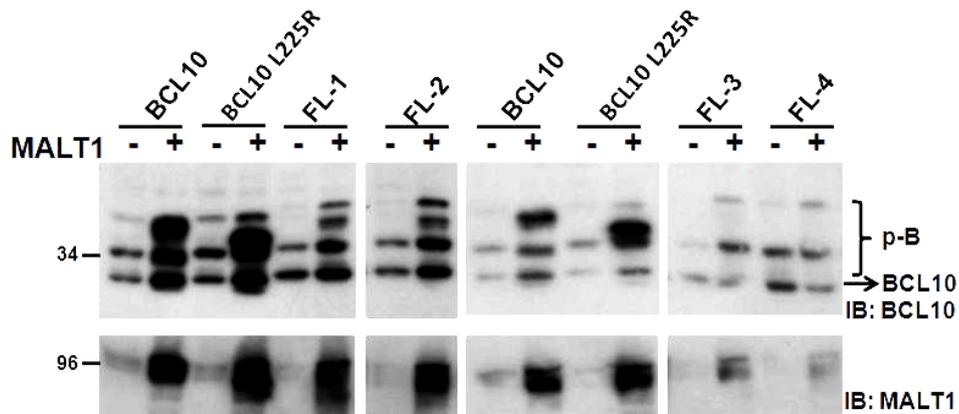


B.

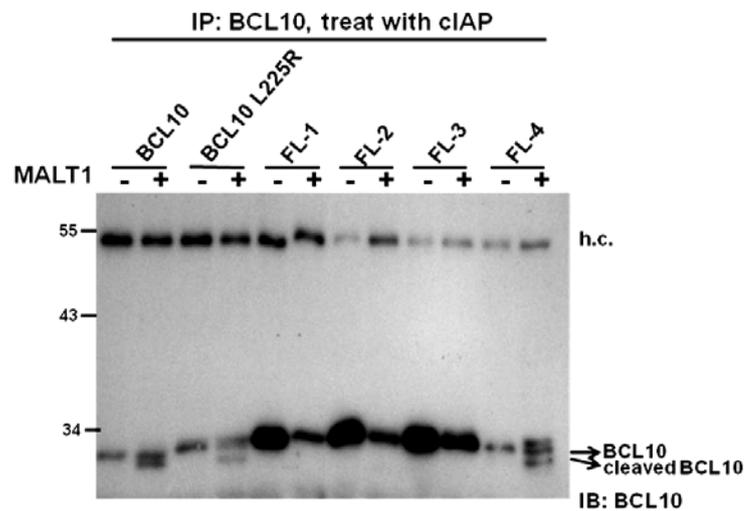


圖十、BCL10 L225R,R228G 可被 MALT1 誘導切割。 A.分別轉染 0.5  $\mu$ g pRcCMV-BCL10、pRcCMV-BCL10 L225R、pRcCMV-BCL10 R228G、pRcCMV-BCL10 L225R,R228G 與 4  $\mu$ g pRcCMV-MALT1-myc 至 293T 細胞於 10-cm dish 上，48 小時後收取蛋白質並以西方墨點法分析，分別使用 BCL10 與 MALT1 一級抗體辨識蛋白質。 B.收取蛋白質並以 BCL10 抗體進行免疫沉澱並處理去磷酸酶 2 小時後，以西方墨點法分析結果。 cIAP：calf intestinal alkaline phosphatase； p-B：phosphorylated BCL10； h.c: heavy chain。

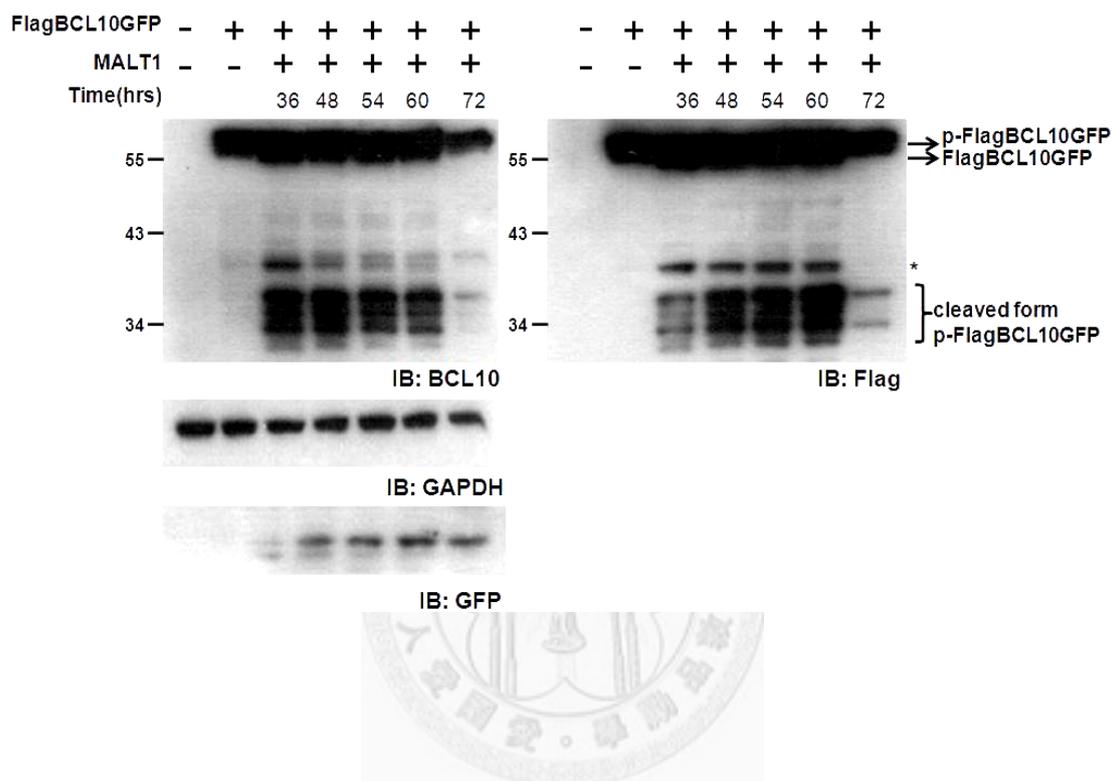
A.



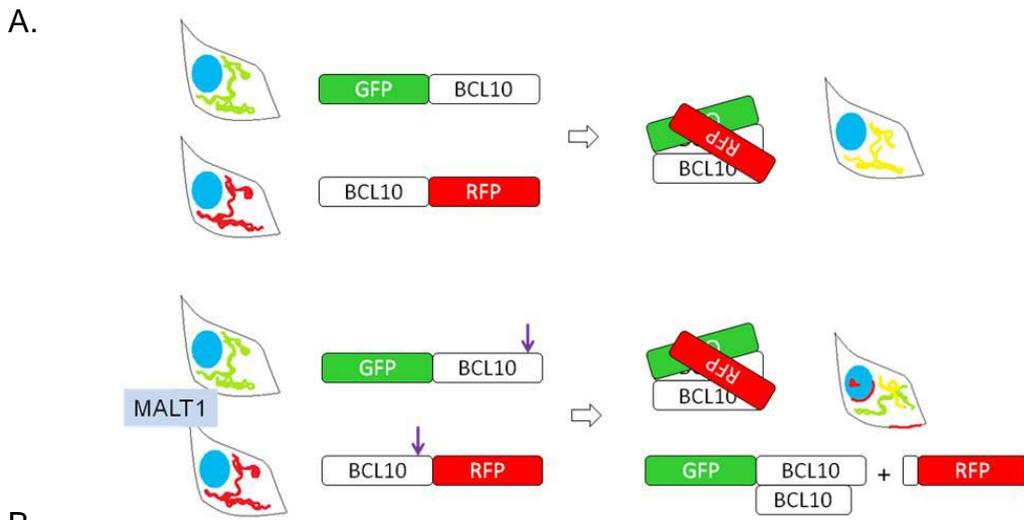
B.



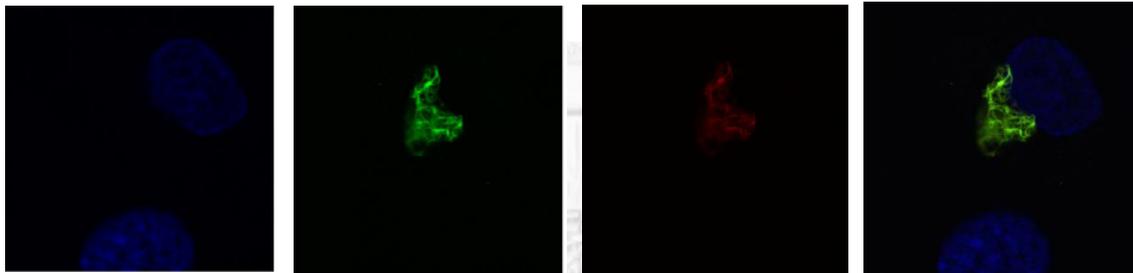
圖十一、除了 BCL10 F222A,L223T,L225R 以外，所有的 BCL10 F222,L223,L225R mutants 均無法被 MALT1 誘導切割。 A.分別轉染 0.5  $\mu$ g pRcCMV-BCL10、pRcCMV-BCL10 L225R、FL-1、FL-2、FL-3、FL-4 與 4  $\mu$ g pRcCMV-MALT1-myc 至 293T 細胞於 10-cm dish 上，48 小時後收取蛋白質並以西方墨點法分析，分別使用 BCL10 與 MALT1 一級抗體辨識蛋白質。 B.收取蛋白質並以 BCL10 抗體進行免疫沉澱並處理去磷酸酶 2 小時後，以西方墨點法分析結果。cIAP：calf intestinal alkaline phosphatase；p-B：phosphorylated BCL10；h.c：heavy chain。FL-1：BCL10 F222H,L223E,L225R；FL-2: BCL10 F222S,L223E,L225R；FL-3: BCL10 F222E,L223A,L225R；FL-4: BCL10 F222A,L223T,L225R。



圖十二、在 293T 細胞中 FlagBCL10 GFP 受到 MALT1 誘導切割現象在轉染後 72 小時始明顯的下降。轉染 pCMVFlagBCL10 GFP (0.25  $\mu$ g) 與 pRcCMV-MALT1-myc (2  $\mu$ g) 的表現質體至 293T 細胞，分別在轉染後 28、36、48、60、72 小時後收取蛋白質並以西方墨點法分析，使用 BCL10、Flag、GFP、GAPDH 一級抗體進行辨識。p-FlagBCL10GFP：phosphorylated FlagBCL10 GFP；\*：non-specific band。



- MALT1



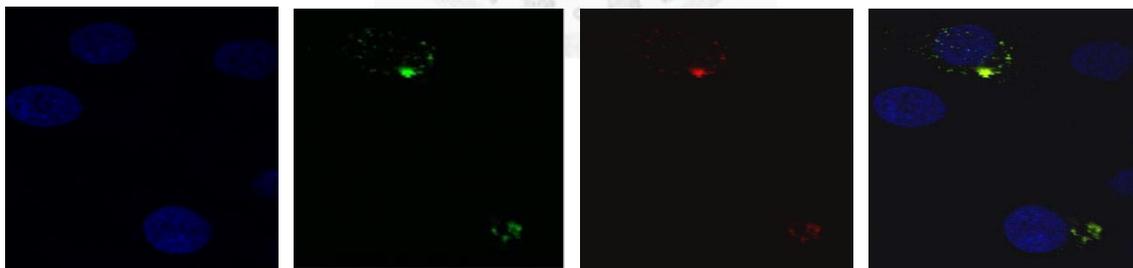
Hoechst

GFPBCL10

BCL10RFP

Merge

+ MALT1



Hoechst

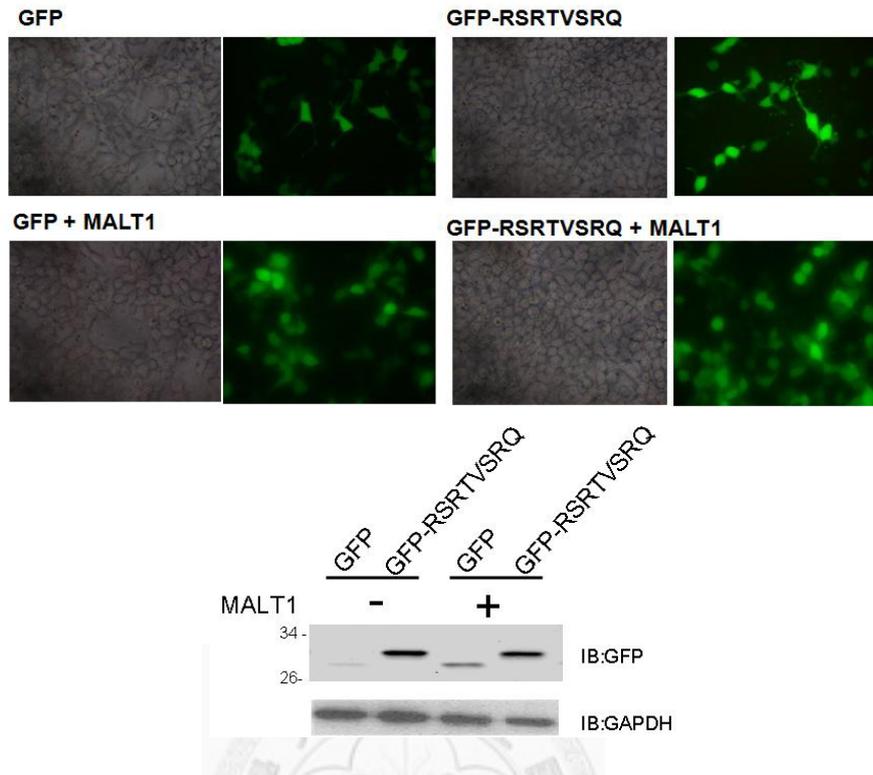
GFPBCL10

BCL10RFP

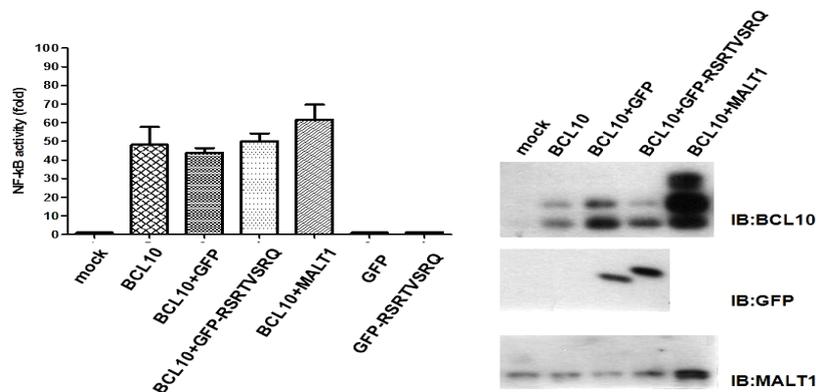
Merge

圖十三、BCL10RFP 與 GFPBCL10 在有無 MALT1 於 293T 細胞的分布情形。 A. 預測同時表現 BCL10RFP 與 GFPBCL10 在有無 MALT1 於細胞表現的狀況。 B. 共同轉染 pRcCMV-BCL10 RFP 0.2  $\mu$ g、pRcCMV-GFPBCL10 0.1  $\mu$ g 與 pCMV6XL5-MALT1 2.4  $\mu$ g 於 293T 細胞，48 小時後進行 Hoechst 染色，以共軛焦顯微鏡觀察，(上圖) 沒有共同表現 MALT1，(下圖) 共同表現 MALT1，結果呈現點狀或是絲狀構造。

A.

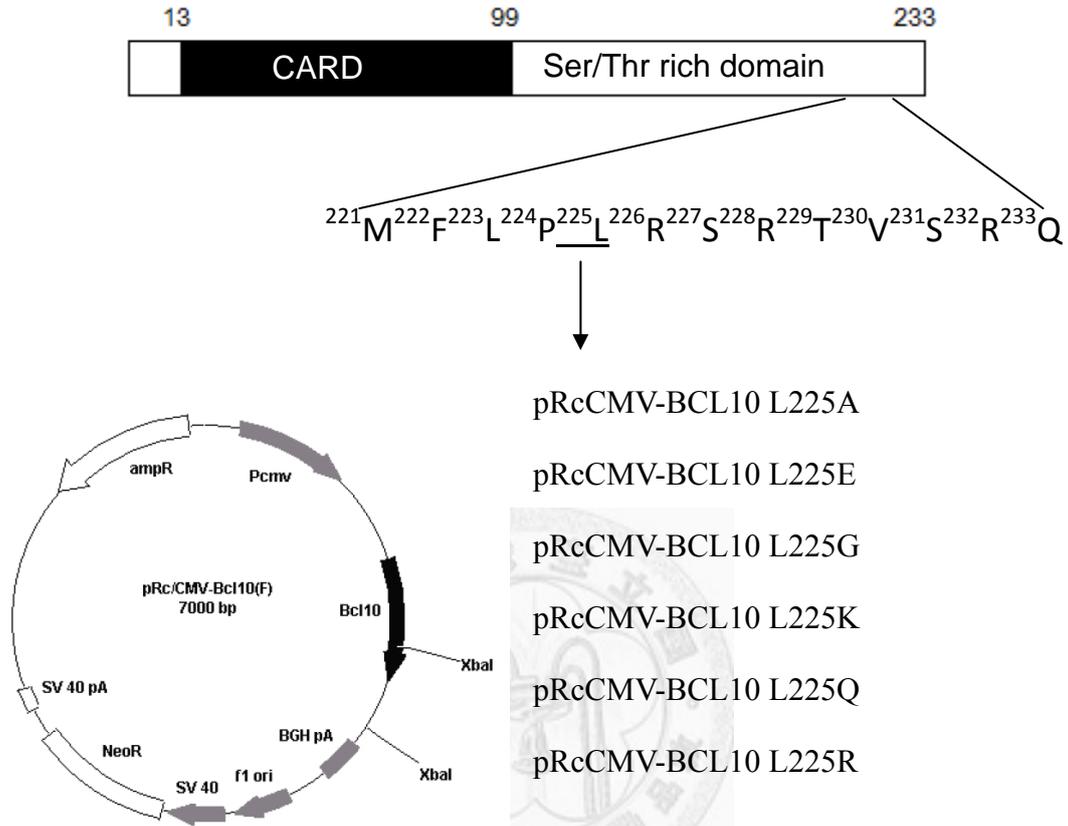


B.



圖十四、GFP-RSRTVSRQ 呈現均質的表現型且不影響 NF- $\kappa$ B 活性。 A.分別轉染 pGFP、pRcCMV-GFP-RSRTVSRQ 0.25  $\mu$ g 與 pRcCMV-MALT1-myc 2  $\mu$ g 於 293T 細胞，48 小時後在螢光顯微鏡下觀察並收取蛋白質以西方墨點法分析，使用 GFP、GAPDH 一級抗體辨識蛋白質。 B.分別轉染 pRcCMV-BCL10、pGFP、pRcCMV-GFP-RSRTVSRQ 0.05  $\mu$ g 與 pNF- $\kappa$ B-Luc 0.1  $\mu$ g，pCMV-Renilla-Luc 0.05  $\mu$ g 於 293T 細胞，48 小時後進行 NF- $\kappa$ B 冷光酵素測定與西方墨點分析，使用 BCL10、MALT1、GFP 一級抗體辨識蛋白質。

## 第捌章、附錄圖表



附圖一、以 pRcCMV-BCL10 做為模板在 Leucine 225 進行單點突變

☀ 利用 Stratagene QuickChange<sup>®</sup> Primer Design Program 設計 primer，並以單股 degenerate primer 進行質體構築。T<sub>m</sub> 值以可黏上 template 的 primer 3' 區域鹼基計算： $T_m = 2 \times (A+T) + 4 \times (C+G) ^\circ C$ 。

☀ Primer：TCTAGTGAGATGTTTCTTCCCVVAAGATCACGTACTGTTTCACG

V = A, C, G，因此根據此種 primer 預測可能得到的產物如下：

pRcCMV-BCL10 L225P、pRcCMV-BCL10 L225E、pRcCMV-BCL10 L225R、  
pRcCMV-BCL10 L225T、pRcCMV-BCL10 L225K、pRcCMV-BCL10 L225A、  
pRcCMV-BCL10 L225Q、pRcCMV-BCL10 L225G，實得產物以畫底線所示。

☀ PCR procedure：

Plasmid template (pRcCMV-BCL10)(100ng/μl)	1 μl
Primer (5 μM)	1 μl
dNTP (1.25 mM)	4 μl
TURBO Pfu (2.5 U/μl)	1 μl
10× Pfu buffer	2.5 μl
ddH <sub>2</sub> O	15.5 μl
<b>Total</b>	<b>25 μl</b>

Temperature	Time	Cycle
94°C	3 min	1
94°C separate	30 sec	
55°C (T <sub>m</sub> -5°C) annealing	1 min	18
68°C extension	10 min	
68°C	10 min	1
4°C	∞	

Extension 時間可根據 PCR 產物長度決定，通常 1 kb 需要 1 分鐘

PCR 產物加入 1 μl *DpnI* (NEB, 20 U/μl)，在 37°C 作用 2 小時或隔夜，去除有 methylation 的 template (PCR 產物沒有 methylation) 後，取 4 μl 進行 transformation，再抽取質體 DNA 定序確認。

其它 BCL10 C 端的單點突變做法相同，整理如下：

以 pRcCMV-BCL10 做為模板在 Arg228 進行單點突變

☀ 產物：pRcCMV-BCL10 R228G

☀ 以單股 primer 進行質體構築

☀ Primer : GTTTCTTCCCTTAAGATCAGGTACTGTTTCACGACAATG

☀ Tm 設為 55°C

**以 pRcCMV-BCL10 L225R 做為模板在 Arg228 進行單點突變**

☀ 產物 : pRcCMV-BCL10 L225R,R228G

☀ 以單股 primer 進行質體構築

☀ Primer : GTTTCTTCCCAGAAGATCAGGTACTGTTTCACGACAATG

☀ Tm 設為 55°C

**以 pRcCMV-BCL10 L225R 做為模板在 Phe222、Leu223 進行單點突變**

☀ 產物 : pRcCMV-BCL10 F222H,L223E,L225R (FL-1), pRcCMV-BCL10 F222S,L223E,L225R (FL-2), pRcCMV-BCL10 F222E,L223A,L225R (FL-3), pRcCMV-BCL10 F222A,L223T,L225R (FL-4)

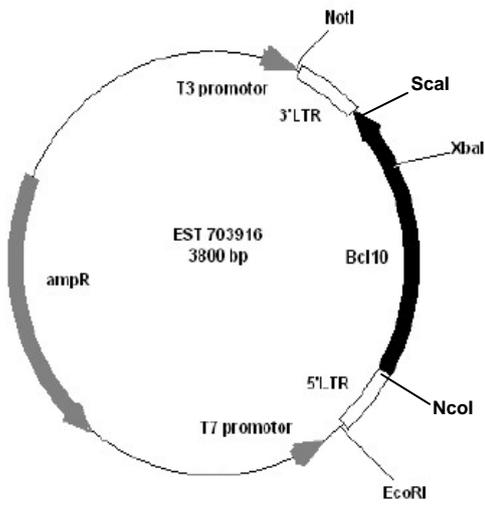
☀ 以單股 degenerate primer 進行質體構築

☀ Primer :

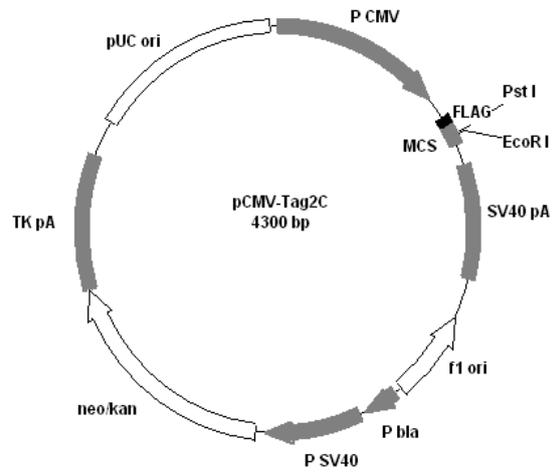
GAACCTTGTGCAAACCTCTAGTGAGATGVVTDVTCCCAGAAGATCACGTACTGT  
TTCAC

V=A, C, G ; D=A, G, T

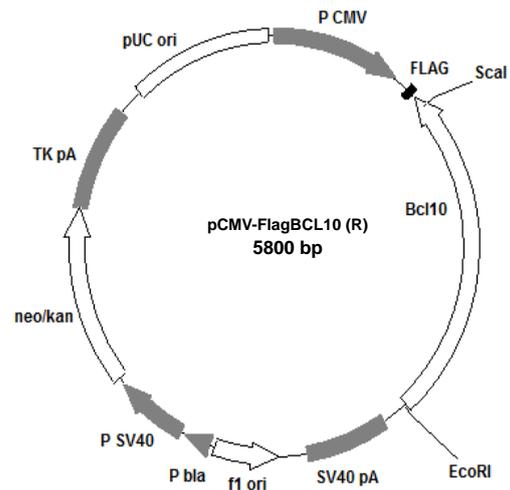
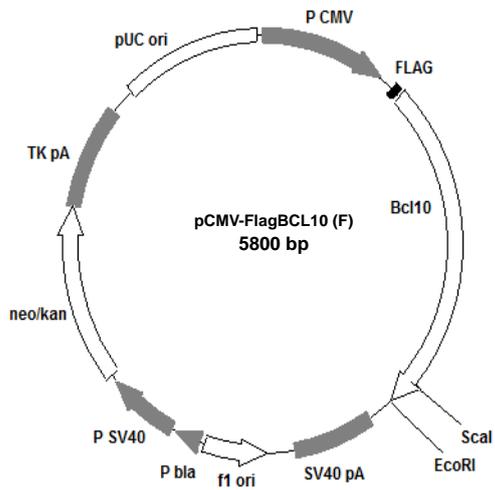
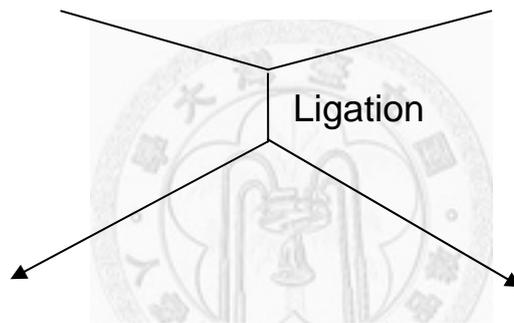
☀ Tm 設為 60°C



*NcoI*, *NotI*, Klenow  
Isolate 1.5kb



*PstI*, CIP

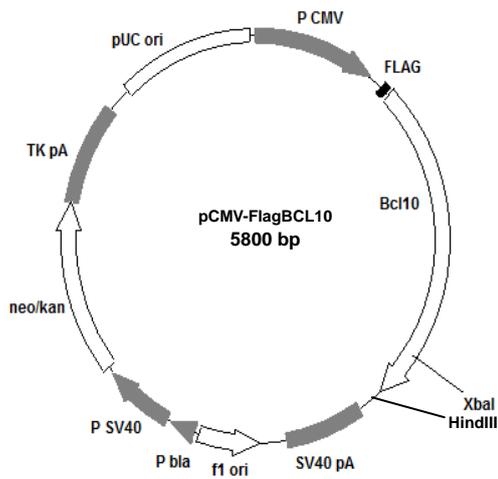


*EcoRI*, *Scal* check

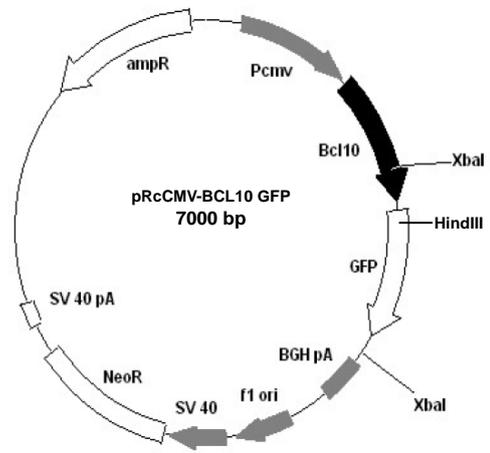
Forward : 700bp; 5100bp

Reverse : 1000bp; 4800bp

附圖二、 構築質體 pCMV-FlagBCL10

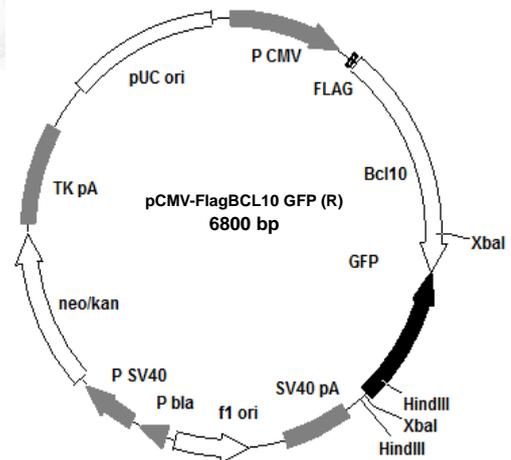
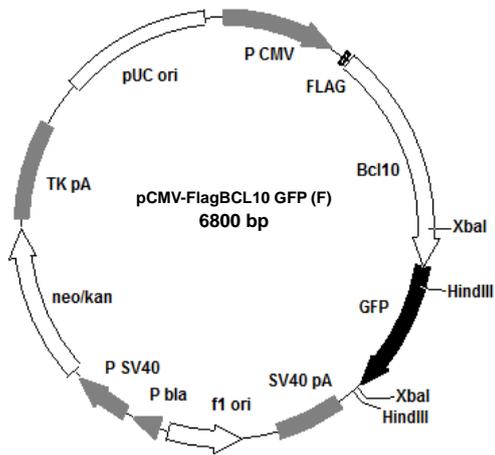
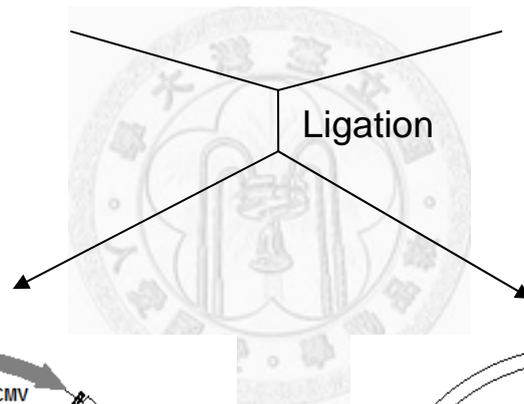


*Xba*I, CIP



*Xba*I

Isolate 1kb fragment



*Hind*III check

Forward : 900bp, 5900bp

Reverse : 200bp, 6600bp

附圖三、 構築質體 pCMV-FlagBCL10 GFP

將 BCL10 C 端序列的氨基酸 R<sup>226</sup>SRTVSRQ<sup>233</sup> 轉換成核苷酸序列，並接在 GFP 上，

質體構築方式如下所示：

合成正股及負股的引子：

Primer I：AAGATCACGTACTGTTTCACGACAATGA

Primer II：TTCTAGTGCATGACAAAGTGCTGTTACT

一、將 primer I 及 primer II 進行 annealing

Primer I (forward) ( $10^{-4}$ M)	10 $\mu$ l
Primer II (reverse) ( $10^{-4}$ M)	10 $\mu$ l
10 $\times$ annealing buffer	5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	25 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

95°C, 4 分鐘 → 緩慢降溫至室溫 → -20°C 保存

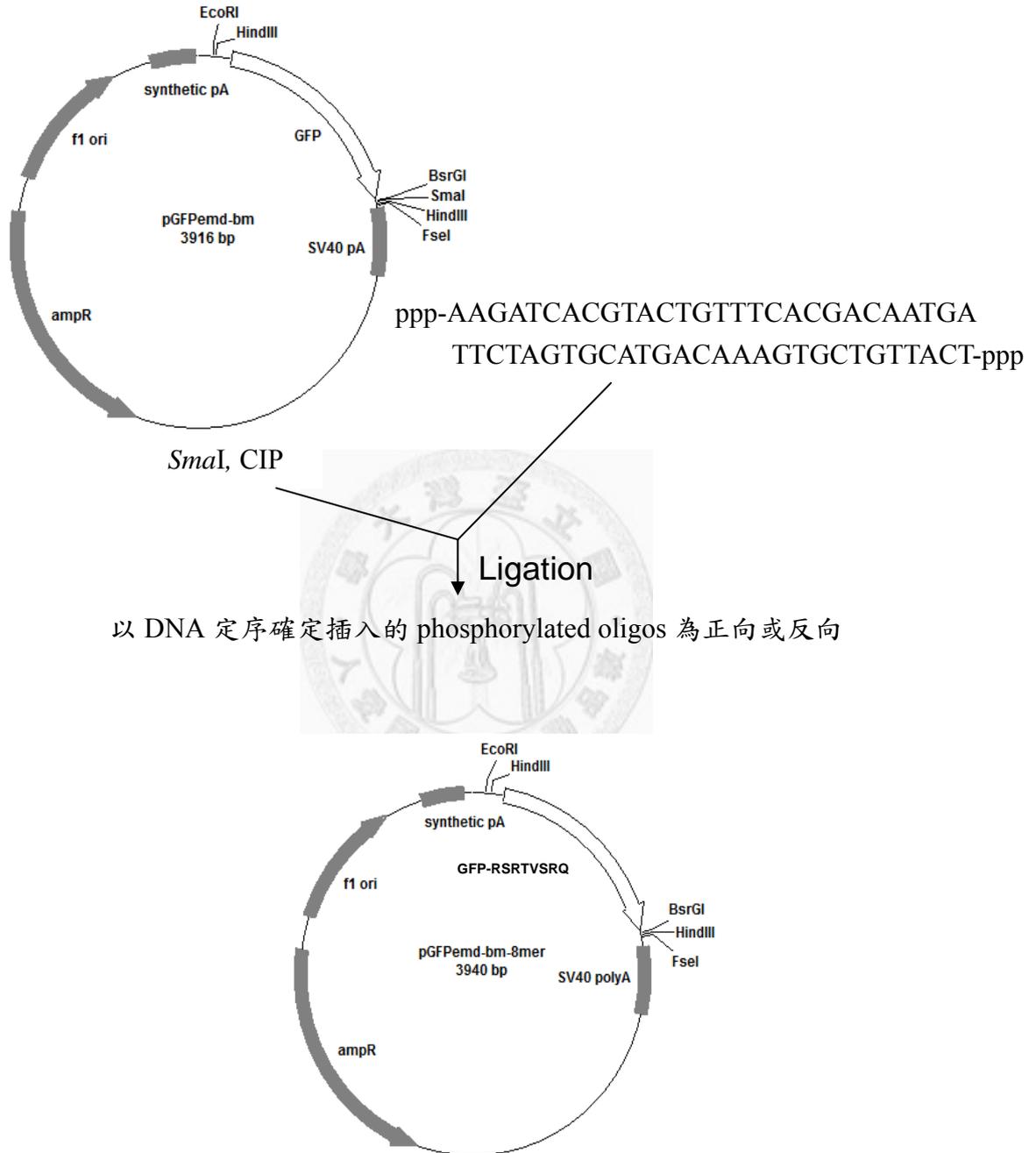
※ 10 $\times$  annealing buffer：130 mM NaCl, 13 mM Tris8.0, 1.3 mM EDTA

二、將 annealed oligos 進行 phosphorylation

Annealed oligos (10 $\times$ dilute)	2 $\mu$ l
T4 Polynucleotide kinase (PNK, 10 U/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
1mM ATP	2 $\mu$ l
PNK buffer (10 $\times$ )	2 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	12 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l

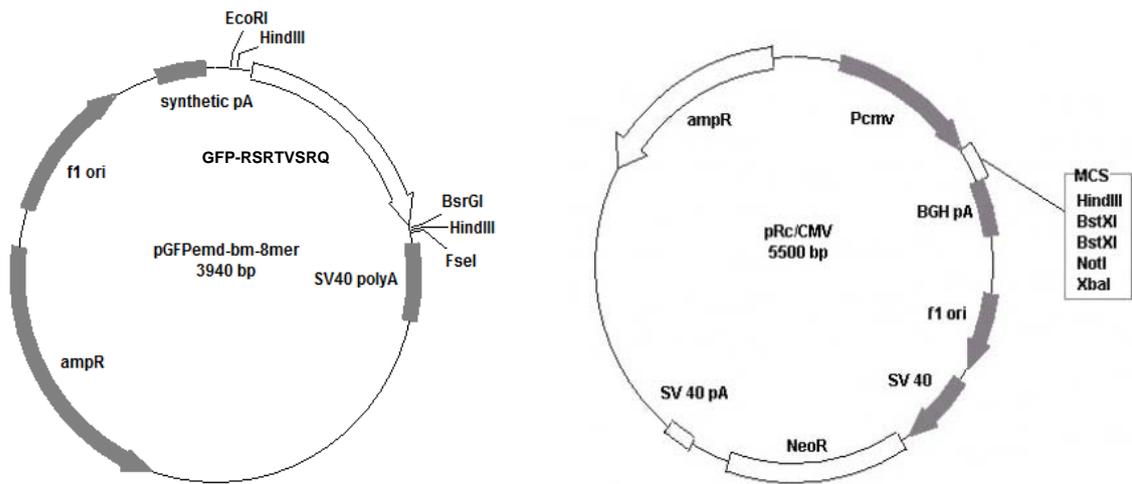
37°C, 30 分鐘 → 70°C, 10 分鐘 → -20°C 保存

三、將 phosphorylated oligos 與處理過 *Sma*I 的 pGFPemd-bm 進行 ligation，獲得 pGFPemd-bm-8mer (pGFPemd-bm-RSRTVSRQ)，過程如下圖所示：



以 DNA 定序確定插入的 phosphorylated oligos 為正向或反向

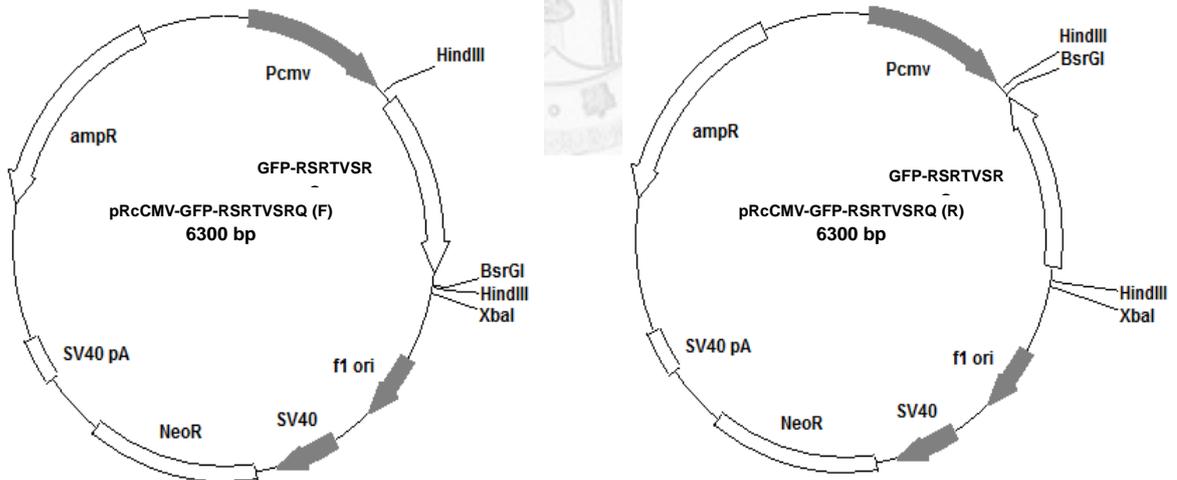
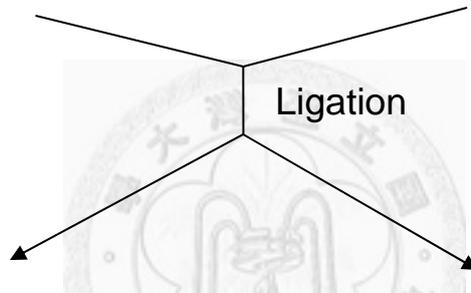
附圖四、 構築質體 pRcCMV-GFP-RSRTVSRQ (continued.)



*HindIII*

Isolate 0.8kb fragment

*HindIII*, CIP

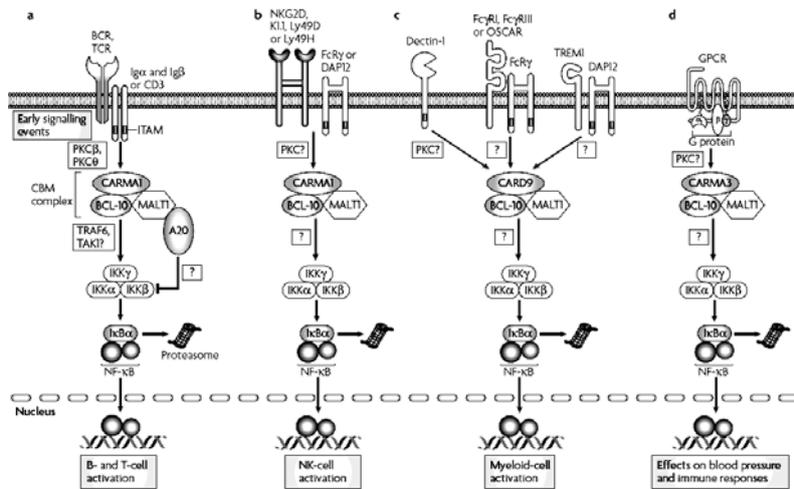


*BsrGI*, *XbaI* check

Forward : 50bp, 6250bp

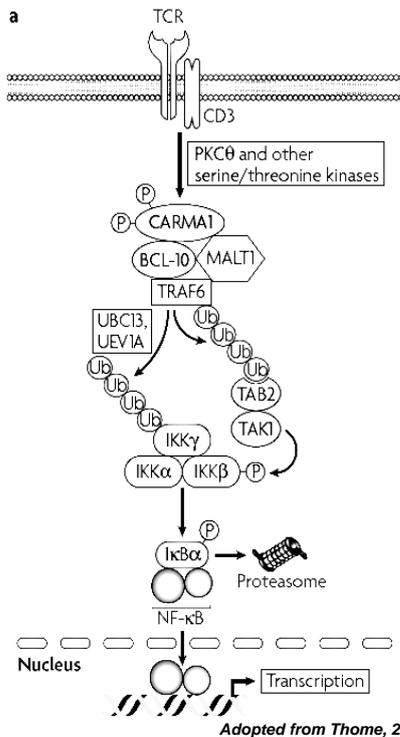
Reverse : 800bp, 5500bp

附圖四、 構築質體 pRcCMV-GFP-RSRTVSRQ



Adopted from Thome, 2008

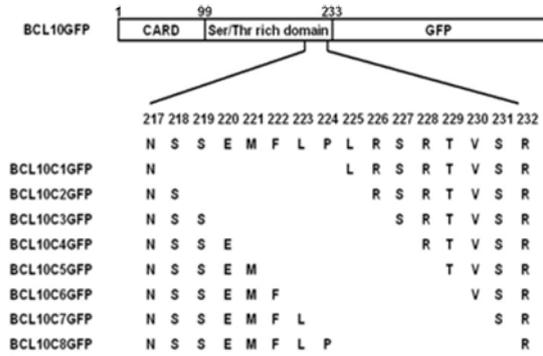
附圖五、CBM 複合體在 NF-κB 訊息傳遞路徑所扮演的角色。不同細胞經 ITAM 結合的受器或是 G-protein couple receptor 接受到各種刺激後，藉由各種 CARD-containing 蛋白質結合 BCL10 與 MALT1 形成 CBM 複合體將訊息往下傳遞以活化 NF-κB，淋巴系細胞與 NK 細胞的 CARD-containing 蛋白質為 CARMA1，骨髓系細胞為 CARD9，非免疫細胞為 CARMA3。圖摘自於 Thome, M., 2008 圖一。



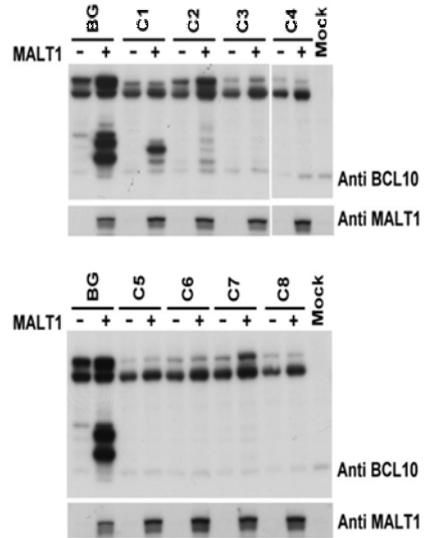
Adopted from Thome, 2008

附圖六、T 細胞受器受到刺激後所引起的 NF-κB 所引起的訊息傳遞路徑。圖摘自於 Thome, M., 2008 圖三。

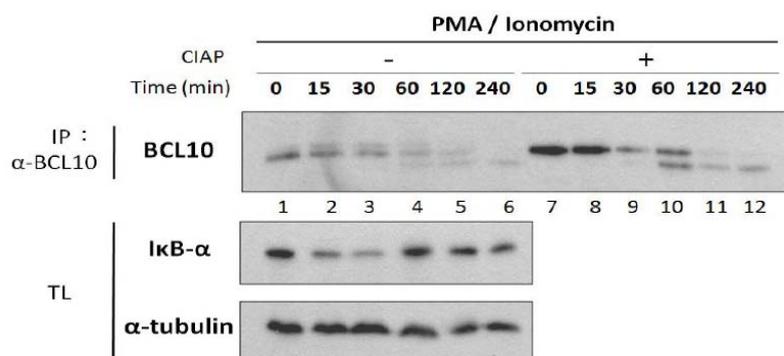
A.



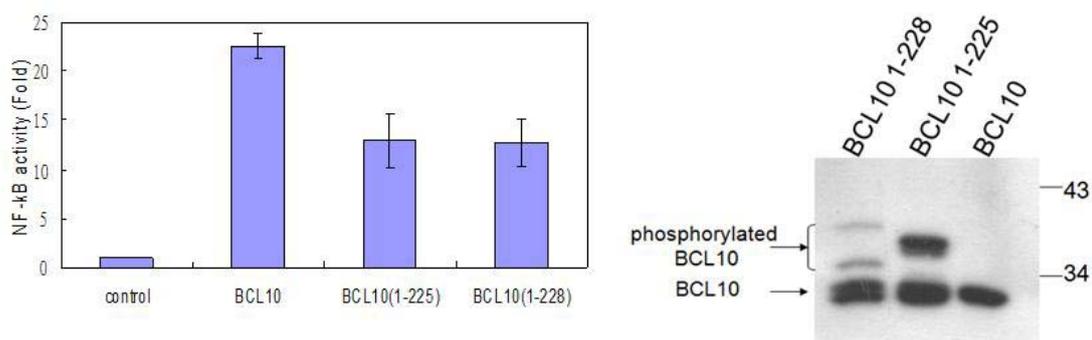
B.



附圖七、BCL10 Leucine225 對於 MALT1 誘導切割是重要的。 A. BCL10 deletion constructs C1-C8 (0.25  $\mu$ g) 轉染至 293T 細胞的表現情形。 B. C1-C8 (0.25  $\mu$ g) 分別與 MALT1(2.25  $\mu$ 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 ( $\Delta$ 218-224 a.a.)、C2 ( $\Delta$ 219-225 a.a.)、C3 ( $\Delta$ 220-226 a.a.)、C4 ( $\Delta$ 221-227 a.a.)、C5 ( $\Delta$ 222-228 a.a.)、C6 ( $\Delta$ 223-229 a.a.)、C7 ( $\Delta$ 224-230 a.a.)、C8 ( $\Delta$ 225-231 a.a.)。(摘自周欣儀學姊碩士論文，95 年)



附圖八、以 P/I 刺激 Jurkat T 細胞的活化可造成 BCL10 的切割。將 Jurkat T 細胞以 PMA (phorbol myristyl acetate, 亦稱 TPA) (50 ng/ml) 與 ionomycin (1  $\mu$ M), 在加入刺激後的 0、15、30、60、120、240 分鐘, 收取細胞蛋白質, 取 30 $\mu$ g 進行 SDS-PAGE 電泳後, 以 anti-I $\kappa$ B $\alpha$  抗體進行西方墨點法。另一方面取 600 $\mu$ g 的細胞蛋白質, 以 anti-BCL10 抗體進行免疫沈澱 12-16 小時後, 經 PBS 清洗後從中取 1/2 蛋白質以 CIAP 在 37 $^{\circ}$ C 處理一小時(圖 A, Lanes 7-12), 經 SDS-PAGE 電泳後, 以 anti-BCL10 抗體進行西方墨點法。 $\alpha$ -tubulin 作為蛋白質質量指標(loading control)。TL: total lysate(細胞蛋白質)。CIAP: calf Intestine Alkaline Phosphatase(磷酸水解酶)。(摘自臧素心學姊碩士論文, 97 年)



附圖九、BCL10 受到 MALT1 誘導切割的有無並不影響 NF- $\kappa$ B 的活性。分別轉染 pRcCMV-BCL10、pRcCMV-BCL10 1-225、pRcCMV BCL10 1-228 0.05  $\mu$ g 與 pNF- $\kappa$ B-Luc 0.1  $\mu$ g, pCMV-Renilla-Luc 0.05  $\mu$ g 於 293T 細胞, 48 小時後進行 NF- $\kappa$ B 冷光酵素測定。(摘自實驗室吳俊賢學長的結果)

附表一、本篇論文其它使用的質體

質體	質體構築者/供應商	質體	質體構築者/供應商
pRcCMV	Invitrogen	pET21a-BCL10-His	宏恩學長
pCMV6XL5	Origene	pET21a-BCL10 1-225	Kenji
pRcCMV-BCL10	雯華學姐	pET21a-BCL10 1-228	Kenji
pRcCMV-BCL10 GFP	雯華學姐	pGFPemd-bm	韻如學姐
pRcCMV-BCL10 L225DGFP	SLD	pRcCMV-MALT1-myc	思薇學姊
pRcCMV-BCL10 R226GGFP	SLD	pCMV6XL5-MALT1	Origene
pRcCMV-BCL10 R228GGFP	SLD	p-NF- $\kappa$ B-Luc	Stratagene
pRcCMV-BCL10 RFP	SLD	pCMV-Renilla-Luc	Stratagene
pRcCMV-GFP BCL10	SLD		