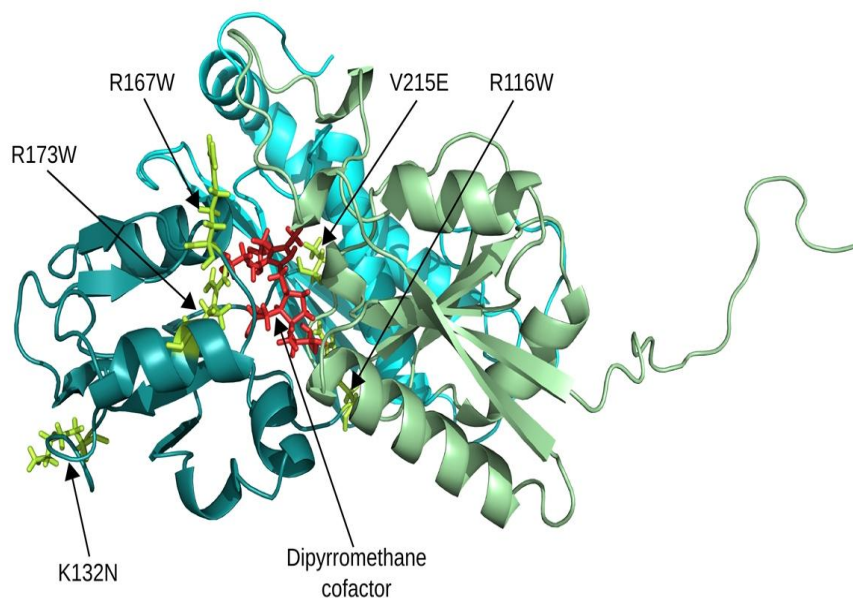


AKUTT INTERMITTERENDE PORFYRI

*Kartlegging av funksjonelle og termodynamiske
eigenskapar til hydroksymetylbilan syntase og utvalte
mutantar*



**Masteroppgåve i helsefag – RAB fag
Eva Rønneseth**



**Institutt for samfunnsmedisin
Universitetet i Bergen
Våren 2011**

Forord

Det byrjar å bli ei stund sidan starten på 2009 då eg blei introdusert for denne oppgåva i eit møte med Ledar av Nasjonalt kompetansesenter for porfyriskjukdommar (NAPOS)

Professor/avdelingsoverlege ved laboratorium for klinisk biokjemi, LKB Sverre Sandberg og studiekoordinator Una Sølvik. Oppgåva fanga mi interesse, og eg såg store mogelegheiter i å skrive ei slik oppgåve, og ikkje minst mykje ny kunnskap om porfyri, molekylærbiologi og proteinkjemiske metodar.

No sit eg her over to år seinare, med mykje lærdom i sekken og som ein person som har vakse på oppgåva. Eg har opplevd glede, frustrasjon, utfordringar og ikkje minst møte med mange nye flotte menneske i løpet av denne tida. Eg er veldig glad for at eg tok utfordringa.

Det er mange personar eg har lyst å takke i forbindelse med denne oppgåva. Eg vil starte med å takke min rettleiar Dr. Marta Vorland og prosjektledar Dr. Karen Toska som har lært meg mange nye metodar, gitt meg mykje ny kunnskap innanfor fagfeltet, og som ikkje minst har brukt mange timar på meg den siste tida - Tusen takk! Eg hadde aldri klart dette utan deke. Eg setter veldig stor pris på all hjelp, og for at døra inn på kontoret alltid har vore opa for meg. Takk til Sverre Sandberg som hadde tru på meg som rett person til oppgåva og for å ha fått meg interessert i fagområdet porfyri, der ferda mi også går vidare i form av ny jobb som Spesialbioingeniør ved Seksjon for porfyrianalyser.

Helene Bustad Johannessen som er tilsett som forskingsassistent på prosjektet. Tusen takk for bidrag til stabilitetsresultata mine, den modifiserte HMBS figuren ,og elles som ei god støtte den siste tida.

Prosjektet har vore eit samarbeid mellom NAPOS og institutt for Biomedisin ved Universitetet i Bergen, UIB, og eg vil i den forbindelse også takke Professor Aurora Martinez for fagleg bidrag til gruppa, tekniskar Randi Myrseth Svebak for hjelp på labben og Dr. Lars Skjærven for bruk av den modifiserte HMBS figuren.

Det har og blitt tatt ut pasientresultat frå Norsk Porfyriregister til bruk i oppgåva, og eg vil her rette ein stor takk til Jørild Haugen Villanger som har bidrege med dette, og til Seksjon for porfyrianalyser, LKB for analysing av pasientprøvene som finnast i registeret.

Bergen, mai 2011

Samandrag

Akutt intermitterende porfyri (AIP) er ein arveleg sjukdom. Dei fleste AIP pasientar har om lag 50 % reduksjon i hydroxymetylbilan syntase (HMBS) aktiviteten, det tredje enzymet i hemesyntesen. Sjølv om tap i aktivitet skuldast mutasjonar i *HMBS* genet, er mekanismane bak ikkje fullt ut forstått. Funksjonelle studiar på wt og sjukdomsframkallande mutantar i ulike delar av enzymet kan gi verdifull informasjon om den spesifikke mutanten og faktorar som bidrar til at pasientar opplever anfall knytt til AIP.

Denne studien omfattar mutantane; R116W, K132N, R167W, R173W og V215E. Disse representerar mutasjonar rundt det aktive setet som kan påverke binding til kofaktoren og/eller substrat eller mutasjonar langt frå det aktive setet som kan påverke folding og stabilitet. K132N og V215E blir i denne studien skildra for fyrste gong.

Rekombinant humant wt-HMBS og utvalte mutantar blei uttrykt i *E.coli* ved bruk av pGEX vektor og reinsa med affinitetskromatografi. Karakteriseringa inkluderte enzym aktivitet, og termostabilitet analysert på circular dichroism og differential scanning fluoremetry (DSF).

Mutantane K132N og V215E viste signifikant lågare enzym aktivitet enn wt, dei andre mutantane viste svært låg aktivitet som forventa. R116W og R173W var mindre termostabile enn wt. V215E viste to ”toppar” på DSF temperaturskannet noko som tydar på ulik utfolding i forhold til wt.

Saman med pasientresultat frå Norsk Porfyriregister har vi sett på geno-fenotype samanhengar for dei ulike mutantane for betre kunne seie noko om betydinga av dei enkelte mutasjonane. Denne informasjonen vil føre til betre forståing av dei underliggande mekanismane for AIP.

Nøkkelord: HMBS, AIP, enzymaktivitet, termostabilitet

Abstract

Acute intermittent porphyria (AIP) is an inherited disorder. The majority of patients diagnosed with AIP have half-normal activity of hydroxymethylbilane synthase (HMBS), the third enzyme in the heme- pathway. Although the loss of activity originates from mutations in the *HMBS* gene, the mechanisms involved remain unclear. Functional studies on wt and disease-causing mutations found in various parts of the enzyme, may give valuable information about the specific mutant and factors leading to an AIP attack.

The mutations in this study include R116W, K132N, R167W, R173W and V215E, representing either mutation around the active site predicted to interfere with proper binding of the cofactor and/or substrate or mutations far from the active site possibly affecting overall folding and/or flexibility. K132N and V215E are here described for the first time.

The recombinant human wt-HMBS and selected mutations were expressed in *E. coli* using a pGEX expression vector and purified by affinitychromatography. The characterization included enzyme activity and thermostability measured by circular dichroism and differential scanning fluorimetry (DSF).

K132N and V215E showed significantly lower activity than the wt, the other mutations had very low activity as expected. R116W and R173W also had low thermostability compared to the wt. V215E showed two peaks on the DSF plot, indicating different unfolding than the wt. Results taken together match findings from patient samples and have enabled us to classify the novel mutants. Together with future studies, this work will lead to improved understanding of the underlying mechanisms of AIP.

Keywords: HMBS, AIP, enzyme activity, thermostability

Forkortingar

<u>Forkorting</u>	<u>Fullt namn</u>
AIP	Akutt intermitterende porfyri
ALA	δ -aminolevulinsyre
ALAD	δ -aminolevulinsyre dehydratase
ALAS	δ -aminolevulinsyre syntase
CD	Circular dichrosim
CEP	Kongenital erytropoietisk protoporfyri
DPM	Dipyrromethane
DSF	Differential scanning fluoremetry
DTT	1,4-dithiothreitol
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EPP	Erytropoietisk protoporfyri
EVF	Erytrocytt volum fraksjon
FC	Farmakologiske chaperoner
FPLC	Fast protein liquid chromatography
GST	Glutathione S-Transferase
HCP	Hereditær koproporfyri
HIB	Høgteknologisenteret i Bergen
HMB	Hydroxymetylbilane
HMBS	Hydroxymetylbilan syntase, og kalla porfobilinogen deaminase
HRP	Horseradishperoxidase
HUS	Haukeland Universitetssjukehus
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
KV	Kolonnevolum
LB	Lysogeny broth
LKB	Laboratorium for klinisk biokjemi
NAPOS	Nasjonalt kompetansesenter for porfyrisykdommer
PBG	Porfobilinogen
PBGD	Porfobilinogen deaminase
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCT	Porfyria cutanea tarda
PV	Porfyria variagata
REK	Regionale komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
URO	Uroporfyrinogen

Innhald

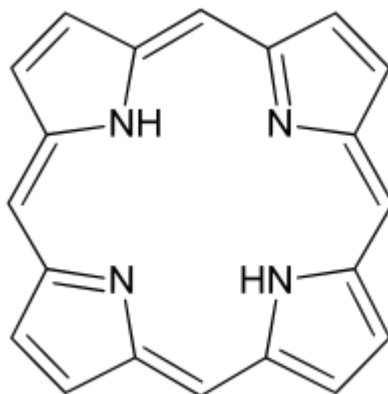
1 INNLEIING	1
1.1 Porfyri.....	1
1.1.1 Porfyriener	1
1.1.2 Hemesyntesen.....	2
1.1.3 Dei ulike porfyrisjukdommane.....	4
1.2 Akutt intermitterende porfyri	6
1.2.1 Diagnostikk og behandling.....	7
1.3 Hydroxymethylbilane synthase	9
1.3.1 Utvalte mutasjonar i HMBS – genet	11
1.3 Hensikt og problemstilling	15
1.3.1 Hensikt	15
1.3.2 Problemstillingar	15
2 MATERIELL OG METODAR.....	16
2.1 Materieil	16
2.2 Metodar	17
2.2.1 Setestyrt mutagenese, transformering og plasmidrens	17
2.2.2 Sekvensering	21
2.2.3 Uttrykking og reinsing av protein	22
2.2.4. Gelfiltrering av protein.....	26
2.2.5 Protein-gelelektroforese/ Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....	26
2.2.6 Immunoblotting	27
2.2.7. HMBS-enzymassay	28
2.2.8 Analyse av ALA/PBG i urin	31
2.2.9 Bradford proteinbestemming.....	33
2.2.10 Circular Dichroism spektroskopi	33
2.2.11 Statistikk.....	34
3 RESULTAT	35
3.1 Setestyrt mutagenese, uttrykking og reinsing av wt HMBS og utvalte mutantar.....	35
3.2 Metodeoptimalisering av enzymassay	38
3.2.1 Varierende mengde enzym (HMBS).....	39
3.2.2 Varierende mengde substrat (PBG).....	39
3.2.3 Tidsskurver	40
3.2.4 Ulik pH på Hepesbuffer	41
3.2.5 PBG stabilitet	41
3.2.6 Oksidering med benzoquinone.....	43
3.2.7 Absorbans versus fluoriscens	44
3.4 Karakterisering av wt og utvalte mutantar	45
3.4.1 Standardkurve med uroporfyrin I.....	45
3.4.2. Enzymmålingar	46
3.4.2 Stabilitetsmålingar.....	50
3.4.3 Oppsummering karakterisering av rekombinante enzym.....	53
3.5 Pasientdata.....	53
4. DISKUSJON	56
4.1 Rekombinant enzym.....	56
4.2 Pasientdata.....	61
4.3 Fenogentotype samanhengar	63
5. KONKLUSJON	65
5.1 Framtidige aspekt for forskingsgruppa	65

1 INNLEIING

1.1 Porfyri

1.1.1 Porfyriener

Porfyriener er forstadium til heme og inngår i hemesyntesen. Porfyri er ein samansetning av fire pyrrolringar som er bunde saman av methenbruer (=CH-), (Fig. 1). Denne strukturen blir også kalla ein tetrapyrrol. Dei fire nitrogenatoma i sentrum av pyrrolringen, gjer det mogeleg for porfyrieneret å inkorporere eit metallion. Dersom metallet er jern får ein danna heme [1], men også kobalt (vitamin B12), magnesium (klorofyll) eller sink kan bli sett inn.



Figur 1: Porfyriener sin strukturformel. Molekylet er sett saman av fire pyrrolringar bunde saman av methenbruer til ein tetrapyrrolring.

Porfyriener og heme blir syntetisert i alle celler hos pattedyr, men det er beinmargen og levera som står for hovuddelen av den biosyntetiske aktiviteten. Heme er grunnlaget for ein rekkje ulike strukturar med ulike funksjonar i cella, og i kroppen inngår til dømes heme som prostetisk gruppe i hemoglobin og bidrar til transport og lagring av oksygen. I hemesyntesen finst porfyrienerane i form av porfyrienergener, som er den reduserte forma av molekylet. Dei ulike porfyrienerogenane blir kalla uro-, hepta-, hekso-, penta-, kopro- og protoporfyrienerogen.

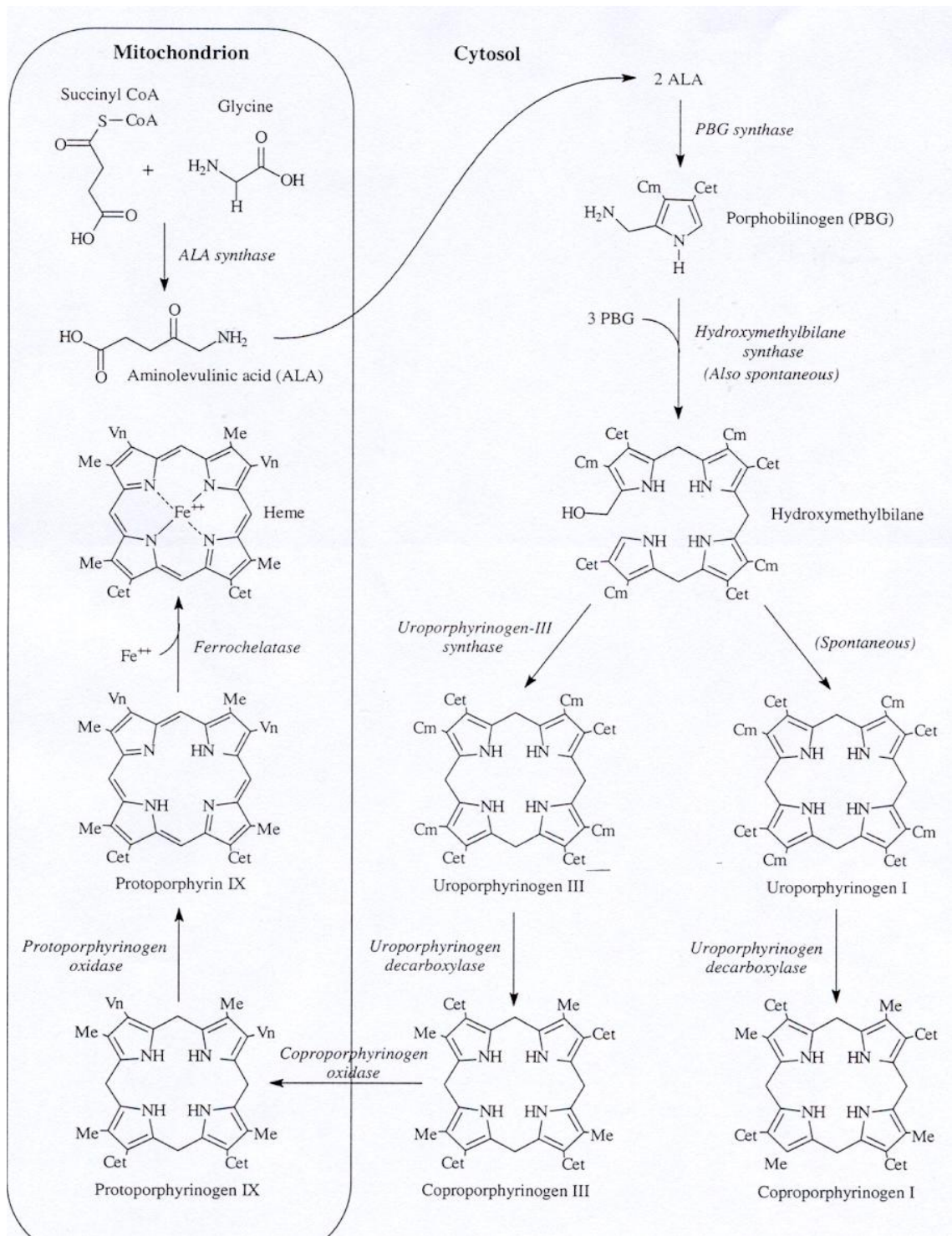
1.1.2 Hemesyntesen

Hemesyntesen er ein kjedereaksjon som er katalysert av åtte ulike enzym, som går føre seg delvis i mitokondriane og cytoplasma (Fig. 2). For kvart av dei åtte enzyma finnast ein arveleg metabolsk sjukdom, porfyri [2] (Tab. 1).

Mitokondria spelar ei sentral rolle i danninga av heme. Det er her sitronsyresukklusen er lokalisert. Syklusen dannar suksinyl-CoA som inngår i det første trinnet i hemesyntesen. Mitokondria inneheld også tre av enzyma som inngår i syntesen; δ -aminolevulinsyre syntase (ALAS), koproporfyirinogen oksidase og ferrokelatase. Celler som manglar mitokondria, slik som dei raude blodcellene, har ikkje moglegheit for å produsere heme [3].

Syntesen startar med danning av δ -aminolevulinsyre (ALA) frå ein kondensering av glysin og suksinyl-CoA katalysert av ALAS i mitokondriane (Fig. 2). ALAS er det hastigheitsbestemmande enzymet i syntesen. Enzymet har lav basal aktivitet og er under negativ tilbakekopling av heme [4]. "Housekeeping" ALAS (ALAS1) er koda for av eit gen på kromosom 3 og finst i alle celler unntatt dei erytroide. ALAS2 er erytroidsesifikt og er koda for på X-kromosomet [3].

I det andre steget i syntesen katalyserer enzymet ALA dehydratase (ALAD, synonym porfobilinogen syntase, PBGS) danninga av porfobilinogen (PBG) frå to molekyl av ALA. Dette skjer i cytosol. ALAD kan bli inhibert av tungmetall, spesielt bly. Tredje enzym i syntesen er hydroxymetylbilane syntase (HMBS, synonym porfobilinogen deaminase; PBGD). Dette fører til at ein får danna hydroxymetylbilane (HMB) frå fire molekyl av PBG. Dette trinnet blir gjennomgått seinare i oppgåva. I det fjerde steget katalyserer uroporfyirinogen-III syntase (UROIII-syntase) omdanninga av HMB til uroporfyirinogen III som er ein lukka ringstruktur. I tillegg får ein danna ein type I isomer, dette skjer uenzymatisk [1]. I steg fem blir uroporfyirinogen dekarboksylert av uroporfyirinogen dekarboksylase for å danne koproporfyirinogen III. Det sjette enzymet i hemesyntesen er koproporfyirinogen oksidase som er lokalisert til mitokondria sin indre membran. Dette enzymet katalyserer oksidering av to av dei fire etylkarboksylat gruppene til vinyl grupper. Dette resulterer i eit meir lipofilt protoporfyirinogen IX i ein prosess som krev oksygen. Protoporfyirinogen IX blir vidare omdanna til protoporfyirin IX ved hjelp av enzymet protoporfyirinogen oksidase. Til slutt får ein satt inn jern (Fe^{2+}) i protoporfyirin med hjelp frå enzymet ferrokelatase, det siste enzymet i hemesyntesen. Ferrokelatase er spesifikt mot Fe^{2+} [1].



Figur 2: Hemesyntesen [1].

1.1.3 Dei ulike porfyrisjukdommane

Det finst til saman åtte ulike porfyrisjukdommar, som anten er arvelege eller erverva. Enzymdefektane vil resultere i overproduksjon av hemeforstadium i beinmargen for dei erytropoietiske porfyriane, og i levera hos dei hepatiske porfyriane. På bakgrunn av symptoma og det kliniske biletet kan ein dele inn i akutte og kutane porfyriar. Pasientar som får opphoping av forstadium, som ALA og PBG, før danning av tetrapyrrolar får akutte symptom ofte i form av akutte magesmerte, kvalme, forstopping eller forvirring, medan pasientar som får opphopingar av intermediat seinare i syntesen etter danning av tetrapyrrolar får kutane symptom.

Innanfor dei akutte porfyriane finn ein sjukdommane ALA dehydratasemangel (plumboporfyri), akutt intermitterende porfyri (AIP) (blir omtala i eit eige kapittel under), porfyria variagata (PV) og hereditær koproporfyri (HCP). Akutte symptom opptre hos alle dei akutte porfyriane, medan pasientar med PV (60 %) og ein sjeldan gang pasientar med HCP (5 %) kan oppleve hudsymptom i tillegg [5]. Dei reine kutane sjukdommane omfattar erytropoietisk protoporfyri (EPP), porfyria cutanea tarda (PCT), kongenital erytropoietisk protoporfyri (CEP) og X-bunde erytropoietisk protoporfyri. Tabell 1 viser ein oversikt over dei ulike porfyriane, kva enzym som er involvert og kva symptom som viser seg hos pasienten.

Tabell 1: Oversikt over dei åtte ulike porfyri sjukdommane

PORFYRISJUKDOM	ENZYM INVOLVERT (NR I SYNTESA)	SYMPTOM	ARVEGANG
ALA-D mangel	ALA- D (2)	AKUTTE	AUTOSOMAL RECESSIV
AIP	HMBS (3)	AKUTTE	AUTOSOMAL DOMINANT
PV	PPOX (7)	AKUTTE OG KUTANE	AUTOSOMAL DOMINANT
HCP	CPOX (6)	AKUTTE OG KUTANE	AUTOSOMAL DOMINANT
CEP	UROS (4)	KUTANE	AUTOSOMAL RECESSIV
PCT	UROD (5)	KUTANE	AUTOSOMAL DOMINANT EL ERVERVA
EPP	FECH (8)	KUTANE	AUTOSOMAL DOMINANT
X-BUNDET EPP	ALAS2 (1)	KUTANE	X BUNDET DOMINANT

Kvar av dei ulike porfyriane har ein karakteristisk utskiljing av porfyriener og porfyriogen i urin, feces og blod. Karakteristiske funn av porfyriener blir brukt til diagnostisering av pasientar. Den ulike utskiljinga skuldast at for kvart steg i hemesyntesen blir porfyriane mindre og mindre vassløyselege, fram til protoporfyriin og heme som er uløyselege i vatn. På grunnlag av dette akkumulerast eit overskot av forstadium frå tidleg i syntesen i urinen, medan forstadia på slutten av syklusen er å finne i blod, feces og galle [1]. Pasientar med porfyri kan oppleve at urinen får ein raudfarge, noko som skuldast opphoping av porfyriener i urinen. Ordet porfyri kjem av det greske ordet *porphuros* som tyder purpur. Raudleg farge på urin kan ofte vere eit karakteristisk trekk hos pasientar som gjennomgår eit porfyrianfall. For pasientar med porfyri kan det være ein lang veg for å få stilt ein riktig diagnose. Porfyrisymptoma er ofte svært generelle og førekjem også ved ein rekkje andre tilstandar. Dette fører til at pasientane ofte får feil diagnose eller at sjukdommen ikkje blir oppdaga [6, 7].

1.2 Akutt intermitterende porfyri

AIP er ein autosomal dominant sjukdom som fører til om lag 50 % reduksjon i aktiviteten til enzymet HMBS. Det finst både personar som har mutasjon, men ingen symptom, såkalla latent AIP, og personar som har mutasjon og som opplever symptom, kalla manifest AIP. Personar med same mutasjon kan vise ulike kliniske bilete.

HMBS katalyserer danninga av den lineære tetrapyrollen HMB ved PBG polymerisasjon som vidare blir metabolisert anten enzymatisk til uropofyrinogen III, eller ved ein spontan reaksjon til uroporfyrinogen I (Fig. 2) [8].

Tilstanden AIP er å finne over heile verden, men den høgaste førekomsten finn ein i dei nordsvenske kommunane Arjeplog og Arvidsjaur. I desse kommunane finn ein prevalensar på 2000 og 500 per 100 000 innbyggjarar [9]. Den hyppige førekomsten i Sverige har gjort at sjukdommen også har blitt kalla "Swedish porphyria" [10]. I Noreg er prevalensen 10:100 000 (NAPOS).

AIP kan utløysast av mange ulike faktorar, som fysisk og psykisk stress, hormonelle faktorar, medikament og faste [6]. Sjukdommen er karakterisert ved neurologiske symptom, magesmerter og i nokre tilfeller også feber. Magesmerter er det mest vanlege symptomet og er ofte starten på eit akutt anfall. AIP er meir vanleg hos kvinner enn hos menn. Dette skuldast truleg at kvinnelege kjønshormon er blant dei faktorane som kan utløyse akutte anfall hos pasientar [11]. Dei fleste, både gutar og jenter, opplever fyrste utbrot av symptom fyrst etter puberteten.

Når behovet for heme aukar, som ved alkohol- eller medikamentbruk, blir hemesyntesen oppregulert. Enzymet ALAS, som er det hastigheitsregulerande enzymet, blir som nemnt regulert ved negativ tilbakekopling av mengda heme i cella [10].

Dersom ALAS1 blir indusert hos ein pasient med AIP med nedsett aktivitet av HMBS, klarar ikkje enzymet (HMBS) å følgje opp denne auken i hemesyntesen. Difor blir HMBS den nye hastigheitsbestemmande faktoren i syntesen, med opphoping av ALA og PBG som resultat. Symptoma ved akutte anfall kan koplast mot ein neurologisk dysfunksjon [2]. I dag er den ledande hypotesen at det er ALA eller andre metabolittar som blir overproduisert av levera som er nevrotoksiske [12]. Eit teikn på dette kan være at pasientar som har gjennomgått levertransplantasjon blir kvitt sin AIP [13].

1.2.1 Diagnostikk og behandling

1.2.1.1 Diagnostisering av AIP

Det kan i mange tilfeller vere vanskeleg å stille diagnosen AIP. Hos mange av pasientane som har sjukdomsanfall vil auka utskiljing av ALA og PBG i urinen vere karakteristisk, men hos ca 1/3 av pasientane vil desse verdiane vere i referanseområdet under anfall, men ein reknar med at ved kraftige anfall vil PBG i urinen alltid auke. Ein nyttig parameter for å stille diagnosen vil derfor vere å måle PBG i urin.

Fordi pasientar med AIP har uspesifikke symptom som også kan opptre hos andre pasientgrupper kan det vere vanskeleg for ein lege å kople det opp til porfyri. Når dette i tillegg er ein sjeldan tilstand er det ikkje alle legar som er kjende med den. Dersom pasienten har opplysningar om familiemedlemmar med porfyri kan dette vere nyttig i diagnostiseringa. Familiescreening kan hindre akutte anfall hos personar med ein latent sjukdom. Genetisk undersøking for å identifisere mutasjonen er derfor viktig [14]. For ein pasient med eit akutt anfall er det svært viktig å få stilt riktig diagnose. Forsinkingar i behandling av pasienten kan føre til nevrologisk skade, og i verste scenario dødsfall [15]. Ein porfyridiagnose bør alltid vurderast hos ein pasient som opplever uforklarlege magesmerter, men undersøkingar for AIP eller andre akutte porfyriar er gjerne dei siste diagnosane som blir vurdert etter at pasienten har vore gjennom uendeleg mange undersøkingar som ikkje har gitt resultat. I nokre tilfeller har også pasienten gjennomgått operasjonar i magen, utan at legane kan forklare smertene pasienten opplever. Dersom pasienten har andre kjenneteikn på akutt porfyri som til dømes høgt blodtrykk, hyponatremi eller lammingar kan dette lettare føre legen i retning av porfyri. Det er også viktig å kartlegge om pasientens anfall opplevast i forbindelse med menstruasjonssyklus eller oppstart av nye medikament [15].

I løpet av eit akutt anfall vil urinen ofte bli raudleg og konsentrasjonen av PBG auke hos pasientar med manifest AIP. Hos pasientar utan klinisk manifest AIP er det berre om lag 30 % som har auka PBG i urinen [16]. HMBS aktiviteten i erytrocyttane er redusert hos om lag 85 % av dei personane som har testa positivt på HMBS-mutasjonar [11]. Ved misstanke om ein akutt porfyri er det ønskjeleg å undersøke både blod, urin og feces, ettersom kvar porfyri har karakteristiske utskiljingar i disse kroppsveskene. Biokjemisk funn av AIP blir verifisert ved genetisk testing.

1.2.1.2 Behandling av AIP

Den beste "behandlinga" for pasientar med akutte anfall er å unngå kjende faktorar (både endogene og eksogene) som utløyer porfyrianfall. Desse faktorane fører til ein induksjon av ALAS aktivitet, som saman med reduksjonen i HMBS aktivitet, kan indusere eit akutt anfall [4]. For mange pasientar med akutte anfall vil innlegging på sjukehus vere nødvendig. Det er svært viktig at pasientar som gjennomgår akutte anfall av AIP får riktig behandling. Det er ein rekkje medikament som er og kan vere porfyrinogene, og behandling med eit av desse medikamenta kan i verste fall vere fatale. Det er oppretta ein nettbasert database som inneheld informasjon om potensielle sikre og usikre medikament for pasientar med akutte porfyriar: <http://www.drugs-porphyrria.org/> [Nedlasta 10.02.11].

Akutte anfall hos pasientar krev behandling, gjerne ved intravenøs tilførsel av hemin og glukose. Hemin undertrykkjer ALAS aktiviteten i levera og reduserar dermed overproduksjonen av ALA og PBG. Pasienten blir vanlegvis betre i løpet av ein til to dagar med hemin behandling, dersom behandlinga er starta tidleg i utviklinga av det akutte anfallet [15]. Behandling kan også regulerast med høgt inntak av oral eller intravenøst karbohydrat [17].

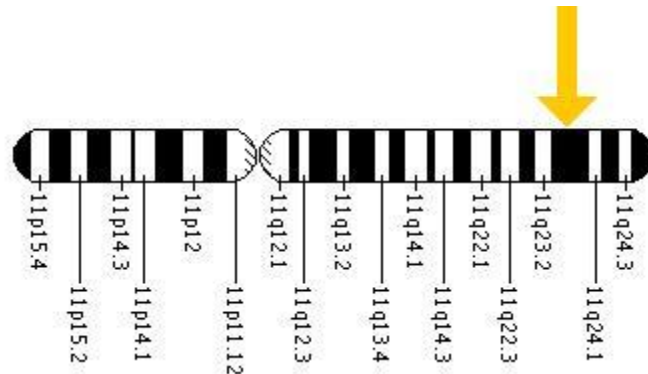
Hos pasientar med gjentatt alvorlege anfall vil det vere aktuelt med levertransplantasjon då effekten av medisinsk behandling er forbigåande og ineffektiv ved irreversibel nevrologisk skade. Levertransplantasjon fører til at pasienten får erstatta dei hepatiske enzymba og kan gjenopprette ein normal ALA og PBG utskiljing [18].

Enzymerstatnings terapi har vore ein suksess hos mange pasientgrupper med arvelege metabolske sjukdommar. I teorien skulle også AIP vere ein god kandidat for denne behandlingsforma, men det har fram til i dag ikkje vore tilfredsstillande resultat på dette området [19].

Nye og betre behandlingsmetodar for pasientar med AIP er ønskjeleg, og genterapi er eit nytt og stort satsingsområde. I dyreforsøk har ein klart å korrigere for det hepatiske genet som forårsakar HMBS defekten hos AIP pasientar ved bruk av adenovirus vektorar [20].

1.3 Hydroxymethylbilane synthase

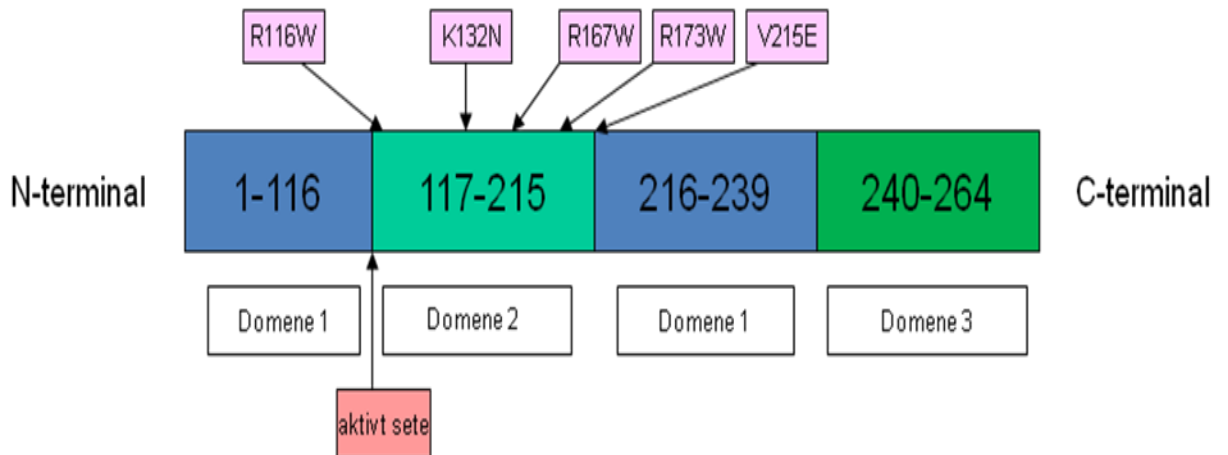
HMBS genet er lokalisert på kromosom 11 q24.1- q24.2 (Fig. 3). Genet er om lag 10 kb langt og inneheld 15 exon [21]. Sjølv om det har blitt rapportert mutasjonar i alle regionar av genet utanom på exon 2, finn ein dei fleste mutasjonane på exon 10 og 12 [22].



Figur 3: Lokalisering av *HMBS* genet (figuren er henta frå National Library of Medicine, U.S)

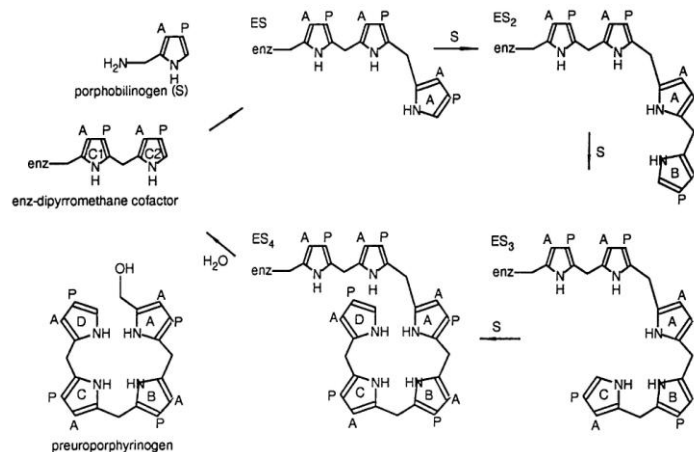
Hos menneske er det funne to ulike isoformer av HMBS. Eit 39 kDa ”housekeeping” enzym og eit 37-kDa erytrocyttspesifikt enzym. Housekeeping HMBS polypeptidet består av 361 aminosyrer, og det erytroide enzymet 344 aminosyrer. Det vil sei 17 fleire aminosyrer på N-terminalen hos housekeeping enzymet [23]. Kva betydning dette har er framleis ukjent.

Det humane HMBS er ein monomer med tre forskjellige domene. Domene 1 (aminosyrer 1- 116 og 216-239), ein hengsleregion, domene 2 (aminosyrer 117-215) og eit C-terminalt, domene 3 (aminosyrer 240-361). Det aktive sete som bind dipyrrometan kofaktoren (DPM) finnast i kløfta mellom domene 1 og 2 (Fig. 4).



Figur 4: Skjematisk struktur av HMBS enzymet. viser antal domene og kva aminosyrer som inngår i dei ulike domena. Lokaliseringa til dei utvalte mutasjonane R116W, K132N, R167W, R173W og V215E er markert på figuren. Mutasjonane blir omtala seinare i kapittelet.

Kofaktoren til HMBS er unik i så måte at den blir danna av HMBS sjølv. Den består av to PBG-molekyl , PBG er og substratet i danninga av HMB. Når kofaktoren er danna blir den kovalent bunde til Cys261 i det humane enzymet og opptrer som ein primer for polymeriseringsreaksjonen kor fire PBG molekyl dannar HMB (Fig. 5). HMBS med DPM kofaktoren bunde til seg blir kalla eit holoenzym, medan det tomme enzym blir kalla eit apoenzym. DPM kofaktoren bind irreversibelt til enzymet, den forsvinn ikkje i løpet av katalysen [23].



Figur 5: Danning av HMB. HMBS katalyserer den sekvensielle kondenseringa av fire PBG molekyl gjennom fire enzymintermediat kompleks (ES) for å danne HMB. Figuren er henta frå [24].

HMBS har ein høg termostabilitet med ein T_m -verdi på over 70°C , og enzymet har eit pH optimum på 8,2 [25]. Aminosyrer som er essensielle for folding og stabilitet til proteinet er aminosyrer ein finn i den hydrofobe kjernen, i svingar og i andre områder som styrer konformasjonen til proteinet. Mutasjonar i desse aminosyrene kan føre til unormal folding og nedbryting av ustabile protein [26], mens mutasjonar i det aktive setet kan hindre binding, reaksjon og tilpassing av kofaktoren og substrat. I fråver av den stabiliserande påverknaden DPM kofaktoren har, vil det opphavlege ustabile apoenzymet kunne bli denaturert og nedbrote intracellulært. Kofaktoren er viktig både for enzymaktivitet og for oppretthalding av proteinestabilitet [27].

1.3.1 Utvalte mutasjonar i HMBS – genet

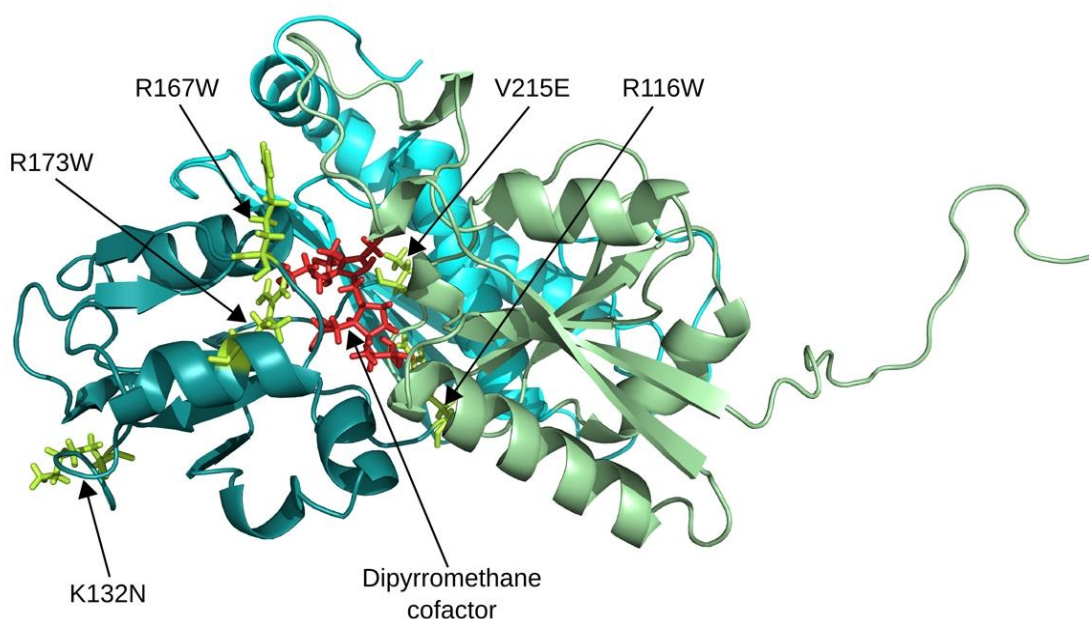
Det er fram til i dag funnet over 300 ulike mutasjonar i *HMBS* genet som forårsakar AIP [28], av disse er 28 mutasjonar registrert i Noreg. Mutasjonane er lokalisert kring det aktive setet, der dei kan påverke eller hindre kofaktoren og substratet i å binde seg delvis eller fullstendig. Ein finn og mutasjonar lokalisert utanfor det aktive setet som kan påverke enzymet sin stabilitet, folding og fleksibilitet.

I denne oppgåva har ein valt å studere mutasjonane R116W, K132N, R167W, R173W og V215E, kor K132N og V215E er to nye mutasjonar som er funne i den norske befolkninga. Alle fem mutasjonane er rapportert i den norske populasjonen.

Tabell 2: Utvalte mutasjonar av HMBS som blir studert i masteroppgåva

Aminosyre	Base (cDNA)	Kommentarar	Referanse
R116W	C346 C>T (exon 8)	<ul style="list-style-type: none">• lokalisert i aktivt sete• tap av interaksjon med E250.• 1,4 % enzymaktivitet• 20 pasientar med manifest AIP	[29] [21]
K132N	C398 G>C (exon 8)	<ul style="list-style-type: none">• lokalisert på overflata på domene 2, langt frå det aktive setet• sekvens variant funnet i 15 familiemedlemmar, men berre indekspasienten har biokjemiske funn som tyder på AIP• klinisk signifikans ukjent	Haukeland Universitetssykehus Upubliserte data
R167W	C499 C>T (exon 10)	<ul style="list-style-type: none">• lokalisert i det aktive setet involvert i binding av kofaktor• 4 pasientar med manifest AIP.• milde symptom	[30]
R173W	C517 C>T (exon 10)	<ul style="list-style-type: none">• lokalisert ved aktivt sete• høg biokjemisk og klinisk penetrans• involvert i binding av kofaktor til aktivt sete• ingen aktivitet• 4 pasientar med manifest AIP	[31]
V215E	C644 T>A (exon 11)	<ul style="list-style-type: none">• lokalisert ved aktivt sete• stor norsk familie• 18 pasientar med manifest AIP, og 13 med latent AIP (asymptomatisk)	Haukeland Universitetssykehus Upubliserte data

Dei fem mutasjonane i denne studien representerar; 1) mutasjonar rundt det aktive setet som kan interferere med optimal binding av kofaktor eller substrat 2) mutasjonar som ligg langt vekk frå det aktive setet som kan påverka folding og/eller fleksibiliteten til proteinet. Kor i enzymet ein finn mutasjonane er visuelt framstilt i ein modifisert modell av HMBS laga av Helene Bustad Johannessen og Lars Skjærven i vår gruppe (Fig. 6).



Figur 6: Modifisert modell av HMBS: Modellen er basert på fleire malar (PDB ids: 1AH5, 1PDA, 1GTK, 1YPN, 3ECR, og 3EQ1). Modifiseringa består av innsetjing av aminosyrer som ikkje er plassert i X-ray strukturen. Til dette er det brukt eit Peptid Fragmentation Modeller program. Figuren viser i tillegg dei utvalte mutasjonane. DPM kofaktoren plassert i det aktive setet er markert med rødt.

1.3.1.1 Mutasjonane

Arg116

Arg116 dannar ionepar med Glu250. Denne interaksjonen bidrar til å fiksere det C-terminale domenet til hengsleregionen noko som lettar prosessen der substratet entrar det aktive setet [23]. Mutasjonen R116W eliminerar ionepardanninga mellom aminosyra i posisjon 116 og Glu250, dette medfører at proteinet destabiliserast. Det er rapportert låg aktivitet hos enzym med denne mutasjonen *in vitro* [32].

Lys132

Mutasjonen K132N er ikkje tidlegare studert. Den har blitt observert i 15 tilfelle ved Haukeland Universitetssjukehus, men så langt er det berre ein pasient som viser teikn til symptom på AIP. Utanom denne pasienten virka mutasjonen ikkje å korrespondere med kliniske eller biokjemiske indikatorar som ein vanlegvis finn hos pasientar med AIP. Mutasjonen er lokalisert på overflata av domene 2 og ligg langt frå det aktive setet.

Fordi mutasjonen er å finne langt frå det aktive setet, vil ein tru at dette kan påverke struktur og stabilitet.

Arg167

Arg167 inngår i sjølve enzym syntesen. Aminosyra er viktig i prosessen med å katalysere bindingsdanning, bryting og translokalisasjonar i oppbygginga av tetrapyrrolen. R167W mutasjonen er lokalisert i det aktive setet. *In vitro* studiar av mutanten har vist redusert aktivitet samanlikna med wt-HMBS [33, 34].

Arg173

Amid nitrogen i Arg173 dannar hydrogenbinding med karboksyl oksygen av propionsyre i sidekjeda til C1 i ringen til kofaktoren. Enzym med punktmutasjonen R173W funne hos pasientar med AIP er inaktiv [35]. Hovudgrunnen til at denne mutasjonen er inaktiv er truleg ein redusert mulighet for å interagere med kofaktoren. Dette er også funne i mutasjonen R173Q [28, 36]. Ein antek difor enzymet for å vere ein tett tilnærming til ei apoform.

Val215

Den siste mutasjonen V215E er heller ikkje studert tidlegare. Denne mutasjonen er funne i ein stor norsk familie. V215 er i nærheita av kofaktoren lokalisert i den inste delen av det aktive sete, og ein mutasjon her forventas å kunne påverke enzymaktiviteten [25]. Det har tidlegare vore studert ein annan mutasjon på denne staden, V215M. Enzymaktiviteten til sistnemnte mutant utgjorde 19 % av aktiviteten til villtypen. I tillegg viste mutanten seg å være ekstremt termolabil [21, 25].

1.3 Hensikt og problemstilling

1.3.1 Hensikt

Hensikta med denne masteroppgåva var å kartlegge funksjonelle og termodynamiske eigenskapar knytt til det rekombinante villtype enzymet og utvalte mutantar. Saman med biokjemiske pasientresultat frå Norsk Porfyriregister på disse mutantane ønska ein å studere feno-genotype samanhengar for å betre kunne forstå mekanismane bak kvar av mutasjonane.

Masterstudiet er ein del av eit større prosjekt, der hovudmålet er å kunne utvikle eit forbetra behandlingstilbod til pasientar med manifest AIP, samt forhindre utbrot hos personar med latent AIP. Dei biokjemiske undersøkingane gjort i mastergraden vil være av stor nytte for vidare arbeid i forskingsgruppa.

1.3.2 Problemstillingar

1. Kartlegge forskjellar mellom rekombinant villtype HMBS og mutantane R116W, K132N, R167W, R173W og V215E med omsyn til:
 - Enzymaktivitet og
 - Termostabilitet
2. Samanlikne resultat frå rekombinante enzym med pasientdata frå Norsk Porfyriregisteret og prøve å karakterisere/klassifisere dei nye AIP mutasjonane i den norske befolkninga.

2 MATERIELL OG METODAR

2.1 Materieil

- ALA/PBG by Column Test, (BioRad)
- Ampicillin Sodium salt (Sigma-Aldrich)
- Antistoff til WB
 - HMBS antibody, ab 76073 (Abcam plc)
 - HPR conjugated anti-Rabbit IgG (Abcam plc)
- Benzoquinone (Sigma-Aldrich)
- BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
- BioRad proteinbesemning (BioRad)
- BL21 Star™ *E. coli* celler (Invitrogen)
- Complete protease inhibitor cocktail (Roche Ltd)
- Glutation-sepharose™ 4B (GE Healthcare, Bio-Science AB)
- Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Sigma-Aldrich)
- Kloramfenikol (Sigma-Aldrich)
- LB-Agar (Sigma Life Science)
- LB-Broth (Sigma Life Science)
- Porfobilinogen (PBG) (Frontier Scientific Inc)
- PD-10 Desalting columns
- Pefa-blokker (Pefabloc SC plus, Roche)
- Plasmid: Wt HMBS pGex-4T-1. Dette var ei sjenerøs gåve frå Ulbrichova D. *et al.* [37].
- pGEX-4T-1 sekvenseringsprimere (GE Healthcare Life Sciences)
- Plasmidrens: Wizard Plus SV. Minipreps (Promega)
- 10 % Polyakrylamidgel (10% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel , BioRad)
- Precision Plus Protein™ Unstained Standards (BioRad)
- Primere (Invitrogen)
- QuikChange™ Site-Directed mutagenesis kit (Stratagene)
- Sodium dodecylsulfate (SDS) (BioRad)
- Trombin (Sigma-Aldrich)
- Urophorpyrin I Dihydrochloride (Frontier Scientific Inc)
- Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices (Millipore Corporation)

Andre kjemikalie som blei brukt til tillaging av buffer og reagens blei kjøpt av Sigma-Aldrich og Merck. Buffer og reagens som er brukt i oppgåva finnes i appendiks. For å hente ut data frå Norsk Porfyriregister blei det sendt søknad til regionale komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK). Søknaden blei behandla og godkjent.

Tabell nr 3: Primere brukt til Setestyrte mutagenese

Mutasjon	Sekvens
R116W-rev	5'- CATGAGGGTTTTCCC A CTTGCAGATGGCTCCG- 3'
R116W-for	5'- CGGAGCCATCTGCAAG T GGGAAAACCCTCATGATG-3'
K132N -rev	5'- CAGGGTTTCTAGGG T TTCCCAACAAATTTGGGTG- 3'
K132N-for	5'- CAAAATTTGTTGGGAA C ACCCTAGAAACCCTGC- 3'
V215E-rev	5'- GGCCCCCTGGCC C TAGCATAACATGC- 3'
V215E-for	5'- GCATGTATGCTG A GGGCCAGGGGGCCTTG- 3'
R167W-rev	5'- GGTGTTGAGGTTTCC C AAATACTCCTGAAC- 3'
R167W-for	5'- CAGGAGTATT T GGGGAAACCCTCAACACC- 3'
R173W-rev	5'- CCAGCTTCCGAAG C AGGTGTTGAGGTTTCC- 3'
R173W-for	5'- GGAAACCTCAACAC C TGGCTTCGGAAGC- 3'

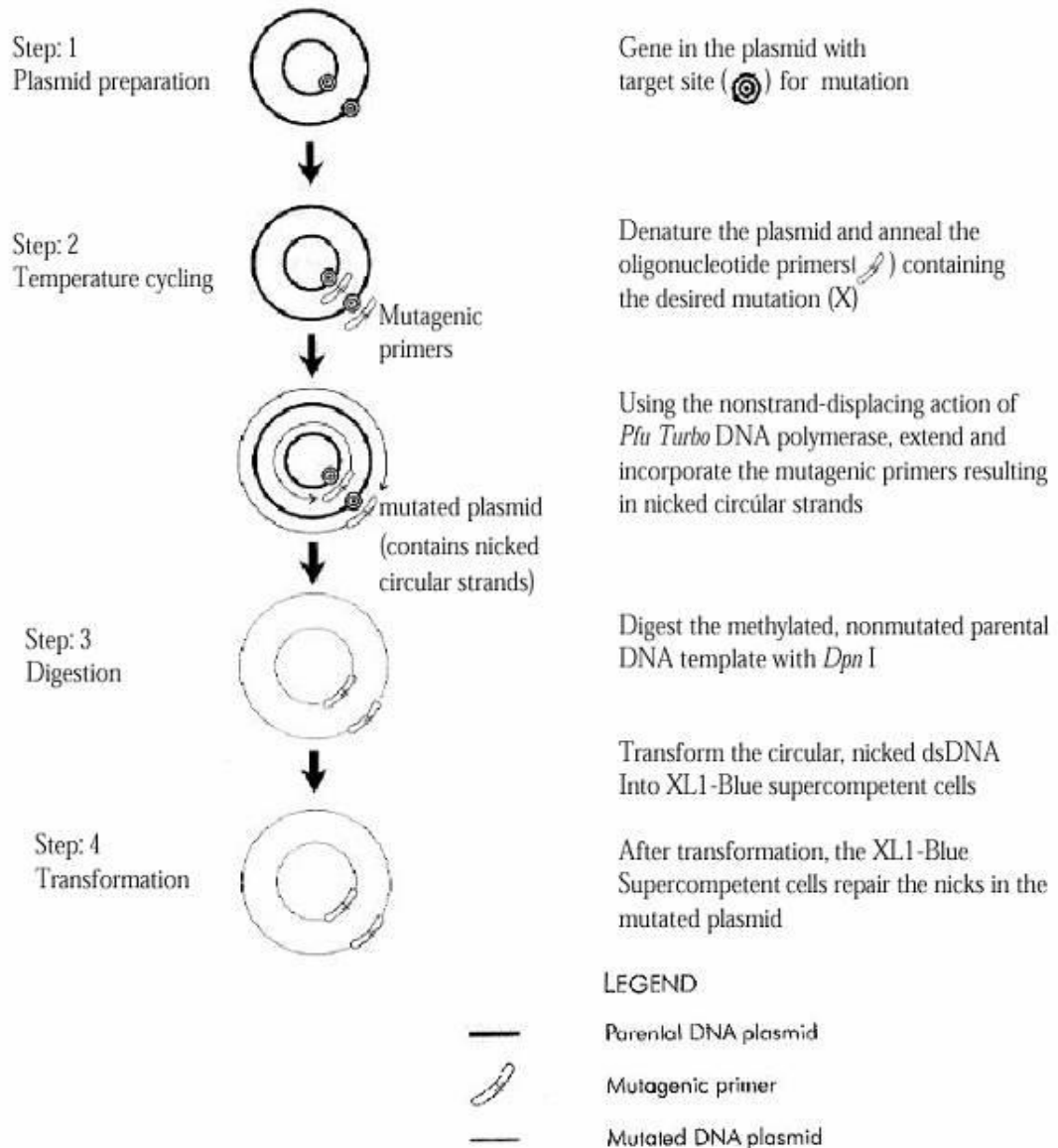
Primerane blei produsert av Invitrogen, rev = revers, for = forward primer

2.2 Metodar

2.2.1 Setestyrte mutagenese, transformering og plasmidrens

Setestyrte mutagenese er ein *in vitro* teknikk brukt for å manipulere inn mutasjonar i eit protein for å til dømes kunne samanlikne samanhengar mellom struktur og funksjon hos ein villtype og ein mutant. Setestyrte mutagenese kan bli nytta som her til å danne punktmutasjonar som fører til byte av aminosyrer på proteinnivå og til å introdusere innsetingar og delesjonar av enkle eller fleire basar. Prosedyren anvende to komplementære oligonukleotidprimere som inneheld mutasjonen av interesse. Kettet som blei brukt til den setestyrte mutagenesen er inndelt i 4 fasar (Fig. 7). I den første fasen blir det genet ein ønsker å mutere (HMBS) innsett i ein vektor. I trinn to som er ein Polymerase Chain Reaction (PCR) reaksjon introduserast den ønska mutasjonen ved hjelp av dei tillaga primerane. Her denaturerast plasmidet etterfølgt av ein annealing av primeren som inneheld den aktuelle mutasjonen. PfuTurbo DNA polymerase forlengar og inkorporere mutageneseprimerene. Dette resulterer i sirkulære DNA-trådar. I tredje fase skjer det ein nedbryting med DpnI, ein endonuklease spesifikk mot metylert DNA.

Sidan det berre er det ny-syntetiserte DNAet som ikkje er metylert, vil ein såleis berre bryte ned det metylerte, altså det ikkje-muterte DNA-templatet, Til slutt blir det sirkulære, brotne dsDNA transformert inn i kompetente celler. Dei kompetente cellene reparerer brota i det muterte plasmidet



Figur 7: Setestyrte mutagenese ved bruk av QuikChange™ Site-Directed mutagenesis kit frå Stratagene

2.2.1.1 Utføring

Primer design

For å designe oligonukleotidprimere til mutagenesen blei programmet Vector NTI frå Invitrogen nytta. Primerane som ein nyttiggjer seg av i setestyrte mutagenese må vere designa etter visse krav for å oppnå eit best mogeleg resultat:

1. Primeren bør være mellom 25 og 45 baser i lengde.
2. Smeltetemperaturen (T_m) til primeren bør være større eller lik 78°C for at primeren skal være mest mogleg stabil.
3. Den ønska mutasjonen bør liggje i midten av primeren med om lag 10-15 baser på kvar side.
4. Primeren bør ha minimum 40 % innhald av GC basar og bør ende med ein eller fleire G- eller C- basar.

Namnet på mutasjonen seier noko om endring av aminosyre i sekvensen. Til dømes vil mutasjonen R167W fortelje oss at aminosyre nr 167 er endra frå arginin (R) til tryptofan (W)

Tillaging av agarskåler med ampicillin.

LB-agar pulver blei løyst som angitt på pakningen (20 g/l ddH₂O). LB-agaren blei autoklavert, tilsatt 0,1 % steril Ampicillin (50 mg/ml), og fordelt i skåler som sto i 45 minutt ved romtemperatur med lokket halvvegs av, før oppbevaring i kjøleskåp.

Mutagenese

Prøvereaksjonen blei laga til som følgjer:

- 5 μl av 10x reaksjonsbuffer
- X μl av wt plasmid (brukte 25 og 50 ng av plasmid wt-HMBS-pGex-4T-1)
- 1,25 μl av revers primer (100 ng/ μl)
- 1,25 μl av forward primer (100 ng/ μl)
- 1 μl av dNTP mix
- + ddH₂O til final volum på 50 μl

Reaksjonen blei starta ved å tilsette 1 μl av *PfuTurbo* DNA polymerase (2,5 U/ μl).

Reaksjonsblandinga blei sett på PCR maskinen på program som følgjer:

Trinn	Syklus	Temperatur	Tid
1	1	95°C	30 sekunder
2	12	95°C	30 sekund
		55°C	1 minutt
		68°C	9 minutt
4	1	4°C	∞

PCR-produktet blei tilsett 1 µl av restriksjons enzymet DpnI (10U/µl), før ein spant ned i en mikrosentrifuge i 1 minutt og inkuberte blandinga ved 37°C i 1 time.

Transformering av E.coli XL1-Blue Superkompetente celler

XL1-Blue superkompetente celler blei tina på is. 50 µl av cellene blei overført til avkjøla eppendorfrøyr, og tilsett 1 µl av DpnI-behandla PCR-produkt. Ein blanda forsiktig og inkuberte på is i 30 minutt før blandinga vart sett i 42°C vassbad i 45 sekunder.

Cellene blei så inkubert på is i 2 minutt, tilsette 0,5 ml av oppvarma Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC) medium (appendiks) og inkubert 1 time ved 37°C på rystar 225-250 rpm. 100- 250 µl av transformasjonsblandinga blei overført til agarskåler med ampicillin, og inkubert i varmeskap 37°C > 16 timar.

Dyrking av transformerte celler

Neste dag blei agarskålene inspisert; kun *E.coli* som har tatt opp plasmid kan vokse på agar skåler tilsatt ampicillin. Ein enkelt koloni *E.coli* blei overført til 10 ml sterilt LB-medium tilsett 40 µl ampicillin (50 mg/ml). Bakteriane blei inkubert over natt på rysteinkubator (200 rpm) ved 37°C og brukt til reinsing av plasmid.

Plasmid reins

Til plasmidreinsen blei det brukt eit kit frå Promega (Wizard Plus SV).

Bakteriekulturen blei sentrifugert ved 4000 rpm i 15 minutt. Pelleten blei så løyst i 250 µl ” Cell resuspension solution”, før ein overførde løyninga til 1,5 ml eppendorfrøyr.

Denne løysninga blei tilsett 250 µl ”cell lysis solution” og inkubert ved romtemperatur (RT) i 1-5 minutt til den var blitt klar. Sette vidare til 10 µl av enzymet ”Alkaline protease”. Løysninga blei blanda ved å invertere 4x før den blei satt til ny inkubering i 5 minutt ved RT. Til slutt blei 350 µl ”Neutralisation solution” tilsett, blanda og sentrifugert i 10 minutt, 14 000 rpm, (RT).

Lysatet blei overført til spinnkolonna , sentrifugert i 1 minutt, 14 000 rpm, RT, før det blei tilsett 750 µl ”Washsolution” til kolonnen. Sentrifugerte igjen 1 min, 14 000 rpm, RT før ein tilsette 250 µl ”Washsolution” til kolonnen. Deretter sentrifugerte ein i 2 min, 14 000 rpm, RT. Kollonna blei så overført til eit sterilt 1,5 ml eppendorfrør, og DNA eluert ut med 100 µl ”nuklease fritt vann” (14 000 rpm, 1min, RT). DNA-løysninga blei oppbevart ved -20°C. DNA reinheit og konsentrasjonen blei målt ved hjelp av NanoDrop 2000c spektrofotometer frå Thermo Scientific.

2.2.2 Sekvensering

For å verifisera mutasjonane blei plasmida sendt til sekvensering ved Universitetet i Bergen sin sekvenslab ved Høgteknologisenteret i Bergen (HIB). Sjølve sekvensreaksjonane blei satt opp i eigen lab etter Big-Dye version 3.1 sequencing protocol frå Applied Biosystems.

Det blei sett opp to reaksjonar, ein forward og ein revers:

Reagens	Kvantitet
Big – Dye version 3.1	1 µl
Sequencing buffer	1,5 µl
Template (plasmid DNA)	200 ng (2 µl)
Primer (forward eller revers)	0,5 µl
ddH ₂ O	5 µl
Total	<u>10 µl</u>

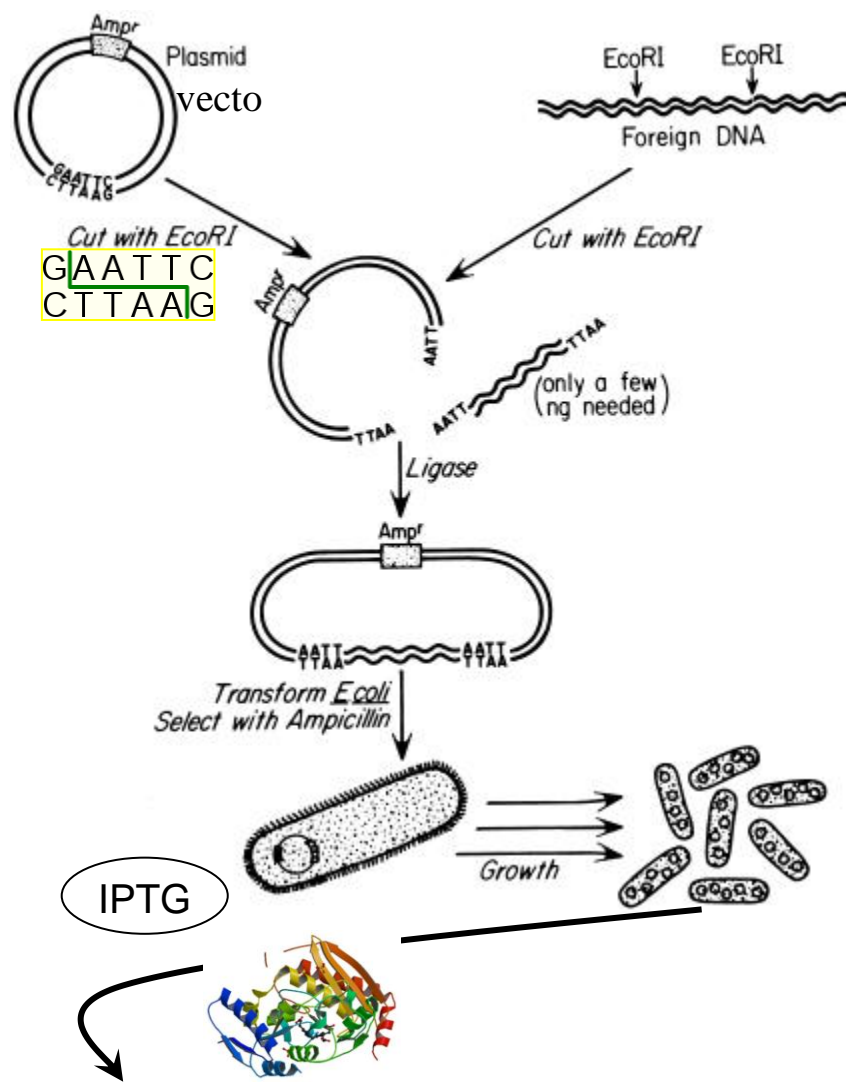
PCR program

1		96°C, 5 min
2	25 syklusar	96°C, 10 sek
		50°C, 5sek
		60°C, 4 min
3		4°C

Prøvane blei fortynna med 10 µl ddH₂O før levering til HIB.

2.2.3 Uttrykking og reinsing av protein

I denne oppgåva blei det brukt eit Glutathione S-Transferase gensystem (GST) for uttrykking og reinsing av det utvalte proteinet. Dette er eit system som er designa for å uttrykke protein i fusjon med Schistosoma japonicum GST i *E.coli* celler. Etter uttrykking av proteinet, kan fusjonsproteinet bli reinsa ved hjelp av affinitetskromatografi, her brukt Glutation-sepharoseTM 4B. pGeX plasmidet som ein gjorde seg nytte av i denne studien inneheldt eit sete mellom GST-domenet, og kloningssete som kodar for kutting med trombin. Dette gjer det mogeleg å klippe det aktuelle proteinet frå fusjonsproteinet (GST) etter reins. Vektoren er også resistent mot ampicillin noko som skuldast ein beta lactamase genregion.



Protein uttrykking

Figur 8: Uttrykking av protein. Det utvalte genet blir sett inn i eit plasmid, som vidare blir transformert i *E.coli* celler. IPTG blir tilsett for å indusere ekspresjon av proteinet, og etter hausting, lysering, og reins sitter ein igjen med eit reint protein.

Transformasjon av E.coli BL 21 star celler

Wt-HMBS proteinet og dei utvalte mutantane blei uttrykt i kompetente *E.coli* BL 21 Star (DE3)pLysS celler frå Invitrogen. Dei kompetente cellene og det aktuelle plasmidet for transformasjonen blei tina på is i 30 minutt, før ein overførde 5 µl plasmid til 50 µl av celler. Prøvane blei inkubert i 30 minutt på is, 35 sekund i vassbad (42°C) og så

tilbake på is i 2 minutt. Tilslutt blei det tilsett 0,5 ml SOC og prøvane blei inkubert ved 37°C i 1 time.

Dyrking av transformerte bakteriar

Ein forkultur bestående av 250 µl transformert *E.coli* og 50 ml LB-medium tilsett 50 µl ampicillin (100 mg/ml) og 100 µl kloramfenikol (34 mg/ml) blei starta. For dyrking av bakteriane blei forkulturen sett til risting (180 rpm) ved 37°C over natt.

Neste dag blei forkulturen overført til ein hovudkultur (1l LB-medium med same antibiotika) og blei ståande på rystar ved 180 rpm og 37 °C til OD₆₀₀ var mellom 0,8-1,0. Då blei det tilsatt 1mM steril isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) for å indusere ekspresjon av proteinet. Hovudkulturen tilsett IPTG blei inkubert vidare ved 28°C, 180 rpm over natt.

Hausting av E.coli

Bakteriekulturen blei overført til 1l plastsentrifugerøyr med kork og sentrifugert ved 4000 rpm, 10 min, 4°C. Pelleten blei løyst i 5 ml vaskebuffer (appendiks), overført til 50 ml rør og sentrifugert ved 4000 rpm i 15 min. Pelleten kunne no frysast ved – 20°C til seinare bruk eller brukast vidare direkte for proteinreins.

Lysis v/ sonikering

Lyserings og homogeniseringsprosessen blei gjort på is. Pellet blei løyst i 10 ml iskald homogeniseringsbuffer (appendiks), og homogenisert for hand ved hjelp av ein Potter-Elvehjem homogenisator. Homogenatet blei overført til 30 ml plastrøyr (SS- 34 rør), og lysert ved sonikering med Vibra-Cell™ Ultrasonic processor (Sonics & Materials, Inc) etter følgjande vilkår:

- Sonikatorstav, 1 cm i diameter
- Pulser: 9 (varigheit)
- Amplitude: varierast til ca 70 for output på 20 W
- Pulserer i 3 x 45 sek og med 45 sek pause mellom kvar gong

Sonikatet blei sentrifugert ved 14 000 rpm, 4°C i 45 minutt og supernatanten fortynna med det resterande av homogeniseringsbufferen for vidare reins av proteinet.

Reins på Glutathion-Sepharose 4B kolonne

Den lyserte proteinløsninga blei applisert med ein pumpehastigheit på 0,4 ml/min på ein 5 ml Glutathion-Sepharose 4B gel kolonne. Kolonnen blei vaska med phosphate buffered saline (PBS) (appendiks) tilsett 1 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) over natt ved 0,5 ml/min.



Figur 9: Reins av wt-HMBS ved hjelp av affinitetskromatografi.

Fjerning av fusjonsproteinet

Neste dag blei kolonnen først vaska med 2 kolonnevolum (KV) PBS (0,4 ml/min) og deretter ekvilibrert med 2 KV klippebuffer (appendiks)(0,4 ml/min). Etter vask blei kolonnematerialet overført til et 15 ml røyr med kork og tilsett ytterlegare 5 ml klippebuffer (5 ml gel + 5 ml klippebuffer, totalt 10 ml) og tilsett 100 U trombin. Prøven blei så inkubert ved 4°C på rotasjon i 1 time og så sentrifugert i 10 min ved 1 000 rpm (Kubota 2010, KUBOTA Corporation). Deretter tok ein av supernatanten og tilsette Pefabloc (0,1-0,5 mg) for å stoppe effekten av trombin. Supernatanten blei oppkonsentrert ved Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices til passende proteinkonsentrasjon. Konsentrasjonen blei målt ved A_{280} på NanoDrop spektrofotometer og lagra i flytande N_2 fram til proteinet skulle nyttast.

2.2.4. Gelfiltrering av protein

Gelfiltrering er ein teknikk som separerer molekyl på bakgrunn av deira molekylære størrelse og form. Proteinet blir filtrert gjennom ei kolonne som inneheld eit porøst materiale. For å kunne filtrere proteinet må det vere gelpartiklar eller porøse glasgranula i kolonnen som er i likevekt med ein mobilfase som tilfredstiller analytten som skal analyserast. Ein vil så kunne skilje analyttane frå kvarandre på grunnlag av størrelse fordi store partiklar blir ekskludert frå porene og eluerast først, medan mindre partiklar vil bli distribuert mellom mobilfasen si innsida og på utsida av gelpartiklane og dermed eluerast seinare [38].

2.2.4.1 Utføring

Gelfiltrering av protein med Fast protein liquid chromatography (FPLC) kolonne

Først sentrifugerast proteinløysninga ved 14 000 rpm, 20 min, 4°C for å fjerne eventuelle utfellingar. Kolonnen som blei nytta til gelfiltrering sto på kjølerom, med ein konstant flow på 0,03 ml/min med kolonnebuffer (appendiks). Før køyring blei injiseringsloopen vaska med kolonnebuffer og flowen endra til 0,38 ml/min. Omlag 200 µl kolonnebuffer var igjen i sprøyta etter vask. Ein trekte så opp 1,8 ml prøve til totalt 2 ml, og prøven blei injisert på kolonnen. Etter ca 2,5 timer starta ein med oppsamling av 5 min fraksjonar. Oppsamlinga fortsette til alt protein var eluert (her omlag 4 timar). Dei aktuelle fraksjonane blei identifisert ut frå kromatogrammet ved UV-detektesjon, samla og oppkonsentrert ved hjelp av 10 k Amicon Ultra-15 filter til ca 400 µl. Proteinkonsentrasjonen blei målt ved A_{280} og proteinet blei oppbevart i flytande N_2 fram til bruk.

2.2.5 Protein-gelelektroforese/ Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Rørsle av lada partiklar som skuldast eit eksternt elektrisk felt blir kalla elektroforese [39]. Den mest vanlege metoden for å bedømme reinheita til eit protein etter ein proteinreins er ved hjelp av polyakrylamid gel elektroforese (PAGE) i samband med

detergenten sodium dodecyl sulfat (SDS) og ein reduktant av disulfidbruer som mercaptoetanol [40].

SDS molekyla er negativt lada og har hydrokarbonkjedar som interagerer med dei hydrofobe delane av proteina. Proteina får dermed ein negativ ladning. Mercaptoetanol fører til at disulfidbruene i proteinet bryt, og proteinet mister sin opphavlege sekundære struktur og blir ufolda. Som ein konsekvens av denne utfoldinga, og den negative ladningen som proteinet no har fått vil proteina vandre mot den positive enden av gelen. Farten på vandringa er avhengig av antalet aminosyrer, altså i all hovudsak den molekylære vekta til proteinet [41].

2.2.5.1 Utføring

Det blei brukt 10 % ferdiglaga polyakrylamidgeler til kjøring av SDS-PAGE. Det reinsa proteinet blei fortynna med ddH₂O etter behov og tilsatt 5 µl SDS-denaturerings buffer (appendiks) for å få eit totalvolum på 20 µl. Prøvane blei inkubert i 5 minutt ved 95°C og sentrifugert i 20-30 sekundar i en mikrosentrifuge for å få vekk luftbobler, før prøvane blei satt på gelen. Det blei også tilsett ein standard med kjende molekylvekter (BioRad). Gelelektroforesen blei kjørt ved 100 V (her om lag 1t). For å kunne visualisere proteinbanda blei gelen farga med 0,1 % Commasie Brilliant Blue (appendiks) og avfarga med ei avfargingsvæske av 5 % etanol og 7 % eddiksyre. Etter tilstrekkeleg avfarging blei gelane tørka ved hjelp av GelAir Drying System (BioRad). Det blei tilslutt tatt bilete av gelen ved hjelp av Gene Flash syngene Bio Imaging (Biocompare).

2.2.6 Immunoblotting

Ved bruk av SDS-PAGE får ein separert protein på grunnlag av størrelse. For å kunne studere desse fraksjonane vidare overføres eller blottast dei ulike proteina frå gelen til ein nitrocellulosemembran. Denne metoden er kjent som Western blotting, eller immunoblotting. Her blir ein sandwich av gelen og nitrocellulosemembranen sett i ein kassett med buffer med to parallelle elektrodar. Straumen induserar ein vandring av proteinet frå gelen over på nitrocellulosemembranen. Fyrst inkuberast membranen med

feittfattig mjølk eller BSA for å blokkere alle uspesifikke bindingsstader. Membranen blei så vidare inkubert med eit antistoff retta mot proteinet ein ønskjer å studere. IgG molekyl vil binde til membranen dersom det finn antigenet og identifiserer proteinet av interesse. For å kunne visualisere proteinet blir membranen inkubert med eit sekundært antistoff kopla med horseradishperoxidase (HRP). Enzymet HRP katalyserer oksidering av luminol ved tilstedeværelse av hydrogen peroxid og produserer ein luminescens som er proporsjonal med mengda protein. Kjemiluminescens er produksjon av lys ved hjelp av ein kjemisk reaksjon [38].

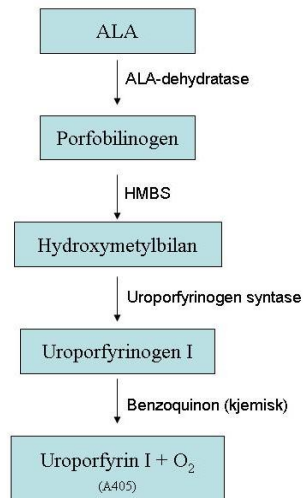
2.2.6.1 Utføring

Dei reinsa proteina ein ønska å studere blei separert ved SDS-PAGE. Proteina blei vidare overført frå gelen til ein nitrocellulosemembran ved 100 V i 1 time ved 4°C. Membranen blei vaska med TBS-T (appendiks) i 10 minuttar, RT, før den blei inkubert med 5 % blokkeringsbuffer (30 ml TBS-T, 1,5 g tørrmjølk) over natt ved 4°C. Neste dag blei membranen vaska med TBS-T, før inkubering med kanin polyklonalt HMBS antistoff (1:1000 i 5 % mjølk) i ein time, RT. Membranen blei reinsa grundig, 3 x TBS-T, og deretter vaska 3-4 gargar a 10 minutt med TBS-T. Deretter blei membranen inkubert med HRP konjugert anti-kanin sekundært antistoff (1:2000 i 5 % mjølk) i ein time, RT. Vaska deretter grundig som etter første inkubering. Ei løysing A av Luminol, Enhancer og 0,1 M Tris-HCl pH 8,5 og ei løysing B av hydrogenperoksid og 0,1 M Tris-HCl pH 8,5, blei blanda 1:1 rett før bruk, og tilsett membranen slik at den var dekkja av løysninga. Membranen blei inkubert i 1 minutt, før den blei plassert i FluorImager (BioRad) for å synleggjere reaksjonen.

2.2.7. HMBS-enzymassay

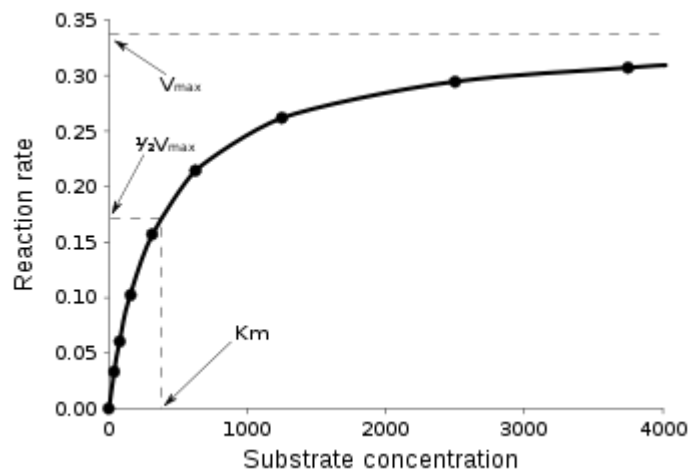
Det fins mange eksterne faktorar som kan påverke aktiviteten til enzyma. Det kan vere variasjon i konsentrasjon av substratmolekylet, temperatur eller pH. Desse faktorane vil føre til at enzymaktiviteten går saktare eller raskare i svært karakteristiske mønster.

Enzymreaksjonen til HMBS går føre seg som vist i figur 10.



Figur 10: Skjematisk framstilling av enzymreaksjonen til HMBS. HMBS katalyserer omdanninga av PBG til HMB, som blir katalysert vidare til uroporfyrinogen av uroporfyrinogen syntase. Uroporfyrinogen oksiderast ved hjelp av benzoquinone til uroporfyrin. Uroporfyrin blir målt spektrofotometrisk ved A_{405} nm

Det blei gjort kinetiske målingar på enzymet, for å få informasjon om K_m og V_{max} . Michaelis-Mentens kurva (Fig. 11) viser korleis ein finn desse verdiane.



Figur 11: Michaelis Menten kurve: Michaelis-Menten konstanten (K_m), svarer til substratkonsentrasjonen som gir $\frac{1}{2} V_{max}$. V_{max} er den maksimale enzym hastigheita. Figuren er eit eksempel.

2.2.7.1 Utføring assay på rekombinant protein

Ein standardmiks (10 µl 0,5M Hepes pH 8,2, 10 µl 1 M 1,4-dithiothreitol (DTT), 60 µl ddH₂O) blei tilsett 10 µl (0,4 µM/µl) enzym og preinkubert ved 37°C i 3 minutt. Det blei brukt lysbeskyttande eppendorfrøyr til reaksjonsblandinga og til substratet. Reaksjonen blei starta ved å tilsette 10 µl 100 µM PBG. For å stoppe reaksjonen blei det tilsatt 20 µl av iskald stoppreagens (1:1 5M HCl og 0,1 % benzoquinone). Prøvane blei sett på is i mørket i minimum 20 minutt før absorbans blei lest av på NanoDrop spektrofotometer ved 405 nm. Det blei gjort ulike forsøk med stigande konsentrasjonar av PBG eller varierende inkuberingstider. Dette er spesifisert ved figurane i resultatkapittelet. For berekning av spesifikk aktivitet blei ei standardkurve med uroporfyrin I sett opp ved kvart assay. Kjende konsentrasjonar av uroporfyrin I blei tilsett til standardmiksen i staden for enzym og substrat. Standardane blei elles behandla på same måte som andre prøvar.

2.2.7.2 Analysering av HMBS i erytrocyttar

Denne prosedyren er ei modifisert utgåve av Ford et al sin metode [42]. Analysen blir utført som rutine på laboratorium for klinisk biokjemi, LKB, Haukeland

Universitetssjukehus (HUS). Humant blod (heparin) blei sentrifugert i 10 minutt ved 2500 rpm, før plasma blei pipittert av og buffycoaten med leukocytene blei fjerna. Dei attverande erytrocyttane blei deretter vaska tre gangar med 0,15 M NaCl. Etter siste vask blei det tilsett 0,15 M NaCl slik at erytrocytt volum fraksjonen (EVF) i vaska prøvemateriale var mellom 0,35-0,45.

Dersom ikkje aktivitetmålingane blei utført same dag som prøven blei vaska blei prøven satt i -20°C frys.

I aktivitetsanalysen blei det sett opp to blindprøvar, samt pasientprøver og kontrollar i parallellar. Ein starta med å tilsetje 1 ml Triton X-100/ZnSO₄/DTT (appendiks) til alle prøveglasa. Det blei så tilsett 100 µl prøvemateriale/kontrollmateriale. Prøvane blei blanda på miksar og inkubert i 15 minutt ved 37°C. Til blindprøvane blei det tilsett 0,5 ml 0,25 M fosfat/citratbuffer (appendiks), medan pasientprøvane og kontrollane blei tilsett 0,5 ml 1,4 mmol/l PBG, før prøvane blei blanda og inkubert i nøyaktig 30 minutt ved 37°C. Reaksjonen blei stoppa ved å tilsetje 2,5 ml 10 % trikloreddiksyre (appendiks), sentrifugert i 10 minutt ved 3000 rpm, og avlest fluorimetrisk innan 30

minutt. Det blei laga ein standard av 1 ml 0,6 µmol/l uroporfyrin og 2 ml 1 M HCl. Denne blei nylaga før kvar analysering og målt både spektrofotometrisk og fluorimetrisk.

For utrekning av prøvesvara nytta ein formelen:

$$\frac{4.10 \times \text{kons. standard} \times \text{fluor. prøve}}{0.100 \times 30 \times \text{fluor. standard} \times \text{EVF}} = U / l$$

Totalvolum = 4,10 ml
Prøvevolum = 0,100 ml
Konsentrasjon bruksstandard i µmol/l
Inkuberingstid = 30 min
Fluorescens i bruksstandard og prøve
EVF i prøven
U = µmol/min

2.2.8 Analyse av ALA/PBG i urin

Prosedyren er ein modifisert utgåve av instruksjonsmanualen til BioRad for å analysere ALA/PBG ved hjelp av ionebytterkolonner samt tidlegare arbeid med metoden [43]. Analysen blir utført regelmessig på laboratoriet for porfyrianalyser, LKB, HUS. PBG absorberast til ein anionbytter (Dowex 2) og ALA til ein kationbytter (Dowex 50). Etter eluering kondenserast ALA med metyl-acetoacetat til monopyrrol, som i likskap med PBG gir ein rosafarga forbindelse med Ehrlichs reagens (4-dimethylaminobenzaldehyd). Denne rosafargen målast spektrofotometrisk og er proporsjonal med mengda PBG og ALA i prøven.

2.2.8.1 Utføring

Saman med serien av urinprøver, blei det også analysert ein lav og ein høg kontroll. Ein starta med å stille inn pH på pasientprøvane til ca pH 6 ved hjelp av konsentrert eddiksyre eller 2,5 M NaOH. Ein nytta ferdige kolonne frå BioRad. Anionbytterkolonnen vart sett oppi kationkolonnen, og den øvste kolonnen fylt med

2.2.9 Bradford proteinbestemming

Bradford proteinbestemming er eit fargebindingsassay, der fargeendringar i proteinløysningar skjer som respons til ulike konsentrasjonar av protein. Metoden involverar binding av fargereagenset Coomassie Brilliant Blue G-250 til protein. Når proteinet blir bunde til fargereagenset blir det danna eit stabilt uprotonert kompleks som har A_{\max} ved 595 nm. Denne reaksjonen kan då avlesast spektrofotometrisk. Ved å samanlikne resultatata til ei standardkurve vil ein kunne bestemme konsentrasjonen av protein i dei ulike løysningane (BioRad protokoll).

2.2.9.1 Utføring

Det blei laga standardkurve med kjente konsentrasjonar av bovine serum albumin (BSA) (0 µg/ml, 3 µg/ml, 6 µg/ml, 9 µg/ml, 12 µg/ml, 15 µg/ml og 18 µg/ml). Prøvane blei fortynna til eit volum på 800 µl. Det blei deretter tilsatt 200 µl fargereagens (BioRad) til eit totalvolum på 1 ml. Reaksjonen sto då i RT i 5-60 minutt. Prøveløysingane blei så lest av spektrofotometrisk ved 595 nm. Den ukjente prøven blei laga til på same måte som for prøvane til standardkurva. Prøven blei lest av ved 595 nm og konsentrasjonen blei rekna ut frå standardkurva.

2.2.10 Circular Dichroism spektroskopi

Circular dichroism (CD) spektroskopi gir informasjon om dei relative delane av sekundære strukturar i proteinet. Ein kan kvantifisere delen av α -helixer, β -kjeder og random coil i ei proteinløysning. For å undersøke proteinets sekundære struktur nyttar ein seg av "far-UV" regionen, som omfattar bølgjelengder i området 190-250 nm. I "near-UV" området (250-350) får ein informasjon om proteinets tertiære struktur [38]. Eit CD spektropolarimeter er ein blanding mellom eit polarimeter med variable bølgjelengder og eit absorpsjonsspektrofotometer. Når ein analyserer ved bruk av eit CD instrument ser ein på forskjellen i absorpsjonskoeffisient av eit optisk aktivt medium for venstre og høgre sirkulært polarisert lys.

2.2.10.1 Utføring

Far-UV CD spektra blei utført ved bruk av J-810 spectropolarimeter, Jasco (Tokyo, Japan). For avlesing av prøven blei det brukt ei termoelektrisk kyvette med 1mm lysbreidde. Prøven inneheldt 0,2 mg/ml gelfiltrert protein i ein fosfatbuffer (10 mM KH_2PO_4 , og 150 mM KF, pH 8,2).

For å sjå på sekundærstrukturen blei det tatt opp spektra i området 260-180 nm. Det blei først utført eit scan ved 20°C, så blei prøven varma opp til 37 °C, deretter til 60 °C og 65 °C, og til sist tilbake til 37 °C. Nitrogenflowen var på 5 l/min.

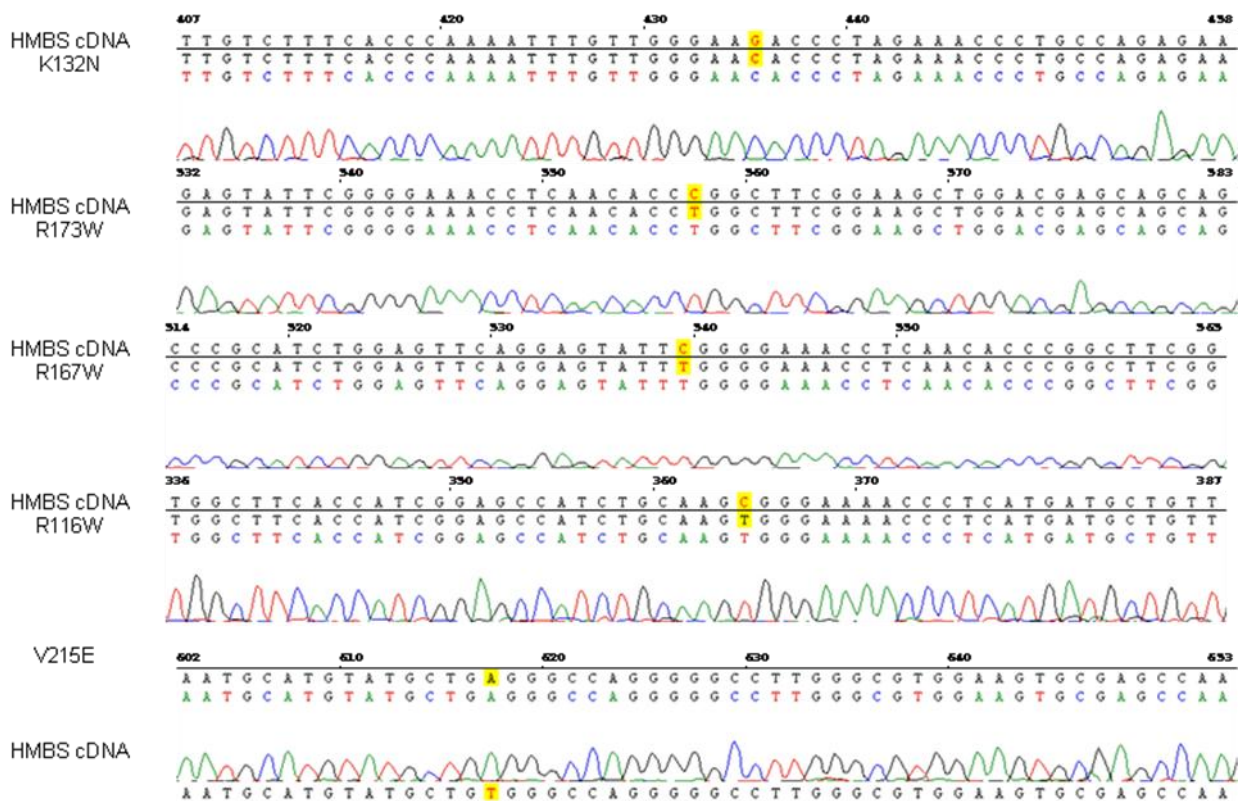
2.2.11 Statistikk

Figurar som blir vist i resultatkapittelet viser gjennomsnittsmålingar frå forsøk med dobbelt eller trippel bestemmingar, der forsøka er repetert minimum tre gongar.

3 RESULTAT

3.1 Setestyrtd mutagenese, uttrykking og reinsing av wt HMBS og utvalte mutantar

Vi mottok genet som kodar for housekeeping *HMBS* insett i ein pGex plasmid vektor, mutantane blei laga ved hjelp av setestyrtd mutagenese. Mutert og wt-plasmid blei så satt inn i XL 1- Blue Superkompetente *E.coli* celler. Plasmidet inneheld ampicillin resistents, slik at celler som har tatt opp plasmid vil selekterast på LB-agar som inneheldt ampicillin. Plasmid DNA frå disse cellene blei så reinsa og sekvensert for å verifisere at ein hadde fått laga dei riktige mutasjonane.

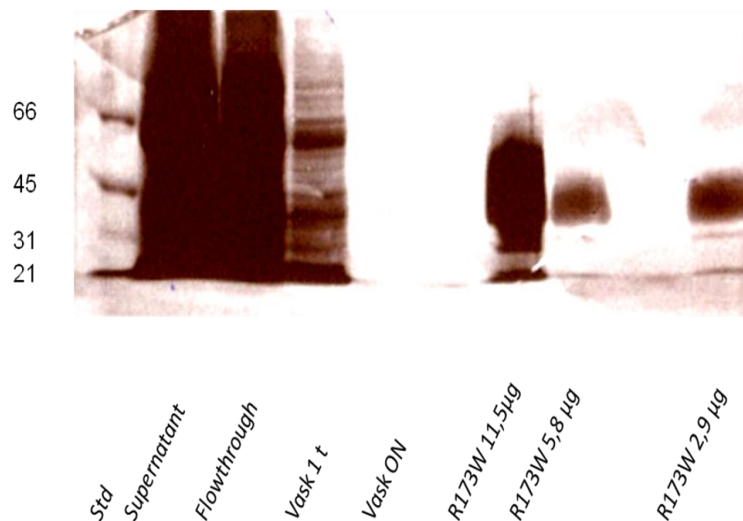


Figur 12: Sekvenseringsresultat av utvalte mutantar samanlikna med wt-sekvensen. Endringar i sekvensen er merka med gult.

Figur 12 viser at ein har fått sett inn riktige mutasjonar i HMBS-sekvensen. I mutasjon K132N har ein fått ein endring av G>C, R173W C>T, R167W C>T, R116 C>T og i mutasjon V215E T>A (jmf. Tab.2 i innleiinga).

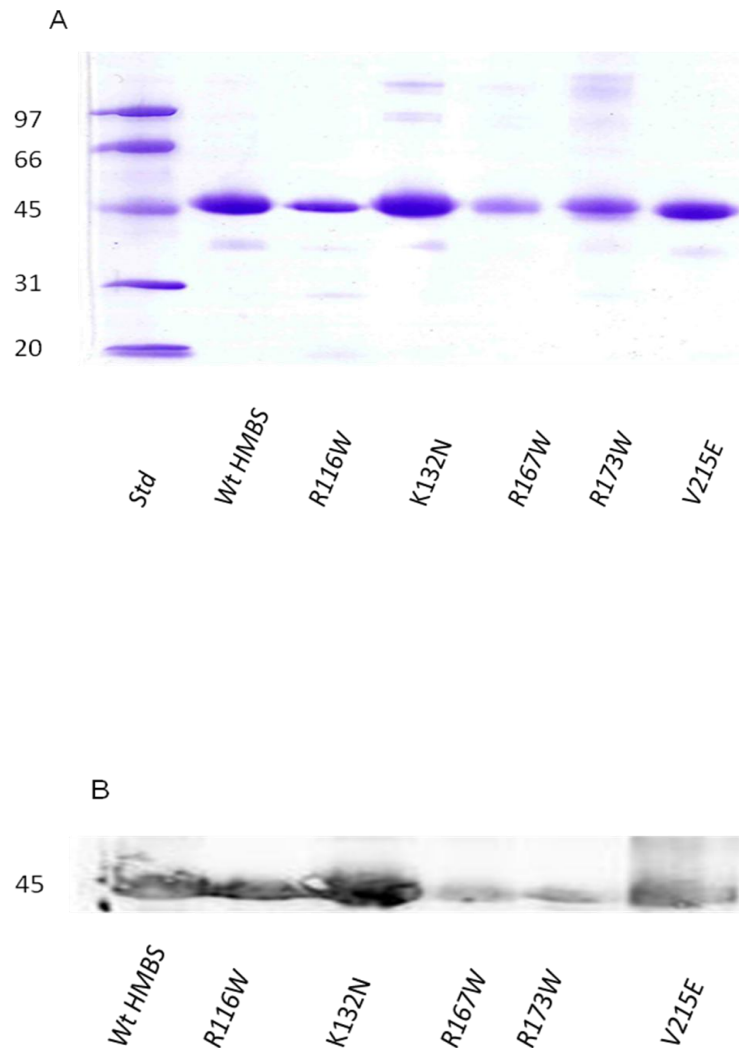
Wt-HMBS og mutasjonane blei transformert inn i BL21 Star™ *E. coli* celler og uttrykt som eit fusjonsprotein med GST. Fusjonsproteinet blei reinsa ved affinitets kromatografi på ei Gluthatione Sepharose kolonne og GST kutta av med trombin (2.2.3).

Figur 13 viser prøver tatt under reinseprosessen av mutanten R173W. Supernatanten og flowthrough (væska som blir eluert frå kolonnen ved påsett supernatant) inneheld mykje protein, etter ein times vask er det framleis mykje uspesifikt protein igjen på kolonnen, men etter vask over natt er det ei rein væske som blir eluert. Ein sit igjen med eit reint produkt som har forventa storleik, om lag 45 kDa. Det er tilsett for høg konsentrasjon av protein på gelen, men ettersom den berre var meint for å bekrefte at reinseprosedyren var gått som den skulle blei den vurdert som ok.



Figur 13: Monitorering av proteinreins, frå påsett supernatant og fram til reint protein. Flowthrough er væska som blir eluert frå kolonnen ved påsett supernatant. Prøvene frå vasken er tatt ut frå kolonnen etter 1 time, og etter vask over natt (ON). Vasken blei utført med PBS tilsatt 0,5 M EDTA. Molekylvekta på standarden er oppgitt i kDa.

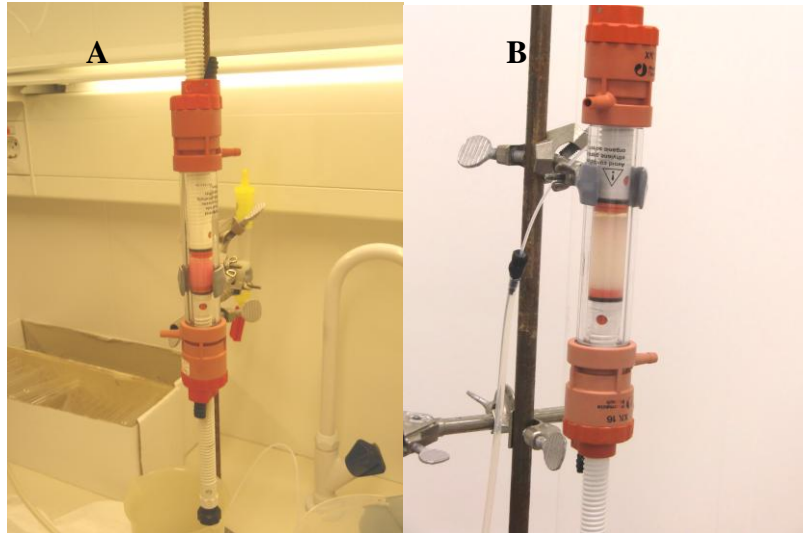
Villtypen og dei utvalte mutantane blei separert ved SDS-PAGE for å stadfeste at ein har reine protein og at wt-HMBS og mutantane hadde lik molekylærvekt (Fig. 14A). I tillegg blei det utført immunoblott med antistoff spesifikt mot HMBS for å bekrefte at det var riktig protein ein jobba med (Fig. 14B).



Figur 14: Wt og utvalte mutantar etter utrykking og reinsing. **A:** Prøvane blei separert ved 10 % SDS-PAGE og farga med Coomassie Brilliant Blue. **B:** Immunoblott med primært polyklonalt kanin HMBS-antistoff, sekundært anti-kanin-HRP antistoff, visualisert med ECL og fluoro imager. Molekylvekta på standarden er oppgitt i kDa.

Porfyriner har som tidlegare nemnt ein karakteristisk raudleg farge. På kolonnen såg vi at proteinet kunne få ein rosa farge. Dette skuldast truleg at HMB reagerar med PBG frå *E.coli* og ein får danna uroporfyrin I. Ein kunne sjå tydelege forskjellar mellom

wt-HMBS og mutantane, R116W og R173W. Wt fekk ein karakteristisk rosa farge på gelen (Fig. 15A), medan dei nemnte mutantane fekk ein gråleg farge (Fig. 15B).



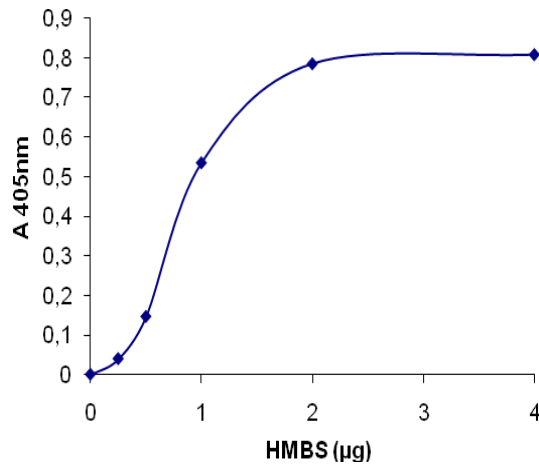
Figur 15: Protein bunde på Glutathione–Sephharose 4B kolonne etter vask med PBS/EDTA buffer. A: Wt-HMBS. B: Mutant R173W.

3.2 Metodeoptimalisering av enzymassay

For å kunne karakterisere eit nytt protein og nye mutantar av dette proteinet er det nødvendig med informasjon om enzymets aktivitet og kva faktorar som påverkar denne. Eit av hovudfokusa i denne oppgåva har vore å etablere eit robust og reproduserbart *in-vitro* enzym assay for rekombinant enzym som vil gi grunnlag for framtidige resultat. Litteraturen viser at det er brukt forskjellige vilkår både med omsyn til konsentrasjonar, buffer, oksideringsmetodar og inkuberingstider.

3.2.1 Varierende mengde enzym (HMBS)

20 μM PBG blei tilsett aukande konsentrasjon av HMBS, høvesvis 0,25, 0,5, 1, 2 og 4 μg .

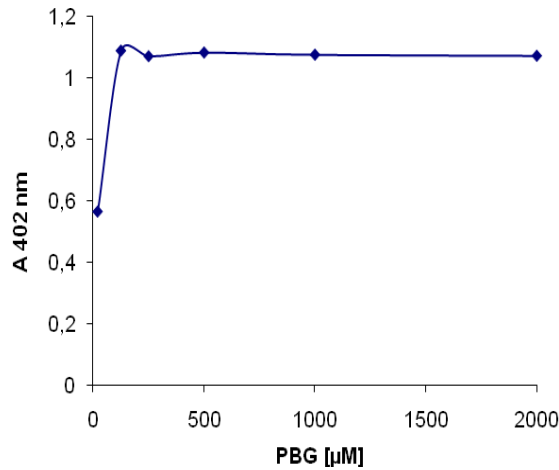


Figur 16: HMBS aktivitet ved ulike konsentrasjonar. PBG konsentrasjonen var på 20 μM . Reaksjonen blei stoppa med 5 M HCl etter 10 min v/37°C

Hastigheita til enzymreaksjonen er avhengig av både enzym og substratkonsentrasjonen. Ved aukande enzymkonsentrasjon vil hastigheita auke så lenge det er nok substrat som kan omdannast. Etter ei viss tid vil det ikkje vere fleire substratmolekyl igjen og kurva vil flate ut då det ikkje blir danna nytt produkt. Figur 16 indikerar at det lineære området av reaksjonen ligg mellom 0,5 μg og 1 μg under dei gitte omstende, det blei valt å gå vidare med 1 μg HMBS.

3.2.2 Varierende mengde substrat (PBG)

For å sjå på samanhengen mellom substratkonsentrasjonen og reaksjonshastigheita sette ein opp reaksjonar med ein konstant enzymkonsentrasjon og varierende substratkonsentrasjon. 1 μg HMBS blei tilsett 20, 125, 250, 500, 1000 og 2000 μM PBG. Figur 17 viser absorbans ($A_{402\text{ nm}}$) som eit mål på HMBS aktivitet når reaksjonen blei stoppa etter 10 minutt. I starten er hastigheita på reaksjonen avhengig av substratkonsentrasjonen. Etter kvart flatar kurva ut, og reaksjonen har oppnådd maksimal hastigheit.

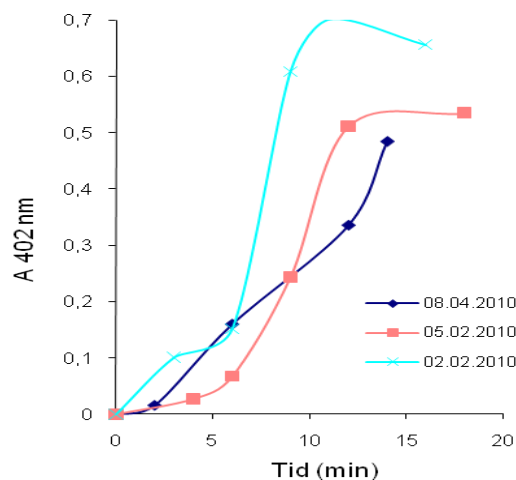


Figur 17: HMBS aktivitet ved ulike konsentrasjonar av PBG. Forsøket blei gjort med 1 µg HMBS. Reaksjonen blei stoppa etter 10 min v/37°C.

Aktiviteten når eit maksimum ved substratkonsentrasjon mellom 150 og 200 µM PBG. I vidare forsøk blei det valt å bruke 125 µM PBG, kor konsentrasjonen framleis er i det lineære området for reaksjonen.

3.2.3 Tidskurver

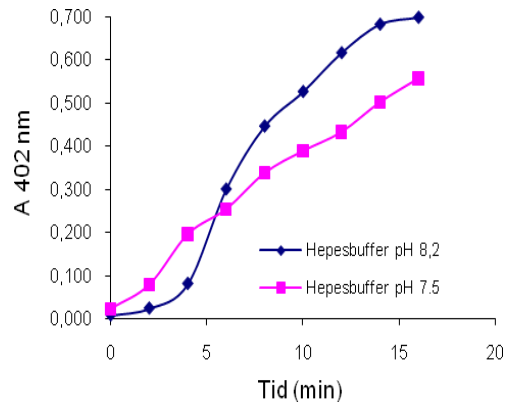
For å sjå korleis aktiviteten endra seg over tid, blei det tatt ut prøvar ved ulike tidspunkt. Figur 18 viser tre ulike seriar kjørt med wt. Det er her vist gjennomsnittsmålingar for tre ulike dagar. Som figuren viser var det vanskeleg å få resultat som var reproduerbare.



Figur 18: HMBS aktivitet målt på tre forskjellige dagar. Det er brukt 1 µg HMBS og 125 µM PBG. Inkubering v/37°C.

3.2.4 Ulik pH på HEPESbuffer

I dei fyrste forsøka blei det nytta HEPESbuffer pH 7,5 for å vere nær fysiologisk pH. Det er vist at wt-HMBS har pH optimum ved 8,2 [25]. Ein valte å undersøke om det var forskjellar i aktivitet ved dei to forskjellige pH-verdiane.

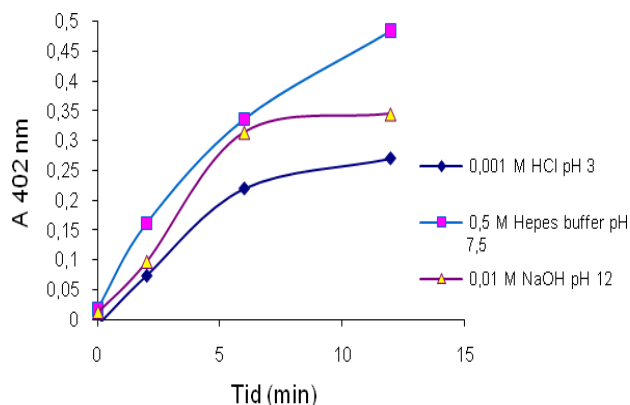


Figur 19: Enzymaktivitet ved forskjellige pH-verdier. Det blei brukt 1 μ g HMBS og 125 μ M PBG i forsøka. Inkubering v/37°C.

Det blei valt å gå vidare med HEPES pH 8,2 då denne gav noko høgare aktivitet.

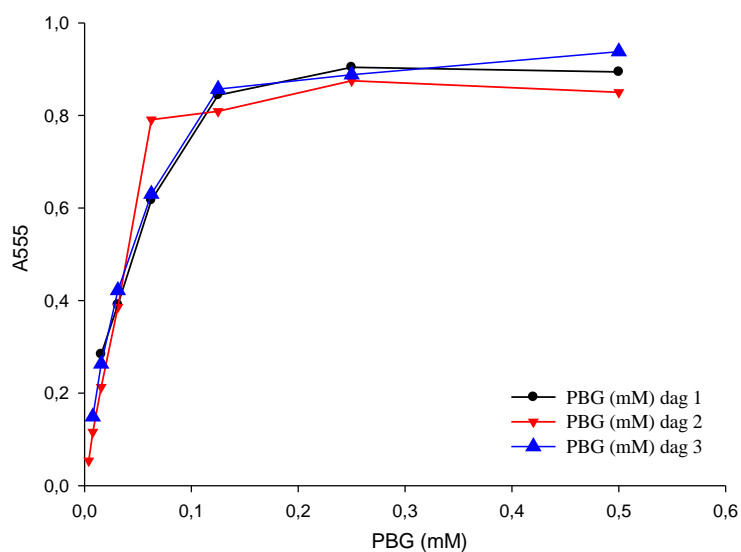
3.2.5 PBG stabilitet

Grunna moglegheit for ustabilitet i substratet og mangelfull rapportering i litteraturen og hos forhandlar om løyselegheit, forsøkte vi å løyse PBG ved ulike pH-verdier. Ulike løysningsmidlar blei undersøkt og det blei valt å løyse PBG i ein sterkt sur løysing, 0,001 M HCl pH 3, ein nøytral løysing, 0,5 M HEPES pH 7,5 og ein sterkt basisk løysing 0,01M NaOH pH 12.



Figur 20: HMBS aktivitet med omsyn til korleis PBG er oppløyst. PBG blei løyst ved forskjellige pH verdiar. Det blei nytta 1µg HMBS og 125 µM PBG i forsøka. Inkubering v/37°C.

PBG viste seg å vere løyseleg i alle dei tre løysningsmiddela. PBG løyst i HEPES buffer pH 7,5 ga høgast enzymaktivitet, ikkje så overraskande då vi allereie har vist i figur 19 at pH kan spele inn på enzymaktiviteten. Ein kan tenkje seg at pH på substratløysninga kan påverke den totale pH i reaksjonen, då substratløysninga utgjer 10 % av totalvolumet. Det blei bestemt å gå vidare med å løyse PBG i ein HEPESbuffer. I forsøket blei PBG løyst ved pH 7,5, men ettersom ein brukte pH 8,2 i standardmiksen til enzymassayet, blei etter kvart også PBG løyst i 0,5 M HEPESbuffer pH 8,2. Det blei valt å gjere eit stabilitetsforsøk på PBG løyst i HEPESbuffer pH 8,2 før ein gjekk vidare med assayet. PBG viste å ha god stabilitet ved oppbevaring v/4°C over 3 dagar (Fig. 21).

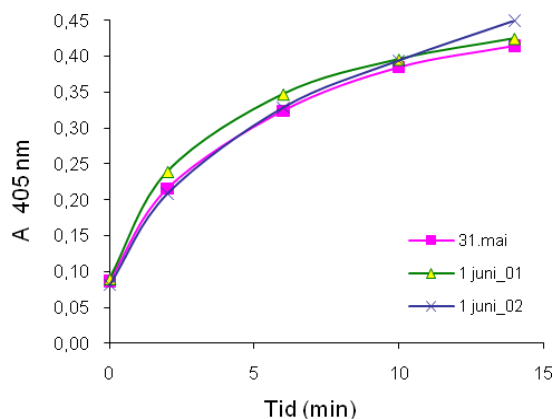


Figur 21: Holdbarheit av PBG løyst i HEPES pH 8,2. PBG sto v/ 4°C i 3 dagar. Konsentrasjonen blei målt med Ehrlichs reagens

3.2.6 Oksidering med benzoquinone

Etter kvart som enzymassayet vårt begynte å ta form, viste det seg at det framleis var vanskeleg å få reproduserbare resultat. Til tross for at ein var bevist på å bruke same batch av enzym, brukte enzym som ikkje hadde vore tint og fryst, friskt substrat og dei andre faktorane var konstante blei resultata variable. Til slutt fant vi ein metode for oksidering som nyttiggjorde seg av benzoquinone som oksideringsmiddel i staden for å utsette prøvane for lys [44, 45]. Faktorar som dagslys på laboratoriet og plassering i forhold til lyskjelde kan føre til at prøvane ikkje alltid blei utsett for lik mengde og styrke av lys.

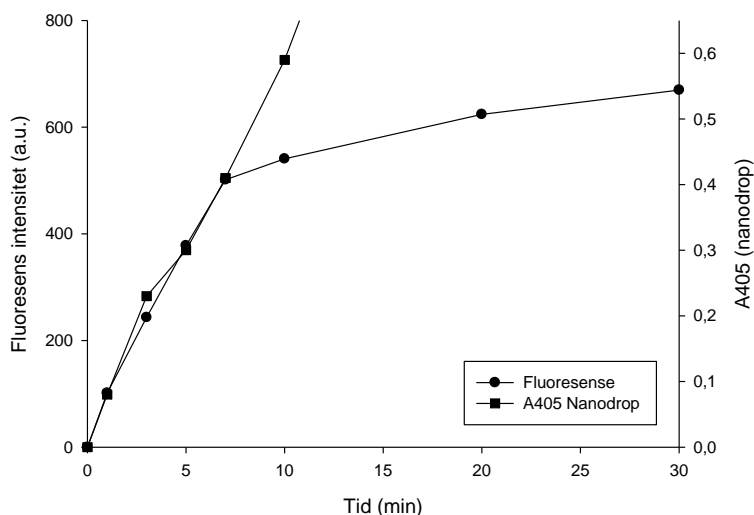
Stoppreagenset blei endra til å innehalde 0,1 % benzoquinone i tillegg til 5 M HCl. Etter at prøvane var tilsett stoppreagenset blei dei sett på is i mørke. Resultata frå figur 22 viser at enzymmålingane etter dette var reproduserbare.



Figur 22: HMBS aktivitet med benzoquinone som oksideringsmiddel. Det er brukt 1,5 μg HMBS og 125 μM PBG. Inkubering v/37°C.

3.2.7 Absorbans versus fluorescens

Til slutt ville ein undersøkje om det var forskjellar mellom å analysere produktet på eit spektrofotometer eller eit fluorimeter. I forsøka med fluorimetrisk måling blei det brukt eit Carry Eclipse Fluorescence Spectrofotometer frå Varain.



Figur 23: HMBS aktivitet målt på spektrofotometer og på fluorimeter. Det er brukt 1 μg HMBS og 100 μM PBG. Inkubering 10 min v/37°C.

Som ein ser av figur 23 er resultatane samanfallande fram til omlag 0,4 i absorbans. Etter det bøyer resultatane målt fluorimetrisk av og kurva flatar ut, medan målingar gjort på nanodrop spektrofotometer aukar lineært til absorbans på 0,6 i dette forsøket og opp til

7 i andre forsøk. Ein bestemte seg derfor for å gå vidare med å måle produktet spektrofotometrisk ved hjelp av nanodrop.

3.4 Karakterisering av wt og utvalte mutantar

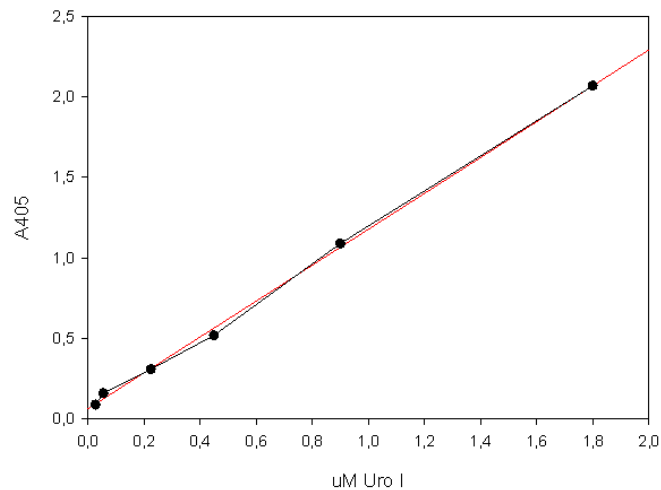
Forsøk med enzymaktivitet blei gjort for å oppnå innsikt i dei kinetiske karakteristikkane til enzymreaksjonen, samt for å bestemme kinetiske konstantar, K_m og V_{max} for HMBS og utvalte mutantar. Det blei og sett på variasjon i aktivitet over tid ved forskjellig inkubering ved 37°C.

For å vurdere enzymets stabilitet blei det gjort temperaturscan ved hjelp av Circular Dichroism (CD) og ved differential scanning fluoremetry (DSF). I tillegg er det gjort eit forsøk for å sjå på eventuelle strukturendringar ved oppvarming av enzymet og bruk av CD-målingar. Det blei og målt enzymaktivitet på wt etter at enzymet hadde vore varma opp til 65°C, for å sjå om oppvarminga førte til endring i aktivitet.

3.4.1 Standardkurve med uroporfyrin I

Til kvart oppsett med aktivitetmålingar blei det satt opp ei standardkurve. Målingane til standardkurva blei satt opp på same måte som for enzyimmålingane, men i staden for å tilsette PBG og HMBS, blei det tilsatt uroporfyrin I. Ved hjelp av standardkurva kan ein rekne ut spesifikk aktivitet.

Figur 24 viser eit døme på ein standardkurve, kor lineær regresjon gir $R^2 = 0,9996$. kor R er korrelasjonskoeffisient. I alle forsøk som blei utført, var $R^2 \approx 1$.

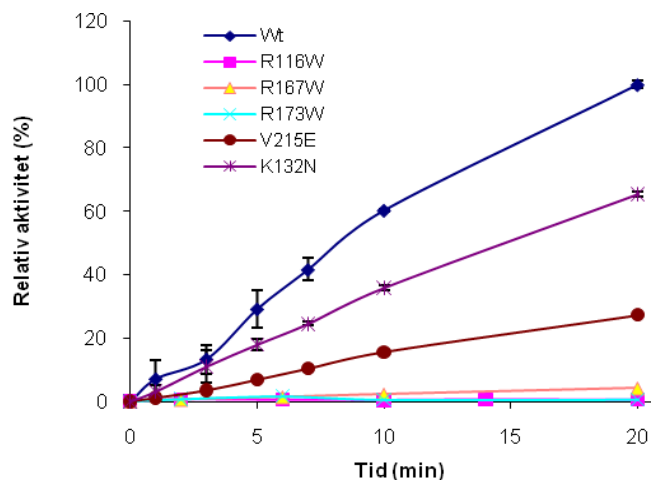


Figur 24: Standardkurve for uroporfyrin I. Koeffisientar B: 0,064, A: 1,114, r^2 : 0,999.
 $\mu\text{M URO I} = -0,064 + 1,114 * A405$

3.4.2. Enzymmålingar

3.4.2.1 Tidsforsøk

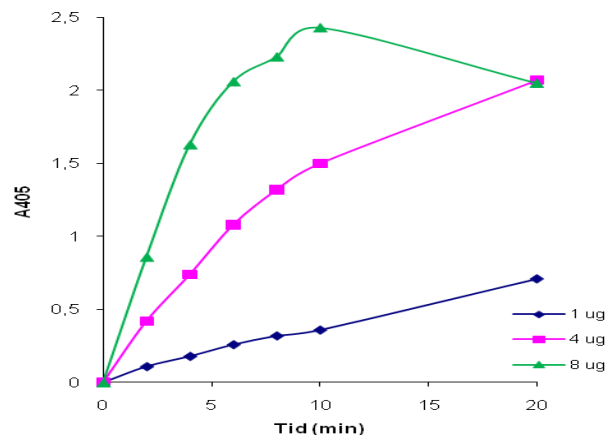
Enzymaktivitet blei målt for wt og mutantane ved ulik inkuberingstid (37°C). Figur 25 viser aktiviteten til dei utvalte mutantane prosentvis av aktiviteten til wt-HMBS. Mutantane K132N og V215E viste høvesvis 65,5 % og 27,4 % aktivitet samanlikna med wt etter 20 min inkubering. Dei tre kjente mutasjonane viste aktivitetar < 5 %, med R116W 0,5 %, R173W 0,6 % og R167W 4,2 %.



Figur 25: Enzymaktivitet for wt og utvalte mutantar. Figuren viser aktivitet som funksjon av tid. Det blei i forsøka brukt 100 μM PBG og 5 μg HMBS. Relativ aktivitet for wt ved 20 minutt vart sett til 100 % som tilsvarar ein spesifikkaktivitet på 21,8 nmol/mg/min.

3.4.1.2 Enzym kinetikk

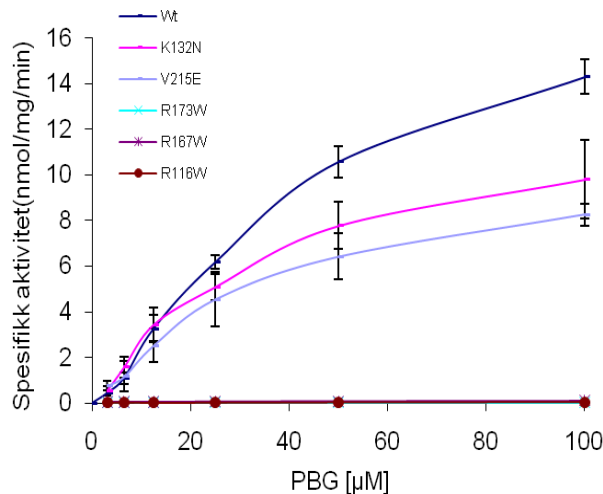
V_{\max} og K_m blir bestemt ved å variere substrat mengda med konstant tid og mengde enzym. Enzymmengda og tida må vere innanfor det lineære området til reaksjonen. For å bestemme mengde enzym og inkuberingtid ved 37°C blei det utført eit forsøk med tre forskjellige konsentrasjonar av HMBS og tatt ut prøvar i tidsintervallet 0-10 minutt.



Figur 26: Linearitets forsøk. HMBS aktivitet ved forskjellig enzymkonsentrasjon og tid. PBG konsentrasjonen var 125 μM . Inkubering v/ 37°C.

Den høgaste konsentrasjonen av HMBS (8 μg) har eit lineært område fram til 7 minutt, medan 4 og 1 μg har lineært område fram til høvesvis 10 og 20 minutt. 1 μg enzym gir låg absorbans slik at det vil bli vanskeleg å oppnå målbare resultat for mutantane som har lågare aktivitet.

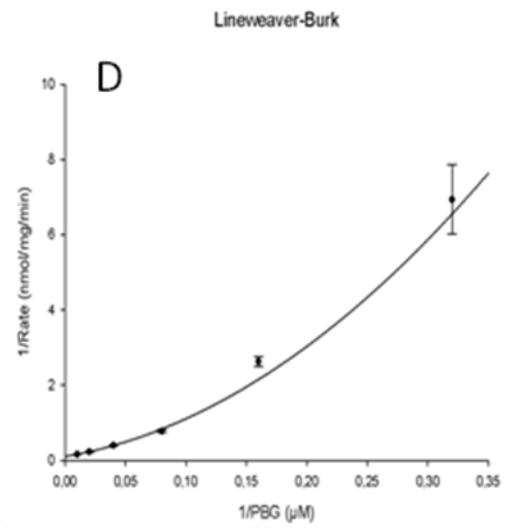
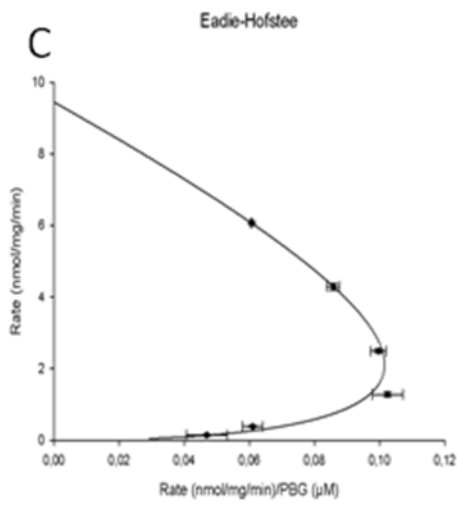
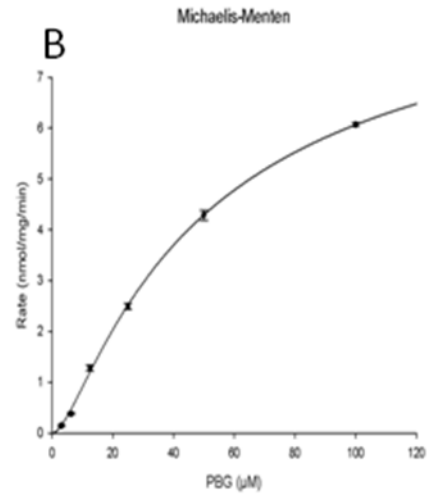
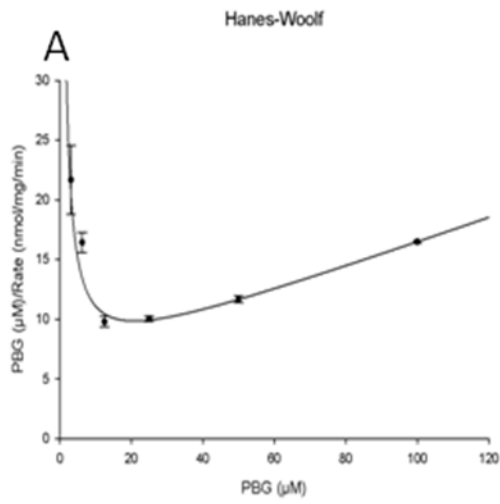
Det blei valt å gå vidare med 4 μg HMBS og inkubering 4 minutt ved 37°C. Disse vilkåra gjev eit robust signal, og er godt innanfor det lineære området av reaksjonen.



Figur 27: Substrat variasjon. Enzymaktivitet for wt og utvalte mutantar som funksjon av varierende mengde PBG. HMBS 4µg og reaksjonen vart stoppa etter 4 minutt v/37°C.

Ved tilsatt 100 µM PBG hadde wt ein spesifikk aktivitet på 14,3 nmol/mg/min, K132N utøvde ein aktivitet på 9,8 nmol/mg/min medan V215E hadde 8,3 nmol/mg/min. For dei tre andre mutantane var aktiviteten så låg at det ikkje let seg talfeste nokon aktivitet.

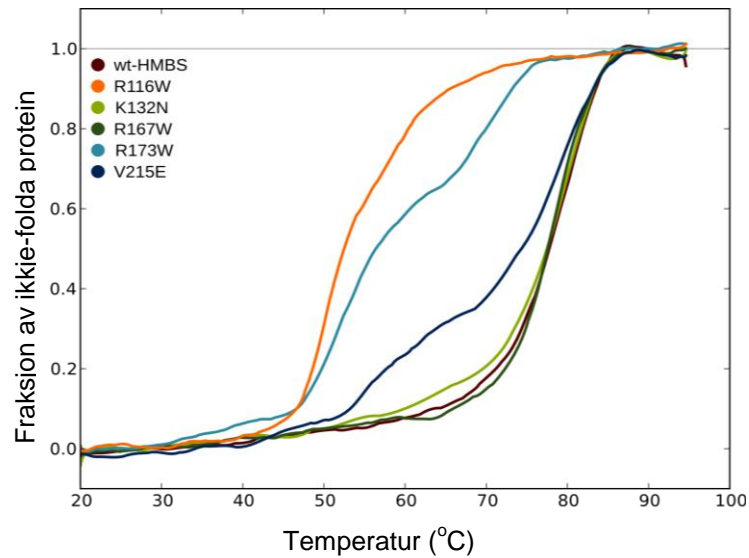
Hastigheita til reaksjonen er relatert til substratkonsentrasjonen gjennom dei to parametrane V_{max} og K_m . Desse verdiane er spesifikke og karakteristiske for eit gitt enzym under definerte omgivnader som for eksempel pH og temperatur [40]. For å finne parametrane V_{max} og K_m blei resultatane frå enzymassay plotta i SigmaPlot og analysert med ein tilleggsmodul "Enzyme Kinetics" (Fig. 28 A-D). Kurvene som er vist i figuren er for ein representativ måling av wt. Dei fire plotta som blei valt var Michaelis-Menten, Hanes-Woolf, Lineweaver-Burk og Eadie-Hofstee. Det blei bestemt V_{max} og K_m verdiane for wt og dei to ukjente mutantane, samt for R167W (Tab. 5). Figur 28 A-D viser at wt ikkje har vanleg Michaelis-Menten tilpassing, dei ulike plotta syner at ein har ein substrataktivering og antyder positiv kooperativitet. Ved vanleg Michaelis-Menten tilpassing ville ein fått lineære kurver for plott A, C og D der ein kunne bestemt V_{max} og K_m ved lineær regresjon. Dette vil bli omtala vidare i diskusjonen.



Figur 28: Fire forskjellige fit av representative målinger av wt-enzymaktivitet gjort med varierende mengde PBG. I forsøket er det nytta 5 μg HMBS, og prøvane er inkubert 4 minutt v/37°C.

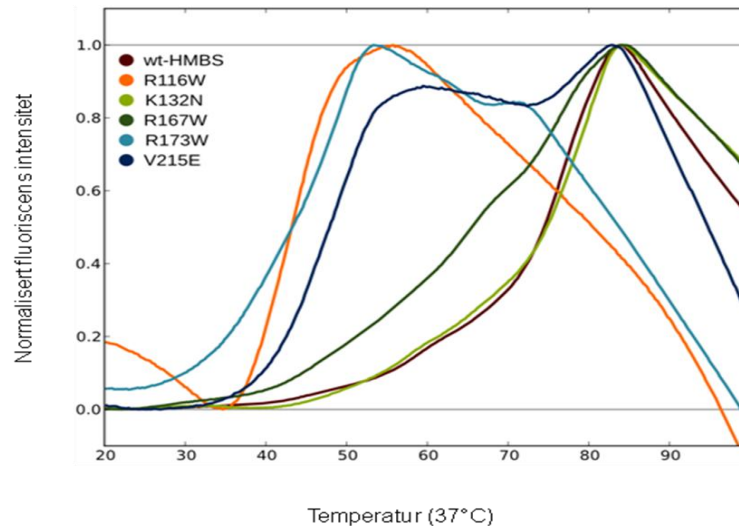
3.4.2 Stabilitetsmålinger

For å undersøke termostabilitet blei det utført temperaturscan på CD og DSF. Dette er to forskjellige metodar for å sjå på proteinutfolding ved ulike temperaturar.



Figur 29: Temperaturavhengig CD. HMBS konsentrasjonen var 0,2 mg/ml. Det blei brukt ein Tris-HCl buffer (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8). Forsøket er utført av Helene Bustad Johannessen.

Dei termiske denatureringskurvene observert ved CD (Fig. 29) viser at K132N og R167W er relativt stabile og har liknande T_m -verdi som wt, 79°C. R116W, R173W og V215E viser alle to transisjonar under denaturering, sjølv om det er mindre tydeleg for R116W.

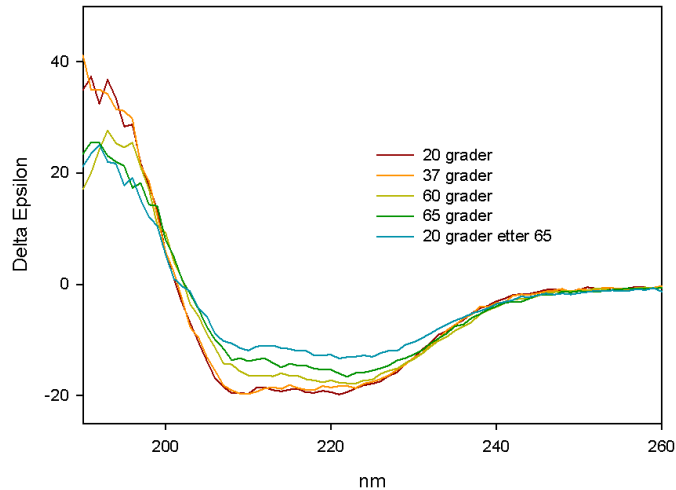


Figur 30: Temperaturscan kjørt med Differential scanning fluoremetry (DSF). Utført med Lightcycler 480 (Roche). HMBS konsentrasjonen var 0,1 mg/ml. Det blei brukt ein Tris-HCl buffer (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8). Forsøket er utført av Helene Bustad Johannessen.

Eksperimentet i figur 30 viser at K132N og R167W har om lag same kurve som wt med ein T_m på 79°C. R116W har ein T_m på 54°C medan kurvene for R173W og V215E antyder to toppar.

Stabilitetsmålingane gjort ved CD og DSF viser begge at K132N og R167W er ganske stabile med T_m verdiar lik wt. Kurvene for dei to mutantane ved DSF er likevel ikkje like ved at R167W startar smelteprosessen tidlegare og har ei brattare kurve opp mot toppen før den bøyer av.

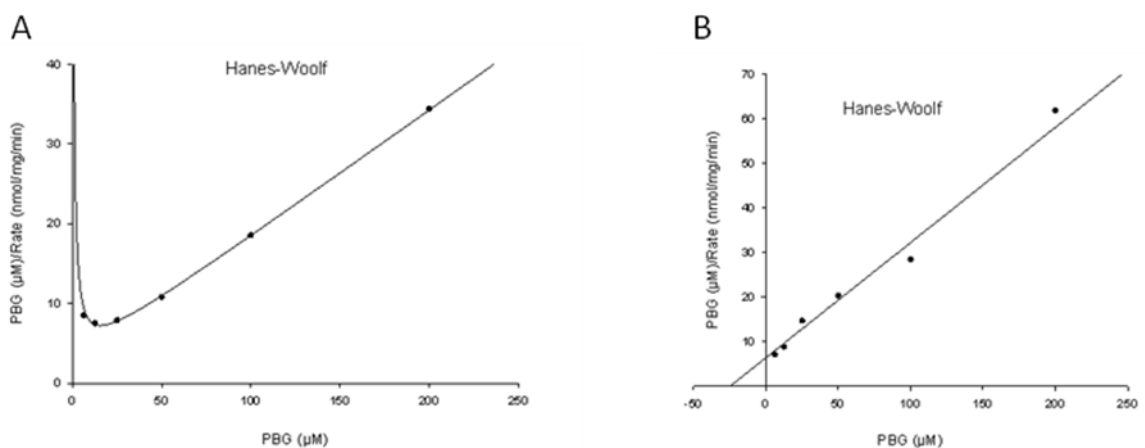
For å undersøke om oppvarming av enzymet kunne ha betydning for sekundærstrukturen blei det utført CD scan ved forskjellige temperaturar (Fig. 31). Eksperimentet er berre gjort ein gang med wt, men resultatane er interessante og forsøket vil bli repetert.



Figur 31: CD scan av wt ved ulike temperaturar. Scan blei kjørt ved 20°C, 37°C, 60°C, 65°C og 20°C etter fyrst å ha blitt oppvarma til 65°C. HMBS konsentrasjonen var 0,2 mg/ml. Det blei brukt ein fosfatbuffer.

Ein observerte ingen struktur endring når temperaturen blei auka frå 20°C til 37°C. Ved oppvarming til 60°C og 65°C kunne ein derimot sjå endringar i strukturen. Endringane verkar irreversible då enzymet ikkje innteke opphavleg struktur når ein senker temperaturen til 20°C.

På bakgrunn av resultatane i figur 30 blei det gjort eit enkeltstående forsøk der ein målte enzymaktivitet av wt utan oppvarming og etter oppvarming til 65°C (Fig. 32)



Figur 32: Enzymaktivitet av wt utan og etter oppvarming til 65°C. A: Enzymaktivitet av wt-HMBS utan oppvarming. B: Enzymaktivitet av wt-HMBS oppvarma til 65°C før analysing. Prøven blei varma opp til 65°C i 10 minutt, før den blei satt på is i 10 minutt før aktivitets assayet blei kjørt som vanlig. Det er nytta 5 µg HMBS, inkubering 4 min v/ 37°C.

Det er tydelig at det har skjedd noko under oppvarminga, ettersom kurvene ikkje har same form. Ein ser at ein har mista den antyda positive kooperativiteten og har no ei lineær kurve for Hanes-Woolf plottet.

3.4.3 Oppsummering karakterisering av rekombinante enzym

Tabell 4 gir ein oppsummering av data frå rekombinant enzym. Det er sett på relativ aktivitet, V_{\max} , K_m og stabilitet for wt og dei utvalte mutantane. To av mutantane, R116W og R173W gav så låg aktivitet at parametrane V_{\max} og K_m ikkje kunne bereknast (merka ikkje målbar i tabellen).

Tabell 4: Enzymatiske og stabilitetsparametre for rekombinant wt og mutantar.

	Relativ aktivitet (%), rekombinant enzym	V_{\max} (nmol/mg/min)	K_m (μ M)	Stabilitet (T_m)
Wt- HMBS	100	$21,3 \pm 1,8$	$45,1 \pm 0,6$	79°C
R116W	0,5	Ikkje målbar	Ikkje målbar	54°C
K132N	65,5	$15,1 \pm 1,8$	$42,2 \pm 2,0$	79°C
R167W	4,2	8,6	1248,6	79°C
R173W	0,6	Ikkje målbar	Ikkje målbar	59°C (72°C)
V215E	27,4	$12,4 \pm 0,6$	$36,8 \pm 5,2$	78°C (62°C)

Prosentvis aktivitet er berekna ut frå aktiviteten til wt etter 20 minutt ($5 \mu\text{g}$ HMBS og $100 \mu\text{M}$ PBG). T_m verdiane i parentes er avlest frå figur 29, mens dei andre er berekna. V_{\max} og K_m verdiane er berekna ved hjelp av Sigmoidplots enzymkinetikkprogram. Aktiviteten til R116W, R167W og R173W var så låg at V_{\max} og K_m ikkje kunne bereknast.

3.5 Pasientdata

Data er henta frå Norsk Porfyriregister. Dette registeret inneheld informasjon om pasientar som har fått bekrefta dei aktuelle mutasjonane ved hjelp av genetiske analysar. Tabell 5-1 viser at det er store variasjonar i kor mange pasientar det er innanfor kvar av dei ulike mutasjonane. For R167W og R173W er det berre fire pasientar. Dette er viktig å ta omsyn til når ein vurderer resultatata frå tabellen.

Tabell 5-1: Enzymatiske og biokjemiske resultat frå pasientar med kjente HMBS mutasjonar.

Mutasjon	Ant. Pas (% aktive)	E-HMBS (U/l)	U-ALA/kreatinin ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$)	U-PBG/kreatinin ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$)
R116W	18 (83)	0,29 ($\pm 0,06$)	10,48 ($\pm 15,67$)	12,31 ($\pm 13,47$)
K132	10 (10)	0,56 ($\pm 0,32$)	2,93 ($\pm 1,06$)	0,41 ($\pm 0,06$)
V215E	37 (59)	0,32 ($\pm 0,09$)	5,27 ($\pm 4,64$)	5,82 ($\pm 8,41$)
R167W	4 (75)	0,36 ($\pm 0,05$)	4,98 ($\pm 1,60$)	4,37 ($\pm 3,07$)
R173W	4 (75)	0,24 ($\pm 0,03$)	2,61 ($\pm 0,54$)	0,92 ($\pm 0,29$)

Tabell 5-2: Enzymatiske og biokjemiske resultat frå pasientar med kjente HMBS mutasjonar med aktiv eller latent AIP

Mutasjon	Aktiv			Latent		
	E-HMBS (U/L)	U-ALA/kreatinin ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$)	U-PBG/kreatinin ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$)	E-HMBS (U/L)	U-ALA/kreatinin ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$)	U-PBG/kreatinin ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$)
R116W	0,26	15,24	17,21	0,26	3,94	2,62
K132	0,37	2,96	*	0,63	2,71	0,43
V215E	0,31	6,03	7,73	0,34	4,29	3,44
R167W	0,36	6,5	7,08	0,36	2,41	0,35
R173W	0,25	2,44	1,01	0,19	3,27	0,4

Innsamla data frå pasientar med dei utvalte mutasjonane i HMBS genet funne i Noreg. Pasientdata er henta frå Norsk porfyriregister og inkluderar HMBS aktivitet i erythrocyttar og ALA/PBG verdiar i urin. Referanseverdiar kjørt inn ved HUS er: U-ALA: < 6.0 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$, U-PBG: < 0,5 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$, e-HMBS 0,43-0,89 U/L.

5-1 gir oversikt over alle pasientane som heilheit, medan **5-2** skil pasientane i aktiv og latent AIP. Pasientane er karakterisert som aktiv eller latent ut frå eigen rapportering.

* = prøvesvar under nedre måleområde

Enzymmålingar gjort i erythrocyttar viser at verdiane for alle pasientane bortsett frå hos pasientar med mutasjonen K132N ligg under referanseområdet for HMBS aktivitet. Hos denne pasientgruppa er det målingar både i og under referanseområdet.

Pasientar som har rapportert at dei har opplevd akutte anfall som kan knytast til diagnosen er oppgitt som % aktive i tabell 5-1, ein ser og av denne tabellen at det berre er ein pasient med mutasjonen K132N som har rapportert om at han/ho har opplevd akutte anfall som kan knytast til porfyrisjukdommen. Prosentandel av pasientar som opplever aktiv AIP fortel noko om mutasjonens kliniske penetrans [34]. Denne er låg (K132N) og middels (V215E) for dei to nye norske mutasjonane.

Tabell 5-2 syner at pasientar med aktiv AIP gjennomgåande har høgare verdiar på u-ALA og u-PBG enn hos pasientar med ein latent AIP. Bortsett frå hos pasientar med mutasjonen K132N der det var berre ein pasient innanfor aktiv AIP. I denne gruppa ser ein ingen forskjellar i utskilling av ALA/PBG i urin.

HMBS aktiviteten i erythrocyttar skil lite om det er aktiv eller latent AIP for alle mutantar.

4. DISKUSJON

AIP er den hyppigaste og mest alvorlege av dei akutte porfyriane. Dei vanlegaste behandlingane for tilstanden er i dag tilførsel av heme og glukose, men for pasientar med gjentakande alvorlege anfall er denne behandlinga utilstrekkeleg og det er derfor av stor interesse å betre behandlingsmetodane. Prosjektet, som denne masteroppgåva er ein del av, har til intensjon å gjere bruk av farmakologiske chaperoner (FC) som behandlingsstrategi. FC er små molekyl som kan gå inn i cellene og hjelpe eit mutert protein med å folde seg på riktig måte. FC kan dermed ha eit terapeutisk potensial ved å hindre misfolding og vidare nedbryting av ustabile HMBS mutantar [46, 47]. Det er evidens for at FC kan hindre sjukdomsutvikling ved reversering av ustabile mutantars konformasjon til den native villtype konformasjonen. Målet er å utvikle FC optimalisert for kvar av dei enkelte pasientgruppers mutasjon.

Betre kunnskap om både villtype enzymet og dei utvalte mutasjonane er essensielt for å oppnå eit meir effektivt og individuelt behandlingstilbod. Vi har derfor gjennomført ei brei karakterisering med spesiell vekt på enzymaktivitet og stabilitet av rekombinant HMBS. I tillegg er det innhenta prøveresultat på e-HMBS og u-ALA/PBG frå pasientar med dei aktuelle mutantane for å belyse feno-genotypiske samanhengar. Alle mutasjonane bortsett frå K132N og V215E har vore skildra i litteraturen tidlegare.

4.1 Rekombinant enzym

For å karakterisere HMBS blei relativ aktivitet, dei enzymkinetiske parametrane V_{\max} og K_m samt termostabilitet undersøkt for rekombinante enzym av wt og dei utvalte mutantane.

Wt-HMBS

Rekombinant wt-HMBS var under dei gitte omstende eit yttarst termostabilt enzym med høg spesifikk aktivitet. I denne studien blei det funnet ein K_m på $45,1 \pm 0,6 \mu\text{M}$, og ein V_{\max} på $21,3 \pm 1,8 \text{ nmol/mg/min}$. I tillegg blei det funnet ein T_m verdi på 79°C . Andre studium rapporterar K_m verdiar mellom $4,2$ og $15,3 \mu\text{M}$ og V_{\max} på $2110 \text{ nmol/time/mg}$ eller V_{\max} på $2,1 \pm 0,1 \text{ nmol/min}$ [23, 25]. Disse avvika kan skuldast forskjellige oppsett av enzymassay eller ulike reinseprosessar for HMBS. Faktorar som er kjent for å

påverke enzym er pH, temperatur eller ionestyrke i løysninga [48]. I våre studiar har vi valt å utvikle ein reinsem metode som avviker noko frå majoriteten i dei rapporterte studia. Den største forskjellen er utelating av eit oppvarmingstrinn av sonikatet til 60°C før vidare reins. Dette steget vil inaktivere uroporfyrinogen III syntase, samt fjerne dei fleste uspesifikke protein då dei fleste protein blir denaturert ved temperaturar før 65°C [26, 27]. Vi har på tross av det manglande trinnet fått eit reint HMBS protein. I tillegg er det ein mogelegheit for at oppvarming til 60°C vil gi ein irreversibel påverknad av den sekundære struktur av HMBS (Fig. 31, preliminære CD studiar) eller innsetjing av DPM kofaktoren og danning av HMBS-PBG intermediat, som skjer allereie under uttrykkinga av protein i *E.coli*. Disse forholda kan definitivt ha innverknad på alle parametrane som er undersøkt og vil difor bli vidare undersøkt i framtidige studiar. Dei preliminære CD-eksperimenta viste ingen strukturendring ved oppvarming til 37°C, men betydelege forskjellar ved oppvarming frå 37°C til 60°C og vidare 65°C. Etter oppvarminga til 65°C blei same prøve nedkjølt til 20°C og eit nytt spekter blei målt ved denne temperaturen. Spekteret viste ein tydeleg irreversibel strukturendring i wt-HMBS og manglande evne til å gjenoppta den native form. Ein årsak kan truleg vere at ein får mista kofaktoren, ein anna at ein kan miste nokre av intermediata (Fig. 5). Det har vist seg at vårt enzympreparat truleg inneheld ein blanding av ulike HMBS intermediat (upubliserte data), disse held på å bli separert for vidare karakterisering. Ein studie gjort av Awan et al viser at holoenzymet sin sekundære struktur blei endra ved oppvarming til 60°C, men reverserast til den native forma ved avkjøling til 25°C. For apoenzymet vil ein oppvarming til 60°C føre til strukturendring [27]. Ein forskjell mellom disse studia er at Awan et al nedkjøler på is etter 60°C og så analyserer ved 20°C, medan vi i våre forsøk analyserte direkte på 20°C etter oppvarming. Det kan være at enzymet treng tid for å binde kofaktoren igjen. Vi kan ikkje utelate at dersom vi hadde latt enzymet stå ei tid på is før det blei analysert på 20°C igjen kunne ha oppnådd same resultat som for holoenzymet i denne studien. Ein annan viktig faktor er at vi analyserte ved 65°C medan dei brukte 60°C. Disse fem gradene kan eventuelt være utslagsgivande for resultatet, men dette er berre spekulasjonar på det nåverande tidspunkt og må verifiserast med fleire eksperiment.

Figur 28 A-D syner fire forskjellige fit for enzymkinetikk utleda frå Michaelis-Menten likninga. Figur 28 B viser ein lag-periode i starten av reaksjonen og angir dermed ein svak positiv kooperativitet i enzymets substratbinding. Dette bekreftast av kurvene til dei tre andre plotta som følgjer et fit for substrat aktivering og av ein Hill koeffisient på

over 1. Vanlegvis oppstår kooperativitet i oligomere protein med binding av lignad/substrat til en subeinining som induserer en konformasjonsendring og vidare fremme hurtigare binding (aukar affiniteten) av substrat til de andre subeininingar. HMBS er en monomer og sjølv om det er observert kooperativitet i monomere protein er det ganske uvanlig [49]. Ein forklaring kan være at HMBS molekylet har to bindingsseter, sjølv om dette ikkje er rapportert, og binding av substrat til eit aktivt sete opnar og lettar binding av substrat til det neste. Ein annan mogleg forklaring på den positive kooperativiteten kan være at binding av kofaktoren, som består av to PBG molekyl, aukar hastigheita av vidare PBG binding (kinetisk kooperativitet). Dette vil i så fall også forklare figur 32 der vi analyserte aktivitet på HMBS før og etter oppvarming til 65°C. Her ser ein tydelig at etter oppvarming har vi fått eit anna fit på kurva, og at den no viser ein linearitet i Hanes-Woolf tilpassinga i kontrast til den hyperbolske form for det ikkje oppvarma enzym. Det er tap av ”kooperativitet” og kan muligvis forklarast med tap av kofaktoren ved oppvarming til 65°C, som det også er antyda i CD målinga.

K132N

K132N som er lokalisert utanfor det aktive sete på domene 2 viser ikkje veldig store avvik i forhold til wt enzymet *in vitro*. K132N har same K_m , men ein 65,5 % lågare enzym aktivitet samanlikna med wt etter 20 minutt og ein V_{max} verdi på $15,1 \pm 1,8$ nmol/mg/min. Ein lik K_m , men lågare V_{max} kan tyde på at enzymet brukar lengre tid på å frigjere produktet frå det aktive sete. Stabilitetsmålingar viste også at enzymet er stabilt og har ein lik T_m som wt på 79°C. T_m verdien fortel også at mutasjonen ikkje påverkar termostabiliteten til enzymet som ein kanskje i teorien tenkte at den kunne gjere.

V215E

Mutasjonen V215E hadde lågare K_m og V_{max} , og viste berre 27,4 % relativ aktivitet mot wt ($t=20$ min). Aminosyra V215 ligg i det indre av det aktive sete, og ein kunne derfor forvente at mutasjonen ville ha påverknad på binding til kofaktoren og/eller substrat, og dermed enzymaktiviteten til proteinet. Det har tidlegare vore rapportert ein relativ aktivitet på 19 % i forhold til wt hos ein mutant med mutasjon i same aminosyre, V215M [21]. Noko som bekreftar at enzymet er sensitiv for endringar i denne posisjonen.

V215 ligg i hengsleregionen som dannar ei bru mellom domene 1 og domene 2. Ein

mutasjon i denne aminosyra vil og kunne påverke stabiliteten og ikkje minst fleksibiliteten til enzymet. Stabilitetsforsøka som blei gjort på mutanten viste at den hadde same kalkulerte smeltetemperatur T_m som wt med 79°C , men mutanten viste ein antydning til to toppar ved analysering på DSF (Fig. 30). For den andre toppen som blei avlest var T_m 62°C . ”Toppen” blir observert som ein skulder med antydning til topp, men kan ikkje separerast frå topp 1 slik at T_m kan bereknast korrekt. Ei hypotese er at det er forskjellar i intermediat samansetninga i forhold til wt. Figuren syner at enzymet blir folda ut forskjellig frå wt. Topp nr to heller mot toppen for R173W som vi veit er ein apoform av proteinet. For å kunne seie noko om forskjellen i desse to stadia måtte ein til dømes ha fraksjonert og analysert desse delane separat, eit arbeid som er påbegynt i gruppa.

Mutanten V215M har vist ein $> 99\%$ reduksjon av aktivitet etter 240 minutt ved 65°C samanlikna med wt [21], noko som og bekreftar at mutasjonar i denne posisjonen påverkar stabiliteten. Det kan vere aktuelt å framstille denne mutasjonen også for å samanfatta funna for dei to ulike endringane av aminosyra V215.

R173W

Enzymaktivitetsforsøka gjort med denne mutanten viste $< 1\%$ aktivitet samanlikna med wt. Dette var som forventa i forhold til det ein hadde funnet i litteraturen [23, 33, 50]. Mutasjonar i aminosyra Arg173 påverkar orienteringa av molekylet slik at det vanskeleg kan binde porfobilinogen i det aktive sete. Dette fører til at ein ikkje får danna eit stabilt kompleks med kofaktor [23]. Mutasjonen resulterer i eit apoenzym, som ikkje har moglegheit for å katalysere reaksjonen, og dette ser vi tydelig igjen i den låge aktiviteten som enzymet utøve, og stabilitetsforsøka viser at mutanten har lågare stabilitet med ein T_m verdi på 59°C , samanlikna med wt på 79°C . Temperaturscannet med DSF syner også at mutanten har antydning til ein skulder, med ein T_m på 72°C . Ut frå våre resultat har ein kome fram til at denne mutasjonen påverkar både funksjon og stabilitet.

R116W

Våre aktivitetmålingar viste $< 1\%$ aktivitet i forhold til wt. Arg116 er lokalisert i det aktive setet og påverkar binding av DPM kofaktoren og av substratet. Dette fører til at mutasjonen har stor innverknad på aktiviteten til enzymet [33, 34]. Denne påverknaden på aktiviteten har og vorte karakterisert i andre studiar [32, 51].

Endring av aminosyre 116 fører til ein innverknad på ei interdomene saltbru, som gjer til at enzymet blir mindre stabilt. Dette kjem og klart fram i våre stabilitetsforsøk der ein viste at mutasjonen hadde T_m verdi på 54°C samanlikna med wt sin på 79°C . DSF resultatata viser og ein meir avgrensa topp enn for dei andre enzymba noko som kan tyde på eit meir homogent enzym preparat.

R167W

Aminosyra R167 er å finne i ein loop på kanten av det aktive setet, men langt vekk frå kofaktoren. Mutasjonen påverkar ikkje enzymet i å danne intermediaære kompleks med substrat molekylet, men forlengar prosessen for å få frigitt produktet frå det aktive setet [23]. Dette viste og eit preliminært forsøk vi gjorde, der ein såg at mutanten brukte lenger tid for å vise aktivitet enn wt og dei andre mutantane. Ved tidsforsøk etter 20 minutt inkubering viste denne mutasjonen ein 4,2 % aktivitet i forhold til wt under same høve. Seinare studiar viste at denne mutanten trengte andre betingelsar for å fungere optimalt. For å få ein meir korrekt verdi av aktiviteten til mutanten i forhold til wt, burde begge ha blitt analysert under omstende som høgare konsentrasjon av PBG og over ein lenger tidsperiode, dette kom tydeleg fram i kinetikk forsøka som viste at R167W hadde ein K_m på 1248,6 og V_{max} 8,6. K_m verdien indikerar tydeleg at enzymet brukar lenger tid på å frigjere produktet frå det aktive setet. Dei foreløpige resultatata frå aktiviteitsforsøka tyder på at det ikkje er ein så alvorleg mutasjon som R173W og R116W som begge viste $< 1\%$ aktivitet, sjølv om alle disse tre mutasjonane er mutasjonar med endring i aminosyre frå arg til trypt, og endringane er kjent for å påverke binding til DPM kofaktoren og substrat.

Med omsyn til termostabilitet viste denne mutasjonen same T_m verdi som wt. I temperaturscannet som blei kjørt på DSF kunne ein likevel sjå ein tendens til forskjell frå wt, dette i form av at kurva var brattare, det vil seie at delar av enzymet utfolda seg tidlegare. Dette skuldast nok at mutanten har ein forskjellig fordeling av enzym-intermediat kompleksa enn wt, med at mutanten er involvert i binding av substrat til aktivt sete.

4.2 Pasientdata

K132N

Mutant K132N som viste den høgaste aktiviteten i rekombinant protein, hadde og den høgaste aktiviteten i erytrocyttar. Det er her blitt rapportert aktivitetmålingar for K132N på $0,56 \pm 0,32$ U/l (n=10). Referanseområdet for e-HMBS ved HUS er 0,43-0,89 U/l. For pasientar med K132N mutasjonen ligg både verdiar for ALA og PBG i urin innanfor det normale. Dette syner at pasientar med denne mutasjonen uttrykker ein mild form for AIP med både normale verdiar i urin og berre lett nedsett enzymaktivitet. Dette stemmer og overeins med at det er berre ein pasient som har rapportert anfall som kan knytast til AIP. Dette er sjølv rapportert og symptoma treng derfor nødvendigvis ikkje vere knytt til ein porfyridiagnose. Pasienten som er registrert som aktiv AIP har ein verdi for e-HMBS som ligg rett under referanseområdet med 0,37 U/l. Det har truleg blitt rekvirert genetisk undersøking av pasienten på grunnlag av denne aktivitetmålinga ettersom det ikkje er noko som tydar på AIP i forhold til utskiljing i urin. Ved genetisk undersøking blei denne mutasjonen funnet i HMBS genet, og det blei antyda at den kunne vere sjukdomsframkallande, og i den forbindelse blei det utreda familiemedlemmar av denne pasienten. Dette forklarar at det i talmaterialet vårt berre er ein pasient med aktiv AIP, medan det er registrert ni med latent AIP. Det rekombinante enzymet med denne mutasjonen viste 65,5 % aktivitet i forhold til wt over tid noko som er ein tydeleg redusert aktivitet. Ein mogleg forklaring på denne låge aktiviteten i forhold til det som aktiviteten i erytrocyttar viser kan være at det er oppreguleringsmekanismer i cellene som gjer at enzymet utøve ein betre aktivitet og at den nedsette aktiviteten i e-HMBS ikkje har klinisk betyding. For å kunne seie meir om dette fenomenet vil det vere aktuelt å sjå på reguleringsmekanismer som til dømes fosforylering av det rekombinante enzymet.

V215E

I den norske befolkninga er dette ein nokså vanleg mutasjon. For pasientar som er registrert i Norsk Porfyriregister er det 59 % som har rapportert om ein aktiv form for AIP (n=37). Enzymaktiviteten i erytrocyttar ligg under referanseområdet for alle pasientane med denne mutasjonen med eit snitt på $0,32 \pm 0,09$ U/l. Dette stemmer og med ein lågare aktivitet hos det rekombinante proteinet.

Med omsyn til utskiljing i urin var det stor spreing i resultata. Nokre viser høg

utskiljing, medan andre har normalutskiljing. Dette reflekterer nok at nokre prøvar kan vere tatt under anfall, medan andre prøvar kan vere registrert når pasientar ikkje opplever anfall. Resultata viser derimot at det gjennomgåande litt lågare utskiljing av ALA og PBG hos pasientar med latent AIP i forhold til pasientar med akutt AIP, dette er antydning i litteraturen at berre om lag 30 % av pasientar utan klinisk manifest AIP viser auka PBG i urin [16].

R173W

Det er i Porfyriregisteret i Noreg berre registrert 4 pasientar med denne mutasjonen. Alle pasientane har ein låg aktivitet av e-HMBS. Etersom det er 75 % av pasientane som har rapportert om ein aktiv form for AIP, ville ein forvente at ein kunne finne høg utskiljing av PBG hos pasientane. Dette viser dataa då ikkje, med berre ein lett forhøgd utskiljing av PBG. Dette skuldast nok igjen at dei innsamla data ikkje seie noko om når prøvane er tatt og analysert, og at 1/3 av pasientane viser normal utskiljing av PBG mellom anfall [6]. To-Figuera et al har antydning at R173W er ein mutasjon med høg biokjemisk penetrans basert på å ha funnet høg PBG utskiljing hos pasientar både med manifest og latent AIP [8]. På grunnlag av det låge antal av pasientar vi har innanfor denne gruppa kan vi verken støtte eller avvise denne hypotesa

R116W

Det nest største pasientgrunnlaget frå Porfyriregisteret har ein frå pasientar med mutasjonen R116W (n=18, 83 % rapportert som aktiv AIP). Det er rapportert nedsett aktivitet av HMBS i erytrocyttar hos alle pasientar med denne mutasjonen, som ein også ville forvente ut frå den strukturelle informasjonen ein har om mutanten. Hos denne pasientgruppa er det registrert prøvesvar med stor utskiljing av ALA og PBG i urin. Dette reflekterer den store andelen av pasientar som har oppgitt at dei har ein aktiv AIP, men kan også skuldast den biokjemiske penetransen som denne mutasjonen har. Dersom prøvesvara er samla inn ved anfall er det naturleg at verdiane av ALA/PBG i urin er høge.

R167W

Dette er rapportert som ein mildare form for AIP enn dei to føregåande mutasjonane [34]. Dette kjem ikkje tydeleg fram frå våre pasientdata som viser ein litt høgare

e-HMBS aktivitet enn R116W og R173W, men større utskiljing i urin. Det er i denne samanheng viktig å notere at vi berre har fire pasientar med denne mutasjonen i Porfyriregisteret. I våre data viser denne mutasjonen høgare utskiljing i urin enn til dømes R173W. Det er derimot vist at R173W mutasjonen har ein høgare klinisk penetrans enn R167W [34]. Eit anna aspekt som tydar på at mutasjonar i posisjon 167 gir ein mildare form av AIP er at det er rapportert om homozygote pasientar (R167Q/R167Q og R167W/R173W) [33]. AIP mutasjonar affiserar vanlegvis berre det eine allelet, då hemesyntesen er essensiell. For oss å kunne seie noko konkret om forskjellar i det kliniskbiokjemiske biletet mellom mutasjonane R167W og R173W måtte ein ha hatt fleire innhenta data.

4.3 Feno-genotype samanhengar

AIP er ein sjeldan arveleg tilstand, det vil difor kunne være ein utfordring å få nok pasientgrunnlag for å kunne kartlegge direkte feno-genotype samanhengar, og å kunne skilje den kliniske penetransen mellom dei ulike familiegruppene på eit statistisk korrekt grunnlag. For å studere slike samanhengar må ein og være merksam på at det vil kunne vere mekanismar *in vivo* som gjer til at til dømes ein mutasjon ikkje har same tyding i kroppen som dei resultata ein får frå det reine proteinet. Det kan også vere mogeleg at det er polymorfismar i det enkelte individ som vil påverke dei ulike mutasjonane og gjer at mutasjonar kan opptre forskjellig hos ulike pasientar. Pasientens kroppstemperatur og pH vil også vere med å påverke korleis enzymet fungerer, særleg kan dette gjere utslag på ustabile mutantar. For å supplere informasjonen ein får frå det rekombinante enzym vil det derfor også vere aktuelt å studere enzymet i celler og frå pasientprøvar.

Det er viktig med kunnskap om det rekombinante enzym for å kunne utvikle behandlingsmetodar for pasientar med AIP. Ut frå funna på proteinnivå kan ein seie noko om korleis mutasjonen påverkar enzymet strukturelt og funksjonelt. Denne informasjonen har gjort til at ein har funne mutasjonar som påverkar aktivitet, og mutasjonar som påverkar folding og stabilitet i enzymet. Denne ulikheita gjer til at det vil være aktuelt å finne ulik behandling for dei ulike mutantane. Chaperoner vil være med på å stabilisere proteinet, og blant våre mutantar vil denne behandlingsmetoden

kunne være aktuell for ein mutasjon som K132N og andre som er ustabile, men har aktivitet. Dei mutasjonane som ikkje virke å ha enzym aktivitet vil det heller vere aktuelt å undersøke for eventuell enzymerstatningsterapi.

For vidare arbeid med feno-genotype samanhengar vil det vere av nytte å ha kjennskap til dei ulike familiane innanfor dei enkelte mutasjon. Etersom AIP er ein autosomal arveleg sjukdom er det ofte slik at kvar familie har sin mutasjon. For å få eit betre grunnlag for å kunne vurdere dei biokjemiske prøveresultata vil det vere aktuelt å samle inn prøveresultat frå familiegrupper, samt at ein skaffar seg kliniske opplysningar om pasientane for tidspunktet prøven blir tatt. Ein annan grunn for at det er viktig med informasjon om når prøvesvara er frå, om dei er sendt i forbindelse med akutt anfall eller ikkje er at dette vil kunne påverke inntrykket som blir gitt frå talverdiane, då om lag ein tredjedel av pasientar med akutte anfall har ”normale” verdiar mellom anfalla [52]. Nokre pasientar vil også i utgangspunktet ha vedvarande høge verdiar av ALA/PBG i urin. Dette gjer tolking av laboratorieresultata utfordrande, ettersom det kan vere vanskeleg å skilje mellom høge verdiar som skuldast eit akutt anfall, eller om det skuldast biologisk variasjon hos pasienten. Det ideelle i slike tilfeller vil vere å vite den eksakte pasient sitt referanseområde [53]. Det er derfor vanskeleg å kunne komme med nokre klare antydingar ut frå pasientprøvane, men saman med informasjon om det rekombinante enzym håpar ein å betre denne forståinga.

Dei viktigaste trekka i resultata vil bli oppsummert under konklusjonen.

5. KONKLUSJON

1. K132N hadde den same K_m , lågare V_{max} og viste 65,5 % aktivitet samanlikna med den rekombinante wt-HMBS. Saman med biokjemiske data frå pasientprøvar gav disse resultatane ein indikasjon på at dette er ein mild form for AIP. I forhold til behandlingsform vil K132N kunne vere aktuell for eventuell behandling med farmakologiske chaperoner.
2. V215E hadde lågare K_m og V_{max} , og viste berre 27,4 % aktivitet samanlikna med wt. Pasientane med denne mutasjonen har ein låg aktivitet i erytrocyttar og viser høgare utskiljing av ALA/PBG i urin. Når ein ser alle resultatane under eitt indikerer dette ein meir alvorleg form for AIP. Etersom denne mutasjonen påverkar både stabilitet og aktivitet, vil det vere aktuelt å undersøke både for behandling med chaperoner og enzymerstatningsterapi.
3. Mutantane R116W, R167W og R173W viser alle grader av redusert termodynamisk stabilitet. Dette kan indikere at dei har lågare metting med kofaktoren, eller tilstadeværing av intermediat kompleksa enn for wt. R167W viser også ein svært høg K_m verdi som tydar på at mutanten brukar veldig lang tid på å frigjere produktet. R116W og R173W viste veldig låg aktivitet som forventast, disse vil vere kandidatar for enzymerterapi. Medan R167W bør vurderast på begge former for behandling.

Resultata frå denne studien har vore med på å klassifisere dei nye mutasjonane. Saman med framtidige studiar vil disse resultatane vere med på å fremme forståing for dei patologiske mekanismane for AIP.

5.1 Framtidige aspekt for forskingsgruppa

Masteroppgåva har vore del av eit stort prosjekt som starta opp samtidig med oppgåva mi. Arbeidet som har blitt gjort i denne studien har lagt eit grunnlag for vidare arbeid med wt og dei utvalte mutantane i håp om å kunne tilby pasientar med AIP eit betre og meir individuelt behandlingstilbod enn det som finnast i dag.

Det er i dag arbeida med å karakterisere dei ulike intermediata for å få betre forståing med funksjonen av disse. Det vil elles bli undersøkt vidare med aktivitetsforsøk på oppvarma enzym for å forstå årsaka til funnet vi hadde i figur 31, samt at ein vil utføre reinseproseduren der ein har med steget for oppvarming av sonikatet før reinsing på affinitetskolonnen. Funnet vi hadde når det blei sett på strukturendringar ved oppvarming av enzymet, er også eit viktig funn som blir undersøkt vidare. I forhold til behandlingsformer vil det i første omgang bli undersøkt for effekt av utvalte FC på rekombinante enzym og dei mest lovande molekyla vil verte vidare undersøkt i både celle og dyreforsøk. Dette er eit prosjekt som er i startfasen, men som har eit stort potensiale og det er stor tru på at det kan vere til hjelp for pasientar med AIP.

Litteraturliste:

1. Burtis, C.A., E.R. Ashwood, and N.W. Tietz, *Tietz textbook of clinical chemistry*. 1999, Philadelphia: Saunders. XXXVII, 1917 s.
2. Puy, H., L. Gouya, and J.C. Deybach, *Porphyrias*. *Lancet*. **375**(9718): p. 924-37.
3. Hoffbrand, A.V., E.G.D. Tuddenham, and D. Catovsky, *Postgraduate haematology*. 2005, Malden: Blackwell. xiii, 1073 s.
4. Herrick, A.L. and K.E. McColl, *Acute intermittent porphyria*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2005. **19**(2): p. 235-49.
5. Puy, H., et al., *Increased delta aminolevulinic acid and decreased pineal melatonin production. A common event in acute porphyria studies in the rat*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(1): p. 104-10.
6. Stokke, O. and T.-A. Hagve, *Klinisk biokjemi og fysiologi*. 2006, Oslo: Gyldendal akademisk. 403 s.
7. Thadani, H., A. Deacon, and T. Peters, *Diagnosis and management of porphyria*. *BMJ*, 2000. **320**(7250): p. 1647-51.
8. To-Figueras, J., et al., *Genetic and biochemical characterization of 16 acute intermittent porphyria cases with a high prevalence of the R173W mutation*. *J Inherit Metab Dis*, 2006. **29**(4): p. 580-5.
9. Andersson, C., et al., *Diagnosis of acute intermittent porphyria in northern Sweden: an evaluation of mutation analysis and biochemical methods*. *J Intern Med*, 1995. **237**(3): p. 301-8.
10. Tollali, G., E.W. Nielsen, and O.L. Brekke, [*Acute intermittent porphyria*]. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 2002. **122**(11): p. 1102-5.
11. Sassa, S., *Diagnosis and therapy of acute intermittent porphyria*. *Blood Rev*, 1996. **10**(1): p. 53-8.
12. Meyer, U.A., M.M. Schuurmans, and R.L. Lindberg, *Acute porphyrias: pathogenesis of neurological manifestations*. *Semin Liver Dis*, 1998. **18**(1): p. 43-52.
13. Soonawalla, Z.F., et al., *Liver transplantation as a cure for acute intermittent porphyria*. *Lancet*, 2004. **363**(9410): p. 705-6.
14. Puy, H., et al., *Molecular epidemiology and diagnosis of PBG deaminase gene defects in acute intermittent porphyria*. *Am J Hum Genet*, 1997. **60**(6): p. 1373-83.
15. Anderson, K.E., et al., *Recommendations for the diagnosis and treatment of the acute porphyrias*. *Ann Intern Med*, 2005. **142**(6): p. 439-50.
16. Thunell, S., *Hydroxymethylbilane Synthase (HMBS) Deficiency*. 1993.
17. Correia, M.A. and J.M. Lunetta, *Acute hepatic heme depletion: impaired gluconeogenesis in rats*. *Semin Hematol*, 1989. **26**(2): p. 120-7.
18. Dar, F.S., et al., *Liver transplantation for acute intermittent porphyria: a viable treatment?* *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. **9**(1): p. 93-6.
19. Marshall, W.J. and S.K. Bangert, *Clinical chemistry*. 2008, Edinburgh: Mosby Elsevier. 416 s.
20. Johansson, A., et al., *Adenoviral-mediated expression of porphobilinogen deaminase in liver restores the metabolic defect in a mouse model of acute intermittent porphyria*. *Mol Ther*, 2004. **10**(2): p. 337-43.

21. Ulbrichova, D., et al., *Correlation between biochemical findings, structural and enzymatic abnormalities in mutated HMBS identified in six Israeli families with acute intermittent porphyria*. Blood Cells Mol Dis, 2009. **42**(2): p. 167-73.
22. Lundin, G., et al., *Four mutations in the porphobilinogen deaminase gene in patients with acute intermittent porphyria*. J Med Genet, 1995. **32**(12): p. 979-81.
23. Song, G., et al., *Structural insight into acute intermittent porphyria*. FASEB J, 2009. **23**(2): p. 396-404.
24. Shoolingin-Jordan, P.M., M.J. Warren, and S.J. Awan, *Discovery that the assembly of the dipyrromethane cofactor of porphobilinogen deaminase holoenzyme proceeds initially by the reaction of preuroporphyrinogen with the apoenzyme*. Biochem J, 1996. **316** (Pt 2): p. 373-6.
25. Schneider-Yin, X., et al., *Characterization of two missense variants in the hydroxymethylbilane synthase gene in the Israeli population, which differ in their associations with acute intermittent porphyria*. Mol Genet Metab, 2008. **94**(3): p. 343-6.
26. Gill, R., et al., *Structure of human porphobilinogen deaminase at 2.8 Å: the molecular basis of acute intermittent porphyria*. Biochem J, 2009. **420**(1): p. 17-25.
27. Awan, S.J., et al., *Reconstitution of the holoenzyme form of Escherichia coli porphobilinogen deaminase from apoenzyme with porphobilinogen and preuroporphyrinogen: a study using circular dichroism spectroscopy*. Biochemistry, 1997. **36**(30): p. 9273-82.
28. Ulbrichova, D., et al., *Acute intermittent porphyria--impact of mutations found in the hydroxymethylbilane synthase gene on biochemical and enzymatic protein properties*. FEBS J, 2009. **276**(7): p. 2106-15.
29. Gu, X.F., et al., *High prevalence of a point mutation in the porphobilinogen deaminase gene in Dutch patients with acute intermittent porphyria*. Hum Genet, 1993. **91**(2): p. 128-30.
30. Llewellyn, D.H., et al., *Homozygous acute intermittent porphyria: compound heterozygosity for adjacent base transitions in the same codon of the porphobilinogen deaminase gene*. Hum Genet, 1992. **89**(1): p. 97-8.
31. Kauppinen, R., *Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis applied to the diagnosis of acute intermittent porphyria*. Mol Cell Probes, 1992. **6**(6): p. 527-30.
32. Chen, C.H., et al., *Acute intermittent porphyria: identification and expression of exonic mutations in the hydroxymethylbilane synthase gene. An initiation codon missense mutation in the housekeeping transcript causes "variant acute intermittent porphyria" with normal expression of the erythroid-specific enzyme*. J Clin Invest, 1994. **94**(5): p. 1927-37.
33. Solis, C., et al., *Acute intermittent porphyria: studies of the severe homozygous dominant disease provides insights into the neurologic attacks in acute porphyrias*. Arch Neurol, 2004. **61**(11): p. 1764-70.
34. Andersson, C., et al., *The W198X and R173W mutations in the porphobilinogen deaminase gene in acute intermittent porphyria have higher clinical penetrance than R167W. A population-based study*. Scand J Clin Lab Invest, 2000. **60**(7): p. 643-8.
35. Pischik, E., S. Mehtala, and R. Kauppinen, *Nine mutations including three novel mutations among Russian patients with acute intermittent porphyria*. Hum Mutat, 2005. **26**(5): p. 496.

36. Delfau, M.H., et al., *Two different point G to A mutations in exon 10 of the porphobilinogen deaminase gene are responsible for acute intermittent porphyria*. J Clin Invest, 1990. **86**(5): p. 1511-6.
37. Ulbrichova, D., et al., *De Novo mutation found in the porphobilinogen deaminase gene in Slovak acute intermittent porphyria patient: molecular biochemical study*. Physiol Res, 2006. **55 Suppl 2**: p. S145-54.
38. Wilson, K. and J.M. Walker, *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. 2005, Cambridge: Cambridge University Press. XVII, 783 s.
39. Kaplan, L.A. and A.J. Pesce, *Clinical chemistry: theory, analysis and correlation*. 1996, St. Louis, Mo.: Mosby. XVII, 1211 s.
40. Whitford, D., *Proteins: structure and function*. 2005, Chichester: Wiley. XIV, 528 s.
41. Wolfe, S.L., *Molecular and cellular biology*. 1993, Belmont, Calif.: Wadsworth. xviii, 1145 s.
42. Ford, R.E., C.N. Ou, and R.D. Ellefson, *Assay for erythrocyte uroporphyrinogen I synthase activity, with porphobilinogen as substrate*. Clin Chem, 1980. **26**(8): p. 1182-5.
43. Mauzerall, D. and S. Granick, *The occurrence and determination of delta-amino-levulinic acid and porphobilinogen in urine*. J Biol Chem, 1956. **219**(1): p. 435-46.
44. Shoolingin-Jordan, P.M., et al., *Human porphobilinogen deaminase mutations in the investigation of the mechanism of dipyrromethane cofactor assembly and tetrapyrrole formation*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 3): p. 731-5.
45. Shoolingin-Jordan, P.M. and R. Leadbeater, *Coupled assay for uroporphyrinogen III synthase*. Methods Enzymol, 1997. **281**: p. 327-36.
46. Calvo, A.C., et al., *Effect of pharmacological chaperones on brain tyrosine hydroxylase and tryptophan hydroxylase 2*. J Neurochem. **114**(3): p. 853-63.
47. Martinez, A., et al., *Rescuing proteins of low kinetic stability by chaperones and natural ligands phenylketonuria, a case study*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2008. **83**: p. 89-134.
48. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemistry*. 2001, New York: Freeman. XXXVIII, 974, [72] s.
49. Flydal, M.I., et al., *Superstoichiometric binding of L-Phe to phenylalanine hydroxylase from Caenorhabditis elegans: evolutionary implications*. Amino Acids. **39**(5): p. 1463-75.
50. Mustajoki, S., et al., *Acute intermittent porphyria: expression of mutant and wild-type porphobilinogen deaminase in COS-1 cells*. Mol Med, 2000. **6**(8): p. 670-9.
51. Ong, P.M., et al., *Acute intermittent porphyria: the in vitro expression of mutant hydroxymethylbilane synthase*. Mol Cell Probes, 1997. **11**(4): p. 293-6.
52. Kauppinen, R. and M. von und zu Fraunberg, *Molecular and biochemical studies of acute intermittent porphyria in 196 patients and their families*. Clin Chem, 2002. **48**(11): p. 1891-900.
53. Aarsand, A.K., P.H. Petersen, and S. Sandberg, *Estimation and application of biological variation of urinary delta-aminolevulinic acid and porphobilinogen in healthy individuals and in patients with acute intermittent porphyria*. Clin Chem, 2006. **52**(4): p. 650-6.

APPENDIX

Buffere og løsingar brukt i masteroppgåva

0,1 % Commasie Brilliant Blue R-250 (3 liter)

1,5 liter etanol
1,5 liter ddH₂O
210 ml eddiksyre
3,21g Coomassie blue, brilliant blue R (250)

Elfo-buffer (runningbuffer)

25 mM TrisBase
192 mM Glycin
0,1% SDS
pH til 8,3

Ehrlich fargereagens

5 g 4-Dimethylamino-benzaldehyd
210 mL konsentrert eddiksyre
40 mL Perklorsyre 70-72%
Dette er nok til 12 pasientprøver.

Fosfatbuffer til CD

10 mM Fosfatbuffer KH₂PO₄
150 mM KF
pH 8,2

0,25 M Fosfat/Citratbuffer

13,4 g Na₂HPO₄ x 7 H₂O.
Løses i 180 mL dd H₂O
pH justeres til 7,5 med 0,23 M Sitronsyre.
Fyll opp med ddH₂O til 200 ml.

Homogeniseringsbuffer

Til 100 ml PBS tilsettes:
150 µl (a 10mg/ml) Benzamidine
100 µl (a 0,5M) EDTA
500 µl (a 0,1M) PMSF
1 stk protease inhibitor cocktail tablett

Klippebuffer

50 mM TrisHCl
2 mM CaCl₂ x 2H₂O
1 mM DTT
150 mM NaCl
pH justeres til 8,0

Kolonnebuffer til FPLC-kolonne

20 mm Hepes

0,2 M NaCl

2 l milliQ vann

pH til 7

løsningsen filtreres og behandles varsomt for å unngå bobler.

Mjølke

30 ml TBS-T

1,5 g mjølke pulver

PBS- buffer

140 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

1,8 mM KH₂PO₄

pH til 7,4

SDS- denaturerings buffer

125 mM Tris-HCl pH 6,8

4 % (w/v) SDS

20 % (v/v) glyserol

10 % (v/v) 2-mercaptoethanol

0,002 % (w/v) Bromphenol Blue

Soc-medium

20 g trypton

5 g gjær ekstrakt

0,5 g NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgCl₂

20 mM glukose

pH 7,4

Transferbuffer (x10)

144g glycin

30,3g Tris

ddH₂O til 1 liter

TBS (x10)

24,4g Tris

80,0g NaCl

pH blir justert til 7,4

TBS-T (x1)

100 ml TBS x10

900 ml kald ddH₂O

1 ml Tween (tilsettes rett før bruk)

Vaskebuffer

2 ml 0,5 M EDTA til 1 liter PBS-buffer

Triton X-100/ZnSO₄/DTT

0,0144g ZnSO₄ x 7 H₂O.

0,0077g Dithiothreitol.

Løysast i 0.2 % Triton X-100 til 50 ml

Fyll opp til 50 mL med 0,2 % Triton X-100.

1.4 mmol/l PBG

0,001 g porfobilinogen (PBG)

Løses i 3.2 mL fosfat/citratbuffer i glass pakket i aluminiumsfolie.

Dette er nok til 1 prøve + 2 kontroller.

10 % Trikloreddiksyre

100 g trikloreddiksyre

1 liter ddH₂O

filtrast