

Hovedoppgave i biokjemi
Sonja Trentinaglia Tveiten

**Subkloning og proteinanalyser av
rGH-varianter i MDCK II-celler**



Institutt for molekylær biovitenskap
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet
UNIVERSITETET I OSLO
Vår 2006

FORORD

Den eksperimentelle delen av hovedfagsoppgaven i biokjemi, ble utført ved Institutt for Molekylær Biovitenskap, Universitet i Oslo. Mine veiledere har vært professor Dr. scient Kristian Prydz og Dr. scient Heidi Tveit.

Jeg vil gjerne rette en stor takk til professor Dr. scient Kristian Prydz og Dr. scient Heidi Tveit for en interessant hovedfagsoppgave, og for den fantastiske veiledningen jeg har mottatt både med den praktiske delen og med skriveingen. De har alltid tatt seg tid til å diskutere resultater, hjelpe meg med gode råd og oppmuntret meg under hele hovedfagsarbeidet.

Videre vil jeg takke resten av "PG-gruppa" som alltid har tatt seg tid til å hjelpe meg, og for det gode miljøet i gruppa. Spesielt takk til Supunnee Sokboonya og Gunnar Dick, for all teknisk hjelp.

Flere personer har ventet lenge på at jeg skulle bli ferdig med studietiden, disse fortjener en STOR takk for all støtte under studietiden. Jeg tenker spesielt på mamma Elsa-Kari Tveiten, bestemor Jenny Tveiten og bestefar Reiar E. Tveiten.

Til slutt vil jeg rette en stor takk til Birgitte Paulsen som har kommet med god hjelp og innspill under hele studietiden.

Oslo den 22.05.2006

.....
Sonja Trentinaglia Tveiten

INNHALDSFORTEGNELSE

FORORD	3
INNHALDSFORTEGNELSE	4
FORKORTELSER	6
1.0 INNLEDNING	10
1.1 Epitelceller	10
1.2 Madin-Darby canine kidney (MDCK) -celler	11
1.3 Proteoglykaner (PG) og glykoproteiner	12
1.3.1 Proteoglykaner.....	13
1.3.2 Glykoproteiner.....	17
1.4 Intracellulær transport	18
1.5 Sorteringssignaler	20
1.5.1 Apikale sorteringssignaler.....	20
1.5.2 Basolaterale sorteringssignaler.....	25
1.5.3 Transcytosesignaler.....	26
1.6 Veksthormon	27
2.0 MATERIALER OG LØSNINGER	28
2.1 Diverse materialer	28
2.2 Diverse løsninger	37
3.0 METODER	41
3.1 Arbeid med mikroorganismer	41
3.1.1 Tillaging av vekstskåler.....	41
3.1.2 Oppdyrking av <i>E.coli</i> fra frysekultur.....	42
3.1.3 Bevaring av <i>E.coli</i> i frysekultur.....	42
3.2 Arbeid med DNA	43
3.2.1 "Kvikksjekk"-metoden.....	43
3.2.2 Plasmidisolering.....	43
3.2.3 Rensing av DNA-fragmenter fra agarosegel.....	44
3.2.4 Agarosegel-elektroforese.....	45
3.2.5 Kvantitering av DNA.....	46
3.3 Polymerase kjedereaksjon (PCR; Polymerase chain reaction)	46
3.4 Kløyving av DNA med restriksjonsenzymmer	50
3.5 Ligering	51

3.6 Sekvensering	52
3.7 Transformering av DNA i E.coli-celler	53
3.7.1 Preparering av kompetente <i>E.coli</i> -celler	53
3.7.2 Transformering av kompetente <i>E.coli</i> -celler	54
3.8 Sorteringsstudier	55
3.8.1 Transfeksjon	55
3.8.2 Trypsinering av celler.....	57
3.8.3 Deteksjon av proteinuttrykk ved hjelp av konfokal fluorescensmikroskopi.....	58
3.8.4 Dyrking av epitelceller på filter	59
3.8.5 Radioaktiv innmerking	61
3.8.6 Immunopresipitering (IP) av rGH:GFP med antistoff	62
3.8.7 Påvisning av CSPG	64
3.8.8 SDS-PAGE	65
4.0 RESULTATER	67
4.1 Molekylærbiologiske metoder	68
4.1.1 PCR amplifisering av rGH konstrukter	70
4.1.2 Identifisering av positive transformanter med pGEM-T Easy og innskudd.....	81
4.1.3 Restriksjonsanalyse av rGH-konstrukter i pEGEM T-Easy vektor	82
4.1.4 Restriksjonskutting av pEGFP-N3 vektor med <i>Xho</i> I og <i>Eco</i> RI.....	83
4.1.5 Identifisering av positive transformanter med pEGFP-N3/pcDNA3 vektor og innskudd	84
4.1.6 Restriksjonsanalyse av rGH-varianter i pEGFP N3-/pcDNA3-vektor	84
4.2 Transfeksjon og seleksjon av positive kloner	86
4.3 Karakterisering av uttrykk og polarisert sortering av rGH:GFP-varianter	88
4.3.1 Analyse av rGH:GFP-varianter	90
5.0 DISKUSJON	95
Forslag til videre arbeid med rekombinant rotte veksthormon.....	99
REFERANSELISTE	100

FORKORTELSER

amp	Ampicillin
Asn	Aspargin
bp	Basepar
BSA	Bovint serumalbumin
C-terminal	Karboksytsyre-enden av et polypeptid
CaCo-2 celler	“Caucasian colon adenocarcinoma cells”
CFTR	Cystisk fibrose transmembran konduktans regulator
CO ₂	Karbondioksid
CS	Kondroitinsulfat
CRE	Common recycling endosomes
Cys	Cystein
dH ₂ O	Destillert vann
DMEM	“Dulbecco`s modified Eagle`s medium”
DMSO	Dimetyl sulfoksid
DNA	Deoksyribonuklein syre
dNTP	2`-deoksynukleosid-5`trifosfat
DS	Dermatansulfat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	Ekstracellulær matriks
EDTA	Etylen-diamin-tetra-acetat
EPO	Erytropoietin
ER	Endoplasmatisk retikulum
<i>et al.</i>	Og andre (Latin: <i>et alibi</i>)
etc.	Og så videre (Latin: <i>et cetera</i>)
EtBr	Etidium bromid
<i>Expand</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
FBS	Føtalt bovint serum

g	Gram
GAG	Glukosaminoglykan
Gal	Galaktose
GalNAc	N-acetylgalaktosamin
GFP	Grønt fluorescerende protein
GH	Vekst hormon (Growth hormone)
GlcN	Glukosamin
GlcNAc	N-acetyl-Glukosamin
GlcUA	Glukuronsyre
Gly	Glysin
GLYT2	Glycine Neurotransmitter Transporter
gp80	Gykoprotein (Apolipoprotein J), 80 kDa
GPI-anker	Glykosylfosfatidylinositol-anker
HS	Heparansulfat
IdoUA	Iduronsyre
IgG	Immunoglobulin G
<i>In vitro</i>	Prosesser utført på laboratoriet
<i>In vivo</i>	Prosesser i levende organismer
IP	Immunopresipitering
Kb	Kilo base par
kDa	Kilodalton
KS	Keratan sulfat
L	Liter
LB-medium	Luria/Bertani buljong
LDL-R	"Low density lipoprotein reseptor"
Man	Mannose
MDCK	"Madin-Darby canine kidney"
Met	Metionin
mCi	Millicurie
min	Minutter
mL	Milliliter

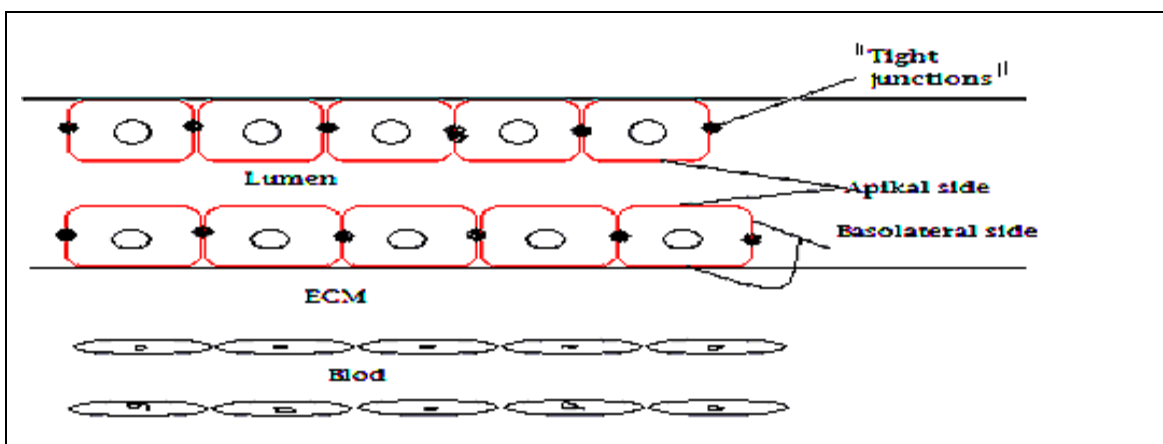
mRNA	"Messenger ribonucleic acid"
N	Nitrogen
NeuNAc	Sialinsyre ("N-acetylneuraminic acid")
N-terminal	Amino-enden av et polypeptid
NTP	Nukleotid-5`-trifosfat
O	Oksygen
P	Fosfat
PAPS	3`-fosfoadenosin 5`-fosfosulfat
PBS	Fosfatbufret saltvann
PCR	Polymerase kjedereaksjon ("Polymerase chain reaction")
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin
PG	Proteoglykan
Pro	Prolin
rGH	Rotte veksthormon ("Rat growth hormone")
rpm	Rotasjoner per minutt
sek	Sekunder
SO ₄ ⁻²	Sulfat
SDS-PAGE	Natrium dodecyl sulfat-polyakrylamid gelelektroforese ("sodium dodecyl (lauryl) sulfate-polyacrylamide gel")
Ser	Serin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE-buffer	Tris-EDTA-buffer
TEMED	Tetrametyletylendiamin
TGN	Trans-Golgi nettverk
Thr	Treonin
Tris	Tris (hydroksymetyl) aminometan
Triton X-100	T-oktylfenoksy-polyetoksyetanol
µg	Mikrogram
µL	Mikroliter
UV-lys	Ultrafiolett lys
V	Volt

<i>Vent</i>	<i>T. litoralis</i>
VIP36	Vesikulært integralt membranprotein, 36 kDa
VSV-G	Vesikulær stomatitis virus glykoprotein
Xyl	Xylose

1.0 INNLEDNING

1.1 Epitelceller

De fleste cellyttypene i multicellulære organismer er polariserte. Et karakteristisk trekk for polariserte celler er en oppdeling av celleoverflaten i forskjellige membrandomener. Hos epitelceller er plasmamembranen inndelt i den apikale og den basolaterale side.



Figur 1.1: Epitelceller. Den apikale siden vender mot lumen av organet, og den basolaterale siden vender mot blodsiden og rommet mellom cellene. Cellene er atskilt av "tight junctions".

Den apikale plasmamembranen vender mot lumen av organer som lunger, tarm, nyreganger etc. og er utsatt for miljøvariasjoner som endringer i osmotisk trykk eller enzymer og trenger derfor en spesielt robust overflate. Den apikale membranen har en spesiell sammensetning av lipider, blant annet mye sfingolipider, som sammen med kolesterol kan danne tettpakkede membranmikrodomener kalt "lipid rafts" (Simons and Vaz, 2004). Det meste av de apikale sfingolipidene er glykosfingolipider som beskytter cellen mot ytre utfordringer (Hansson *et al.*, 1986). I tillegg har den apikale siden mikrovilli, som øker overflaten og dermed muligheten for opptak av stoffer. Epitelceller i nyrene og tarmen har stor kapasitet for absorpsjon og sekresjon. Den basolaterale membranen, som er i kontakt med blodforsyningen, inneholder mye fosfatidylcholin og proteiner som er ansvarlig for næringsopptak og vekstkontroll.

Cellene i et epitellag er bundet sammen av spesielle proteinkomplekser ("tight junctions") rett under deres apikale overflate. Funksjonen til "tight junctions" er å forhindre fri passasje av molekyler og ioner mellom lumen og blodsiden og å opprettholde en forskjell i protein- og lipidsammensetning mellom den apikale og basolaterale membranside (van Meer and Simons, 1986). Denne forskjellen fører til en polaritet som medfører at cellene må opprettholde spesifikke transportveier til og fra begge disse sidene av cellelaget og at mange molekyler må underkastes sorteringsmekanismer for å transporteres til sitt korrekte målsted. Sorteringen medieres ved at signaler i molekylstrukturene gjenkjennes av et sorteringsapparat. Til den basolaterale side sorteres blant annet proteiner (blant disse integriner; transmembrane reseptorer) og proteoglykaner (blant disse Syndecan; et transmembrant heparansulfat proteoglykan) som er viktige for epitelcellenes interaksjon med den ekstracellulære matriks. Denne interaksjonen er igjen viktig for at epitelcellene skal innordne seg i epitelcellelaget, og er ofte nedregulert når epitelceller transformeres til kreftceller (over halvparten av alle kreftformer har epitelial opprinnelse).

1.2 Madin-Darby canine kidney (MDCK) -celler

MDCK-celler er en epitelcellelinje isolert fra nyretubuli fra en hund i 1958 av S.H. Madin og N.B. Darby.

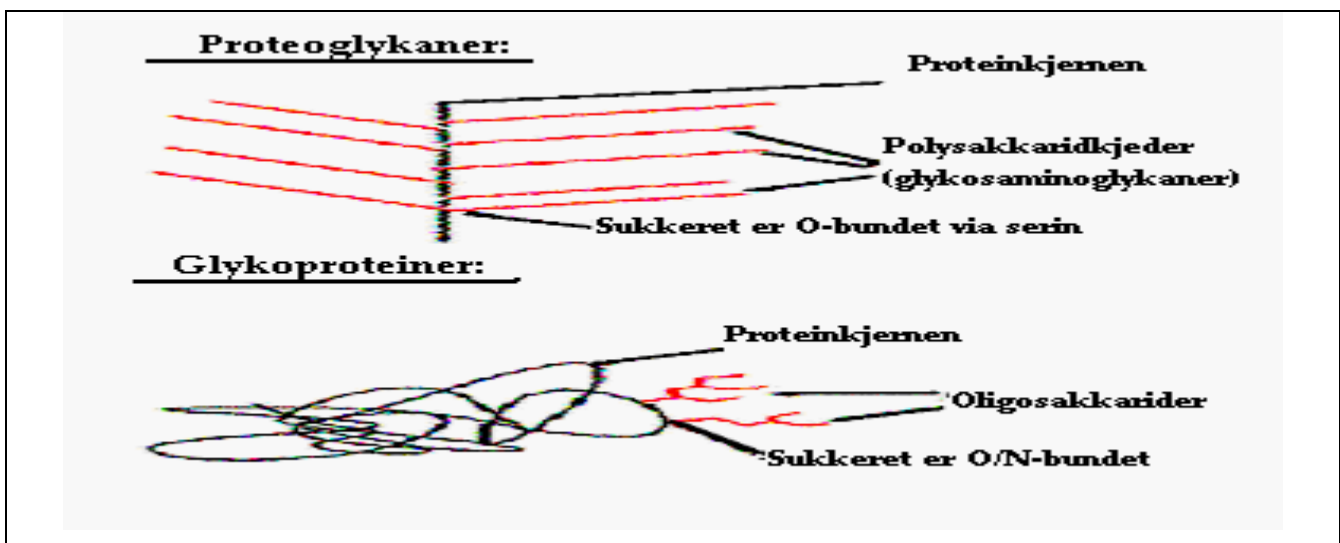
Det finnes to varianter av cellelinjen. De originale MDCK II-cellene har mange fellestrekk med proksimale tubuli epitelceller, mens MDCK I-cellene likner mer på cellene i den distale delen av samlekanalen. Den største forskjellen er den transepiteliale elektriske motstanden. MDCK I-cellene danner et epitellag med en høy elektrisk motstand (ca. 3000 ohm x cm²) mens MDCK II-cellene danner et epitelmonolag som i morfologiske hovedtrekk ikke kan skilles fra et MDCK I-cellelag, men som har lavere motstand (100 ohm x cm²) (Barker and Simmons, 1981). Morfologien til de to variantene har noen mindre forskjeller. MDCK-I celler har ingen cilier, har færre mikrovilli på den apikale membran og har en mer foldet lateral membran i forhold til linje II. De to cellelinjene har noe ulik polypeptidsammensetning i den apikale og basolaterale membran, men begge er rike på glykolipider. De har lik

sammensetning av fosfolipider, men ulikt glykosphingolipidinnhold (Hansson *et al.*, 1986).

MDCK-celler danner et monolag av celler ved dyrking på permeable filtre, der et apikalt og et basolateralt domène dannes. Filterdyrkede celler viser morfologi og funksjoner som *in vivo* nyreepitel med Na^+ , K^+ -ATPase (cellulær ionepumpe) lokalisert i den basolaterale membranen.

En typisk MDCK-celle har en basalt lokalisert kjerne omgitt av glykogen-deposita. Golgi-komplekset ligger supranukleært. De laterale membransidene til nabocellene ligger tett inntil hverandre og er forbundet med desmosomer. Desmosomer er intracellulære filamenter som trenger inn i plasmamembranen og krysser de laterale membransidene til to celler. I motsetning til "tight junctions", som separerer de to membransidene og blokkerer intracellulær transport, slipper de mindre tette desmosomene molekyler inn i rommet mellom nabocellene.

1.3 Proteoglykaner (PG) og glykoproteiner



Figur 1.2: Figuren viser grunnstrukturen for et proteoglykan og et glykoprotein. Begge typer har sukkermolekyler bundet til proteiner, men proteinene i proteoglykaner er ofte mer lineære. Sukkerkjedene på proteoglykanene er lineære og lange, mens glykoproteiners sukkerkjeder er forgrenede og korte.

1.3.1 Proteoglykaner

I de siste årene har interessen for proteoglykaner vært økende, fordi det har vist seg at denne type sukkermodifiserte proteiner har betydning ved sykdommer som diabetes, fibrose, aterosklerose og kreft. For eksempel er en komplikasjon ved diabetes at nyrenes filtreringsfunksjon endres, slik at viktige proteiner i blodet skilles ut i urinen. En av årsakene til dette, er at mengden av og strukturen til proteoglykaner mellom endotelet og epitelet i nyrene endres.

Proteoglykaner er en klasse glykoproteiner som har polysakkaridkjeder kovalent bundet til seg. De syntetiseres av alle animalske celletyper og spiller blant annet en viktig rolle ved filtrering i nyrene. Den primære strukturen består av et protein og minst en karbohydratkjede (glukosaminoglykaner; GAG). Proteinkjernen varierer fra 10 kDa til >500 kDa i størrelse, og antall GAG-kjeder bundet til proteinet varierer fra en til >100. I tillegg har flere proteoglykaner forskjellige typer GAG-kjeder bundet til seg (Rapraeger *et al.*, 1985) og/eller N-bundne eller O-bundne glykaner.

Glukosaminoglykaner er uforgrenete, høyt sulfaterte sukkerkjeder som består av repeterende disakkarider (typisk 40-100 ganger) av et heksosamin [N-acetyl-D-glukosamin (GlcNAc) eller N-acetyl-D-galaktosamin (GalNAc)] og en heksuronsyre [D-glukuronsyre (GlcUA) eller D-iduronsyre (IdoUA)]. Sukkerkjedene i proteoglykaner skiller seg fra andre glykokonjugater ved to unike strukturelle trekk. De inneholder repeterende disakkaridenheter som er høyt sulfaterte og de er noen av de mest negativt ladete animalske makromolekyler ved fysiologisk pH, på grunn av det store antall sulfatgrupper og heksuronsyrene.

En rekke proteoglykanfunksjoner er knyttet til glukosaminoglykan-kjedenes evne til å binde og regulere aktiviteten til andre proteiner. Viktige funksjoner er blant annet regulering av lipoprotein-omsetningen, filtrering i nyrene, oppbygging av ekstracellulær matriks-struktur og regulering av celledeling og differensiering. Proteoglykaner er viktige for vevenes fysiske og biologiske egenskaper og regulerer celle-celle og celle-matriks interaksjoner. De sure, hydrofile sukkerkjedene påvirker vevets hydratisering, elastisitet, kationinnhold og deltar

direkte i høyaffinitetsbindinger til ekstracellulære matriksproteiner, vekstfaktorer, enzymer, celleoverflate-reseptorer og makromolekyler som kollagen og antitrombin.

Bindingsegenskapene er ladningsavhengige og vil derfor variere med antall GAG-kjeder, kjedenes sulfateringsgrad og proteoglykanets molekylvekt. Ikke alle bindingene foregår via GAG-kjedene. Noen proteinkjerner kan også binde andre proteiner. Bindingsegenskapene gjør proteoglykaner egnet til å fungere som et magasin for mange ulike komponenter, som for eksempel vekstfaktorer, matriksproteiner og enzymer.

Proteoglykaner kan grupperes inn i fire hovedgrupper etter hvilke disakkaridene de inneholder i GAG-kjedene:

1. Kondroitinsulfat (CS)/dermatansulfat (DS)

I kondroitin-4-sulfat er sukkerkjedene bygd opp av disakkaridet D-glukuronurat/N-acetyl-D-galaktosamin-4-sulfat.

Kondroitin-6-sulfat består av repeterte D-glukuronurat/N-acetyl-D-galaktosamin-6-sulfat disakkarider.

I noen tilfeller dannes også kondroitin-4,6-disulfat.

Kondroitinsulfatene opptrer separat eller blandet etter vevstypen. De finnes i brusk, cornea, bein, hud, arterievegger og i blodceller.

Dermatansulfat med disakkaridet L-iduronat/N-acetyl-D-galaktosamin-4-sulfat finnes i hud og sener.

2. Heparin/heparansulfat (HS)

I heparin/heparansulfat er sukkerkjeden bygd opp av disakkaridet N-sulfo-D-glukosamin-6-sulfat/D-glukuronurat-2-sulfat. Heparin og heparansulfat er forskjellig ved at heparin er mer ekstensivt modifisert med høyt innhold av N- og O-sulfat i tillegg til høyt innhold av IdoA/GlcA.

Mastceller inneholder heparin, bl.a. i lunge, lever, hud og tarm, mens heparansulfat-proteoglykaner forekommer på celleoverflater i de fleste vev og i basalmembraner, i lungene og i arterier.

3. Keratansulfat (KS)

Keratansulfat består av N-acetyl-D-glukosamin-6-sulfat/D-galaktose disakkarider med et variabelt sulfatinnhold. Glukosaminoglykanet finnes i brusk og cornea.

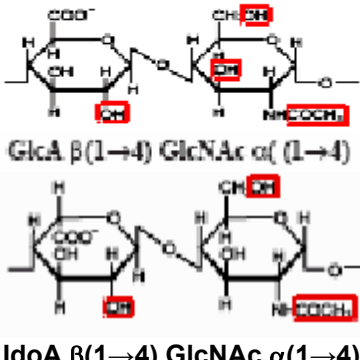
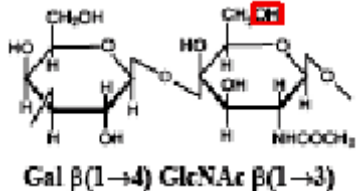
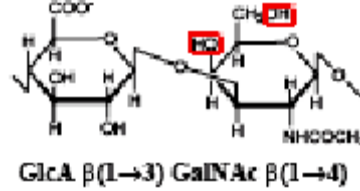
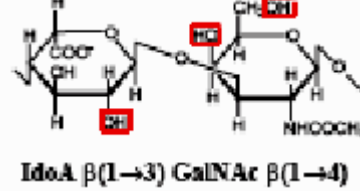
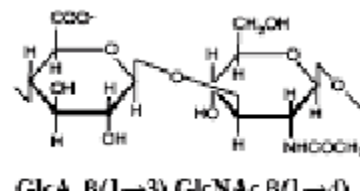
4. Hyaluronsyre

Hyaluronsyre er en ikke-sulfatert, ikke-proteinbundet glukosaminoglykan-kjede bestående av repeterende N-acetyl-D-glukosamin/D-glukuronurat sukkerkjeder. Hyaluronsyre finnes i bindevev, brusk, synovialvæske, navlestreng, fostervann og i glasslegemet i øyet.

GAG-kjedene er (med unntak av hyaluronsyre og keratansulfat) kovalent bundet til en proteinkjerne via en tetrasakkaridsekvens (tetrasakkarid linker); xylose-galaktose-galaktose-glukuronsyre (Xyl-Gal-Gal-GlcUA), med xylose-enheten bundet via en O-glykosid binding til serin i protein kjernen (figur 1.2). Serin-bindingssetet for kondroitin og heparan polymerisering er lokalisert til et Ser-Gly dipeptid eller Ser-Gly repeterende sekvens med flankerende sure aminosyrer. Keratansulfat kan være bundet til aspargin via en N-glykosid binding eller via O-glykosid binding til hydroksylgrupper i serin eller threonin. Hyaluronsyre er ikke sulfatert og heller ikke kovalent bundet til et protein.

Som tidligere nevnt er GAG-kjedene sulfaterte i ulike posisjoner på både heksosaminet og heksuronsyren. Sulfateringen er katalysert av sulfotransferaser som buker 3'-fosfoadenosin 5'-fosfosulfat (PAPS), som sulfatdonor. Sulfateringsmønsteret kan variere betydelig langs GAG-kjeden, hvilket medfører strukturelle ulikheter både innen og mellom de enkelte polysakkaridkjedene. Det er også stor variasjon i proteindelens struktur og størrelse. I tillegg til det variable sulfateringsmønsteret, øker dette den strukturelle diversiteten til proteoglykaner. De fleste proteindelene kan deles inn i flere domèner.

Alle proteoglykaner inneholder ett eller flere GAG-bindingsdomèner, som utgjøres av Ser-Gly dipeptider, og ett eller flere domèner som er ansvarlige for bindingen av proteoglykaner til celleoverflaten, til makromolekyler i ekstracellulær matriks, eller for interaksjoner med andre proteiner.

GAG	Heksuronsyrer eller iduronsyre	Galaktose	Heksosamin	Disakkaridkomposisjon
Heparansulfat/ heparin	D-glukuronsyre (GlcA) L-iduronsyre (IdoA)	-----	D-glukosamin (GlcNAc)	 <p>GlcA $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc $\alpha(1\rightarrow4)$ IdoA $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc $\alpha(1\rightarrow4)$</p>
Keratansulfat	-----	Galaktose (Gal)	D-glukosamin (GlcNAc)	 <p>Gal $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc $\beta(1\rightarrow3)$</p>
Kondroitinsulfat	D-glukuronsyre (GlcA)	-----	D-glukosamin (GlcNAc)	 <p>GlcA $\beta(1\rightarrow3)$ GalNAc $\beta(1\rightarrow4)$</p>
Dermatansulfat	D-glukuronsyre (GlcA) L-iduronsyre (IdoA)	-----	D-glukosamin (GlcNAc)	 <p>IdoA $\beta(1\rightarrow3)$ GalNAc $\beta(1\rightarrow4)$</p>
Hyaluronsyre	D-glukuronsyre (GlcA)	-----	D-glukosamin (GlcNAc)	 <p>GlcA $\beta(1\rightarrow3)$ GlcNAc $\beta(1\rightarrow4)$</p>

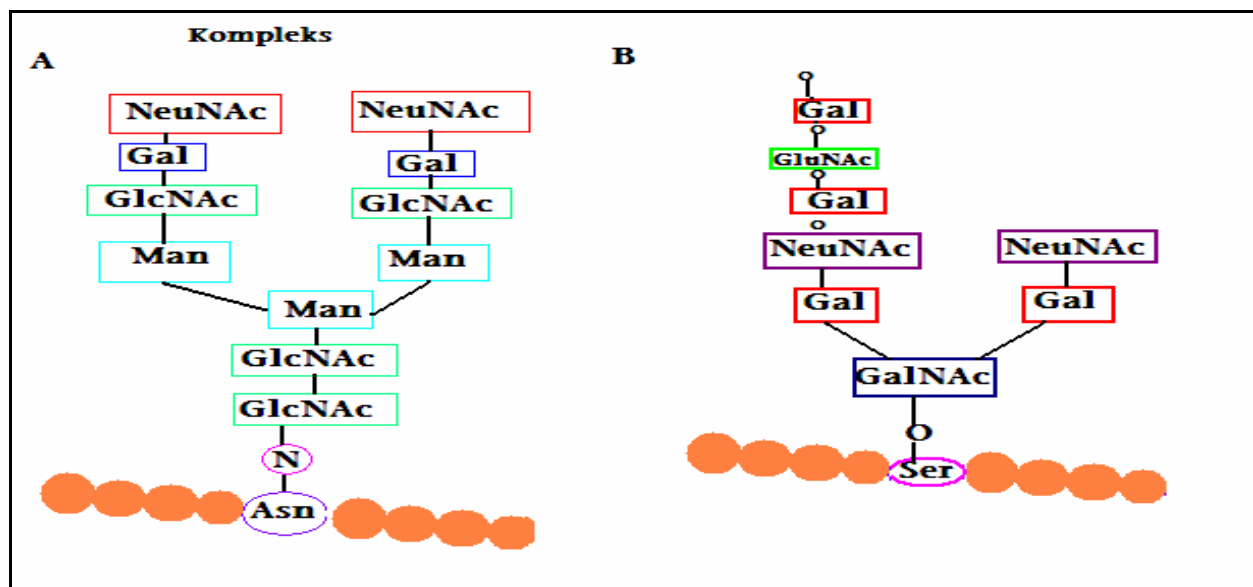
FIGUR 1.3: Strukturer av de forskjellige GAG-kjedene. *Strukturene av de repeterende disakkaridene i GAG-kjedene er tegnet uten sulfateringer. De forskjellige sulfateringsposisjonene i hvert enkelt disakkarid, er merket inn med rødt.*

1.3.2 Glykoproteiner

Proteiner kan være modifisert med karbohydrater på forskjellige aminosyrer som følger: O-glykosylerte proteiner har oligosakkarider bundet til Thr og Ser, C-glykosylerte proteiner har blitt identifisert til sidekjeden av Trp (Hartmann and Hofsteenge, 2000) og N-glykosylerte proteiner er modifisert på Asn i sekvensen Asn-X-Ser/Thr hvor X er hvilken som helst aminosyre med unntak av Pro (Pless and Lennarz, 1977). Ikke alle Asn-X-Ser/Thr motiv mottar N-glykaner, men alle N-glykaner er bundne til proteinet via denne sekvensen.

N-linkede glykoproteiner blir syntetisert i endoplasmatisk retikulum (ER) og blir trimmet i Golgi-apparatet. Syntesen av karbohydratmotivene foregår via fire step; syntesen av et lipid-linket oligosakkarid (dolichol-PP-oligosakkarid), overføringen av dette lipid-sukkeret til NH₂ gruppen på Asn av et voksende polypeptid, fjerning av noen sukkerenheter på lipid-sukkeret og tilførsel av sukkerenheter på den gjenværende oligosakkariden.

Det finnes tre forskjellige hovedklasser av N-glykaner avhengig av antall mannose-enheter som er tilknyttet (høy mannose struktur, kompleks og hybrid) og glykanene kan ha forskjellig antall "antenner" ved at GlcNAc blir tilført i forskjellige posisjoner på mannose.

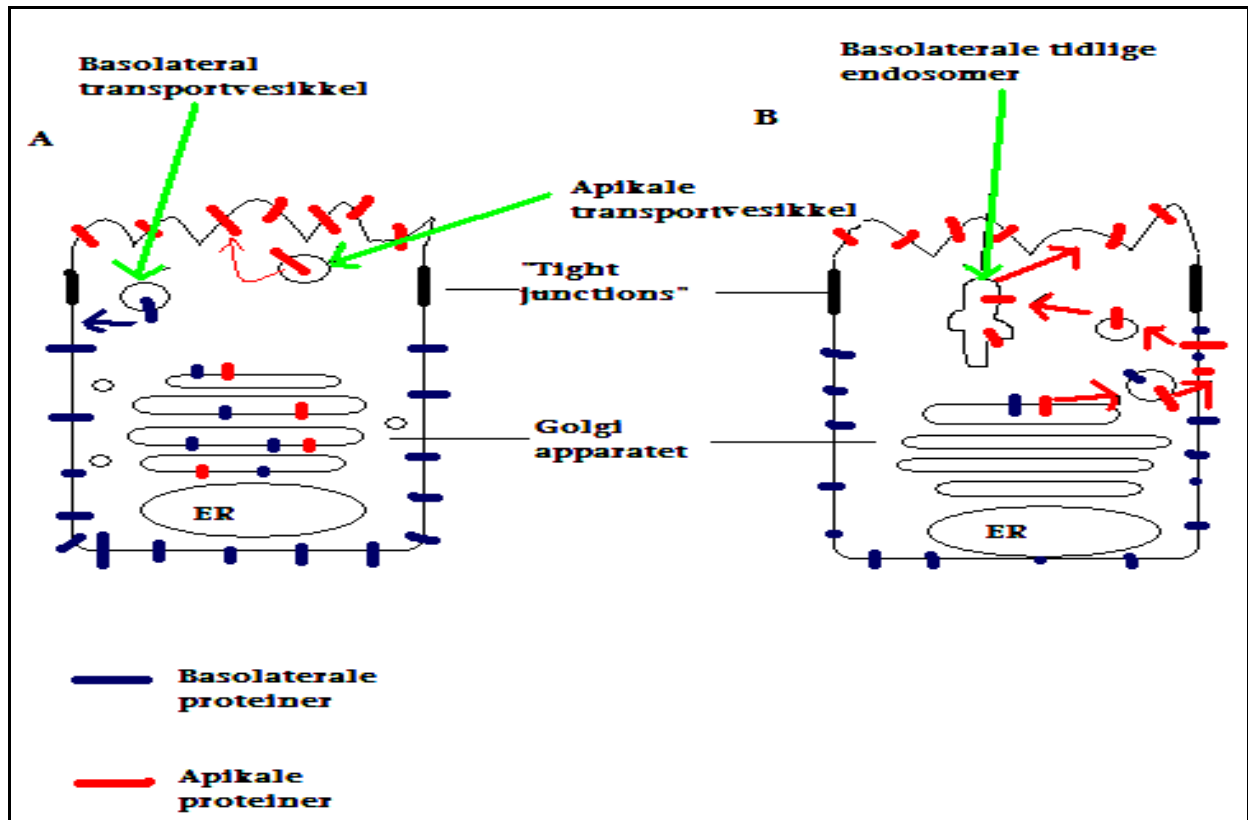


Figur 1.4: N- og O-glykaner. Kjedene er korte og forgrenede med forskjellige monosakkarider. A) viser et eksempel på et N-forankret oligosakkarid og B) viser et eksempel på et O-forankret oligosakkarid.

1.4 Intracellulær transport

For å opprettholde og vedlikeholde epitelcellenes polaritet, må det finnes bestemte mekanismer for transport av nysyntetiserte proteiner og lipider til deres korrekte membranside. Sekretoriske proteiner og membranproteiner blir transportert fra ER til Golgi-apparatet ved hjelp av vesikler. I trans-Golgi nettverk (TGN) blir proteinene pakket i vesikler for transport til forskjellige destinasjoner, inkludert den apikale og den basolaterale plasmamembranen. I den biosyntetiske vei, ved resirkulering, ved endocytose og ved transcytose vil apikale og basolaterale plasmamembranproteiner underkastes ulike sorteringsmekanismer. Disse mekanismene utgjøres av kjente og ukjente komponenter som inkluderer apikale og basolaterale sorteringssignaler, adaptorer for basolaterale signaler, og docking- og fusjonsproteiner for vesikulær transport. Selv om det tidligere er blitt antatt at proteinsorteringen i den biosyntetiske vei i MDCK-celler foregikk utelukkende i TGN, tyder nyere forskning på at noe sortering i apikal og basolateral retning kan foregå i "common recycling endosomes" (CRE), når de forlater TGN (Ang *et al.*, 2004). CRE er også hovedsorteringsstedet for membranproteiner som er internalisert fra de apikale og basolaterale overflater (Wang *et al.*, 2000).

Det kan være flere transportveier i epitelceller for levering av proteiner til samme målsted (figur 1.4). For eksempel i en direkte transportvei blir proteiner transportert fra TGN til celleoverflaten uten mellomstasjoner. Transport av basolaterale proteiner kan skje via en slik transportvei i alle epitelceller som er blitt undersøkt (Bomsel and Mostov, 1991). Den apikale transporten varierer med hensyn til celletype. Apikale komponenter kan bli transportert via en direkte vei og/eller via en indirekt transportvei. I den indirekte veien blir alle proteiner først sendt til den basolaterale siden, hvor apikale proteiner endocytteres og sorteres, for deretter å bli sendt videre til den apikale membranside ved transcytose. I MDCK-celler vil mesteparten av transporten foregå via den direkte veien, men i andre typer epitelceller, inkludert hepatocytter og tarmceller, har den indirekte vei en større betydning.



Figur 1.5: Forenklet skisse for sortering av plasmamembranproteiner i en polarisert epitelcelle. A) viser den direkte vei fra TGN til apikal eller basolateral membran via vesikler. B) viser den indirekte vei der proteiner først blir transportert til den basolaterale side og tatt opp igjen via endocytose, for deretter å bli transportert til den apikale side ved transocytose.

1.5 Sorteringssignaler

Tabell 1.1: Determinanter for polarisert sortering. Område i proteinet der sorteringssignalet er lokalisert.

Område	Determinant	Polaritet*	Eksempler*
	Tyrosin-basert motiv	B	LDL-, transferrin reseptor, vesikulær stomatitt virus glykoprotein
	Dileucin motiv	B	IgG Fc reseptor, E-cadherin
Cytoplasmatisk domène	PDZ-bindende motiv	A/B	CFTR (A), BGT-1 GABA transporter (B), ErbB-2 reseptor tyrosin kinase (B)
	Andre	A/B	H,K-ATPase α -subenhet (A), megalin (A), GAT-2 GABA transporter (B)
	Membran lipid-anker	A	Influenza virus hemagglutinin og neuraminidase
Transmembran domène	GPI-anker	A	Placenta alkalisk fosfatase, "decay-accelerating" faktor, Thy-1
	N-glykosylering	A	Occludin, FcLR, GLYT2 glycin transporter, EPO, Endolyn
	O-glykosylering	A	Neurotropin reseptor, sukrase isomaltase
			Kv1 natrium kanal (neuroner)
Lumenalt/ekstracellulært domène	Oligomeriserings domène	A?	Det GPI-forankrede PG glypikan
	HS	B?	
	CS	A?	Endogent syntetisert CSPG og hexyl- β -xylosider med CS

*A=apikal, B=basolateral

1.5.1 Apikale sorteringssignaler

Apikale sorteringssignaler er oftest lokalisert i den ektoplasmatiske delen eller i membrandoménet, men kan også være lokalisert i det cytoplasmatiske doménet.

Det første apikale sorteringssignalet som ble postulert var glykosylfosfatidylinositol

(GPI)-ankere. Endogent produserte GPI-forankrede proteiner ble lokalisert i den apikale overflaten av MDCK-celler og i andre epitelcellelinjer (Lisanti *et al.*, 1989). "Lipid rafts", domøner som er rike på sfingolipider og kolesterol, antas å være medvirkende til transport av proteiner til den apikale membranen (Simons and Vaz, 2004). I Golgi-apparatet blir GPI-forankrede proteiner selektivt inkorporert i "rafts" ved hjelp av deres GPI-ankere, mens noen transmembrane proteiner blir inkorporert på grunn av egenskapene til transmembrandomønet, og deretter transportert til den apikale siden. I samsvar med denne "lipid raft" hypotesen er de aller fleste endogene GPI-forankrede proteiner som er studert, funnet på den apikale overflaten til polariserte epitelceller. En indikasjon på at apikal sorteringsinformasjon er lokalisert til selve GPI-ankeret kommer fra eksperimenter der ektodomønet til to basolaterale proteiner (Herpes gDI og VSV G) ble fusjonert til GPI-ankere. De rekombinante proteinene ble transportert til den apikale delen av plasmamembranen, hvilket indikerte en dominant rolle for GPI-ankere som sorteringssignal.

Nyere forskning har bidratt med nye modeller, som foreslår at et GPI-anker likevel ikke er et selvstendig sorteringssignal, eller at det kan være andre sorteringssignaler som dominerer over GPI-signalet. Ved å erstatte det cytoplasmatiske og det transmembrandomønet av et basolateralt sortert protein med et GPI-anker, kan man ha fjernet et dominant basolateralt signal, mens et ressesivt apikalt signal gjenstår i ektodomønet. Pang og medarbeidere viste i 2004 at N-glykaner (beskrevet nedenfor) kan mediere apikal sortering, og ikke GPI-ankeret alene i rekombinant membran dipeptidase (Pang *et al.*, 2004). Benting og medarbeidere viste i 1999 at tilførsel av et GPI-anker til det ikke-glykosylerte proteinet rotte veksthormon (rGH), som normalt blir utskilt omtrent like mye til hver side av MDCK-celler, ga ingen endring i sortering (Benting *et al.*, 1999). Når proteinet med GPI-anker ble tilført N-glykanseter ble det observert en relativ økning i sortering til apikal side. Glykaner kan derfor fungere som apikale sorteringssignaler. Det endogene glykoproteinet gp80, som skiller ut hovedsakelig til apikal side i MDCK-celler, fikk et ikke-polarisert sekresjonsmønster etter inhibering av N-glykosyleringen (Kondor-Koch *et al.*, 1985). Det er også vist at forskjellige transmembrane proteiner som mangler det basolaterale signalet akkumulerer

i Golgi-apparatet, ikke bare i polariserte MDCK-celler, men også i ikke-polariserte CHO-celler (Gut *et al.*, 1998).

Et annet interessant aspekt er betydningen av glykanenes posisjon i proteinet. Erythropoietin i MDCK-celler vil hovedsakelig sorteres apikalt på grunn av N-glykaner festet til proteinet. Det viste det seg at bare mutasjon i en av tre N-glykan konsensus sekvenser (aminosyre 38) forandret sekresjonen fra hovedsakelig apikal til ikke-polarisert, mens mutasjon i de andre to setene ikke gav merkbar effekt (Kitagawa *et al.*, 1994). Et annet eksempel er at mutasjon i bare to av åtte N-glykan seter for endolyn førte til redusert apikal sortering (Potter *et al.*, 2004). Begge glykanene er lokalisert i en globulær og antatt disulfid-linket loop som ligger mellom to mulige mucin-domèner i endolyn og kan dermed ha betydning for konformasjonen til domènet.

Selv om det foreligger en overbevisende mengde data som viser at glykaner kan være av betydning for apikal sortering, er det enda usikkert om glykosylering i denne sammenheng bare spiller en indirekte rolle ved for eksempel å bidra til korrekt folding av proteiner, eller ved å delta i en annen mer spesifikk interaksjon som transportsignal.

En tredje gruppe av apikale sorteringssignaler omfatter proteinmotiver i det ektoplasmatiske, transmembrane eller cytoplasmatiske domènet av proteiner. I noen løselige glykoproteiner, fører fjerning av N-glykanene ikke til en reduksjon i apikal sekresjon (Marzolo *et al.*, 1997). Heller ikke alle endogene membranproteiner (Bravo-Zehnder *et al.*, 2000) og eksogene glykoproteiner (Rodriguez-Boulan and Gonzalez, 1999) får sitt sorteringsmønster påvirket ved fjerning av N-glykaner, noe som tyder på at andre apikale signaler kan spille inn. Det transmembrane domènet til influensa HA proteinet inneholder apikal sorteringsinformasjon, som medierer inkorporering av proteinet i "lipid rafts". Det cytoplasmatiske domènet til det lyssensitive proteinet rhodopsin (Tai *et al.*, 1999) har bindings seter for det mikrotubilibindende motorprotein dynein, som er nødvendig for transport av rhodopsin til den apikale membranen i MDCK-celler. Det cytoplasmatiske domènet av megalin (Tai *et al.*, 1999) og noen få andre apikale proteiner, inneholder apikale sorteringssignaler som hittil ikke har blitt

karakterisert.

Tabell 1.2: N- og O-glykaners betydning ved apikal sortering. *Proteiner med N-/O-glykan bundet til proteinet, ved hvilken metode, i hvilken cellelinje, en beskrivelse og referanser.*

Protein	Metoder	Cellelinje	Kommentar	Referanser
Neurotropin reseptor(p75 ^{NTR})	Glykosyleringshemmere, mutasjoner	MDCK, Caco-2	O-glykan-rikt område nødvendig for apikal sortering; delesjon av membran anker resulterer i apikal transport i MDCK celler, men basolateral i Caco-2 celler.	(Monlauzeur <i>et al.</i> , 2000)
pro-SI	Glykosyleringshemmere, mutasjoner	Caco-2	Apikal transport krever O-glykosylering av området fra Ala37 til Pro48 og et membran ankrings domène.	(Naim <i>et al.</i> , 1999)
gp80	Glykosyleringshemmere, glykosyleringsinhiberte cellelinjer	MDCK; ricin-resistent MDCK	"core" oligosakkarider	(Urban <i>et al.</i> , 1987; Appel <i>et al.</i> , 1996)
Erythropoietin	Glykosyleringshemmere, mutasjoner	MDCK	En av tre N-glykaner (posisjon 38) kreves for apikal transport.	(Kitagawa <i>et al.</i> , 1994)
Muse Fc/LDL-reseptor chimera	Glykosyleringshemmere, mutasjoner	MDCK	Apikalt merkede chimera aggregerer i Golgi komplekset ved manglende N-glykosylering.	(Gut <i>et al.</i> , 1998)
Endolyn	Glykosyleringshemmere, mutasjoner	MDCK	Terminale sukkerkjeder; to av åtte N-glykaner (posisjon 68 og 74) kreves for apikal transport.	(Potter <i>et al.</i> , 2004)
Glykosylert rotte veksthormon (rGH) og GPI-forankret rGH	Mutasjoner	MDCK	Tilførsel av to N-glykan seter til rGH resulterer i apikal transport.	(Benting <i>et al.</i> , 1999)
Membran dipeptidase (GPI-forankret protein)	Mutasjoner	MDCK, Caco-2	Delesjon av N-glykaner resulterer i basolateral transport.	(Pang <i>et al.</i> , 2004)

Apikale sorteringsmekanismer

Mekanismene som styrer sortering og transport av proteiner til den apikale siden av epitelceller, er fortsatt for en stor del ukjente. Noen hypoteser er imidlertid blitt fremlagt.

Apikale sorteringssignaler som medierer assosiasjon med dynein har blitt antatt å fungere ved å medføre mikrotubuli-mediert transport til den apikale overflaten.

Sorteringsmekanismer for andre apikale signaler er mindre kjent. De kan fungere som konvensjonelle sorteringssignaler, for eksempel ved å binde til en apikal signal reseptor som bidrar til inkorporering inn i en apikal vesikkel (Tai *et al.*, 1999).

Det har blitt foreslått at N-glykaner sorteres til apikal side ved å bli gjenkjent av en lektin sorteringsreseptor. Ved overuttrykk av VIP36 (en type lektin) i MDCK-celler, ble sekresjonen av gp80/clusterin til apikal side stimulert, men det hadde ingen effekt på et ikke-glykosylert protein (Hara-Kuge *et al.*, 2002). Det er dog blitt påvist at endogent VIP36 hovedsakelig er lokalisert til de tidlige delene av Golgi-apparatet og lektinets rolle i apikal sortering er omdiskutert (Fullekrug *et al.*, 1999).

Et alternativ til den konvensjonelle reseptormodellen for apikal sortering er "lipid raft" hypotesen, som ble presentert av van Meer og Simons i 1988. "Lipid raft" hypotesen går ut på at proteiner blir sortert apikalt, fordi de har høy affinitet for mikrodomèner av glykosfingolipider og kolesterol som er samlet i Golgi-apparatet. I følge denne hypotesen danner "lipid-raftene" og deres assosierte proteiner, sorteringsplattformer som blir gjenkjent av spesialiserte mekanismer i TGN, i resirkuleringsendosomer eller i plasmamembranen. I TGN blir "rafts" blir inkorporert i apikale transportintermediater som transporterer dem til den apikale membranen. Proteiner som viser affinitet for "lipid rafts" er GPI-forankrede proteiner og proteiner med et hydrofobt transmembrandomène med visse karakteristika. Hypotesen kan diskuteres, siden noen GPI-forankrede proteiner også krever N-glykaner for apikal transport selv om ikke N-glykaner alltid er assosiert med "lipid rafts".

1.5.2 Basolaterale sorteringssignaler

Inntil 1991 var den rådende hypotese at transport av proteiner til den basolaterale membranside foregikk via en ikke-selektiv transportvei. Denne modellen var basert på at epitelspesifikke proteiner hovedsakelig er lokalisert i den apikale membranen, mens den basolaterale side har en membransammensetning som er ganske lik den man finner i ikke-polariserte celler.

Basolaterale sorteringssignaler er vanligvis lokalisert i den cytoplasmatiske delen av proteinet. Mostov viste i 1986 at en delesjon av det cytoplasmatiske domènet til polymèr immunoglobulin-A reseptor forhindrer basolateral lokalisering. I 1991 ble det vist at signalet var overførbart til andre proteiner (Casanova *et al.*, 1991). I 1991 ble det påvist at også "low-density lipoprotein" (LDL) reseptoren inneholdt basolaterale signaler i det cytoplasmatiske domènet og at også disse signalene kunne overføres til andre proteiner (Hunziker *et al.*, 1991). Senere studier har bekreftet disse resultatene og viser at domènene inneholder et tyrosin eller dileucin motiv, som ofte ligger i nærheten av et område med sure aminosyrer.

Det er blitt identifisert to hovedklasser av basolaterale sorteringssignaler; signaler som overlapper med sekvenser som gir clathrin-mediert endocytose, og signaler som ikke er relatert til disse. Eksempler på proteiner med den førstnevnte klassen er VSV G proteinet, lysosomal sur fosfatase og nerve vekstfaktor reseptor. Disse signalene er vist å inneholde et bestemt tyrosinresidium, med slektskap til endocytosesignaler (Hunziker and Mellman, 1991). Endocytiske og basolaterale sorteringssignaler er likevel ikke identiske, selv om de kan lokaliseres til samme område og endringer av aminosyrer når disse sekvensene overlapper, kan ha ulik virkning på de to sorteringsfenomenene (Prill *et al.*, 1993). For LDL reseptoren (LDL-R) har det blitt registrert to ulike basolaterale sorteringssignaler som kan fungere uavhengig av hverandre. Felles for begge signalene er et tyrosin residium (Matter *et al.*, 1992). Hunziker og medarbeidere viste i 1991 at utskiftning av et bestemt tyrosin residium blokkerer endocytose, mens den basolaterale sorteringen er uforandret. Overlappende signaler for endocytose og basolateral sortering som er tyrosin-uavhengige er hittil bare funnet i Fc reseptoren for IgG og i MHC II

assosiert invariant chain (Ii) (Simonsen *et al.*, 1997). I disse tilfellene er både basolateralt sorteringssignal og endocytosesignal vist å inneholde leucin-baserte motiver. Ii inneholder to slike motiver; Leu-Ile og Met-Leu. I motsetning til dette inneholder Fc reseptoren bare ett di-leucin motiv. Det er bare funnet et par eksempler på den andre klassen av basolaterale sorteringssignaler som ikke er relatert til endocytosesignaler: LDL-R (distal determinant), polymer IgR reseptoren (pIg-R) og transferrin-reseptoren. De to førstnevnte har svært ulik primærstruktur og mens LDL-R er hovedsakelig avhengig av et tyrosinresidium, trenger pIg-R tre andre aminosyreresidier (H656, R657 og V660) som er lokalisert i to domøner med ulik struktur.

1.5.3 Transcytosesignaler

Sorteringen av transmembranproteiner som skal transcyteres tvers over et epitelcellelag, kan se ut til å bli kontrollert av spesifikke signaler i deres cytoplasmatiske domøner. Imidlertid er det eneste transcytotiske signalet som er oppdaget fosforylering av et serinresidium i det cytoplasmatiske domønet av pIg-R (Breitfeld *et al.*, 1990). Dette ble bekreftet ved en utbytting av serin residiet med et alaninresidium (som ikke kan fosforyleres) og transcytosen ble blokkert. Likevel kan ikke fosforyleringen være det eneste signalet for transcytose da mange transcyterte molekyler ikke har et potensielt fosforyleringssete.

1.6 Veksthormon

Veksthormon (growth hormone; GH) også kalt *somatotropin*, er et protein på rundt 190 aminosyrer som blir produsert i hypofyseforlappen. Etter oppdagelsen i 1920-1930 årene, ble det funnet at ved å injisere rotter i vekstfasen med et hypofyse-ekstrakt, ble veksten økt. Gjennombruddet i genteknologien i 1970 årene førte til at veksthormon kunne produseres ved hjelp av rekombinant DNA teknologi.

Sekresjonen reguleres hovedsakelig av hypothalamus, som produserer to hormoner med virkning på veksthormon; et som stimulerer og et som hemmer utskillelsen av GH. Veksthormonet virker på de fleste vev i kroppen, og har en rekke forskjellige virkninger, som bl.a. vekst og metabolisme.

Rekombinant rGH er et enkelt, uglykosylert polypeptid med en molekylmasse på ca 22 KDa. Proteinet er blitt brukt til blant annet sorteringsstudier i MDCK-celler der man har klonet inn to seter for N-glykaner (Scheiffele *et al.*, 1995).

2.0 MATERIALER OG LØSNINGER

2.1 Diverse materialer

Bakterieceller:

E. coli DH5 α .

SupE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1, λ^- , deoR, delta(lacZYA-argF), U169, ϕ 80lacZ-delta-M15, F⁻.

Cellelinje:

MDCK II-celler fra ATCC

Enzymer:

Restriksjonsenzymer fra Fermentas:

Enzym	Fermentas buffer
<i>Eco</i> RI	Buffer <i>Eco</i> RI ⁺
<i>Xho</i> I	Buffer R ⁺

Restriksjonsenzymer fra Promega:

Enzym	Promega buffer
<i>Eco</i> RI	Buffer H

Øvrige enzymer:

Bakteriofag T4 DNA Ligase fra Fermentas

Kondroitinase ABC lyase fra Seikagaku Corporation

Vent DNA-polymerase og Vent buffer fra BioLab

Expand DNA-polymerase og buffer1 fra Roche

Kit:

Plasmid-isoleringssett fra QIAGEN eller PROMEGA

DNA-ekstraksjonssett fra QIAGEN eller PROMEGA

Kjemikalier:

Stoff	Leverandør
Aceton	Merck
Agarose	Saveen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Ampicillin	Astra
Amplify	Amersham
Baktoagar	Difco
¹⁴ C merket Rainbow molekylvektsstandard	Sigma
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Sigma
Dithiotreitol (DTT)	Saveen
1 kb DNA-markør	Fermentas
dNTP (100 mM av hver)	Fermentas
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	BioWhittaker, BE 12-614F
Eddiksyre (AcOH)	Merck
Etanol (Rektifisert- og absolutt-alkohol)	Arcus
Etidiumbromid (EtBr)	Sigma
Fenol	Merck
Fugene TM 6 Transfeksjon reagens	Roche
Føtalt bovint serum (FBS)	Integro b.v. Holland
G-418 Disulfat	Duchefa
Gjærekstrakt	Difco
D-Glukose (Druesukker)	Sigma
L-Glutamin	Bio Whittaker, BE17-605E

Glyserol	Norsk Medisinaldepot.
Guanidin hydroklorid	Fluka
Kaliumdihydrogenfosfat (KH_2PO_4)	Merck
Kaliumklorid (KCl_2)	Merck
Kloroform	Merck
Magnesiumklorid (MgCl_2)	Merck
2-Merkaptoetanol	Sigma
Metanol	PROLABO
Natriumacetat (NaOAc)	Merck
Natriumdodesylsulfat (SDS)	Saveen
Natriumhydrogenfosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)	Merck
Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO_3)	Merck
Natriumhydroksid (NaOH)	Merck
Natriumklorid (NaCl)	Merck
Nonidet P-40	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Bio Whittaker, DE17-602E
1,4-Piperazindietansulfonsyre (PIPES)	Merck
Polyetylen glykol (PEG-8000)	Sigma
Protein Molecular Weight Markers	CALBIOCHEM
Rabbit polyclonal til GFP (ab290)	Abham
Saltsyre (HCl)	PROLABO
Tetrametyletylendiamin (TEMED)	Bio-Rad
Trikloreddiksyre (TCA)	Merck
Tris-base (TRIZMA®-base)	Sigma
TRIS/CAPS-buffer	Bio-Rad
Triton X-100	Sigma
Trypsin	Gibco
Trypton	Difco
Tween-20	Saveen

Primere fra MedProbe:Primere brukt ved sekvensering:

Sp6-primer (revers): 5`-GATTTAGGTGACACT ATA G-3`

T7-primer (forover): 5`-AATACGACTCACTATAGG G-3`

pEGFP-N3 (forover): 5`-GGCGTGTACGGTGGGAGGTC-3`

Primere brukt ved PCR:

P-71: 5`-AAGGAATTCATGGCTGCAGACTCTCAGACTCCCTGGCT-3`

P-37: 5`-GCTGGAAGACGGCAGGTGGGCAGATCCTC-3`

P-38: 5`-AATCGTTCTCGAGACTAGAAAGCACAGCTGCTTTCCGC-3`

P-73: 5`-GTTCTCGAGACTACCAAGTCGTCGCCACTCCCAGATCCTGATCCAGAGC
CGGAGCCGGAGCCGAAGCCTGATCCAGAGTCGTCCCAGAAAGCACAGCTGCT-3`**Radioaktive kjemikalier:**Easy Tag Express [³⁵S] Protein Labeling mix fra PerkinElmer

Sulphur-35 fra PerkinElmer

Glucosamine Hydrochloride D-[6-³H (N)] fra PerkinElmer**Templat brukt i PCR fra MedProbe:**K-115:

ATGGCTGCAGACTCTCAGACTCCCTGGCTCCTGACCTTCAGCCTGCTCTGCCTGCTG
TGGCCTCAAGAGGCTGGTGCTTTACCTGCCATGCCCTTGTCCAGTCTGTTTGCCAAT
GCTTCGCTCCGAGCCCAGCACCTGCACCAGCTGGCTGCTGACACCTACAAAGAGTT
CGAGCGTGCCTACATTCCCAGGGACAGCGCTATTCCATTCAGAATGCCCAGGCTG
CGTTCTGCTTCTCAGAGACCATCCCAGCCCCACCGGCAAGGAGGAGGCCCAGCAG
AGAACTGACATGGAATTGCTTCGCTTCTCGCTGCTGCTCATCCAGTCATGGCTGGGG
CCCGTGCAGTTTCTCAGCAGGAACCTTACCAACAGCCTGATGTTTGGTACCTCGGAC
CGCGTCTATGAGAACTGAAGGACCTGGAAGAGGGCATCCAGGCTCTGATGCAGGA
GCTGGAAGACGGCAGCCCCCGTATTGGGCAGATCCTCAAGCAAACCTATGACAAGT
TTGACGCCAACATGCGCAGCGATGACGCTCTGCTCAAAAACCTATGGGCTGCTCTCCT

GCTTCAAGAAGGACCTGCACAAGGCAGAGACCTACCTGCGGGTCATGAAGTGTCGC
CGCTTTGCGGAAAGCAGCTGTGCTT

K-95:

ATGGCTGCAGACTCTCAGACTCCCTGGCTCCTGACCTTCAGCCTGCTCTGCCTGCTG
TGGCCTCAAGAGGCTGGTGCTTTACCTGCCATGCCCTTGTCCAGTCTGTTTGCCAAT
GCTTCGCTCCGAGCCCAGCACCTGCACCAGCTGGCTGCTGACACCTACAAAGAGTT
CGAGCGTGCCTACATTCCCGAGGGACAGCGCTATTCCATTCAGAATGCCCAGGCTG
CGTTCTGCTTCTCAGAGACCATCCCAGCCCCACCGGCAAGGAGGAGGCCCAGCAG
AGAACTGACATGGAATTGCTTCGCTTCTCGCTGCTGCTCATCCAGTCATGGCTGGGG
CCCGTGCAGTTTCTCAGCAGGAACTTTACCAACAGCCTGATGTTTGGTACCTCGGAC
CGCGTCTATGAGAACTGAAGGACCTGGAAGAGGGCATCCAGGCTCTGATGCAGGA
GCTGGAAGACGGCAGCCCCCGTATTGGGCAGATCCTCAAGCAAACCTATGACAAGT
TTGACGCCAACATGCGCAGCGATGACGCTCTGCTCAAAAACCTATGGGCTGCTCTCCT
GCTTCAAGAAGGACCTGCACAAGGCAGAGACCTACCTGCGGGTCATGAAGTGTCGC
CGCTTTGCGGAAAGCAGCTGTGCTTTGAGGACTACTCTGGATCAGGCTTCGGCTC
CGGCTCCGGCTCTGGATCAGGATCTGGGAGTGGCTTCCTAACGGAA

K-96:

ATGGCTGCAGACTCTCAGACTCCCTGGCTCCTGACCTTCAGCCTGCTCTGCCTGCTG
TGGCCTCAAGAGGCTGGTGCTTTACCTGCCATGCCCTTGTCCAGTCTGTTTGCCAAT
GCTGTGCTCCGAGCCCAGCACCTGCACCAGCTGGCTGCTGACACCTACAAAGAGTT
CGAGCGTGCCTACATTCCCGAGGGACAGCGCTATTCCATTCAGAATGCCCAGGCTG
CGTTCTGCTTCTCAGAGACCATCCCAGCCCCACCGGCAAGGAGGAGGCCCAGCAG
AGAACTGACATGGAATTGCTTCGCTTCTCGCTGCTGCTCATCCAGTCATGGCTGGGG
CCCGTGCAGTTTCTCAGCAGGATCTTTACCAACAGCCTGATGTTTGGTACCTCGGAC
CGCGTCTATGAGAACTGAAGGACCTGGAAGAGGGCATCCAGGCTCTGATGCAGGA
GCTGGAAGACGGCAGCCCCCGTATTGGGCAGATCCTCAAGCAAACCTATGACAAGT
TTGACGCCAACATGCGCAGCGATGACGCTCTGCTCAAAAACCTATGGGCTGCTCTCCT
GCTTCAAGAAGGACCTGCACAAGGCAGAGACCTACCTGCGGGTCATGAAGTGTCGC

CGCTTTGCGGAAAGCAGCTGTGCTTTTCGAGGACTACTCTGGATCAGGCTTCGGCTC
CGGCTCCGGCTCTGGATCAGGATCTGGGAGTGGCTTCCTAACGGAA

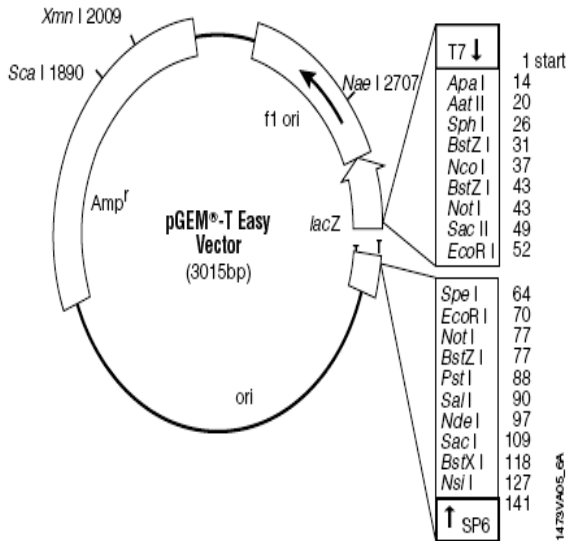
Utstyr:

Type	Leverandør
Agarose-gel elektroforese	Biomax QS 710/MP1015, Kodak
Autoklav	TOMY Autoclave SS-325
Celleflasker (25 cm ² og 75 cm ²)	Sarstedt
Criterion Tris-HCl gel, 4-20 %	BioRad
Criterion XT gel, 4-12 %	BioRad
DNA-konsentrasjonsmåling	BioPhotometer, Eppendorf
DNA-sekvensering	MegaBace 1000DNA Analysis System, Amersham
Dyrkningsinkubatorer	-Model T-51, New Brunswick™ -Scientific Co. Inc. -Incubator Shaker, New Brunswick™ Scientific Co. Inc. -CO ₂ Water-Jacketed Incubator, NUAIRE
Eppendorfrør 1,5 mL	Sarstedt
Filterplater (Transwell 6 brønner, 24 mm diameter, 0,4 µm porestr.)	Costar
Glass petriskåler (ca. 14 cm i diameter)	Sarstedt
Konfokalmikroskop	Bergman AS
Kuvetter (Kvartskuvetter)	Starna Ltd.
Magnetholder	DYNAL
Magnetrører	Combimag RCO, IKA
Nitrogentank	Direct Access Refrigerator International Cryogenics, Inc. Director D-4000
PCR-blokk	PTC-100, MJ Research Inc.

pH-meter	pH-meter 80, Radiometer Copenhagen
Pipetter	Proline, BIOHIT
Pipettespisser	Sarstedt
Plast-rør	15 ml og 50 ml rør, Sarstedt 1,5 ml eppendorfrør, Sarstedt
Plastskåler	Sarstedt
PVDF-membran	Bio-Rad
SDS-PAGE	Vertikal Mini-Slab Gel-system, Bio-Rad
Sentrifuger	Centrifuge 5415R, Eppendorf Centrifuge GS-15R, Beckman LC Carousel Centrifuge, Roche
Sterile 1 mL og 10 mL pipetter	Sarstedt
Strømforsyning	EC-105 og EC-250-90, E-C Apparatus Corp.
Transfer Cell	Bio-Rad
Tritium Storage Phosphor Screen	Amersham Biosciences
Typhoon 9400 Variable Mode Imager	Amersham Biosciences
Vannbad	Tempette junior TE-8J, Techne
Varmebløkk	DB-2D, Techne
Vippebord	CM-9, Sarsted. Doumax 1030, Heidolph
Vippebrett	Sarstedt
Vortex	MS 2 Minishaker, IKA
3MM Whatman papir	Whatman International

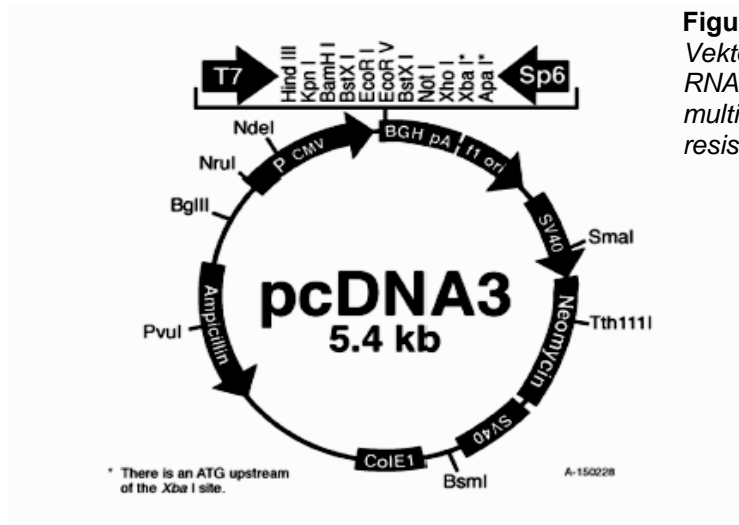
Vektorer:

pGEM[®]-T Easy vektor fra Promega:



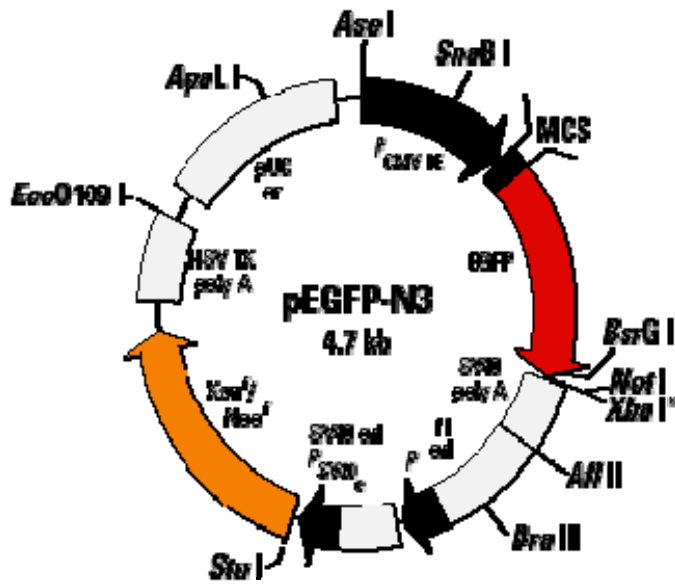
Figur 2.1: pGEM[®]-T Easy vektor. Vektoren er kuttet med *EcoRV* og blitt tilført en 3`terminal thymidine til hver ende som reduserer religering av vektor. Vektoren (høy kopi vektor) inneholder T7 og SP6 RNA-polymerase promotere som flankerer et multikloningssete. Den inneholder også et gen som er resistent mot ampicillin (Promega).

pCDNA3-ekspressjonsvektor fra Invitrogen:



Figur 2.2: pcDNA3 ekspressjonsvektor. Vektoren (høy kopi vektor) inneholder T7 og SP6 RNA-polymerase promotere som flankerer et multikloningssete. Den inneholder et gen som er resistent mot ampicillin.

pEGFP-N3-ekspressjonsvektor fra Clontech:



Figur 2.3: pEGFP-N3 eukaryotisk ekspressjonsvektor. CMV-promotor regulerer ekspresjonen av DNA-innskudd som i sin 3'-ende, er koblet til den kodende delen av GFP-proteinet. Vektoren inneholder også en kanamycin-resistent markør og en SV40-poly(A)-sekvens (Clontech).

2.2 Diverse løsninger

0,1 M CaCl₂

1,47 g CaCl₂ x 2H₂O og 0,1 L destillert vann blandes og autoklaveres.

DMEM tilsatt G-418

G-418 = C₂₀H₄₀N₄O₁₀•2H₂SO₄
 Formelmasse av H₂SO₄ = 98,0
 g/mol
 Formelmasse av G-418 = 692
 g/mol

G-418 sterilfiltreres til en konsentrasjon på 500 mg/mL.

$$\frac{2500 \text{ mg}(G-418)}{5 \text{ mL}(H_2O)} = 500 \text{ mg/mL G-418}$$

$$H_2SO_4 \text{ utgjør} = \frac{2 \times (98) \text{ g/mol}}{692 \text{ g/mol}} \times 100\% = \underline{\underline{28\%}}$$

1,25 mL av stock-løsningen ble tilsatt til 500 mL DMEM (inkludert 25 mL serum, 5 mL L-Glutamin og 5 mL Pen-Strep). Dette tilsvarer: 500 mg/mL x 1,25 mL = 625 (inkludert salt og G-418) mg/flaske, 625 mg x 72 % = 450 mg G-418.

0,5 M EDTA (pH 8,0)

18,6 g dinatrium-etylendiamintetraacetat (EDTA-Na₂) løses i MilliQ-vann til 90 mL. PH justeres til 8,0 med 5 M NaOH. MilliQ-vann tilsettes til 100 mL. Autoklaveres.

Fenol:kloroform (1:1)

Like mengder av fenol og kloroform blandes. Blandingen ekvilibrerer ved å ekstrahere flere ganger med 0,1 M Tris-HCl (pH 7,6). Blandingen oppbevares i mørke flasker (med aluminiumsfolie rundt) ved 4 °C.

4 M Guanidin HCl løsning

76,43 g Guanidin-HCl løses i 0,2 M acetatbuffer. Volumet justeres til 200 mL og tilsettes 2 % Triton X-100.

5 x Elektroforesebuffer:	75 g Trizma-base (pH 8,7), 72 g Glysin, 50 mL 10 % SDS, tilsettes MilliQ-vann til 1L.
1 x Elektroforesebuffer:	Lages ved å blande 100 mL 5 x Elektroforesebuffer med 400 mL MilliQ-vann til 1 L.

IP-vaskeløsning

0,25 mL Triton X-100 (0,05 %) og 25 mL (1M) Tris justeres til pH 7.4. Deretter tilsettes 4,38 g (150 mM) NaCl og MilliQ-vann opp til 500 mL. 5 g BSA tilsettes til slutt om ønskelig.

LB-medium

20 g LB BROTH, 5 g gjærekstrakt og 10 g NaCl blandes og justeres til 7,0 pH med 5 M NaOH, hvis under pH 7,0, og med 5 M HCl, hvis over pH 7,0. MQ-vann tilsettes til et sluttvolum på 1 L. Løsningen autoklaveres og kjøles ned til 50 °C før tilsetting av 500 µL ampicillin/kanamycin.

LB-skåler

LB-medium blandes i en flaske med kork og autoklaveres til all agar smelter. Vekstmediet avkjøles til ca. 50 °C og tilsettes antibiotikum. Deretter overføres løsningen til plastskåler og lokkene settes på. Skålene stables oppå hverandre for å forhindre kondens. Dette tørkes i et par timer og lagres deretter i forseglede plastposer ved 4 °C.

3 M NaOAc

40,81 g natriumacetat x 3H₂O løses i MilliQ-vann til 90 mL. pH justeres til 8,0 med iseddik og MilliQ-vann tilsettes til 100 mL. Autoklaveres. 292,2 g NaCl løses i 1 L destillert vann, filtreres og autoklaves.

10 x PBS, pH 6,8

80,0 g NaCl, 2,0 KCl, 14,4 g Na₂HPO₄ x 2H₂O og 2,0 g KH₂PO₄ blandes med 800 mL destillert vann. pH justeres til 6.8 og tilsettes 200 mL destillert vann.

1 M PIPES

342,4 g PIPES løses i MilliQ-vann til 1 L. Autoklaveres.

SOB-medium

10 g Trypton, 2,5 g gjærekstrakt, 0,25 g NaCl og 415 µL (3 M) KCl blandes og pH justeres til 7,0. MilliQ-vann tilsettes til 500 mL og autoklaveres. Før bruk tilsettes 2,5 mL sterilt (2 M) MgCl₂.

50 x TAE

242 g Tris, 23,76 mL Eddiksyre,

100 mL 0,5 M EDTA, pH 8,0.

Tris løses i 500 mL destillert vann, tilsettes eddiksyre og 0,5 M EDTA. Filtreres og autoklaveres.

TB-buffer

10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂. pH justeres til 6,7 med 5 M KOH og MilliQ-vann tilsettes til 500 mL.

TE-buffer (pH 8,0)

10 mg Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA. Autoklaveres.

1 M Tris-HCl

121,1 g Tris-base løses i MilliQ-vann til 800 mL. pH justeres med konsentrert HCl eller NaOH til ønsket pH. MilliQ-vann tilsettes deretter til 1 L. Autoklaveres.

1 M Tris, pH 8,0

121,1 g Tris løses i 800 mL destillert vann, pH justeres med konsentrert HCl. 200 mL destillert vann tilsettes og løsningen autoklaveres.

Trypsin-EDTA (5L)

2,5 g Trypsin, 1 g EDTA, 2 g KCl, 40 g NaCl, 5 g Glukose, 1,75 g NaHCO₃ og 50 mL Pen-Strep. Steriliseres før bruk ved å filtrere med SCAP/0,20 HNI (pumpe). Flaskene skal autoklaveres før bruk.

3.0 METODER

Metodedelen tar for seg de metodene og teknikkene som ble benyttet under arbeidet med hovedfagsoppgaven.

3.1 Arbeid med mikroorganismer

Ved arbeid og dyrkning av bakterier er det viktig å jobbe med sterile løsninger og preparater, og grunnleggende sterilteknikker ble benyttet. Pipettespisser, eppendorfrør og MilliQ-vann ble autoklavert i 20 min ved 121 °C. Ved dyrkning av bakteriekulturer ble det benyttet sterile plastrør og autoklaverte Erlend Meyer-kolber. Det meste av arbeidet ble utført på arbeidsbenk og latexhansker ble brukt.

Ved dyrkning av *E.coli*-bakterier er det viktig å vite hvilken bakteriestamme man arbeider med, og hvilket dyrkningsmedium bakteriene skal ha for å sikre stabilitet og vedlikehold av plasmider. Bakteriekulturer med *E.coli* dyrkes normalt over natt (ca 16 timer) i beholdere som er 10x større enn kulturvolumet, og ved kraftig risting. *E.coli*-bakterier oppbevares enten på skåler (4 °C) eller som frysekultur (-80 °C).

3.1.1 Tillaging av vekstskåler

Vekstskåler brukes til å så ut og dyrke bakteriekulturer slik at man kan atskille de enkelte bakteriene fra hverandre i separate kolonier.

Prosedyre:

- LB-medium lages som beskrevet i materialer 2.2 og autoklaveres.

- Vekstmediet avkjøles til under 50 °C, og ønsket antibiotika tilsettes.
- Ønsket antall plastskåler settes frem på en steril laboratoriebank eller i avtrekk, og fylles med vekstmedium (halvfulle).
- Skålene settes oppå hverandre, og etter to timer snus de og lagres i forseglede poser ved 4 °C.

3.1.2 Oppdyrking av *E.coli* fra frysekultur

Prosedyre:

- Frysekultur av *E.coli* hentes fra -80 °C, og settes på is.
- Litt av frysekulturen overføres til 5 mL LB-medium i et sterilt 50 mL plastrør ved hjelp av en steril tannpirker.
- LB-mediumet med bakteriecellene dyrkes ved 37 °C og kraftig risting over natt.

3.1.3 Bevaring av *E.coli* i frysekultur

For langtids oppbevaring av bakteriekulturer blir bakteriecellene fryst ned ved -80 °C.

Prosedyre:

Følgende tilsettes til et sterilt 1,5 mL rør med skrukork og blandes godt:

- 850 µL bakteriekultur
- 150 µL glyserol

Løsningen fryses raskt ned ved -80 °C.

3.2 Arbeid med DNA

I denne oppgaven ble "kvikksjekk"-metoden brukt for å raskt kunne påvise DNA-plasmider, mens et QIAGEN-kit ble benyttet ved isolering og rensing av plasmider.

3.2.1 "Kvikksjekk"-metoden

"Kvikksjekk"-metoden er en rask og enkel metode for å sjekke om en bakteriekultur har tatt opp et plasmid, og eventuelt størrelsen på plasmidet. En fenol-kloroform behandling av bakteriecellene fører til at cellene ødelegges og proteinene felles ut i fenolfasen, mens nukleinsyrer forblir i vannfasen. Siden denne metoden er så rask å gjennomføre, er den fordelaktig når mange kolonier skal sjekkes for innhold av DNA-plasmid.

Prosedyre::

Til et eppendorfrør tilsettes:

- 100 μ L bakteriekultur
- 50 μ L fenol:kloroform (1:1)
- 10 μ L loading buffer (6x)

Blandingens ristes kraftig i 10 sekunder og sentrifugeres ved 10000 x g i 3 minutter ved romtemperatur. 20-30 μ L av den øvre vannfasen appliseres på en 0,8 % agarosegel. Elektroforesen utføres ved 100 V i ca. 30 minutter. Agarosegelen legges på en UV-transilluminator for å synliggjøres.

3.2.2 Plasmidisolering

Isolering av plasmider fra bakterier kan enten foregå i liten, mellomstor eller stor skala. Dette kalles henholdsvis mini-, midi- og maxi prep. Det er blitt brukt to forskjellige

miniprep kit og en maxiprep isolering i denne oppgaven. QIAprep Miniprep system er en rask og lett metode, og utbyttet ligger i området 3 µg til 6 µg plasmid DNA pr. mL kultur. Prinsippet bak metoden er en NaOH/SDS (Natriumhydroksid/Sodium Dodecyl Sulphate) buffer som lyserer cellene. SDS løser opp fosfolipidene og proteinene i celledmembranen, mens NaOH/AlkalineProtease-løsning denaturerer proteiner, kromosomalt DNA og plasmid DNA, og inaktiverer endonukleaser. Lysatet blir deretter nøytralisert og justert til et høyt saltnivå ved tilsetning av nøytraliseringsbuffer. Den høye saltkonsentrasjonen fører til at denaturerte proteiner, kromosomalt DNA og SDS vil felle ut. Små lukkede sirkulære DNA-molekyler vil derimot renaturere å forbli i løst tilstand. DNA-plasmid kan så overføres til en QIAspin kolonne, der det bindes til glassmatriksen mens cellulære proteiner og andre metabolitter ikke bindes. Salt vaskes bort med vaske-bufferen, og rensede plasmider kan deretter elueres med destillert vann eller Tris-buffer.

Plasmidisoleringskittene som ble brukt i denne oppgaven er "QIAprep® Maxiprep Kit" og "QIAprep® Miniprep Kit". Protokoll fra leverandøren fulgte med kittet, og ble gjennomført som beskrevet

<http://www1.qiagen.com/literature/protocols/QIAprepMiniprep.aspx?>,
<http://www1.qiagen.com/Products/Plasmid/>.

3.2.3 Rensing av DNA-fragmenter fra agarosegel

Ved rensing av DNA-fragmenter fra agarosegel, tilsettes gelbiten en egnet buffer som inneholder den rette pH for absorpsjon av DNA til QIAquick membranen (opptil 10 µg DNA kan bindes til kolonnen), og løses ved oppvarming. Løsningen overføres til en QIAquick spin kolonne, der DNA-fragmenter vil bindes til glassmatriksen og andre silikater i nærvær av kaotrope salter. En vaskebuffer vasker bort urenheter som primere, salter, enzymer, nukleotider, agarose, EtBr, oljer og detergenter. DNA-fragmentene kan deretter elueres med destillert vann eller Tris-buffer.

Ved rensing av DNA-fragmenter ble Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System brukt. Protokoll fra leverandøren fulgte med kittet (www.promega.co.jp/QP_PDF/QP%20Wiz%20SV%20Mini.pdf), og ble gjennomført som beskrevet.

3.2.4 Agarosegel-elektroforese

Agarose er et polysakkarid utvunnet fra sjøtang, og danner en fast gel når det løses opp i vann ved konsentrasjoner fra 0,5 til 2 % (w/v). Agarosegel-elektroforese benyttes for å separere DNA-fragmenter av forskjellige størrelser. Når DNA-fragmenter av forskjellige størrelser i en agarosegel utsettes for et elektrisk felt, vil DNA-fragmentene bevege seg mot den positive elektroden med en hastighet som er avhengig av dets størrelse og form. Små DNA-fragmenter vil vandre raskere enn store DNA-fragmenter, og sirkulære DNA-fragmenter raskere enn lineære DNA-fragmenter. Forskjellige konsentrasjoner av agarosen i gelen vil kunne gi varierende separasjon av DNA-fragmenter med ulik størrelser. Agarose-konsentrasjon på 2 % vil gi god separasjon av små DNA-fragmenter, mens 0,8 % gir god separasjon av DNA-fragmenter mellom 0,5 og 10 kb.

Prosedyre for tillaging av 0,8 % agarosegel:

- 0,4 g agarose løses opp i 50 mL 1xTAE-buffer ved oppvarming.
- EtBR (0,5 µg/mL) tilsettes og løsningen helles over i gelformen. Kammen settes nedi og dette skal stå i 20-30 minutter, eller til agarosegelen er stiv.
- Agarosegelen legges i elektroforeseapparatet og 1xTAE-buffer helles oppi før kammen fjernes og DNA-prøvene appliseres i brønnene. Det appliseres også en markør (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder).
- Elektroforesen kjøres ved 100 V i ca. 30 min.
- Agarosegelen legges deretter på UV-transluminator for visualisering.

3.2.5 Kvantitering av DNA

Bestemmelse av DNA-konsentrasjon gjøres lett ved UV-absorbansmålinger, som baserer seg på nukleotidenes evne til å absorbere lys i den ultrafiolette delen av lys-spekteret. Absorpsjonsmaksimum for DNA er 280 nm og BioPhotometer-maskinen ble brukt til kvantitering av DNA.

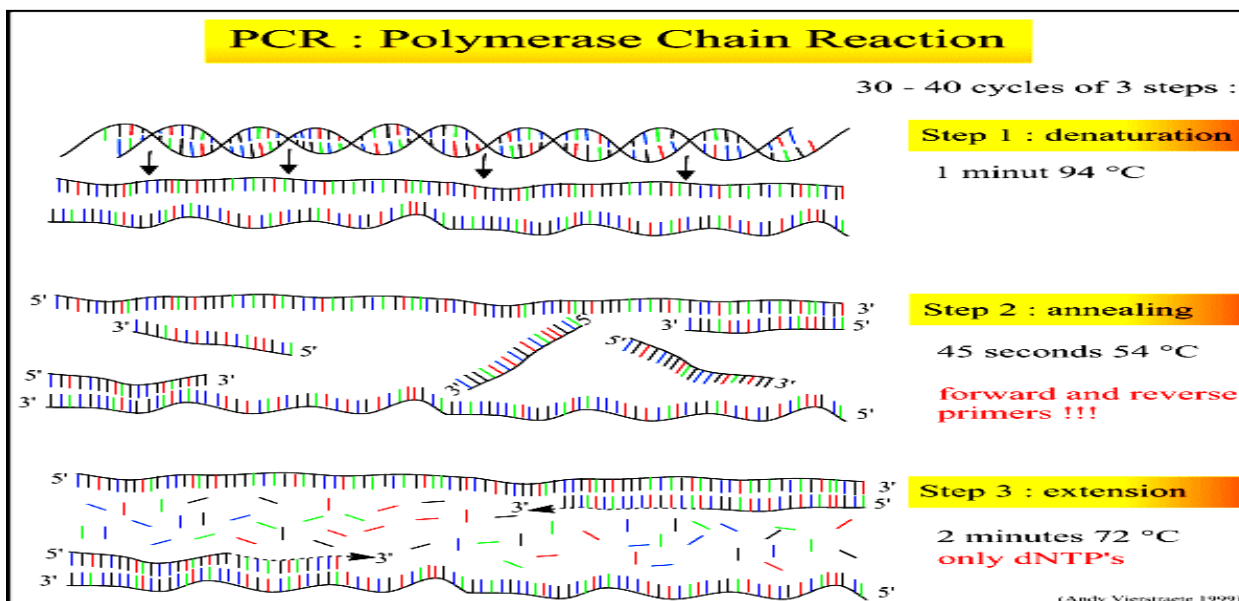
3.3 Polymerase kjedereaksjon (PCR; Polymerase chain reaction)

PCR er en metode for amplifisering av spesifikke DNA sekvenser *in vitro* ved hjelp av primere som er komplementære med den flankerende målsekvensen, samt en termostabil DNA polymerase. I løpet av PCR-reaksjonen øker konsentrasjonen eksponentielt av dette spesifikke DNA fragmentet. Kary Mullis fikk Nobelprisen i Kjemi i 1993 for utviklingen av PCR.

PCR-prinsippet er en syklisk prosess bestående av tre trinn:

1. **Denaturering** ved 94 °C:
Bindingene som holder dobbeltrådet DNA sammen brytes, og det dannes to komplementære DNA-molekyler.
2. **Annealing** (temperaturen varierer, avhengig av primeren). Primerene fester seg til sin komplementære sekvens.
3. **Elongering** ved 68/72 °C (avhenger av hvilken DNA-polymerase man bruker):
En varmestabil DNA-polymerase forlenger (i 5' → 3'-retning) primerne som har festet seg og lager en eksakt kopi av DNAet mellom primerene. 35-100 nukleotider blir satt på pr. sekund.

Antall sykler avhenger av mengde og tilgang på templat-DNA, men 20-40 sykler er vanlig.



Figur 3.1: Polymerase kjedereaksjon (PCR). En PCR består av tre trinn. Trinn 1: Denaturering: DNA-molekylet denatureres og to komplementære DNA-molekyler dannes. Trinn 2: Annealing: primerene fester seg til sine komplementære områder på DNA-molekylet. Trinn 3: Elongering: Den varmestabile DNA-polymerasen forlenger primerene vha dNTPer. Disse tre trinnene gjentas 20-40 ganger. (Figuren er hentet fra Andy Vierstraete 1999).

PCR-enzym:

Det brukes en varmestabil DNA-polymerase i PCR-reaksjonen, slik at tilsetning av nytt enzym ikke er nødvendig etter en syklus. Den høye denatureringstemperaturen hindrer renaturering og dannelse av sekundær struktur slik at amplifiseringen blir mer effektiv.

Noen DNA-polymeraser har 3`-5`eksonuklease-aktivitet, og den brukes til korrekturlesing (korrigerer feilinnsette baser). Expand DNA-polymerase er en kombinasjon av Pwo og Vent DNA-polymeraser. Pwo DNA-polymerase er veldig prosessiv (men uten 3`-5`eksonuklease aktivitet), mens Vent DNA-polymerase har 3`-5`eksonuklease aktivitet.

dNTP-miks:

12,5 µL av hvert nukleotid (100 mM) blandes sammen og tilsettes 950 µL MilliQ-vann slik at sluttkonsentrasjonen av dNTP-miks blir 1,25 mM og det totale volum blir 1 mL.

PCR program:

Step 1	94 °C i 2 min
Step 2	94 °C i 30 sek
Step 3	55-68 °C i 30 sek (gradient blokk)
Step 4	68/72 °C (Expand/Vent DNA polymerase) i 1 min
Step 5	go to step 2, 29 sykler
Step 6	68/72 °C (Expand/Vent DNA polymerase) i 10 min
Step 7	4 °C, ∞
Step 8	End

Prosedyre for PCR:

Følgende tilsettes i et eppendorfrør:

- 0,5 µL templat-DNA
- 1,0 µL 5`-primer (10 pmol/µL)
- 1,0 µL 3`primer (10 pmol/µL)
- 7,0 µL dNTP-mix (1,25 mM)
- 11,7 µL dH₂O

Like før reaksjonen settes i gang tilsettes:

- 2,5 µL Buffer 1
- 0,75 µL Expand DNA-polymerase.

Første PCR for DNA-klon nr 3 (ST6`):

Følgende tilsettes et eppendorfrør:

- 0,5 µL templat-DNA
- 2,0 µL 5`-primer (10 pmol/µL)
- 2,0 µL 3`primer (10 pmol/µL)

- 8,0 µL dNTP-mix (1,25 mM)
- 1,0 µL MgSO₄

Like før reaksjonen settes i gang tilsettes:

- 2,5 µL 10x Vent buffer
- 9,0 dH₂O
- 0,5 µL Vent DNA-polymerase

PCR-produktet appliseres på en 0,8 % agarosegel, kuttet ut og renses. PCR-produktet brukes som 3`primer i en ny PCR-reaksjon:

Andre PCR for DNA-klon nr 3 (ST6`):

Følgende tilsettes et eppendorfrør:

- 0,5 µL templat-DNA
- 1,0 µL 5`-primer (10 pmol/µL)
- 1,0 µL 3`primer (10 pmol/µL)
- 7,0 µL dNTP-mix (1,25 mM),

Like før reaksjonen settes i gang tilsettes:

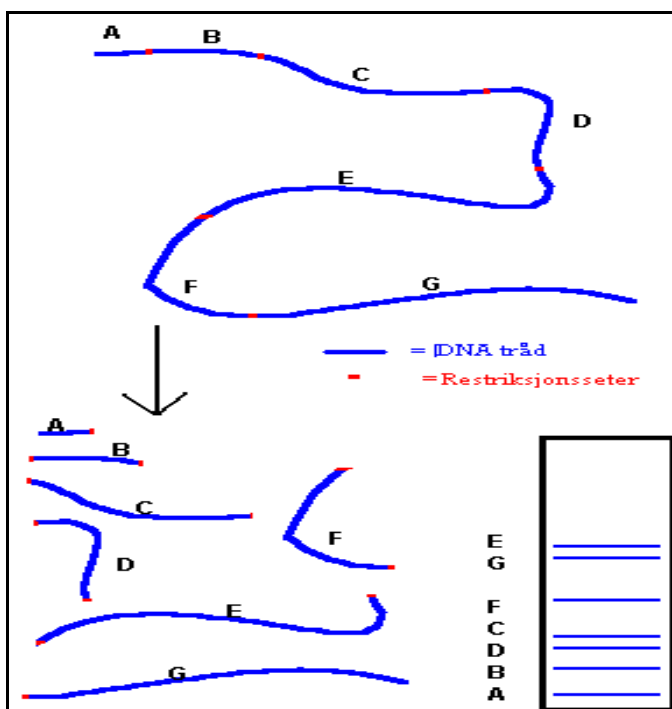
- 5,0 µL buffer 1
- 0,75 µL Expand DNA-polymerase
- 2,75 µL dH₂O.

Etter endt PCR appliseres det hele på en agarosegel for kontroll.

3.4 Kløyving av DNA med restriksjonsenzymer

Restriksjonsenzymer, også kalt nukleaser, er enzymer som inngår som en del av bakterienes forsvar mot bakteriofager. Alle restriksjonssystemer i bakterier består av to enzymatiske elementer: en endonuklease (som kutter DNA) og en metylase som henger metylgrupper på spesifikke gjenkjenningssteder. Metylasene beskytter det bakterielle DNAet slik at det ikke skal bli degradert av sine egne endonukleaser.

Endonukleasene/restriksjonsenzymene fungerer som molekylære sakser som kutter opp alt DNA som ikke er "korrekt" metylert. Enzymene gjenkjenner korte, spesifikke (ofte palindrome) DNA sekvenser og dette kan utnyttes ved subkloning av DNA.



Figur 3.2: Restriksjonskutt av DNA. Store fragmenter vil vandre kortere i en agarosegelelektroforese (fragment E størst deretter følger G-F-C-D-B-A).

Prosedyre for restriksjonskutting med Eco RI og Xho I:

Følgende blandes i et 1,5 mL eppendorfrør:

- 20 μL DNA-preparat
- 0,3 μL BSA (100x)
- 3 μL Eco RI buffer (10x)
- 5 μL dH₂O

Mikses ved pipettering og deretter tilsettes:

- 1 μL Eco RI enzym
- 1 μL Xho I enzym

Mikses forsiktig ved pipettering.

Blandingen inkuberes i 1-4 timer ved 37 °C.

3.5 Ligering

DNA-fragmenter kan kobles sammen ved hjelp av T4 DNA-ligase. Enzymet danner fosfodiesterbindinger mellom nærliggende 3`-hydroksyl-grupper og 5`-fosfat-grupper i DNA-fragmenter. Ved ligering av DNA-fragmenter og plasmid, bør det molare forholdet være slik at det er et klart overskudd av DNA-fragmentet i forhold til vektor. Ligeringsstemperaturen er en kombinasjon av størst mulig enzymaktivitet og så stabil som mulig hybridisering mellom klebrige ender i DNA-fragment og vektor. Det mest vanlige er 16 °C eller romtemperatur.

Prosedyre for ligering i pGEM-T Easy vektor:

Følgende tilsettes i et eppendorfrør:

- 12,5 μL ligerings buffer (2X)
- 1 μL pGEM-T Easy vektor
- 10 μL renet PCR-produkt (300-600 ng)
- 1,5 μL T4 DNA-ligase enzym (0,4 U)

Dette blandes og inkuberes ved romtemperatur 1 time. Deretter blir ligeringsblandingen transformert inn i *E.coli*-celler som beskrevet i metoder 3.7.2.

Ligering av DNA-fragmenter og restriksjonskuttet pEGFP-N3 /pcDNA3 vektor:

Følgende tilsettes i et eppendorfrør:

- 1,5 μL ligase buffer (10x)
- 10 μL rensset DNA-fragment
- 1 μL rensset og restriksjonskuttet vektor
- 1,5 μL dH₂O
- 1,5 μL T4 DNA Ligase

Dette inkuberes ved 16 °C i ca. 16 timer.

Ligeringsblandingen transformeres i kompetente Kan^r *E.coli* celler (pEGFP-vektor) og Amp^r *E.coli* celler (pcDNA3 vektor), overføres til vekstskåler tilsatt kanamycin (pEGFP vektor) eller ampicillin (pcDNA3-vektor), og inkuberes i 16 timer ved 37 °C.

3.6 Sekvensering

Etter at DNA-konsentrasjonen var målt, ble konstruktene sendt til sekvenserings-laboriatoriet ved Institutt for molekylær biovitenskap, Universitetet i Oslo.

Til 500 ng av DNA tilsettes milliQ-vann til et totalt volum på 11 μL
(500 ng/konsentrasjon av DNA (ng/ μL) = x μL DNA).

3.7 Transformering av DNA i *E.coli*-celler

På laboratoriet kan plasmid-DNA bli innført i en bakteriecelle ved en prosess kalt transformering. Bakteriene blir behandlet med en blanding av CaCl_2 og dimetylsulfoksid (DMSO) som gjør cellene kompetente. Dette gjør de midlertidig permeable for små DNA molekyler. DNA og bakteriecellene blandes på is slik at plasmidet legger seg på utsiden av plasmamembranen til cellene. Når bakteriecellene utsette for et varmesjokk ($42\text{ }^\circ\text{C}$), vil DNAet komme seg inn i bakterien, og tilbakeførsel av bakteriene til is fører til at bakteriens cellevegg blir tett igjen. Vanligvis vil 1 av 10000 celler ta opp plasmidet og de cellene som tar opp plasmid vil bare ta opp et hver. For å identifisere disse transformantene trengs det en seleksjonsmarkør, som for eksempel ampicillin/kanamycin. Det transformerte plasmidet inneholder et gen som gjør bakteriecellene motstandsdyktige mot seleksjonsmarkøren. I oppgaven er det brukt et pGEM-T Easy-plasmid som koder for et gen som gjør cellene resistente mot ampicillin, og pEGFP-plasmid som koder for et gen som gjør cellene resistente mot kanamycin. Det brukes ofte høy-kopi plasmider som replikeres uavhengig av bakteriens eget DNA.

3.7.1 Preparering av kompetente *E.coli*-celler

Denne metoden produserer *E.coli*-celler med en høy transformasjonseffektivitet. Bakteriecellene dyrkes i SOB-medium til $\text{OD}_{600} \sim 0,6$ ved $18\text{ }^\circ\text{C}$. Bakteriecellene blir deretter vasket flere ganger med PIPES-buffer og behandlet med DMSO. De kompetente cellene blir sjokkfrosset ved hjelp av flytende nitrogen og deretter lagret ved $-70\text{ }^\circ\text{C}$.

*Prosedyre for tillaging av kompetente *E.coli*-celler:*

- 10-12 bakteriekolonier plukkes fra et ferskt utstryk av bakteriestammen på SOB-skåler.
- Cellene suspenderes i 250 mL SOB-medium i en 2 L erlenmeyerkolbe.

- Bakteriecelleene dyrkes deretter ved 18 °C med risting ved 220 rpm til en OD₆₀₀ ~ 0,6.
- Bakteriekulturen kjøles ned på is i 10 minutter og overføres til sterile sentrifugerør.
- Bakteriecelleene høstes ved sentrifugering (2500 x g) i 10 minutter ved 4 °C.
- Supernatanten fjernes og bakteriepelleten løses i 80 mL kald TB-buffer.
- Løsningen inkuberes på is i 10 minutter og sentrifugeres ved 2500 x g i 10 minutter ved 4 °C.
- Supernatant fjernes forsiktig og pelleten løses opp i 20 mL TB-buffer.
- 1,5 mL DMSO tilføres til bakteriesuspensjonen ved forsiktig omrøring før inkubasjon på is i ca. 10 minutter.
- Bakteriesuspensjonen overføres til eppendorfrør i alikvoter på 200 µL og sjokkfryses i flytende nitrogen. Oppbevares i -70 °C.

3.7.2 Transformering av kompetente *E.coli*-celler

- Kompetente celler tines på is i 30 minutter.
- DNA-plasmidblandingen tilsettes og blandes forsiktig. Løsningen settes på is i 30 minutter.
- Bakteriecelleene utsettes for et varmesjokk (42 °C) i 1 minutt, og settes tilbake på is i 2-3 minutter.
- Bakteriecelleene overføres ved hjelp av en pipette til en vekstskål med ønsket seleksjonsmedium og strykes ut med en glasstav. Skålene inkuberes ved 37 °C i 14-16 timer.

Prosedyre for dyrkning av bakteriestammer fra vekstskåler:

5,0 mL (1/10 av totalt volum) vekstmedium gjøres klar i et sterilt 50 mL rør.

En enkelt koloni plukkes fra vekstskålen med en steril tannpirker/pipette spiss og overføres til vekstmediumet og inkuberes i en risteinkubator ved 37 °C i 14-16 timer.

3.8 Sorteringsstudier

Epitelceller i kroppen tar opp næringsstoffer fra blodbanen via spesifikke "pumper" og reseptorer som er lokalisert til den basolaterale siden av cellelaget. Når cellene dyrkes på plast eller glass, må cellene omorganisere en del av sine strukturer for opptak av næring fra mediet som da kun finnes på oversiden (i den apikale delen) av cellene.

3.8.1 Transfeksjon

Etter sekvensering ble DNA-konstruktene (pcDNA3/pEGFP-N3 med DNA-innskudd) transfektert inn i MDCK II-celler.

Transfeksjon er en generell prosess for å bringe fremmed DNA inn i celler. Deretter kan proteinets uttrykk og funksjon studeres. Det finnes to hovedtyper transfeksjon, transient og stabil transfeksjon. I stabil transfeksjon blir plasmid- eller retrovirusvektorer stabilt integrert i genomet til vertscellen, noe som resulterer i et stabilt uttrykk av et transfektert gen også etter at cellene deler seg. I transient transfeksjon blir vektor-DNA ikke integrert inn i genomet, men DNA-innskudd uttrykkes bare så lenge plasmidet er i cellen. Ekspresjon av transfekterte gener kan da vanligvis bli målt etter 16-96 timer.

FuGENE™ 6 er et multikomponent lipidbasert transfeksjonsreagens som danner komplekser med DNA, og transporterer dette inn i cellen. FuGENE™ 6 transfeksjonsreagens har høy transfeksjonseffektivitet i mange celletyper.

Andre vanlige transfeksjonsteknikker inkluderer kalsiumfosfat kopresipitering, bruk av virusvektor og kationisk liposom-mediert transfeksjon.

Fordeler med FuGENE™ 6 reagens omfatter:

- Veldig høy transfeksjonseffektivitet i mange vanlige celletyper.
- Ingen cytotoxicitet, selv i mange primære celletyper.
- Fungerer godt både i nærvær og fravær av serum.

- Krever minimal optimalisering.

Prosedyre for fremstilling av (FuGENE™ 6 reagens:DNA) komplekser:

100 μ L serum-fritt medium (DMEM, 1 % L-Glutamin og 1 % Pen-Strep) tilsettes først til et 1,5 mL eppendorfrør. Deretter tilsettes 12 μ L FuGENE™ 6 reagens og 4 μ g DNA (forhold 3:1). Innholdet i røret blandes ved å slå forsiktig på røret. Blandingen inkuberes til slutt i 15-45 minutter ved romtemperatur. FuGENE™ 6 reagens:DNA-blandingen tilsettes dråpevis til cellene (som har dannet et 50-70 % tett cellelag) og fordeles deretter i skålen. Skålen med de transfekterte cellene settes tilbake i inkubatoren og inkuberes i 72 timer ved 37 °C og 5 % CO₂. En kontrollskål behandles likt med skålen med de transfekterte cellene. Etter 72 timer trypsineres cellene (3.8.2) i skålen og sås ut på nye skåler med medium tilsatt 500 mg/mL G-418 (seleksjonsmarkør). Kontrollskålene tilsettes også medium med G-418 (500 mg/mL). Når cellene i kontrollskålen er døde, kan kolonier fra skålene med de transfekterte cellene plukkes.

Prosedyre for fortynningsrekke for transfekterte celler:

En skål med transfekterte celler trypsineres og fordeles på 4 skåler og skålene tilsettes medium med G-418 til et totalt volum på 14 mL. De ulike fortynningene lages fordi transfeksjonseffektiviteten på dette tidspunkt ikke er kjent og det er ønskelig at tettheten av positive kloner er optimal i minst en av skålene.

Skål 1: 1:30 fortynning

$$x/14 = 1/30 \Rightarrow x = 14 \text{ mL}/30 = 0,467 \text{ mL} = 467 \mu\text{L}$$

467 μ L av de trypsinerte cellene tilsettes 13,53 mL medium med G-418 slik at det totale volum blir 14 mL.

Skål 2: 1:100 fortynning

$$x/14 = 1/100 \Rightarrow x = 14 \text{ mL}/100 = 0,14 \text{ mL} = 140 \mu\text{L}$$

140 μL av de trypsinerte cellene tilsettes medium med G-418 slik at det totale volum blir 14 mL.

Skål 3: 1:200 fortyning

$$x/14 = 1/200 \Rightarrow x = 14 \text{ mL}/200 = 0,07 \text{ mL} = 70 \mu\text{L}$$

70 μL av de trypsinerte cellene tilsettes medium med G-418 slik at det totale volum blir 14 mL.

Skål 4: Resten av cellene: $10 \text{ mL} - (0,467 + 0,14 + 0,07) \text{ mL} \approx 9,3 \text{ mL}$

9,3 mL av de trypsinerte cellene tilsettes 4,7 mL medium med G-418 slik at det totale volum blir 14 mL. Til slutt overføres hele volumet til skålene og de settes i CO_2 -inkubatoren. Etter at alle cellene i kontrollskålen er døde, plukkes kolonier fra de andre skålene som inneholder transfekterte celler. Disse koloniene merkes med tusj rundt kolonien på skålens underside. En metallring settes over kolonien og tilsettes 200 μL trypsin. Når cellene i kolonien er løst, overføres til en 25 cm^2 kulturflaske, og medium med G-418 tilsettes til et sluttvolum på 10 mL. Flaskene settes i CO_2 -inkubator ved 37 °C og 5 % CO_2 , inntil flasken er tett med celler.

3.8.2 Trypsinering av celler

For vedlikehold av cellelinjen dyrkes MDCK II-cellene i plastflasker med dyrkningsmedium ved 37 °C og 5 % CO_2 . Etter ca. 3 dager dannes et tett cellelag og cellene kan løsnes og sås ut på nytt. Cellene danner et tett cellelag, og mellom cellene finnes spesielle proteinkomplekser som kalles "tight junctions" som er avhengige av Ca^{2+} ioner. Trypsin-løsningen er tilsatt EDTA som binder Ca^{2+} ioner og som dermed åpner "tight junctions". Når disse kompleksene åpnes, vil trypsinet komme til på undersiden av cellene og bryte bindingene til underlaget. Ved tilsetting av medium med serum etter endt trypsinering, inaktiveres trypsinet.

Prosedyre for trypsinering av MDCK II-celler i 25 cm²/75 cm² flasker:

Mediet i flaskene helles av. Cellene vaskes med 5 mL (25 cm² flasker)/ 10 mL (75 cm² flasker) trypsin. 3 mL (25 cm² flasker)/ 5 mL (75 cm² flasker) trypsin tilsettes i 1-2 minutter som også helles av. 1 mL trypsin tilsettes og settes til inkubering ved 37 °C og 5 % CO₂ til cellene har løsnet. Deretter tilsettes 10 mL medium. Cellene kan nå fordeles på nye flasker (75 cm²) med et sluttvolum på 20 mL, fryses ned i ampuller eller sås ut på skåler for transfeksjon.

Prosedyre for trypsinering av MDCK II-celler på skåler:

Mediet i skålene helles av. Cellene vaskes med 5 mL trypsin. 5 mL trypsin tilsettes i 1-2 minutter som så helles av. 2 mL trypsin tilsettes og settes til inkubering ved 37 °C og 5 % CO₂ til cellene har løsnet. Etter at cellene har løsnet tilsettes 8 mL medium med G-418 til hver av de nye skålene.

Prosedyre for nedfrysning av MDCK II-celler:

Cellene trypsineres (som beskrevet over) og tilsettes 10 mL medium. Alt overføres til et 15 mL sentrifugerør og sentrifugeres ved 1500 rpm i 5 minutter. Supernatanten kastes. Pelletten tilsettes 1 mL frysemedium, cellene blandes godt, overføres til fryserør og settes raskt i -80 °C fryseren. Når cellene er frosset, overføres de til en nitrogentank.

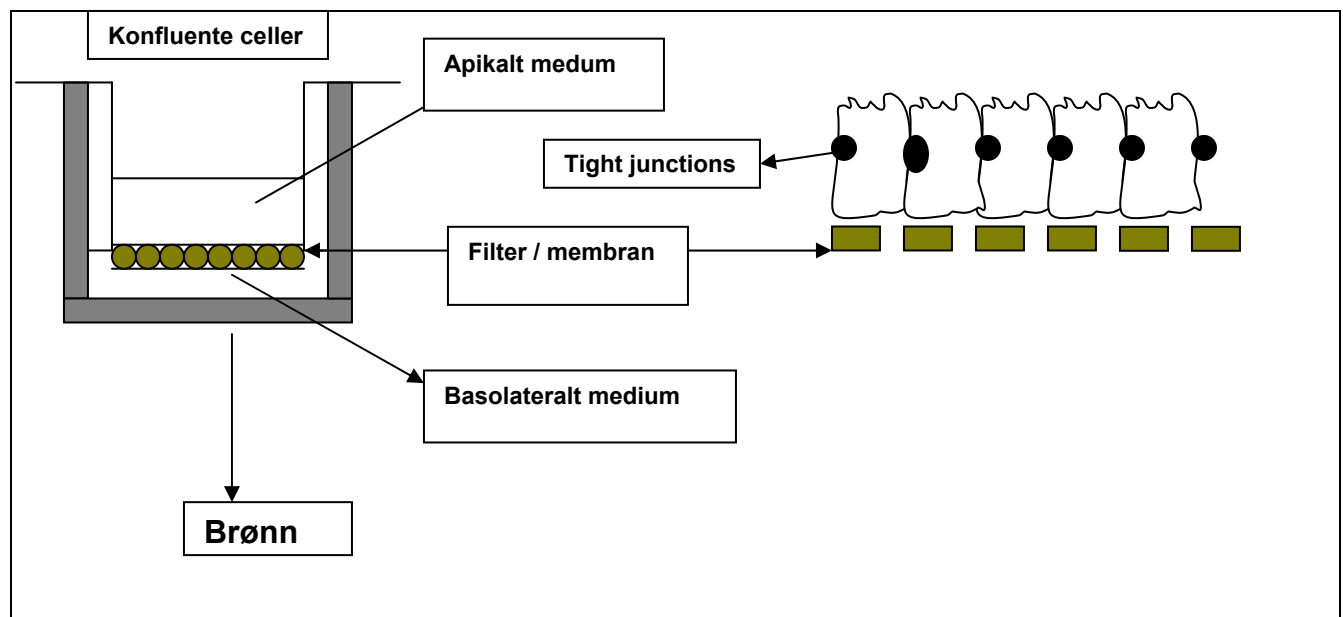
3.8.3 Deteksjon av proteinuttrykk ved hjelp av konfokal fluorescensmikroskopi

Fire av konstruktene inneholder genet som koder for grønt fluorescerende protein (GFP; green fluorescent protein). Genet er isolert fra *Aequorea victoria* og er et mye brukt reporter-gen ved studier av proteinuttrykk, inkludert subcellulær lokalisering, eller som en markør ved transfeksjon, på grunn av enkel deteksjon av fluorescens i levende celler. GFP

fluorescens krever ingen kofaktorer, substrater eller ekstra genprodukter, noe som gjør det til et ideelt reporter-gen ved transfeksjon. Ved bruk av lasermikroskopi vil proteinet produsere sterk grønn fluorescens, dersom proteinet er uttrykt i cellen.

3.8.4 Dyrking av epitelceller på filter

MDCK-celler som dyrkes på filter vil oppnå samme polarisering som epitelceller *in vivo*. De vil vokse, dele seg og danne et tett cellelag med "tight junctions". Den apikale siden vil vende opp og være i kontakt med mediet over filteret, mens den basolaterale siden vil være i kontakt med mediet under filteret. Ved å høste det apikale og det basolaterale mediet separat, kan man på en enkel måte skille apikal fra basolateral sekresjon.



FIGUR 3.3: Dyrking av epitelceller på filter. MDCK-celler vil oppnå samme polarisering dyrket på filter som *in vivo*. Basolateralt og apikalt medium er adskilt og kan analyseres separat.

Prosedyre for dyrking av MDCK-celler på filter:

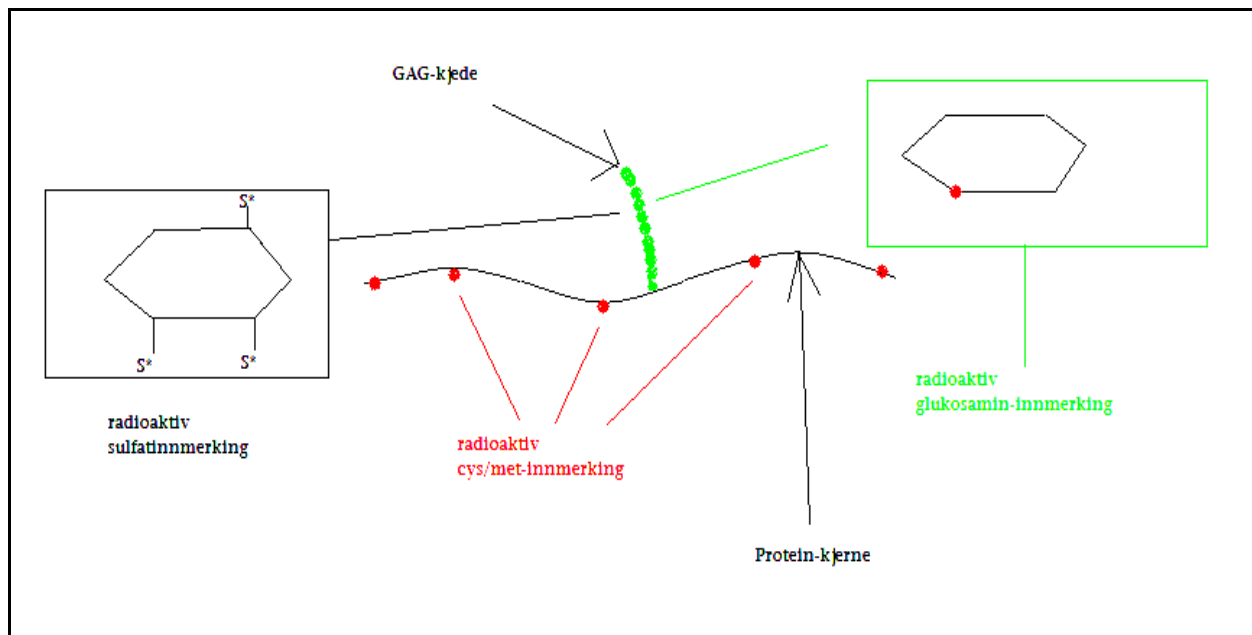
Etter trypsinering av konfluente celler (3.8.2), overføres tilsatt dyrkningsmedium med celler og trypsin til et 50 mL sentrifugerør. Cellene sentrifugeres ved 1500 rpm i 5 minutter ved 16

°C. Supernatanten helles av og cellene resuspenderes i 10 mL dyrkningsmedium. 1,6 mL overføres til oversiden av hvert av filterne. Filterne er på forhånd plassert i plastringer i en autoklavert glass-petriskål, der 80 mL dyrkningsmedium utgjør det basolaterale mediet. I disse skålene dyrkes cellene på filter i 4 døgn, slik at cellene danner tette cellelag. Deretter flyttes filterne over i 6-brønners plastbrett, der en kan skille basolateralt og apikalt medium for hvert enkelt filter, og cellene settes til inkubering ved 37 °C og 5 % CO₂. Cellene dyrkes med medium tilsatt (³⁵S)-cys/met (cystein/metionin), (³⁵S)-SO₄⁻²(sulfat) eller (⁵H)-GlcN (glukosamin) for radioaktiv metabolsk merking (3.8.5). Dagen etter høstes apikalt og basolateralt medium for hvert filter og cellefraksjonen høstes ved å lysere cellene med immunopresipitering (IP)-lysisbuffer.

Prosedyrer for høsting av celler:

- Filterne (cellefraksjonen) vaskes 3 ganger med kald PBS (2 mL under filteret og 1 mL over filteret) i 5 minutter med bevegelse, på is..
- Filterne overføres til nye brønner og tilsettes 1 mL IP-lysis. Deretter settes de på is med bevegelse i 45 minutter.
- De lyserte cellene overføres til eppendorfrør og oppbevares ved -80 °C

3.8.5 Radioaktiv innmerking



Figur 3.4. Radioaktiv innmerking av proteoglykaner. ^{35}S -cys/met indikerer mengde protein, ^{35}S -sulfat angir mengde GAG sulfatert og ^3H -glukosamin sier noe om hvor mange/lange GAG-kjedene er.

$[^{35}\text{S}]$ -Sulfat innmerking

GAG-kjeder på proteoglykaner (PG) er modifisert med sulfatgrupper. Ved å erstatte sulfat (kaldt) med radioaktivt sulfat i mediet, kan man detektere sulfaterte PG som er syntetisert i cellene i innmerkingsperioden, og som har blitt utskilt til mediene eller forblir i cellefraksjonen.

$[^{35}\text{S}]$ -Cystein/metionin (Cys/met) innmerking

Ved innmerking med radioaktiv cys/met vil proteindelen bli merket med radioaktivitet og man kan detektere mengde proteiner i apikalt og basolateralt medium, samt cellefraksjonen.

$[^3\text{H}]$ - Glukosamin (GlcN) innmerking

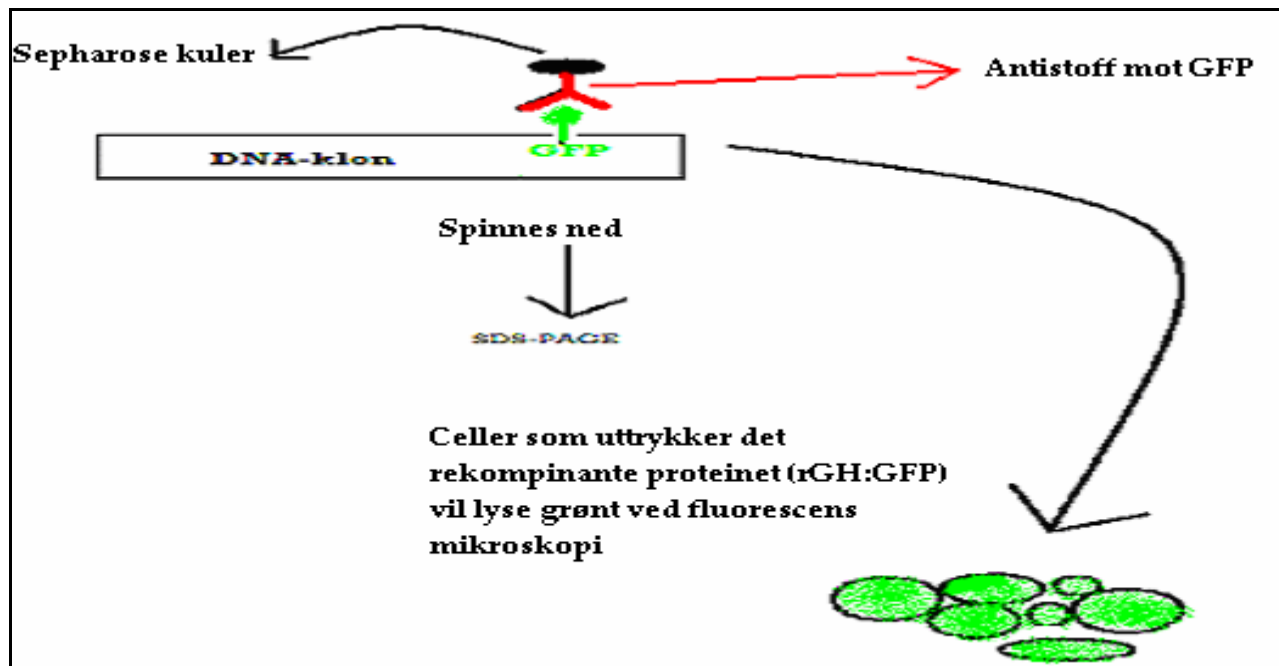
Radioaktiv glukosamin vil inkorporeres i GAG-kjedene, og gir et bilde på hvor lange/mange kjeder som finnes i apikalt og basolateralt medium og på cellulære PG.

Prosedyre for radioaktiv innmerking av rGH:GFP:

I en 6-brønners plastplate tilsettes 1,5 mL RPMI-1640 SO_4^{-2} -(cys/met)-/glukose-fritt medium, som er tilsatt henholdsvis radioaktivt sulfat, cys/met eller GlcN til en sluttkonsentrasjon på 0,2 mCi/mL, til hver av brønnene. Filtrene med tett cellelag overføres til brønnene, og 1 mL av samme medium tilsettes apikalt. Innmerkingen foregår i 24 timer ved 37 °C og 5 % CO_2 før cellene høstes.

3.8.6 Immunopresipitering (IP) av rGH:GFP med antistoff

Ved IP renses man ut ønsket protein fra en blanding av proteiner, ved hjelp av antistoff (figur 3.5). Proteoglykanene er radioaktivt innmerket for senere analyse ved Natrium dodecyl sulfat-polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE). GFP, som gjenkjennes av antistoffet, kan isoleres ved presipitering med protein A-Sepharose i mikrosentrifuge (antistoffet bindes til GFP og protein A-Sepharose bindes til antistoffet.). Protein A-sepharose består av protein A, et bakterieprotein som gjenkjenner Fc regionen av IgG, koblet til sepharose-kuler. I oppgaven ble det benyttet antistoff mot GFP som igjen er koblet til rGH. Med dette kunne rGH-GFP-fordelingen i apikalt og basolateralt medium bestemmes og modifikasjoner studeres.



Figur 3.5: Immunfelling av rGH:GFP-protein. Ønsket protein isoleres ved hjelp av immunfelling med GFP antistoff. Klon som uttrykker protein kan påvises ved hjelp av fluorescensmikroskopi.

Prosedyre for Protein A-Sepharose behandling:

Protein A-Sepharose kulene er suspendert 1:1 i 20 % etanol. BSA brukes til å blokkere uspesifikke bindingssteder på protein-A-sepharose.

- Ønsket volum kuler spinnes ned ved 1000 rpm og supernatanten kastes.
- 1x PBS med 1 % BSA tilsettes opp til 15 mL og settes på kjølerom over natt under kontinuerlig rotering.
- Kulene spinnes ned ved 1000 rpm og supernatanten kastes.
- 1x PBS uten BSA tilsettes til 15 mL og blandes ved å vende på rørene. De to siste trinnene gjentas 2-3 ganger.
- Løsningen spinnes ned ved 1000 rpm og supernatanten kastes.
- Til slutt resuspenderes sepharose-kulene i PBS uten BSA med likt forhold (1:1) og kulene er klare til bruk.

Apikalt (1,0 mL) og basolateralt (1,5 mL) medium tilsettes 60 μ L protein A-Sepharose kuler (1:1), og settes til rotering på kjølerommet. Etter en time spinnes sepharosen ned ved 13000

rpm og supernatanten overføres til nye eppendorfrør. Dette trinnet utføres for å fjerne radioaktive proteiner som binder seg uspesifikt til sepharosen. Rørene med mediumprøver tilsettes deretter 1 μ L antistoff og settes til rotering på kjølerom over natt. Dagen etter tilsettes 60 μ L kuler (1:1) til hvert rør og settes til rotering på kjølerom i 4 timer.

Vasking av immunfelt protein:

Vasketrinn er nødvendige for å bli kvitt andre proteiner som kan være uspesifikt bundet til antistoffet.

- Blandingen spennes ned i 30 sekunder og supernatanten kastes.
- 1 mL IP-vaskeløsning (med 1 % BSA) tilsettes og settes til rotering i 10 minutter på kjølerom. Rørene spennes ned ved 13000 rpm og supernatanten kastes. Trinnet gjentas to ganger.
- 1 mL IP-vaskeløsning (med 1 % BSA) tilsettes og rørene ristes godt og spennes ned ved 13000 rpm. Supernatanten kastes. Trinnet gjentas fire ganger.
- Rørene tilsettes 1 mL IP-vaskeløsning (uten BSA) og ristes godt. Spennes ned ved 13000 rpm og supernatanten kastes. Trinnet gjentas tre ganger.
- 1 mL IP-vaskeløsning (uten BSA) tilsettes og prøvene som senere skal cABC-behandles deles i to like volum. Deretter gjentas foregående trinn en gang.
- Prøvene som ikke skal viderebehandles, tilsettes 20 μ L MilliQ-vann og 10 μ L (4x) XT-prøvebuffer, og fryses ned ved -20°C for senere å bli applisert på SDS-PAGE.

3.8.7 Påvisning av CSPG

Kondroitinase ABC (cABC) behandling anvendes til å påvise CSPG. Ved behandlingen blir glykosidbindinger til C-4 på heksuronsyreresidene i CS- og DS-kjeder enzymatisk kløyd via en eliminasjonsmekanisme, slik at det dannes disakkarider.

Prosedyre for behandling av proteiner med cABC:

Etter IP fjernes supernatanten ved sentrifugering, og tilsettes 1,5 μL 10 x c-ABC-buffer (0,05 M Natriumacetat i 0,05 M Tris pH 8.0, 0,1 % BSA), 1,2 μL cABC enzym (1 enhet/mL) og 15 μL MQ-vann. Blandingen inkuberes ved 37 °C over natt. Dagen etter tilsettes 10 μL (4x) XT-prøvebuffer og analyseres ved SDS-PAGE.

3.8.8 SDS-PAGE

Proteiners vandring i et elektrisk felt bestemmes av molekylenes ladning og størrelse. Ved SDS-PAGE separeres imidlertid ikke proteiner etter sin opprinnelige ladning. Proteinene forbehandles med den anioniske detergenten SDS og Dithiotreitol (DTT). DTT er et reduserende agens som bryter de fleste disulfidbindinger i proteiner. Under behandlingen med SDS denatureres proteinene ved at det dannes karakteristiske komplekser mellom SDS og proteinene. Som hovedregel gjelder det at masseforholdet mellom SDS og et protein i komplekset alltid er det samme under ellers like betingelser. I gjennomsnitt bindes det ca. ett SDS-molekyl pr. to aminosyrer. På grunn av den negative ladningen til SDS-molekylene vil proteinets opprinnelige ladning utgjøre en svært liten andel av kompleksets totale ladning. Ved gelelektroforese er det derfor proteinets størrelse og form, samt porestørrelse i gelen, som avgjør proteinets vandring. Ved å bruke polyakrylamid som støttemedium, kan det lages geler med bestemte porestørrelser ved å variere konsentrasjonen av akrylamid og bis-akrylamid. Molekyler med en viss størrelse vil bli mer eller mindre hindret ved vandring i gelen. Små molekyler vil vandre raskere enn store molekyler, og mobiliteten er omvendt proporsjonal med logaritmen til molekylmassen. Siden alle proteinene er negativt ladet etter SDS-behandlingen, vil alle vandre mot den positive elektroden, som ligger i det nedre bufferreservoaret. Metoden egner seg godt til å skille proteiner etter molekylvekt og også til omtrentlig bestemmelse av proteiners molekylvekt.

Prosedyre for SDS-PAGE:

30 μL proteinløsning blandes med 10 μL 4x XT-prøvebuffer. Prøvene kokes ved 100 °C i 3 minutter, og spinnes deretter ned før de appliseres på en 4-12 % XT SDS-PAGE gel (for ^{35}S -Sulfat og ^{35}S -Cys/met innmerkede prøver) og 4-20 % Tris-HCl SDS-PAGE gel (for ^3H -GlcN innmerkede prøver) for analyse. Som molekylvektstandard brukes 2 μL ^{14}C -Rainbow protein molecular weight marker, sammen med 10 μL XT-prøvebuffer. Prøvene appliseres på gelen, og elektroforesen utføres ved 180 V i ca. 1 time.

Etter elektroforesen legges gelen i en fikserløsning bestående av metanol:vann:eddiksyre i forholdet 1:5:1. Dette gjøres under rolig bevegelse i 30 minutter. Deretter overføres gelen til Amplify™ ved videre bevegelse i 30 minutter. Amplify™ benyttes fordi løsningen forsterker det radioaktive signalet, slik at eksponeringstiden reduseres. Til slutt tørkes gelen ved 60 °C i 1 ½ time, og legges på et tritiumfosfor (for ^3H)-screen eller et lavenergi (for ^{35}S)-screen over natt.

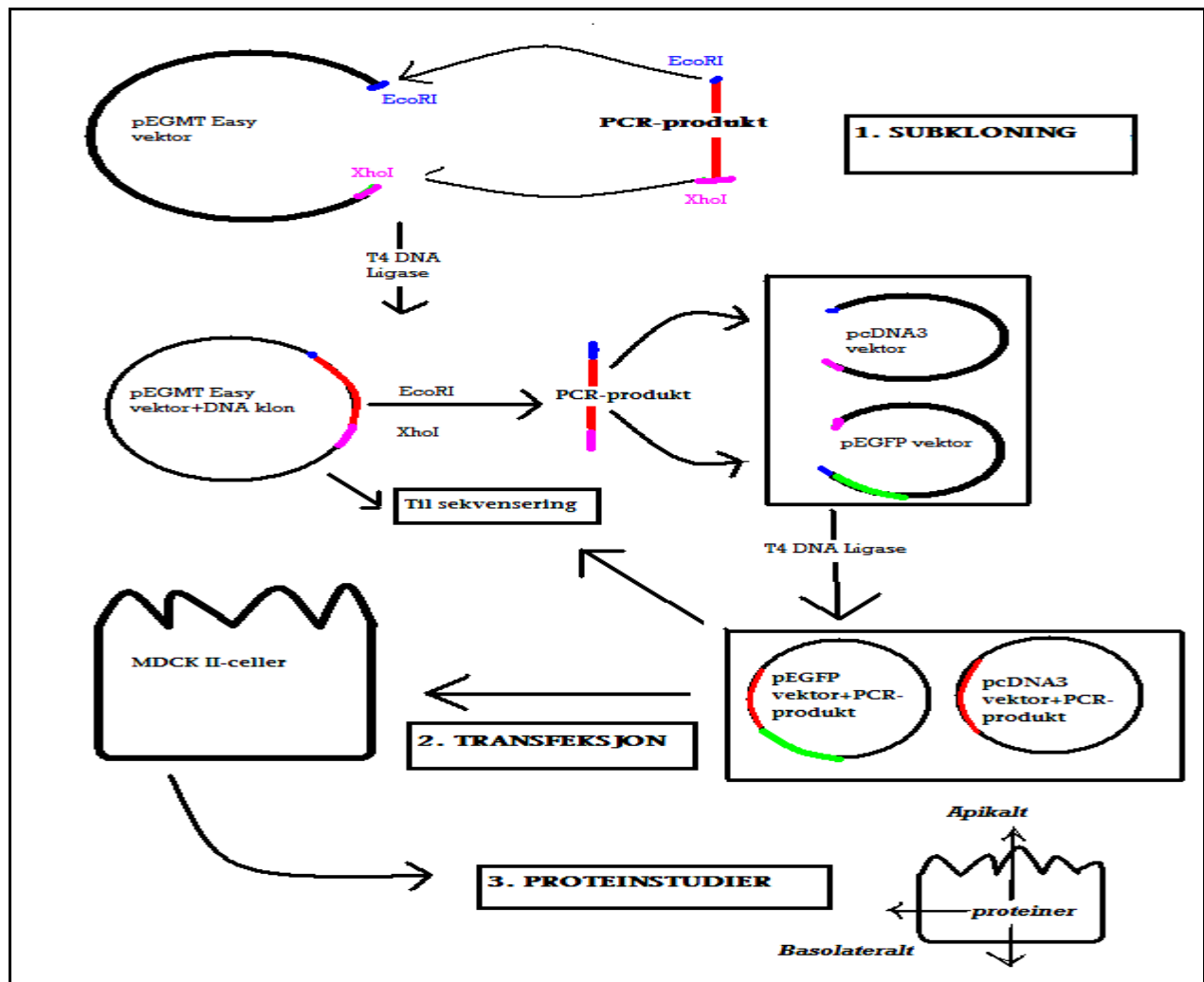
4.0 RESULTATER

Glykandelen av glykoproteiner og proteoglykaner har vært satt i sammenheng med apikal sortering i epitelceller (Kondor-Koch *et al.*, 1985; Scheiffele *et al.*, 1995; Kolset *et al.*, 1999), uten at de molekylære mekanismene for slik sortering har blitt identifisert. Formålet med oppgaven har vært å produsere stabilt transfekterte cellelinjer som uttrykker varianter av et rekombinant modellprotein (rGH; rat growth hormone - rotte veksthormon), hvor dette proteinet i de ulike celleklonene har variasjon i antall og type glykosylerings seter.

Glykosylerings seter er satt inn i form av tripeptidet -Asn-X-Ser/Thr- for N-glykaner og/eller dipeptidet -Ser-Gly- (Bourdon *et al.*, 1987) for glukosaminoglykaner (GAG). I tillegg har de fleste rGH-variantene som er produsert et C-terminalt grønt fluorescerende protein (GFP; "green fluorescent protein"), som muliggjør både immunpresipitering (IP) med anti-GFP og fluorescensmikroskopi for studier av uttrykk og lokalisering. Studien er utført i epitelcellelinjen MDCK II, som er en velstudert cellelinje for cellulær polaritet (Rodriguez-Boulant *et al.*, 2004).

Det eksperimentelle arbeidet med oppgaven kan deles inn i tre hoveddeler (se også figur 4.1):

1. Molekylærbiologisk del. Produksjon av åtte rGH-konstrukter.
2. Transfeksjon av vektorkonstrukter inn i MDCK II-epitelceller.
3. Karakterisering av uttrykket av varianter av modellprotein rGH i MDCK II-celler og polarisert sortering i epitelceller dyrket på filter.



Figur 4.1: Fremgangsmåte for tillaging og transfeksjon av MDCK-celler for studier av rekombinante varianter av rotte veksthormon. Ligering av rGH-konstrukt inn i klonings- og ekspresjonsvektor, kutting av vektorer ved hjelp av restriksjonsenzymmer, sekvensering, transfeksjon, polarisert celledyrking og studier av proteinuttrykk og sortering.

4.1 Molekylærbiologiske metoder

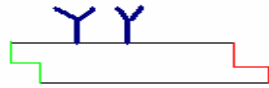
De molekylærbiologiske metodene bestod av polymerase kjedereaksjon (PCR; polymerase chain reaction), ligering, restriksjonskutting og sekvensering. I denne oppgaven ble det laget åtte DNA-konstrukt.

De fire første konstruktene ble subklonet inn i pcDNA3-ekspressjonsvektor

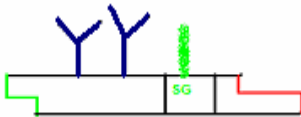
1. rGH = **ST5**



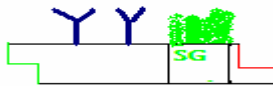
2. rGH med to seter for N-glykaner = **ST4**



3. rGH med to seter for N-glykaner og to seter for GAGs = **ST6**



4. rGH med to seter for N-glykaner og åtte seter for GAGs C-terminalt = **ST7**



De fire neste konstruktene ble subklonet inn i pEGFP N3-ekspressjonsvektor

5. rGH = **ST5**



6. rGH med to seter for N-glykaner = **ST4**



7. rGH med to seter for N-glykaner og åtte seter for GAGs C-terminalt = **ST6**



8. rGH med åtte seter for GAGs C-terminalt = **ST7**



Figur 4.2: Åtte DNA-konstruktur ble subklonet. Y=N-glykaner, mørk grønn ende=GFP, SG=serglycin seter (lys grønn).

4.1.1 PCR amplifisering av rGH konstrukter

De ulike rGH-konstruktene ble amplifisert ved hjelp av PCR-metoden. To forskjellige restriksjonskuttseter (*Eco* RI og *Xho* I) i endene av PCR-produktet ble valgt for å redusere muligheten for religering av vektor, ukorrekt innsetting av konstrukt inn i vektor eller vektor-vektor/innskudd-innskudd liggering. Expand DNA-polymerase og Vent DNA-polymerase ble benyttet under PCR-reaksjonen. Ved bruk av Expand vil produktet få satt på ekstra A-residier i enden, og PCR-produktet kan liggeres inn i pGEM®-T Easy vektor (figur 2.1). Denne vektoren inneholder et overheng av T residier i polylinkeren, og det blir dermed lettere å ligere inn innskuddet som har et overheng med ekstra A-residier. Deretter ble PCR-produktene ligert inn i ekspresjonsvektoren.

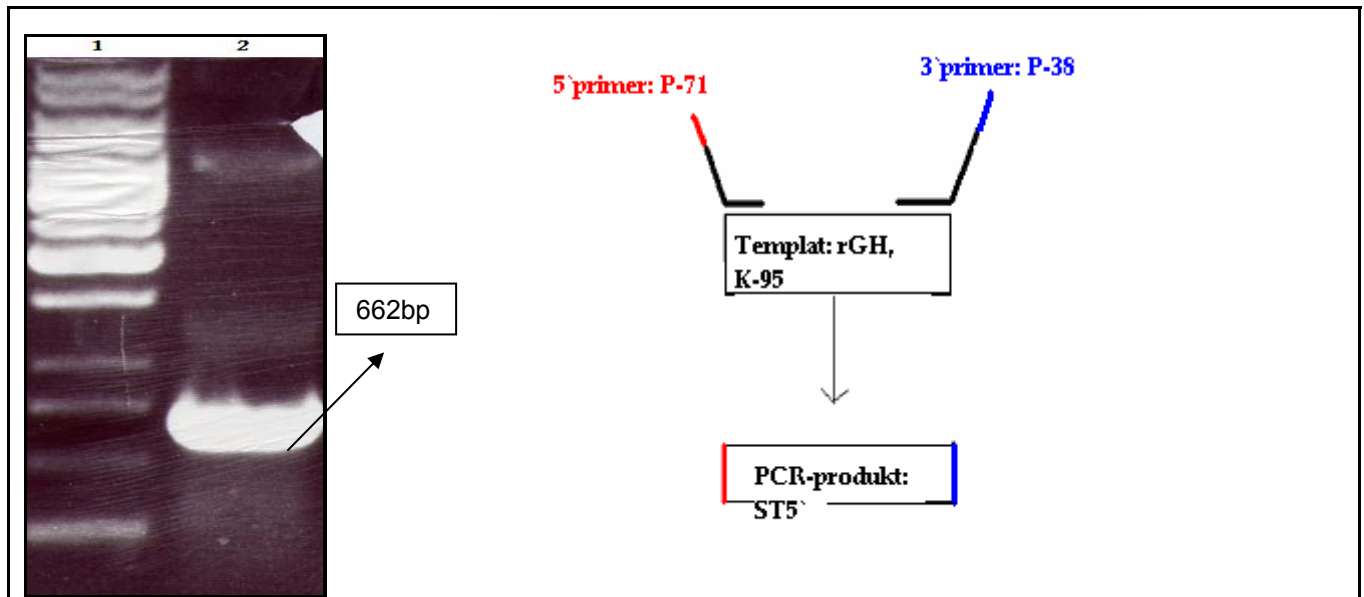
Vent DNA-polymerase ble benyttet for et konstrukt som ble mutert med to Ser-Gly seter. I denne prosessen ble to PCR-reaksjoner satt opp der PCR-produktet fra første runde ble brukt som primer i neste. Vent DNA-polymerase ble benyttet i den første PCR-reaksjonen og Expand DNA-polymerase i den andre. Vent DNA-polymerase har 3`-5` eksonukleaseaktivitet, men setter ikke på ekstra A residier.

Fire PCR-produkter (figur 4.2) ble ligert inn i pcDNA3-ekspresjonsvektoren (figur 2.2), men på grunn av infeksjon i cellekulturen ved første runde transfeksjon av MDCK II-celler, ble fire nye (figur 4.2), og liknende, PCR-produkter amplifisert og ligert inn i pEGFP N3-ekspresjonsvektor (figur 2.3). Denne vektoren har et vedheng av GFP som gir det uttrykte proteinet fluorescens. Dette gjør det enklere å påvise positive cellekloner etter transfeksjon, ved hjelp av konfokal fluorescensmikroskopi av levende celler. Direkte deteksjon av positive kloner underveis er meget tidsbesparende i forhold til molekylærbiologiske (RT-PCR) eller biokjemiske (immunpresipitering eller Western-blotting) teknikker.

Ved første forsøk på kutting av PCR-produktene ved de to restriksjonssetene, ble båndet med forventet størrelse i agarosegelen for svakt til at det lot seg rense fra gelen. Det ble nødvendig med optimalisering av kuttetiden og mengde plasmid, buffer, BSA og restriksjonsenzym.

Alle templat og primere ble utlevert ferdiglaget (For sekvenser se kapittel 2.1).

PCR-produkt ST5`: Som templat ble genet for rGH benyttet, og primere inneholdende *Eco* RI (5`-primer)- og *Xho* I (3`-primer)- seter (figur 4.3).

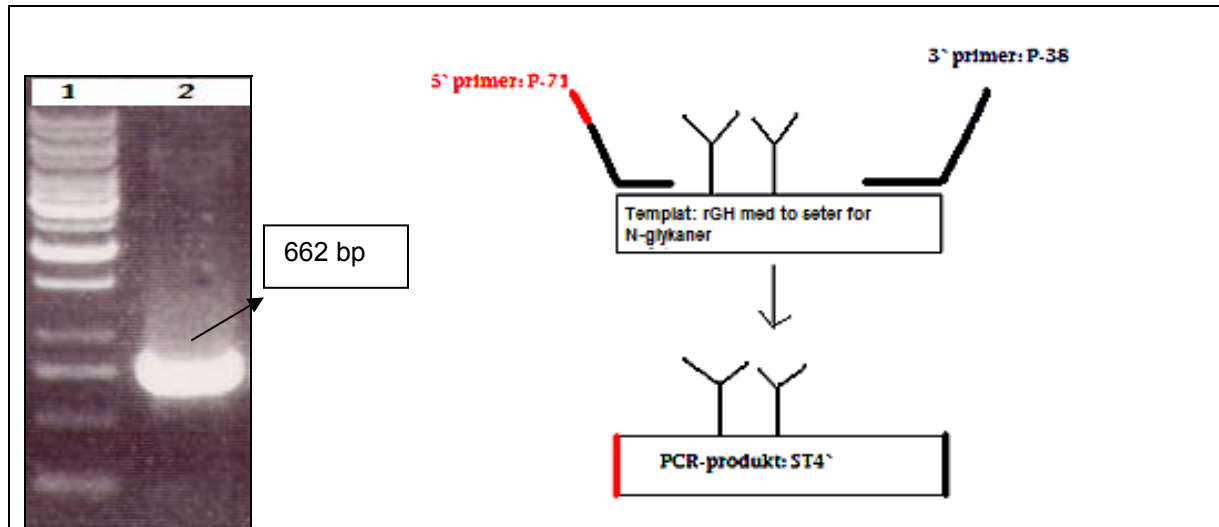


Figur 4.3: PCR-produkt av ST5`. rGH-mutant amplifisert ved hjelp av PCR og analysert på agarosegel. Brønn 1: 1 kb DNA-standard. Brønn 2: ST5` (662 bp). Røde ender viser restriksjonsseter for *Eco* RI. Blå ender viser restriksjonsseter for *Xho* I.

Aminosyresekvensen av PCR-produktet (ST5`):

MAADSQTPWLLTFSLLCLLWPQEAGALPAMPLSSLFANAVLRAQHLHQLAADTYKEFERAYI
 PEGQRYSIQNAQA AFCFSETIPAPTGKEEAQQRTDMELLRFSLLLIQSWLGPVQFLSRIFTNS
 LMFGTSDRVYEKLDLEEGIQALMQELEDGSPRIGQILKQTYDKFDANMRSDDALLKNYGLL
 SCFKKDLHKAETYLRVMKCRRFAESSCAF

PCR-produkt ST4`: Som templat ble genet for rGH modifisert med to seter for N-glykaner benyttet (K-115), og primere inneholdende *Eco* RI (5`-primer) og *Xho* I (3`-primer) seter (figur 4.4).



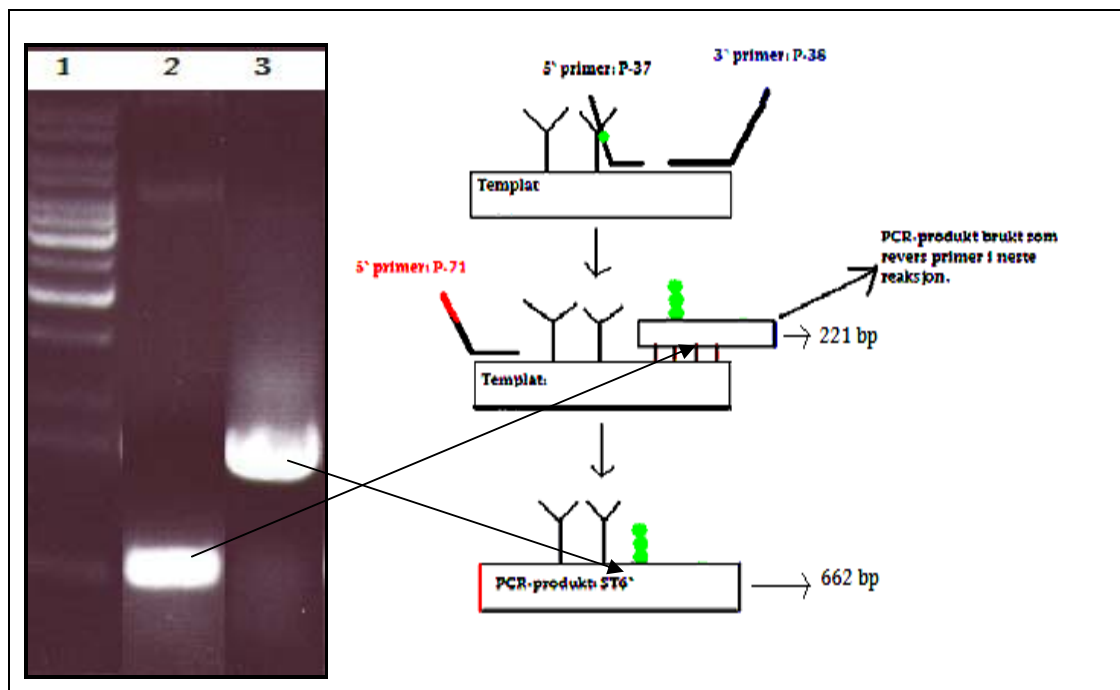
Figur 4.4: PCR-produkt av ST4`. rGH-mutant amplifisert ved hjelp av PCR og analysert på en agarosegel. Brønn 1: 1 kb DNA-standard. Brønn 2: ST4` (662 bp). Røde ender viser restriksjonsseter for *Eco* RI. Blå ender viser restriksjonsseter for *Xho* I. Y = N-glykaner.

Aminosyresekvensen av PCR-produktet (ST4`):

MAADSQTPWLLTFSLLCLLWPQEAGALPAMPLSSLFANASLRAQHLHQLAADTYKEFER
 AYIPEGQRYSIQNAQA AFCFSETIPAPTGKEEAQQRTDMELLRFSLLLIQSWLGPVQFLS
 RNFITNSLMFGTSDRVYEKLDLEEGIQALMQELEDGSPRIGQILKQTYDKFDANMRSDD
 ALLKNYGLLSCFKDLHKAETYL RVMKCRRFAESSCAF

N-glykansetene er merket med rødt og understreket.

PCR-produkt ST6`: PCR-produktet ble laget ved hjelp av to PCR-reaksjoner (figur 4.5). I begge reaksjonene ble genet for rGH modifisert med to seter for N-glykaner brukt som templat (K-115). 5`-primer inneholdt to Ser-Gly seter og 3`-primer inneholder *Xho* I kuttsete. I første PCR-runde ble det dannet et PCR-produkt som inneholdt to Ser-Gly seter og *Xho* I i C-terminal ende. Dette produktet ble deretter brukt som 3`-primer i neste PCR-reaksjon. 5`-primer inneholdt kuttsetet for *Eco* RI. Agarosegelbildet av PCR-produkt etter første og andre PCR, er vist i figur 4.5.



Figur 4.5: PCR-produkt av ST6`. rGH-mutant amplifisert ved hjelp av PCR og analysert på agarosegel. Brønn 1: 1 kb DNA-standard. Brønn 2: PCR-produkt (221 bp) som ble brukt som revers primer i neste PCR. Brønn 3: ST6` (662 bp). Røde ender viser restriksjonsseter for *Eco* RI. Blå ender viser restriksjonsseter for *Xho* I. Y = N-glykaner. Grønne sirkler = GAG-kjeder.

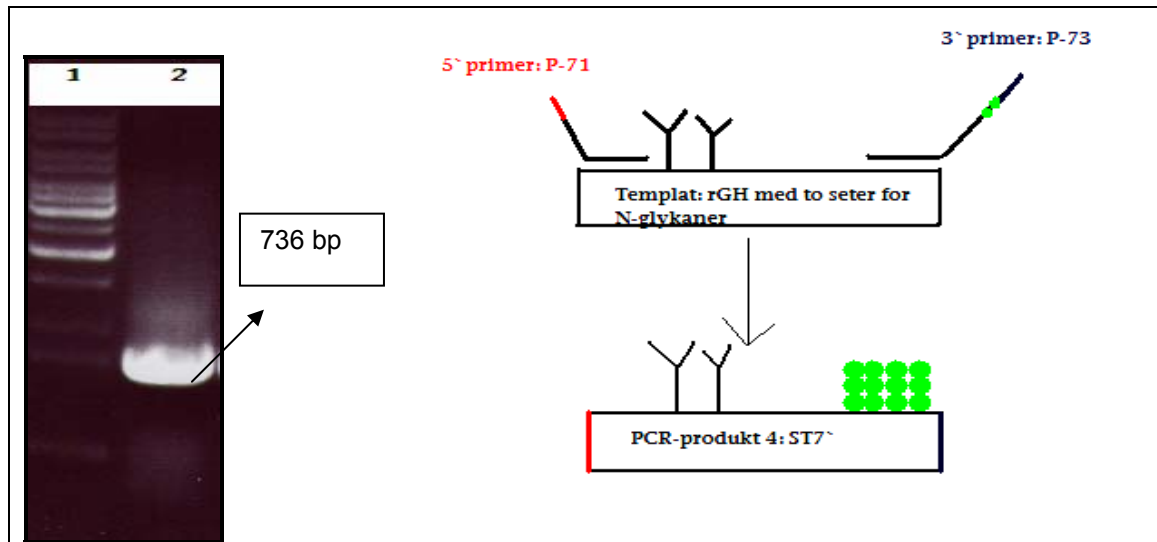
DNA-sekvensen av PCR-produktet som ble brukt som 3`-primer i neste reaksjon:
GCTGGAAGACGGCAGCCCCCGTATTGGGCAGATCCTCAAGCAAACCTATGAC
AAGTTTGACGCCAACATGCGCAGCGATGACGCTCTGCTCAAAAACCTATGGGC
TGCTCTCCTGCTTCAAGAAGGACCTGCACAAGGCAGAGACCTACCTGCGGGT
CATGAAGTGTGCGCCGCTTTGCGGAAAGCAGCTGTGCTTTCTAGTCTCGAGAA
CGATTGCGAATTC

Aminosyresekvensen av PCR-produktet (ST6`):

MAADSQTPWLLTFSLCLLWPQEAGALPAMPLSSLFANASLRAQHLHQLAADTY
KEFERAYIPEGQRYSIQNAQA AFCFSETIPAPTGKEEAQQRTDMELLRFSLLLIQS
WLGPVQFLSRNFTNSLMFGTSDRVYEKLDLEEGIQALMQELEDGSGSGGQILK
QTYDKFDANMRSDDALLKNYGLLSCFKDLHKAETYLRVMKCRRFAESSCAF

N-glykansetene er merket med rødt og understreket. Ser-Gly setene er merket med blått og understreket.

PCR-produkt ST7`: Som templat ble genet for rGH modifisert med to seter for N-glykaner benyttet (K-115), og primere inneholdende *Eco* RI (5`-primer) og *Xho* I (3`-primer) seter (figur 4.6). Revers primer inneholdt også et område med 8 Ser-Gly seter (et område fra humant serglycin).



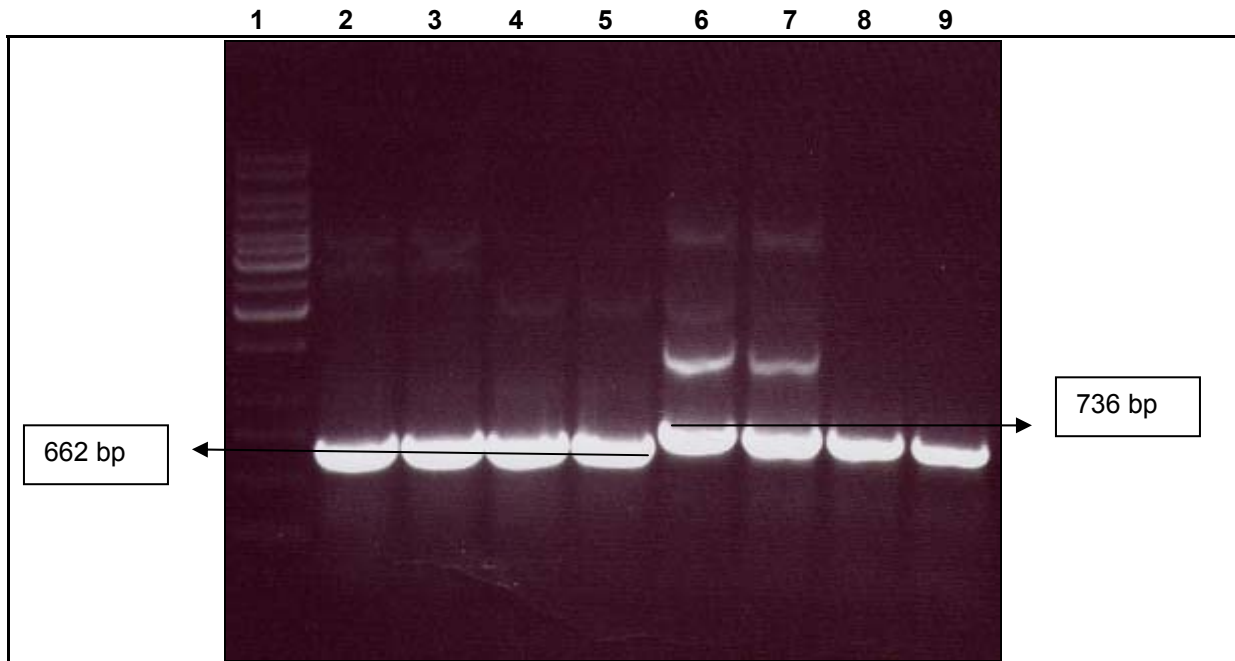
Figur 4.6: PCR-produkt av ST7. rGH-mutant ble amplifisert ved hjelp av PCR og analysert på agarosegel. Brønn 1: 1 kb DNA-standard. Brønn 2: ST7 (736 bp). Røde ender viser restriksjonssteder for Eco RI. Blå ender viser restriksjonssteder for Xho I. Y = N-glykaner. Grønne sirkler = GAG-kjeder.

Aminosyresekvensen av PCR-produktet (ST7):

MAADSQTPWLLTFSLLCLLWPQEAGALPAMPLSSLFANASLRAQHHLHQLAADT
 YKEFERAYIPEGQRYSIQNAQA AFCFSETIPAPTGKEEAQQRTDMELLRFSLLLI
 QSWLGPVQFLSRNFTNSLMFGTSDRVYEKLDLEEGIQALMQELEDGSPRIGQI
 LKQTYDKFDANMRSDDALLKNYGLLSCFKKDLHKAETYLRVMKCRRFAESSCA
 FEDYSGSGFGSGSGSGSGSGFLTE

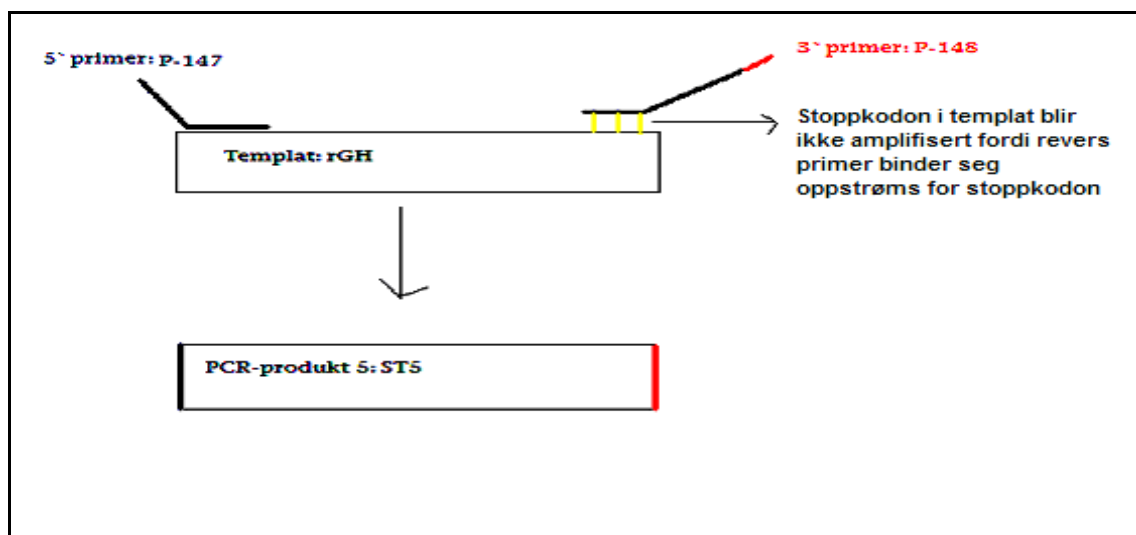
N-glykaner er merket med rødt og understreket. Ser-Gly setene er merket med blått og understreket.

De neste fire PCR-produktene mangler stoppkodon og ved replikasjon i en GFP N3-vektor blir det dermed dannet et mRNA som inneholder PCR-produkt med et C-terminalt GFP. Agarosegelbildet for PCR-produktene er vist i figur 4.7.



Figur 4.7: PCR-produkt av ST4-ST7. rGH-mutanter ble amplifisert ved hjelp av PCR og analysert på agarosegel. Brønn 1: 1 kb DNA-standard. Brønn 2 og 3: ST4 (662 bp). Brønn 4 og 5: ST5 (662 bp). Brønn 6 og 7: ST6 (736 bp). Brønn 8 og 9: ST7 (736 bp).

PCR-produkt ST5: Som templat ble genet for rGH benyttet (K-95), og primere inneholdende *Eco* RI (3'-primer) og *Xho* I (5'-primer) seter (figur 4.8). Merk at 3'-primer bindes til templat oppstrøms for stoppkodon. Agarosegelbildet er vist i figur 4.7.



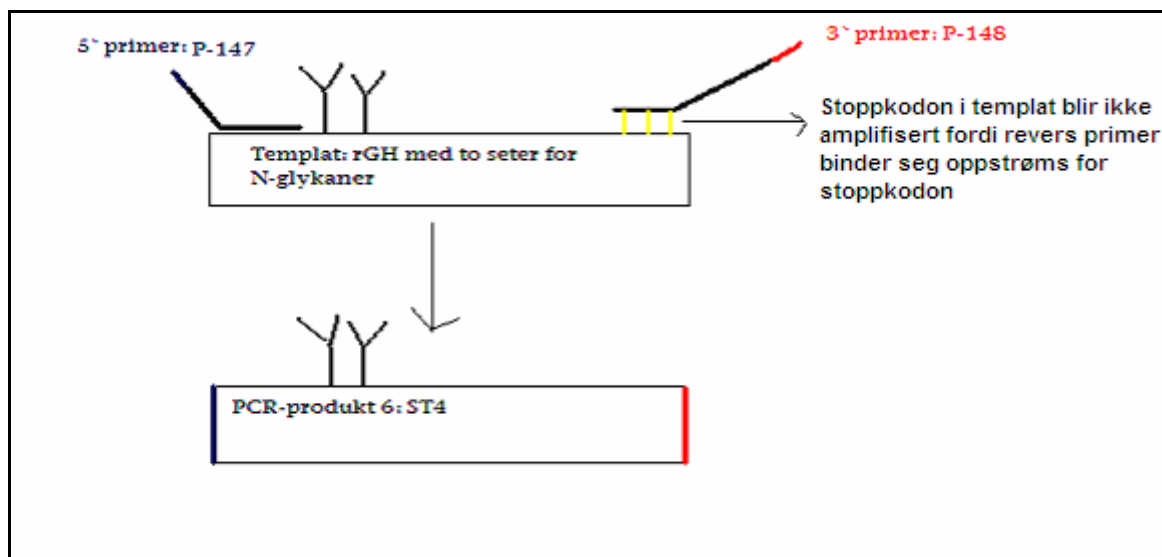
Figur 4.8: PCR-produkt ST5. Røde ender viser restriksjonsseter for *Eco* RI. Blå ender viser restriksjonsseter for *Xho* I.

Aminosyresekvens av PCR-produktet (ST5):

MAADSQTPWLLTFSLLCLLWPQEAGALPAMPLSSLFANAVLRAQHLHQLAADTYKE
 FERAYIPEGQRYSIQNAQA AFCFSETIPAPTGKEEAQQRTDMELLRFSLLIQSWLG
 PVQFLSRIFTNSLMFGTSDRVYEKLDLEEGIQALMQELEDGSPRIGQILKQTYDKF
 DANMRSDDALLKNYGLLSCFKKDLHKAETYLRVMKCRRFAESSCAFANSAVDGTA
 GPGSIATMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICT
 TGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDG
 NYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGI
 KVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDH
 MVLLEFVTAAGITLGMDELYK

GFP-proteinet er merket med grønt.

PCR-produkt ST4: Som templat ble genet for rGH modifisert med to seter for N-glykaner benyttet (K-115), og primere inneholdende *Eco* RI (3'-primer) og *Xho* I (5'-primer) seter (figur 4.9). Merk at 3'-primer bindes til templat oppstrøms for stoppkodon. Agarosegelbildet er vist i figur 4.7.



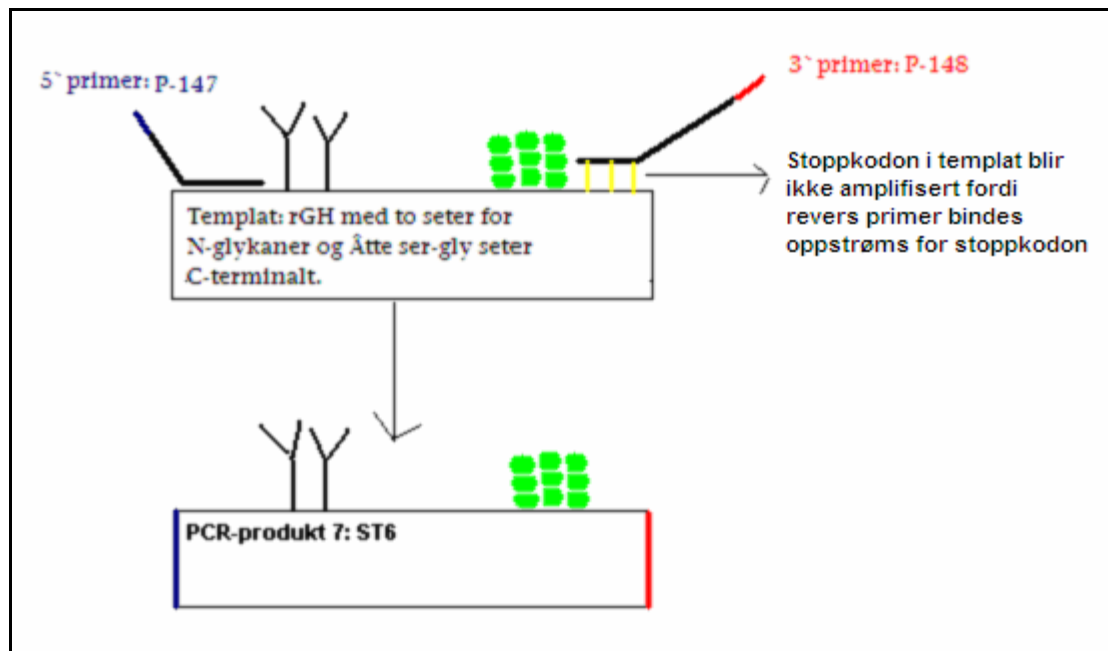
Figur 4.9: PCR-produkt ST4. Røde ender viser restriksjonsseter for *Eco* RI. Blå ender viser restriksjonsseter for *Xho* I. Y = N-glykaner.

Aminosyresekvensen av PCR-produktet (ST4):

MAADSQTPWLLTFSLLCLLWPQEAGALPAMPLSSLFANASLRAQHLHQLAADTYKE
FERAYIPEGQRYSIQNAQA AFCFSETIPAPTGKEEAQQRTDMELLRFSLLIQSWLG
PVQFLSRNFTNSLMFGTSDRVYEKLDLEEGIQALMQELEDGSPRIGQILKQTYDKF
DANMRSDDALLKNYGLLSCFKKDLHKAETYLRVMKCRRFAESSCAFANSAVDGTA
GPGSIATMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICT
TGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDG
NYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVIYIMADKQKNGI
KVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHVLTQSALS KDPNEKRDH
MVLLEFVTAAGITLGMDELYK

N-glykanene er merket med rødt og understreket. GFP-proteinet er merket med grønt.

PCR-produkt ST6: Som templat (ST7` i pGEM T-easy vektor) ble genet for rGH modifisert med to seter for N-glykaner og åtte Ser-Gly seter benyttet (et område fra humant serglycin), og primere inneholdende *Eco* RI (3`-primer) og *Xho* I (5`-primer) seter (figur 4.10). Merk at 3`-primer bindes til templat oppstrøms for stoppkodon. Agarosegel bildet er vist i figur 4.7.



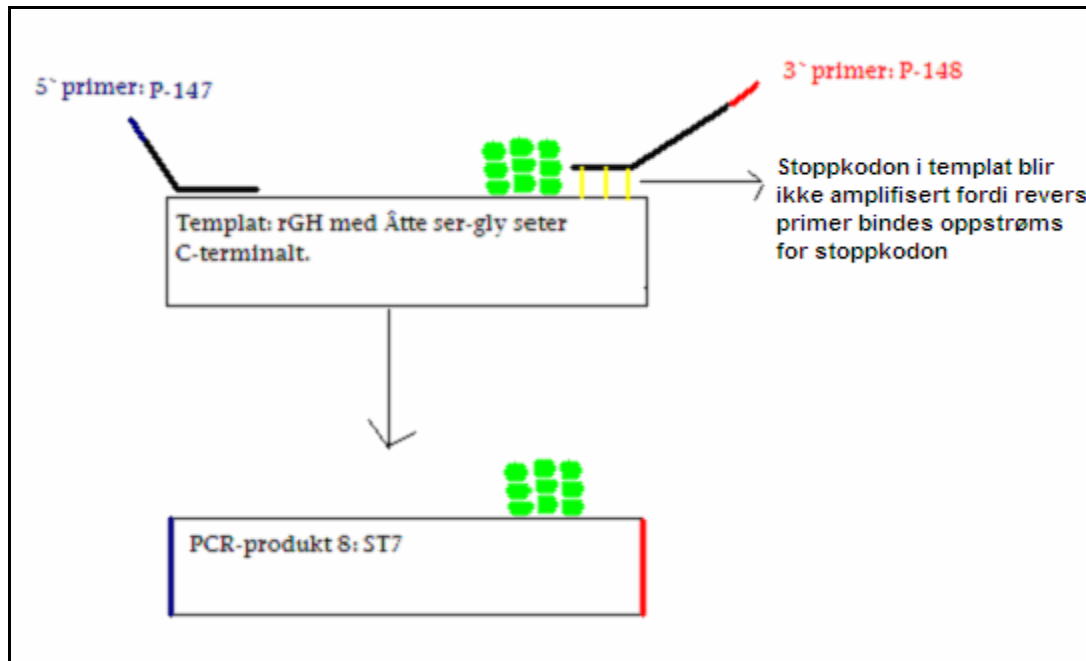
Figur 4.10: PCR-produkt ST6. Røde ender viser restriksjonsseter for *Eco RI*. Blå ender viser restriksjonsseter for *Xho I*. Y = N-glykaner. Grønne sirkler = GAGs.

Aminosyresekvensen av PCR-produktet (ST6):

MAADSQTPWLLTFSLCCLLWPQEAGALPAMPLSSLFANASLRAQHLHQLAADTYKE
 FERAYIPEGQRYSIQNAQA AFCFSETIPAPTGKEEAQQRTDMELLRFSLLIQSWLG
 PVQFLSRNFTNSLMFGTSDRVYEKLDLEEGIQALMQELEDGSPRIGQILKQTYDKF
 DANMRSDDALLKNYGLLSCFKKDLHKAETYL RVMKCRRFAESSCAFEDYSGSGFG
 SGSGSGSGSGSGFLTEANSAVDGTAGPGSIATMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVN
 GHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMK
 QHDFFSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNI
 LGHKLEYNYN SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDG SVQLADHYQQNTPIGDGP
 VLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK

N-glykanene er merket med rødt og understreket. Ser-Gly setene er merket med blått og understreket. GFP-proteinet er merket med grønt.

PCR-produkt ST7: Som templat (K-96) ble genet for rGH modifisert med åtte Ser-Gly seter benyttet (et område fra humant serglycin), og primere inneholdende *Eco* RI (3'-primer) og *Xho* I (5'-primer) seter (figur 4.11). Merk at 3'-primer bindes til templat oppstrøms for stoppkodon. Agarosegel bildet er vist i figur 4.7.



Figur 4.11: PCR-produkt ST7. Røde ender viser restriksjonsseter for *Eco* RI. Blå ender viser restriksjonsseter for *Xho* I. Grønne sirkler = GAGs.

Aminosyresekvensen av PCR-produktet (ST7):

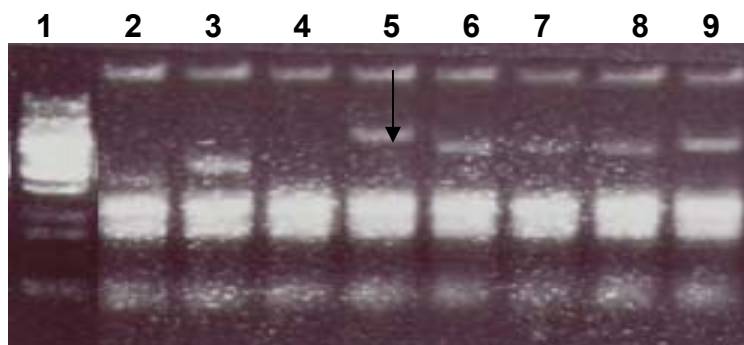
MAADSQTPWLLTFSLCCLLWPQEAGALPAMPLSSLFANAVLRAQHLHQLAADTYKE
 FERAYIPEGQRYSIQNAQA AFCFSETIPAPTGKEEAQQRTDMELLRFSLLLIQSWLG
 PVQFLSRIFTNSLMFGTSDRVYEKLDLEEGIQALMQELEDGSPRIGQILKQTYDKF
 DANMRSDDALLKNYGLLSCFKKDLHKAETYLRVMKCRRFAESSCAFEDYSGSGFG
SGSGSGSGSGSGFLTEANSAVDGTAGPGSIATMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVN
 GHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMK
 QHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNI
 LGHKLEYNYN SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGP
 VLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK

Ser-Gly setene er merket med blått og understreket. GFP-proteinet er merket med grønt.

PCR-produktene ble kuttet ut fra agarosegelene og rensset slik det er beskrevet i metoder 3.2.3. Deretter ble produktene ligert inn i pGEM®-T Easy kloningsvektor (metoder 3.5), transformert i kompetente *E.coli* DH5 α -celler og strøket ut på hver sin agarskål (tilsatt ampisillin).

4.1.2 Identifisering av positive transformanter med pGEM-T Easy og innskudd

10 kolonier ble plukket av hver vekstskål med mulige transformanter, og dyrket opp i 5 mL LB-medium (tilsatt ampisillin) over natt. Påvisning av plasmid med innskudd ble utført ved "kvikksjekk"-metoden (metoder 3.2.1). Metoden viser supercoilet plasmid med eller uten innskudd som sirkulært og supercoilet. Plasmid med innskudd har større molekylvekt og vil vandre kortere i en agarosegel enn plasmid uten innskudd. Resultater etter "kvikksjekk" av plasmid med/uten innskudd (ST5) er vist i figur 4.12.

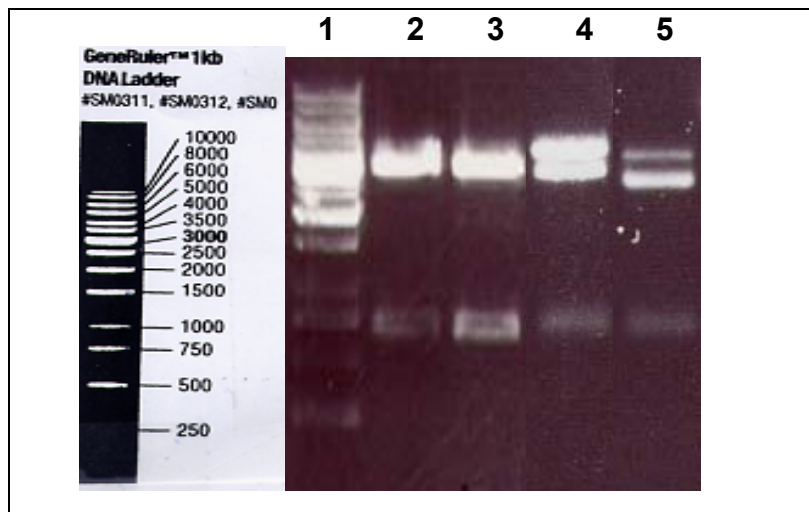


Figur 4.12: "Kvikksjekk"-agarosegel av pGEM T-Easy vektor med/uten DNA-innskudd. Plasmider med mulig DNA-innskudd fra overnatt-kulturer etter behandling med fenol og kloroform. Vannfasen som inneholder nukleinsyrer, blir satt på agarosegelen. Brønn 1: 1 kb DNA-standard. Brønn 2-9: ST5 transformert i *E. coli*.

Prøven i brønn 5 har vandret kortere i gelen og er dermed større enn de andre DNA-fragmentene. Dette båndet ble kuttet ut av gelen, rensset og preparert ved hjelp av mini/maxiprep. DNA-innskuddet ble isolert fra kloningsvektor ved hjelp av restriksjonskutting.

4.1.3 Restriksjonsanalyse av rGH-konstrukt i pEGEM T-Easy vektor

pEGEM T-Easy plasmider med PCR-innskudd ble analysert ved hjelp av enzymene *Eco* RI og *Xho* I. Etter restriksjonskutting ble plasmidene analysert ved hjelp av agarosegelelektroforese som beskrevet i metoder 3.2.5. En vellykket ligering vises ved at DNA-innskuddet blir kuttet ut av vektor ved restriksjonssetene brukt i ligeringen (figur 4.13). DNA-konstruktene ST4-ST7, ble ligert direkte inn i pEGFP N3-ekspressjonsvektor.

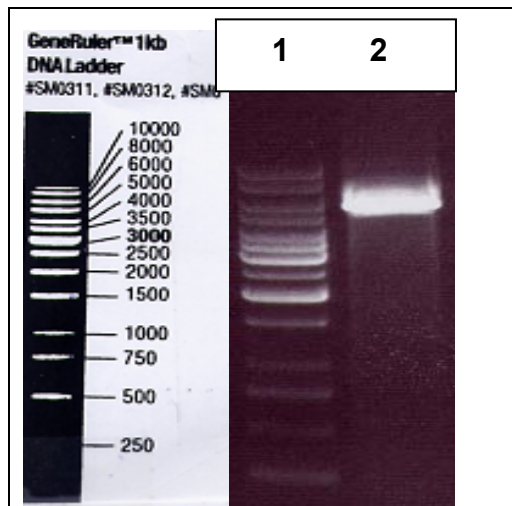


Figur 4.13: Restriksjonsanalyse av DNA-konstrukt 1-4 i pEGEM T-Easy vektor. Innskudd er kuttet ut av vektor med *Eco* RI og *Xho* I. Vektorbåndet ligger rundt 3000 bp. Brønn 1: 1 kb DNA-standard. Brønn 2: ST4'. Brønn 3: ST5'. Brønn 4: ST6'. Brønn 5: ST7'.

Figur 4.13 viser restriksjonskutting med *Eco* RI og *Xho* I av fire ulike rGH-mutanter i pEGEM T-Easy vektor. Bildene viser to fragmenter; et fragment som ligger rundt 3000 bp som tilsvarer størrelsen på pEGEM T-Easy vektor, og et mindre fragment som tilsvarer det ønskede PCR-produktet. Sistnevnte ble kuttet ut av agarosegelen og rensset (metoder 3.2.3).

4.1.4 Restriksjonskutting av pEGFP-N3 vektor med *Xho* I og *Eco* RI

pEGFP-N3 vektoren ble kuttet med *Xho*I og *Eco* RI restriksjonsenzymmer og analysert på agarosegel som vist i figur 4.14.



Figur 4.14. Restriksjonskuttet pEGFP-N3 vektor. Brønn 1: 1 kb DNA-standard. Brønn 2: *Xho* I og *Eco* RI kuttet pEGFP-N3 vektor.

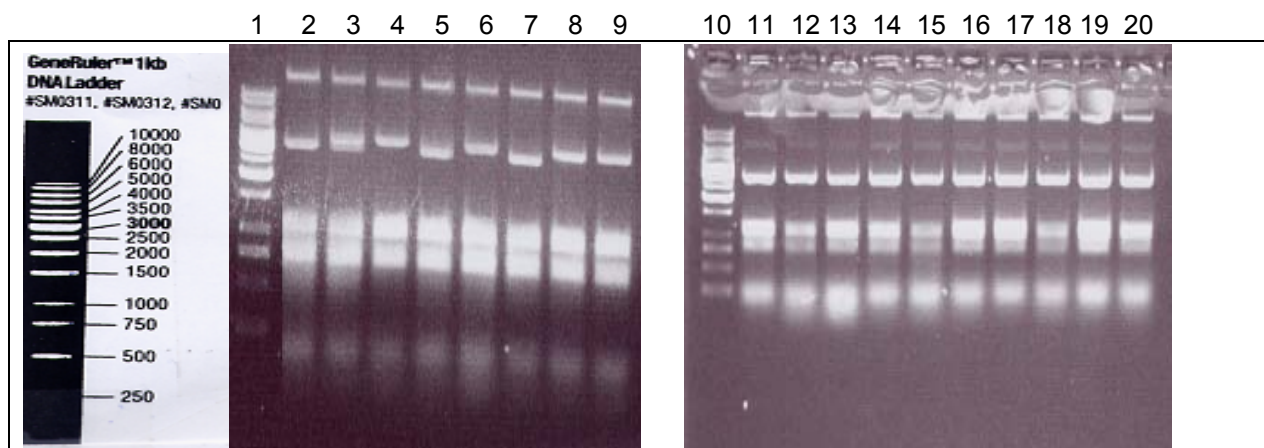
Da pEGFP-N3 vektor ble kuttet med restriksjonsenzymmer, resulterte det i to fragmenter; et lite fragment som ikke er synlig på figuren av agarosegelen, og et stort fragment på rundt 5000 bp, som er synlig (figur 4.14). Det største fragmentet ble kuttet ut av agarosegelen med en skalpell og renses ved hjelp av "QIAEX II Agarose Gel Extraction kit" (metoder 3.2.3).

pcDNA3-vektor ble utlevert kuttet med *Eco* RI og *Xho* I.

PCR-produktene fra DNA-konstrukt 1-4 (ST4', ST5', ST6' og ST7') ble ligert inn i pcDNA3-vektor, og PCR-produktene fra DNA-konstrukt 5-8 (ST4, ST5, ST6 og ST7) ble ligert inn i pEGFP N3-vektor. Ligeringsblandingen ble transformert inn i kompetente *E.coli* DH5 α -celler og strøket ut på vekstskåler med ampicillin (pcDNA3-vektor) og kanamycin (pEGFP N3-vektor).

4.1.5 Identifisering av positive transformanter med pEGFP-N3/pcDNA3 vektor og innskudd

10 kolonier ble plukket fra vekstskålene med mulige transformanter, dyrket i 5 mL LB-medium med ampicillin/kanamycin over natt. Påvisning av plasmid med innskudd ble utført ved hjelp av "kvikksjekk"-metoden, og resultatene er vist i figur 4.15.

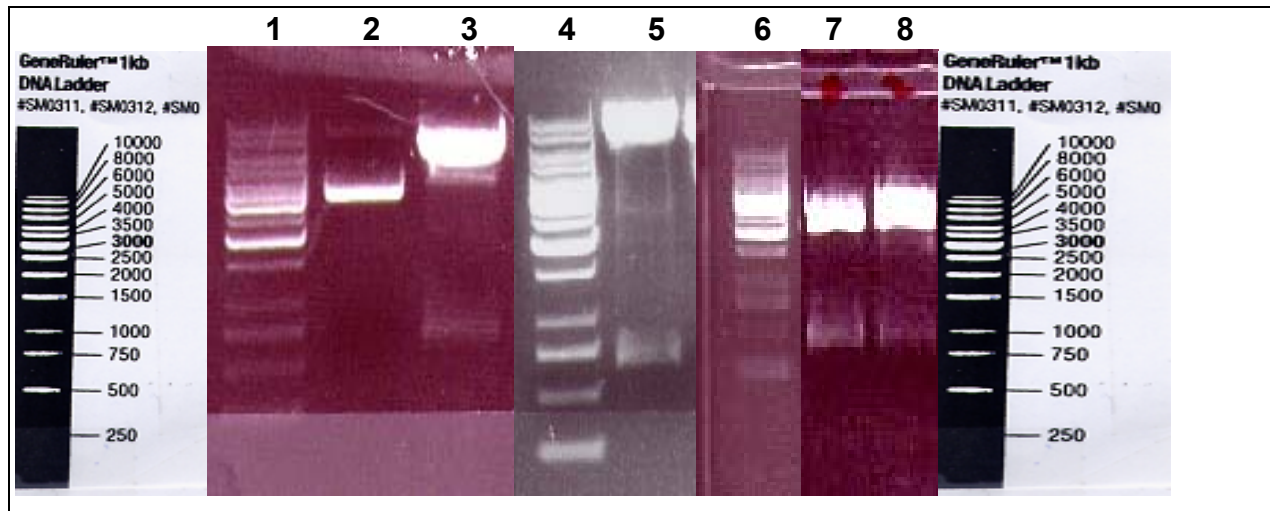


Figur 4.15: Kvikksjekk"-agarosegel av pcDNA3- og pEGFP-N3 vektor med/uten innskudd. Figurene viser plasmid med mulig DNA-innskudd etter "kvikksjekk"-analyse på en agarosegel. Brønn 1: 1 kb DNA-standard. Brønn 2-9: Transformanter i pEGFP N3-vektor. Her ligger transformantene ved en størrelse rundt 5000 bp. Brønn 11: 1 kb DNA-standard. Brønn 12-20: Transformanter i pcDNA3-vektor. Transformantene ligger ved en størrelse rundt 4000 bp.

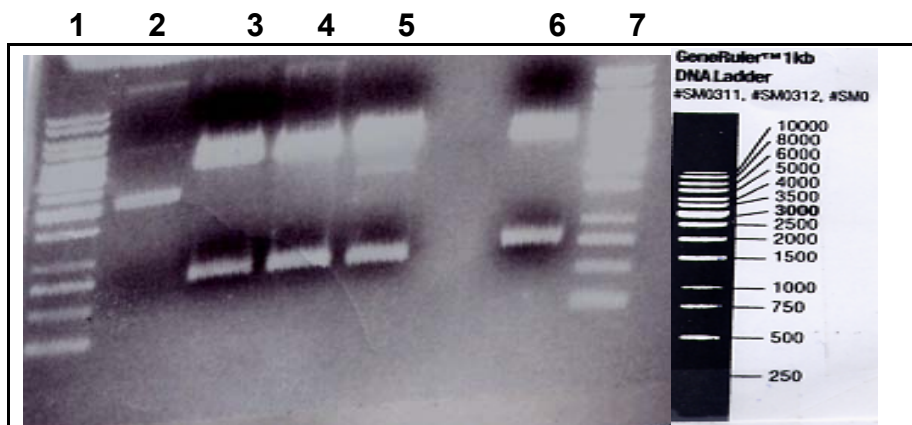
Bakteriekoloniene i brønn 4, 6, 8 og 9 hadde vandret kortere i gelen og plasmidene inneholdt muligens innskudd. Bakteriekoloniene i brønn 11-20 hadde vandret like langt og noen vilkårlige ble valgt ut, preparert og kontroll-kuttet med *Eco* RI og *Xho* I.

4.1.6 Restriksjonsanalyse av rGH-varianter i pEGFP N3-/pcDNA3-vektor

Siste trinn i subkloningsprosessen var å påvise riktig størrelse av DNA-konstruktene og dermed også at de er blitt ligert inn i ekspresjonsvektoren. Resultatene er vist i figur 4.16 og 4.17.



Figur 4.16: Restriksjonsanalyse av DNA-konstrukt 1-4 kuttet ut fra pcDNA3-vektor med *Eco* RI og *Xho* I. Brønn 1: 1 kb standard. Brønn 2: Ukuttet vektor. Brønn 3: ST4. Brønn 4: 1 kb DNA-standard. Brønn 5: ST5. Brønn 6: 1 kb DNA-standard. Brønn 7: ST6. Brønn 8: ST7.



Figur 4.17: Restriksjonsanalyse av DNA-konstrukt i pEGFP N3-vektor. DNA-innskudd ble kuttet ut av pEGFP-N3 vektor med restriksjonsenzymene *Eco* RI og *Xho* I. Brønn 1: 1 kb DNA-standard. Brønn 2: Ukuttet plasmid med ST5 innskudd. Brønn 3: ST4. Brønn 4: ST5. Brønn 5: ST6. Brønn 6: ST7. Brønn 7: 1 kb DNA-standard.

Figur 4.16 og 4.17 viser at restriksjonskutting av pcDNA3- (5,4 kb) og pEGFP N3-vektor (4,7 kb) med innskudd, resulterte i to fragmenter; et stort fragment som tilsvarer vektor og et mindre som tilsvarer det ønskede produktet med riktig størrelse. Disse plasmidene med innskudd ble sendt til sekvensering ved sekvenseringslaboratoriet ved Institutt for molekylær biovitenskap, og resulterte i riktig sekvens uten mutasjoner. Deretter ble

DNA-konstrukt 5-7 (ST4, ST5 og ST6; rGH:GFP klon) transfektert inn i MDCK II-celler på grunn av at proteiner med et GFP domène, lettere kan detekteres ved hjelp av fluorescensmikroskopi. På grunn av problemer ved subkloningsdelen av ST7, ble ikke denne tidsnok ferdig for transfeksjon.

4.2 Transfeksjon og seleksjon av positive kloner

Etter at DNA-konstruktene var ferdigklonet og sekvensert, ble de transfektert (rGH:GFP-konstruktene) stabilt inn i MDCK II-celler ved hjelp av transfeksjonsreagenset FuGENE™6 (metoder 3.8.1). MDCK II-celler ble dyrket i plastskåler til 50-70 % celletetthet, før DNA og FuGENE™ 6 ble tilsatt. FuGENE™ 6 er en blanding av hydrofobe forbindelser som kan bringe fremmed DNA effektivt inn i pattedyrceller og som har lav toksisitet. Det ble benyttet et forhold på 3:1 mellom μL FuGENE™ 6 og μg DNA, et forhold som er anbefalt for optimal transfeksjonseffektivitet. Ved stabil transfeksjon inkorporeres DNA-konstruktet inn i (MDCK II) cellenes eget genom. Et mindre antall celler blir transfektert og etter transfeksjon tilsettes celledyrkningsskålene medium som inneholder antibiotikum (G-418) som dreper celler som ikke inneholder funksjonelt vektorkonstrukt og i tillegg også celler, inkludert bakterier, som er mulige forurensninger av cellekulturen. Nærvær av G-418 medfører et seleksjonstrykk hvor celledyrkningsskålene til slutt bare skal inneholde celler som har vektorens resistensmarkør mot G-418. Parallelle skåler med ikke-transfektete celler ble undersøkt, for å kontrollere at alle disse cellene var døde etter den aktuelle tid i nærvær av G-418. Overlevende celler i skåler som var tilsatt DNA og transfeksjonsreagens, ble undersøkt videre. Dersom disse danner små, runde og regelmessige kolonier, kan man anta at de stammer fra en enkelt transfektert celle og dermed er av samme klon. Slike kolonier ble høstet ved hjelp av trypsin, dyrket opp i plastflasker til tilstrekkelig antall celler for nedfrysning i flytende nitrogen i flere ampuller per klon.

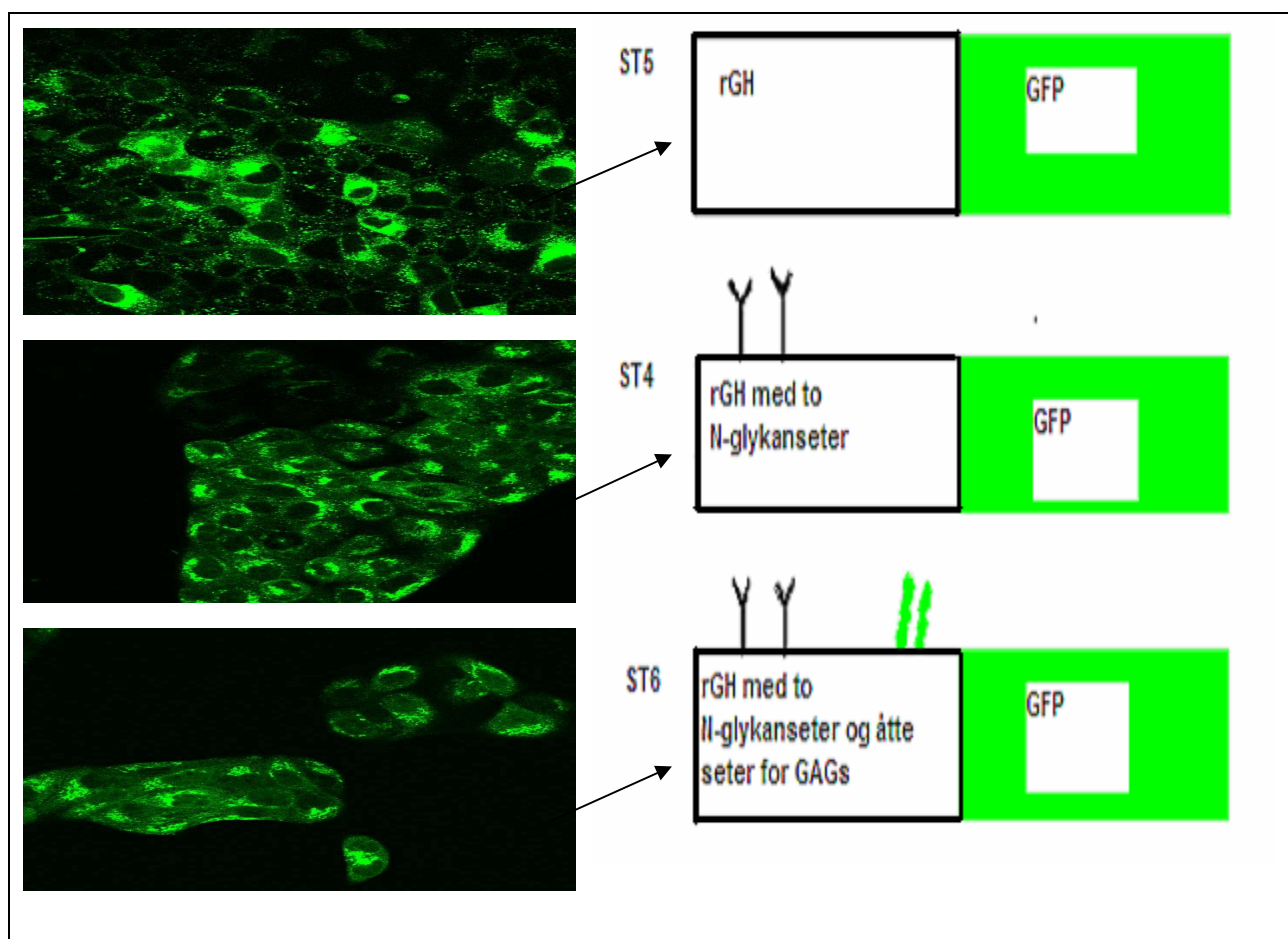
Ved transfeksjon kan det være en fordel å benytte relativt konsentrert DNA, blant annet for å redusere faren for å bringe kontaminasjon fra bakteriekulturer over i eukaryot

cellekultur. Vi benyttet derfor Maxiprep til oppkonsentrering av DNA, slik at transfeksjonsvolumet kunne reduseres.

Transfeksjonen ble utført over ca. 3 døgn før seleksjonstrykket ble initiert ved tilsetning av G-418. Skåler med henholdsvis transfekterte celler og kontrollceller, ble fulgt de neste to ukene for å identifisere cellekloner med inkorporert vektor. Overlevelse under seleksjonstrykket er imidlertid ikke noen garanti for at celleklonen uttrykker det ønskede genprodukt (protein). Undersøkelse av positive kloner har tidligere vært en alvorlig flaskehals ved stabil transfeksjon av pattedyrceller, fordi flere paralleller av hver klon har vært gjenstand for oppdyrking og ulike ekstraksjonsmetoder for studier av syntese av spesifikk mRNA og/eller ønsket protein. Med utviklingen av moderne konfokalmikroskopi har det blitt mulig å studere levende celler i mikroskopi ved høyere forstørrelse, dersom proteiner eller lipider i cellen inneholder en fluorescerende "merkelapp". Følsomheten for denne metodikken har etter hvert blitt så høy at intensiteten som kreves for inngående bølger er lavere enn det som kan skade cellene. Ved å transfektere cellene, slik at proteiner uttrykkes med et domène som gir grønn fluorescens (GFP), vil man kunne undersøke om cellene uttrykker det ønskede proteinet i tilstrekkelige grad uten at klonet må ekstraheres og underkastes langvarige biokjemiske analyser. GFP finnes også i varianter med rød, blå og gul fluorescens, slik at flere proteiner kan transfekteres inn i cellene samtidig. I tillegg til at man kan evaluere uttrykksnivået av ønsket fluorescerende protein i transfekterte celler, kan man i mange tilfeller også avgjøre om proteinet viser et forventet lokaliseringsmønster. Ved en undersøkelse av fluorescensen i de ulike cellekloner, kan man enkelt skille kjernelokalisering fra cytoplasmatisk lokalisering eller en perinukleær lokalisering som representerer Golgi-apparatet og/eller sene endosomer.

4.3 Karakterisering av uttrykk og polarisert sortering av rGH:GFP- varianter

MDCK II-celler med uttrykk av rGH:GFP, ble påvist ved konfokal fluorescensmikroskopi. Kloner som hadde lavt eller intet påviselig proteinuttrykk ved mikroskopi, ble ekskludert fra påfølgende studier. Celleklonene det ble arbeidet videre med viste i tillegg til et tydelig proteinuttrykk også en forventet lokalisering, samtidig som cellelinjen hadde en normal epitelial morfologi (figur 4.18 og tabell 4.1).



Figur 4.18: MDCK II-celler transfektert med rGH-mutant::GFP sett ved hjelp av GFP fluorescens (60 x forstørning). (A) ST5; rGH (B) ST4; rGH med to seter for N-glykaner (C) ST6; rGH med to seter for N-glykaner og åtte Ser-Gly seter C-terminalt

For å kunne studere polarisert sortering av de ulike variantene av rGH:GFP fusjonsproteiner, må MDCK II-celler dyrkes på filtre for å oppnå *in vivo*-liknende epitelial

morfologi. Porene (0,4 μm i diameter) i filtermembranen muliggjør næringsopptak via basolateralt lokaliserte reseptorer for aminosyrer, monosakkarider, transferrin, lipoproteiner og liknende. Normalt trypsineres en konfluent flaske (75 cm^2) MDCK II-celler, inneholdende omtrent 10-15 millioner celler, hvorpå cellene fordeles på 6 polykarbonatfiltre, hvert med en overflate på 4,7 cm^2 . Etter 3-4 døgn har cellene dannet tette cellelag som kan underkastes polaritetsstudier. Studier av polarisert sekresjon av rekombinante proteiner fra epitelceller utføres vanligvis ved immundeteksjon med antistoffer rettet mot en epitop innført i enden av proteinet, for eksempel en FLAG-tag, myc-tag eller his-tag. Dette kan utføres ved Western-blotting eller ved immunpresipitering. Det finnes gode antistoffer mot GFP, som gjør det mulig å benytte dette proteinet også som en biokjemisk tag. I denne oppgaven ble polarisert sortering av rGH:GFP derfor studert ved immunpresipitering av alikvoter av apikalt og basolateralt medium etter metabolsk merking med ^3H -GlcN, ^{35}S -cystein/metionin eller ^{35}S -sulfat i 24 timer (metoder 3.8.5).

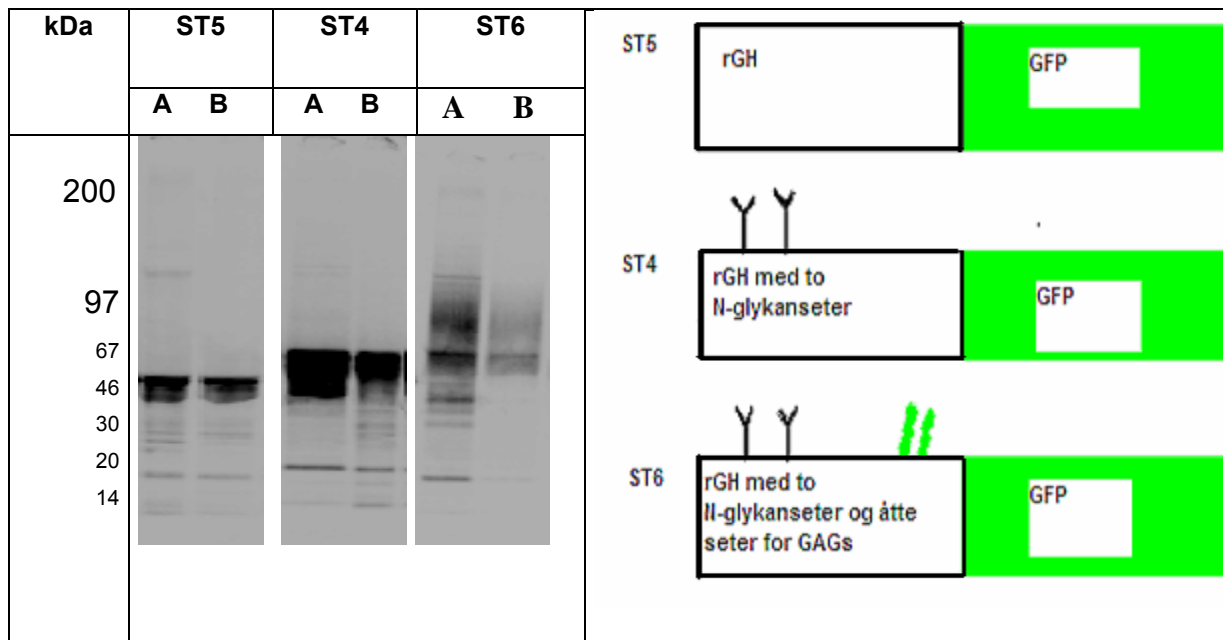
Tabell 4.1: Oversikt av kloner som uttrykte proteinet. *ST4 = rGH med to seter for N-glykaner, ST5 = rGH, ST6 = rGH med to seter for N-glykaner og åtte seter for GAGs C-terminalt.*

Klon	Proteinuttrykk	
ST4-6	Høyt.	
ST4-9	Høyt.	
ST4-10	Moderat.	
ST5-6	Lite.	
ST5-7	Høyt.	
ST5-10	Lite.	
ST5-13	Høyt.	
ST5-18	Høyt.	
ST5-19	Høyt.	
ST5-21	Høyt.	
ST5-27	Høyt.	
ST5-28	Høyt.	
ST6-5	Høyt.	

4.3.1 Analyse av rGH:GFP-varianter

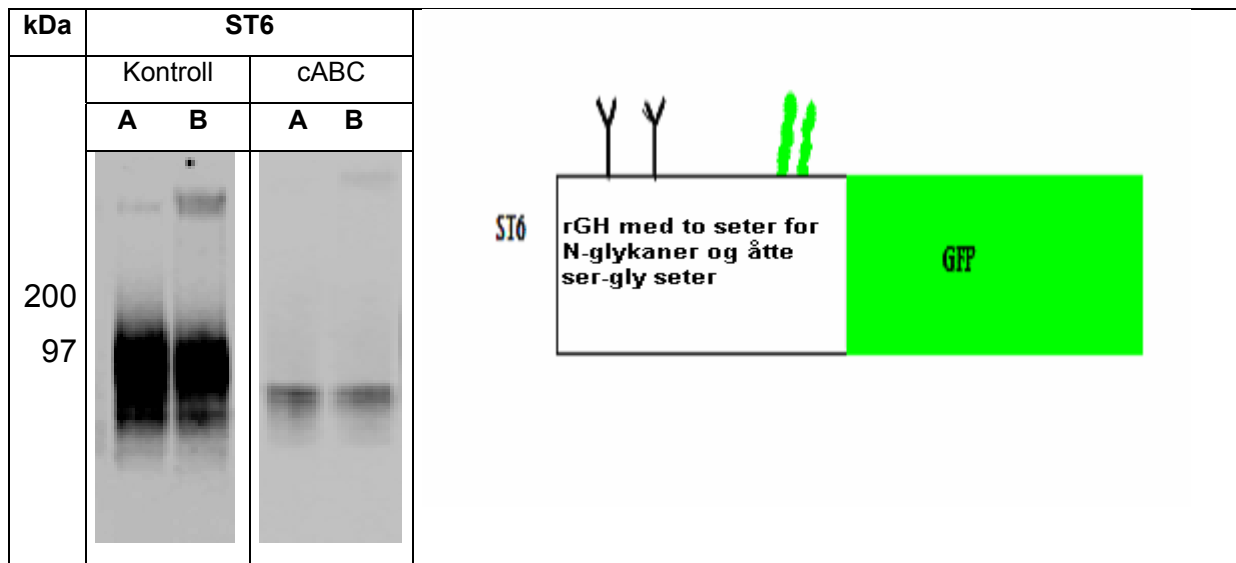
Alle de sekretoriske rGH:GFP-variantene kan merkes metabolsk i proteindelen med ^{35}S -cystein/metionin, siden proteinet inneholder disse aminosyrene. For varianter som inneholder seter for N-glykaner, vil metabolsk merking med $^3\text{H-GlcN}$ gi svar på om disse setene er tatt i bruk av syntesemaskineriet i den sekretoriske veien. Glukosaminet vil inkorporeres i N-glykangrupper og samtidig vil N-glykanene bidra til å øke molekylvekten av proteinet, slik at mobiliteten ved SDS-PAGE vil endres. Derfor vil man allerede ved innmerking med ^{35}S -cystein/metionin kunne observere om N-glykaner er koblet til proteinet på grunn av endret molekylvekt.

Ved å metabolsk merke med ^{35}S -sulfat, vil man kunne spesifikt undersøke om proteinet inneholder sulfaterte glukosaminoglykan (GAG)-kjeder. Dette vil kunne endre mobiliteten ved SDS-PAGE ytterligere. GAG-kjedene vil også inkorporere $^3\text{H-GlcN}$ og proteindelen kan fortsatt merkes med den "universelle merkelappen" ^{35}S -cystein/metionin. Fordi proteiner kan skilles ut i forskjellige varianter med ulik modifisering (Tveit *et al.*, 2005), vil det kunne gi ekstra informasjon å sammenlikne resultater fra flere type innmerkinger for proteiner hvor det foreligger alternativer. SDS-PAGE i figur 4.19 viser rGH:GFP metabolsk merket med ^{35}S -cystein/metionin etter IP fra apikalt og basolateralt medium. Det ble observert et like sterkt bånd både apikalt og basolateralt for klon ST5. For ST4 som har to seter for N-glykaner, lå båndet litt høyere og det var sterkere på apikal side. ST6-båndet var bredt, sterkest på apikal side og lå høyt oppe i gelen, men dog ikke så høyt som forventet. Tidligere resultater har vist at CS-GAG-kjeder kan ha størrelse på omtrent 60 kDa (Tveit *et al.*, 2005; Vuong *et al.*, 2006). Hvor mange og lange GAG-kjeder ST6-varianten er modifisert med kan imidlertid ikke avgjøres uten omfattende biokjemiske studier.



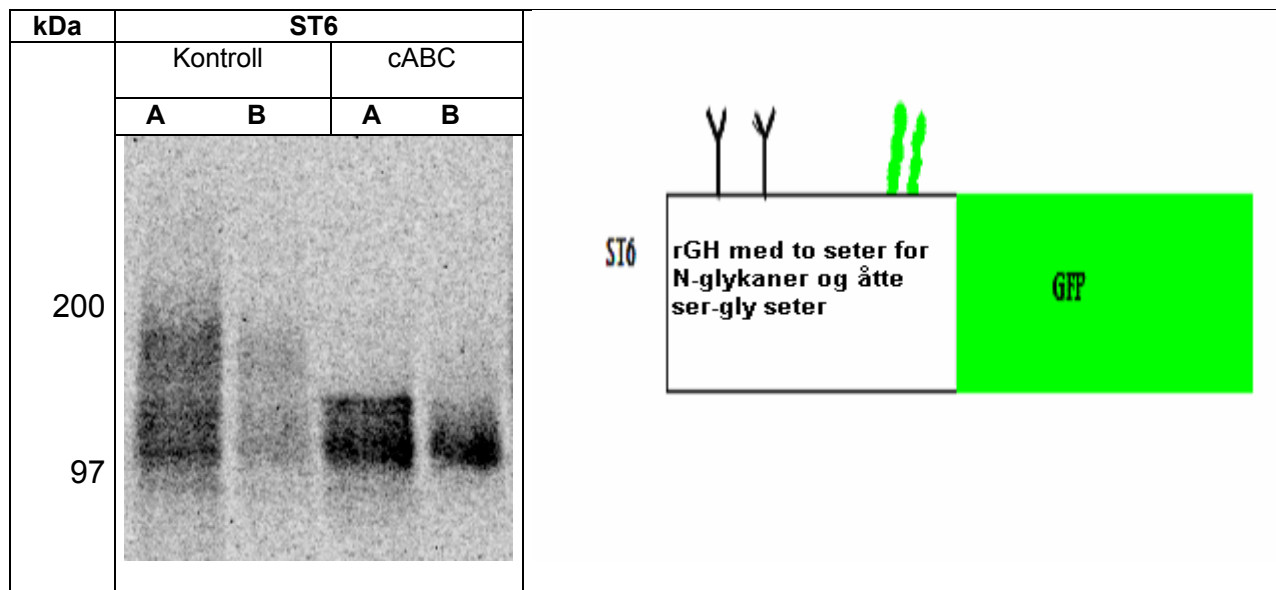
Figur 4.19: Sorteringsanalyse av rGH:GFP-kloner. MDCK II-celler transfektert med ST4, ST5 og ST6 DNA-konstrukt har inkorporert ^{35}S -cys/met rGH:GFP IP med anti-GFP antistoff. Apikalt og basolateralt medium appliseres med like store mengder og analyseres på en 4-12 % Bis-Tris SDS-polyakrylamid gel. Resultatet viser et representativt sett fra et forsøk med 3 paralleller.

For å karakterisere type GAG på rGH:GFP utskilt i apikalt og basolateralt medium, ble alikvoter av rGH med innsatt GAG-område fra Serglycin (klon ST6), behandlet med cABC enzym (metoder 3.8.7). cABC bryter ned CS og på denne måten kan man påvise om rGH:GFP var blitt påsatt CS-kjeder. De cABC behandlede IP rGH:GFP prøvene ble analysert på SDS-PAGE sammen med ubehandlede prøver. Figur 4.20 viser at det brede, mest høymolekylære båndet, som er typisk for proteoglykaner, forsvant etter behandlingen.



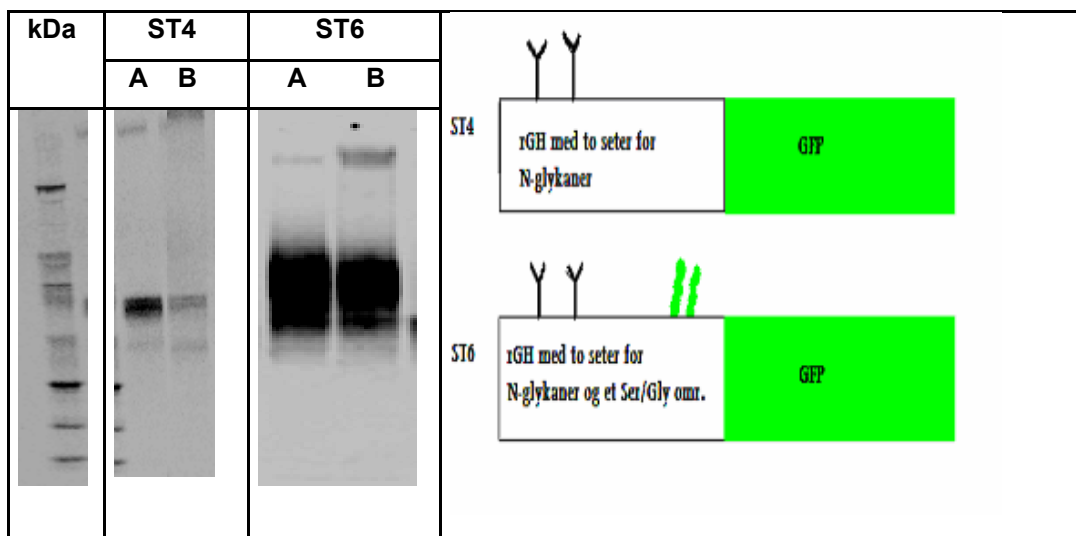
Figur 4.20: Sorteringsanalyse av rGH:GFP-klon ST6. MDCK II-celler transfektert med ST6 DNA-konstrukt, inkorporert med $^{35}\text{S-SO}_4^{2-}$ og IP med et anti-GFP antistoff. Apikalt og basolateralt medium ble behandlet med cABC og like store mengder ble applisert og analysert på en 4-12 % Bis-Tris SDS-polyakrylamidgel. Resultatet viser et representativt sett fra et forsøk med 3 paralleller. A=Apikalt, B=Basolateralt.

Det samme mønsteret kan observeres for rGH:GFP med N-glykaner og GAG-kjeder, som var radioaktivt merket inn med $^3\text{H-GlcN}$ (figur 4.21). Også her forsvant det brede, høymolekylære båndet etter cABC behandling.



Figur 4.21: Sorteringsanalyse av rGH:GFP-klon ST6. MDCK II-celler transfektert med ST6 DNA-konstrukt, inkorporert med $^3\text{H-GlcN}$ og IP med anti-GFP antistoff. Apikalt og basolateralt medium ble behandlet med cABC og like store mengder ble applisert og analysert på en 4-20 % Tris-HCl SDS-polyakrylamid gel. Resultatet viser et representativt sett fra et forsøk med 2 paralleller. A=Apikalt, B=Basolateralt.

For å studere sulfatering av rGH-variantene, ble de transfekterte MDCK II-cellene med uttrykk av ST4 og ST6, merket inn med radioaktivt sulfat, immunpresipitert og analysert ved SDS-PAGE. Det er tidligere vist at for enkelte glykoproteiner kan N-glykangrupeer sulfateres i Golgi-apparatet. Figur 4.22 viser at begge variantene med N-glykaner sorteres mest til det apikale mediet. ST4-varianten har fått sulfat inkorporert i N-glykanene og sulfatmerkingen viser omtrent samme apikal/basolateral ratio som cys/met innmerkingen. Sulfatmerkingen fordeler seg noe jevnere mellom apikalt og basolateralt medium for ST6-varianten, enn vist ved innmerking med cys/met (figur 4.19) og glukosamin (figur 4.21). Dette kan henge sammen med at CS-kjeder på basolateralt utskilt PG kan være mer sulfatert enn det som skilles ut apikalt, også for en og samme proteinkjerne (Tveit *et al.*, 2005; Vuong *et al.*, 2006).



Figur 4.22: Sulfateringsmønster for rGH:GFP-klon ST4 og ST6. MDCK II-celler transfektert med ST4 og ST6 DNA-konstrukter, ble inkorporert med $^{35}\text{S-SO}_4^{2-}$ før IP. Apikalt og basolateralt medium ble applisert og analysert ved SDS-PAGE. Resultatet viser et representativt sett fra forsøk med 3 paralleller. A=Apikalt, B=Basolateralt.

Resultatene viste at:

- rGH uten modifiseringer ble transportert omtrent like mye til hver side i MDCK II-celler.
- rGH modifisert med to seter for N-glykaner ble transportert mest til den apikale siden i MDCK II-celler.
- N-glykanene var sulfaterte på rGH-variantene både med og uten GAGs (figur 4.22).
- rGH med to seter for N-glykaner og åtte seter for GAGs, ble transportert mest til den apikale siden av epitelet.
- GAG-kjedene viste seg å være av typen kondroitinsulfat da GAG-båndene forsvant på SDS-gel etter behandling med cABC enzym (figur 4.21).
- GAG-kjedene på rGH var muligens mest sulfatert i det basolaterale mediet.

En oversikt over resultatene er vist i tabell 4.2.

Tabell 4.2: Oppsummering av resultater. *Polarisert sortering av modifisert rGH i transfekterte MDCK II-celler. Kvantitering utført ved Image Quant analyser.*

Radioaktiv innmerking	ST4: rGH med to seter for N-glykaner	ST5: rGH	ST6: rGH med to seter for N-glykaner og åtte seter for GAGs
Cys/Met	Transportert mest til den apikale siden (61 % apikalt, 39 % basolateralt).	Omtrent like mye transportert til hver side (55 % apikalt og 45 % basolateralt).	Sortert mer til apikal side (76 % apikalt og 24 % basolateralt).
Sulfat	Sulfatert mer på apikal side (55 % apikalt, 49 % basolateralt).	Ikke sulfatinmerket.	Sulfatert mer i apikalt medium (55 % apikalt og 45 % basolateralt).
GlcN	Flest N-glykaner i apikalt medium (58 % apikalt, 42 % basolateralt).	Ikke GlcN innmerket.	Flere GAGs i apikalt medium (65 % apikalt og 35 % basolateralt).

5.0 DISKUSJON

Proteoglykaner (PG) er makromolekyler sammensatt av proteiner med glukosaminoglykaner (GAG) kovalent bundet til proteinet. GAG linket til proteinet kan være kondroitinsulfat (CS), heparin/heparansulfat (HS), keratansulfat (KS) eller dermatansulfat (DS). Eksempler på PG med bundet GAG er aggrekkan og versikan som er store ekstracellulære CSPG, dekorin og biglykan som er små PG med CS/DS eller KS, syndekan som er membranbundne på celleoverflaten med CS/HS og intracellulære PG som serglycin med CS eller CS/HS.

Oppgavens mål var å uttrykke modellproteinene rotte veksthormon (rGH) med GAG (glukosaminoglykan)-kjeder og/eller N-glykaner med et grønt fluorescerende protein (GFP; green fluorescence protein) C-terminalt, og å studere apikal og basolateral transport og sortering av de rekombinante variantene av proteinet. rGH ble substituert med et område fra humant serglycin som er et PG med 24 Ser-Gly repeterende sekvenser (Kolset and Gallagher, 1990). Den epiteliale MDCK II-cellelinjen som ble benyttet som modellsystem, er tidligere benyttet mye til studier av polarisert transport av glykoproteiner og proteoglykaner. Resultater fra Svennevig og medarbeidere viste at Madin-Darby canine kidney (MDCK) II-celler produserer både HSPG og CSPG (Svennevig *et al.*, 1995).

rGH er normalt et ikke-glykosylert protein, som blir utskilt omtrentlig like mye til begge sider av polariserte MDCK-celler (Gottlieb *et al.*, 1986). Scheiffele og medarbeidere viste i 1995 at addisjon av seter for N-glykaner til rGH, førte til en økt sekresjon til apikal side (Scheiffele *et al.*, 1995). Dette kan tyde på at N-bundne karbohydratkjeder har enten en direkte (som et sorteringssignal) eller en indirekte (som en stabiliseringsfaktor for konformasjonen av proteinet) rolle.

Tidligere resultater tyder på at CSPG og xylosider påsatt CS-kjeder, som blir transportert til den apikale siden i MDCK II-epitelceller, inneholder et apikalt signal for polarisert transport (Kolset *et al.*, 1999). Serglycin vil i de fleste tilfeller modifiseres med CS-kjeder og ble i MDCK II-celler transportert mest til apikal side (Tveit *et al.*, 2005).

Det er tidligere foreslått at HS-kjeder kan ha en basolateral sorteringseffekt. HSPGet glypikan ble transportert hovedsaklig basolateralt i MDCK- og CaCo-2 epitelceller, mens glypikan uten HS seter ble transportert mest til den apikale siden (Mertens *et al.*, 1996), sannsynligvis på grunn av N-glykankjedene bundet til glypikan (Benting *et al.*, 1999).

Resultater vi fikk ved immunpresipitering (IP) viste at rGH ble, som forventet, utskilt omtrentlig like mye til begge sider i MDCK II-celler (55 % apikalt, 45 % basolateralt). Ved addisjon av to N-glykanseter gikk sekresjonen av rGH mest til apikal side, som forventet (61 % apikalt, 39 % basolateralt).

rGH er normalt et ikke-glykosylert protein som tidligere er blitt modifisert med seter for N-glykaner som nevnt tidligere, men det er derimot aldri blitt satt inn Ser-Gly seter på rGH. Det var derfor interessant å se om det rekombinante proteinet ville uttrykkes, hvilke typer GAGs som eventuelt ville bli påsatt og om sorteringen av proteinet ville påvirkes. Vi modifiserte rGH:GFP med et område fra humant serglycin som inneholdt åtte seter for GAGs med to sure aminosyrer før setene og en sur aminosyre etter den repeterende sekvensen (25 aminosyrer totalt fra serglycin). Radioaktivt merket rGH:GFP med SG-seter hadde høyere molekylvekt ved SDS-PAGE og var altså modifisert med GAG-kjeder. Studier av nedbrytning av CS med kondroitinase ABC (cABC) viste at rGH var blitt modifisert med CS, siden proteoglykanbåndet ble redusert etter behandling med dette enzymet. Proteoglykanbåndet lå litt høyere i gelen enn båndet for rGH uten GAGs, dette på grunn av at linker regionen ikke blir nedbrutt ved cABC-behandling slik at seks sakkarider er igjen i hver kjede. Dette DNA-konstruktet kodet i tillegg for N-glykaner seter. Det var interessant om rGH med seter for N-glykaner og CS fikk en økt sekresjon til apikal side. Et annet interessant punkt var om rGH som var modifisert med N-glykaner og GAG-kjeder viste tegn til at disse strukturene påvirket hverandre.

rGH med seter for N-glykaner og CS-kjeder, ble transportert mest til apikal side som forventet (76 % apikalt, 24 % basolateralt), men det trengs flere forsøk for å verifisere dette. Om man sammenlikner ST6 og ST4 så blir rGH med både GAG-kjeder og N-glykaner (ST6) transportert mer apikalt enn rGH med bare N-glykaner (76 % versa 61 %), men også her gjenstår det flere forsøk som kan bekrefte at GAG-kjeder sammen med N-glykaner gir en økt apikal sekresjon.

Siden DNA-konstrukt ST6 (med seter for N-glykaner og et område fra serglycin) fikk påsatt CS-kjeder, kan det spekuleres i om også ST7 (med et område fra serglycin) får på seg CS. I så tilfelle vil det være interessant å se om også rGH med CS vil transporteres apikalt som med andre CSPG. Dette vil styrke teorien om at CS er et signal for apikal transport. Man kan også sammenlikne ST6 (rGH med et område fra serglycin og seter for N-glykaner) med ST7 (med et område fra serglycin), og se om det vil bli en økning i forhold til apikal transport på grunn av N-glykanene.

SDS-PAGE av IP rGH med seter for N-glykaner og et serglycin-område, viser tre PG-bånd. Dette tyder på at det finnes flere former av rGH:GFP, en del med N-glykaner bundet til seg og en del med både N-glykaner og GAG-kjeder. Hvorfor noen varianter bare får N-glykaner bundet til seg er et interessant punkt som kan undersøkes videre.

Proteoglykanbåndet for rGH modifisert med CS-kjeder, ligger noe lavere og er noe smalere enn tidligere resultater med serglycin proteinet (Tveit *et al.*, 2005). Serglycin proteinet har 24 SG seter, mens rGH:GFP har blitt modifisert med åtte seter. Muligens har ikke alle setene blitt benyttet av syntesemaskineriet eller så er kjedene kortere enn på serglycin. Serglycin området på vårt rekombinante rGH var bare en liten del av serglycin proteinet, og en mulighet kan være at andre deler av serglycin proteinet er nødvendig for å få dannet lengre kjeder. Trolig er dette det første eksemplet på at SG seter er generert i et protein som i utgangspunktet ikke er et PG, lar seg modifisere med GAGs.

rGH med modifiserte serglycin-seter blir radioaktivt innmerket i GAG-kjedene av ^3H -GlcN, og GAG-kjedene blir sulfaterte i spesielle posisjoner i suktermolekylene. Med denne innmerkingen kan man studere sulfateringsgraden, ved at disse to forsøkene sammenliknes. Det er tidligere antydnet at GAG-kjedene på blant annet serglycin, blir sulfatert ulik avhengig av til hvilken side proteoglykanene blir transportert i polariserte MDCK II-celler. CS-kjedene på SG:GFP på basolateral side, var mer sulfaterte enn de på apikal side (Tveit *et al.*, 2005). En forklaring kan være at GAGs med høyere negativ ladning har en større affinitet for basolaterale transportmolekyler. Alternativt kan det finnes apikale og basolaterale "plattformer" som proteiner sorteres til før post-translasjonelle modifikasjoner skjer og at sorteringen for proteiner til apikal og basolateral side, foregår i den sekretoriske vei enn tidligere antatt. Ved å sammenlikne gelene med ^{35}S -sulfat og ^3H -GlcN innmerkede IP rGH:GFP (for ST6) kan man finne ut noe om sulfateringsgraden til GAG-kjedene. Våre resultater hentydet til en sterkere sulfatering på basolateral side, men dette må undersøkes nærmere med flere paralleller.

Det interessante var at også N-glykanene ble sulfatert (ST4). Det finnes noen rapporter om sulfatering av N-glykaner, for eksempel er glykoproteinet gp80 (Apolipoprotein J) sulfatert i MDCK-celler (Urban *et al.*, 1987) og ulike virus proteiner deriblant influensa virus hemagglutinin (Spiro and Spiro, 2000). N-glykankjedene på Vesikulær stomatitt virus blir også sulfatert i visse cellelinjer (Karaivanova and Spiro, 1998). Sulfatering av oligosakkarider er dog ikke blitt grundig undersøkt og muligheten for at mange karbohydratkjeder blir sulfaterte er til stede. Funksjonen av sulfateringen er enda uklar, men kan muligens ha en betydning for sorteringen. Resultatene kan tyde på at apikale N-bundne oligosakkarider ble mer sulfatert enn de basolaterale, men dette må undersøkes nærmere.

Forslag til videre arbeid med rekombinant rotte veksthormon

Rotte veksthormon bør transfekteres inn i MDCK II-celler og IP:

Sammenlikne rotte veksthormon modifisert med et område fra serglycin (ST6) og analysere GAG-kjedene, om kjedene da blir lengre enn for rotte veksthormon med både CS og N-glykaner, og om ST6 vil gå mer eller mindre apikalt enn ST7.

Transfektore og IP de fire første DNA-konstruktene (figur 4.2):

Undersøke om GFP-proteinet, som er like stort som rotte veksthormon, har betydning for syntesen av N-glykanene og GAGs.

De fire første DNA-konstruktene er noe ulike konstruktene i pEGFP N3-vektor, ST6` som har N-glykaner og et serglycin område midt i proteinet. Vil disse gi proteiner med andre typer GAG-kjeder, og vil kjedene bli lengre eller kortere? Påvirkes sorteringen?

Behandle rotte veksthormon med N-glykaner og GAG-kjeder (ST6), med tunicamycin (hemmer syntese av N-glykaner):

Vi vil kunne undersøke hvordan N-glykaner påvirker sorteringen til apikal og basolateral side og om de har noen betydning for syntesen av GAG-kjeder (rGH med N-glykaner og GAGs).

Undersøke sulfatering av N-bundne oligosakkarider på rGH:

Undersøke om sulfateringen av N-glykanene forandres ved fjerning av GAG-kjedene.

REFERANSELISTE

- Ang, A. L., Taguchi, T., Francis, S., Folsch, H., Murrells, L. J., Pypaert, M., Warren, G., and Mellman, I. (2004). Recycling endosomes can serve as intermediates during transport from the Golgi to the plasma membrane of MDCK cells. *J Cell Biol* **167**, 531-543.
- Appel, D., Pilarsky, C., Graichen, R., and Koch-Brandt, C. (1996). Sorting of gp80 (GPIII, clusterin), a marker protein for constitutive apical secretion in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells, into the regulated pathway in the pheochromocytoma cell line PC12. *Eur J Cell Biol* **70**, 142-149.
- Barker, G., and Simmons, N. L. (1981). Identification of two strains of cultured canine renal epithelial cells (MDCK cells) which display entirely different physiological properties. *Q J Exp Physiol* **66**, 61-72.
- Benting, J. H., Rietveld, A. G., and Simons, K. (1999). N-Glycans mediate the apical sorting of a GPI-anchored, raft-associated protein in Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* **146**, 313-320.
- Bomsel, M., and Mostov, K. (1991). Sorting of plasma membrane proteins in epithelial cells. *Curr Opin Cell Biol* **3**, 647-653.
- Bourdon, M. A., Krusius, T., Campbell, S., Schwartz, N. B., and Ruoslahti, E. (1987). Identification and synthesis of a recognition signal for the attachment of glycosaminoglycans to proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 3194-3198.
- Bravo-Zehnder, M., Orio, P., Norambuena, A., Wallner, M., Meera, P., Toro, L., Latorre, R., and Gonzalez, A. (2000). Apical sorting of a voltage- and Ca²⁺-activated K⁺

- channel alpha -subunit in Madin-Darby canine kidney cells is independent of N-glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13114-13119.
- Breitfeld, P. P., Casanova, J. E., McKinnon, W. C., and Mostov, K. E. (1990). Deletions in the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor differentially affect endocytotic rate and postendocytotic traffic. *J Biol Chem* **265**, 13750-13757.
- Casanova, J. E., Apodaca, G., and Mostov, K. E. (1991). An autonomous signal for basolateral sorting in the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor. *Cell* **66**, 65-75.
- Fullekrug, J., Scheiffele, P., and Simons, K. (1999). VIP36 localisation to the early secretory pathway. *J Cell Sci* **112 (Pt 17)**, 2813-2821.
- Gottlieb, T. A., Beaudry, G., Rizzolo, L., Colman, A., Rindler, M., Adesnik, M., and Sabatini, D. D. (1986). Secretion of endogenous and exogenous proteins from polarized MDCK cell monolayers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 2100-2104.
- Gut, A., Kappeler, F., Hyka, N., Balda, M. S., Hauri, H. P., and Matter, K. (1998). Carbohydrate-mediated Golgi to cell surface transport and apical targeting of membrane proteins. *Embo J* **17**, 1919-1929.
- Hansson, G. C., Simons, K., and van Meer, G. (1986). Two strains of the Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell line have distinct glycosphingolipid compositions. *Embo J* **5**, 483-489.
- Hara-Kuge, S., Ohkura, T., Ideo, H., Shimada, O., Atsumi, S., and Yamashita, K. (2002). Involvement of VIP36 in intracellular transport and secretion of glycoproteins in polarized Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. *J Biol Chem* **277**, 16332-16339.
- Hartmann, S., and Hofsteenge, J. (2000). Properdin, the positive regulator of complement, is highly C-mannosylated. *J Biol Chem* **275**, 28569-28574.

- Hunziker, W., Harter, C., Matter, K., and Mellman, I. (1991). Basolateral sorting in MDCK cells requires a distinct cytoplasmic domain determinant. *Cell* **66**, 907-920.
- Hunziker, W., and Mellman, I. (1991). Relationships between sorting in the exocytic and endocytic pathways of MDCK cells. *Semin Cell Biol* **2**, 397-410.
- Karaivanova, V. K., and Spiro, R. G. (1998). Sulphation of N-linked oligosaccharides of vesicular stomatitis and influenza virus envelope glycoproteins: host cell specificity, subcellular localization and identification of substituted saccharides. *Biochem J* **329 (Pt 3)**, 511-518.
- Kitagawa, Y., Sano, Y., Ueda, M., Higashio, K., Narita, H., Okano, M., Matsumoto, S., and Sasaki, R. (1994). N-glycosylation of erythropoietin is critical for apical secretion by Madin-Darby canine kidney cells. *Exp Cell Res* **213**, 449-457.
- Kolset, S. O., and Gallagher, J. T. (1990). Proteoglycans in haemopoietic cells. *Biochim Biophys Acta* **1032**, 191-211.
- Kolset, S. O., Vuong, T. T., and Prydz, K. (1999). Apical secretion of chondroitin sulphate in polarized Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. *J Cell Sci* **112 (Pt 11)**, 1797-1801.
- Kondor-Koch, C., Bravo, R., Fuller, S. D., Cutler, D., and Garoff, H. (1985). Exocytotic pathways exist to both the apical and the basolateral cell surface of the polarized epithelial cell MDCK. *Cell* **43**, 297-306.
- Lisanti, M. P., Caras, I. W., Davitz, M. A., and Rodriguez-Boulan, E. (1989). A glycopospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* **109**, 2145-2156.
- Marzolo, M. P., Bull, P., and Gonzalez, A. (1997). Apical sorting of hepatitis B surface antigen (HBsAg) is independent of N-glycosylation and glycosylphosphatidylinositol-anchored protein segregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1834-1839.

- Matter, K., Hunziker, W., and Mellman, I. (1992). Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants. *Cell* **71**, 741-753.
- Mertens, G., Van der Schueren, B., van den Berghe, H., and David, G. (1996). Heparan sulfate expression in polarized epithelial cells: the apical sorting of glypican (GPI-anchored proteoglycan) is inversely related to its heparan sulfate content. *J Cell Biol* **132**, 487-497.
- Monlauzeur, L., Breuza, L., and Le Bivic, A. (2000). Different functional recognition of basolateral signals in Caco-2 and MDCK cells. *Exp Cell Res* **258**, 195-203.
- Naim, H. Y., Joberty, G., Alfalah, M., and Jacob, R. (1999). Temporal association of the N- and O-linked glycosylation events and their implication in the polarized sorting of intestinal brush border sucrase-isomaltase, aminopeptidase N, and dipeptidyl peptidase IV. *J Biol Chem* **274**, 17961-17967.
- Pang, S., Urquhart, P., and Hooper, N. M. (2004). N-glycans, not the GPI anchor, mediate the apical targeting of a naturally glycosylated, GPI-anchored protein in polarised epithelial cells. *J Cell Sci* **117**, 5079-5086.
- Pless, D. D., and Lennarz, W. J. (1977). Enzymatic conversion of proteins to glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 134-138.
- Potter, B. A., Ihrke, G., Bruns, J. R., Weixel, K. M., and Weisz, O. A. (2004). Specific N-glycans direct apical delivery of transmembrane, but not soluble or glycosylphosphatidylinositol-anchored forms of endolyn in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* **15**, 1407-1416.
- Prill, V., Lehmann, L., von Figura, K., and Peters, C. (1993). The cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase contains overlapping but distinct signals for basolateral sorting and rapid internalization in polarized MDCK cells. *Embo J* **12**, 2181-2193.

- Rapraeger, A., Jalkanen, M., Endo, E., Koda, J., and Bernfield, M. (1985). The cell surface proteoglycan from mouse mammary epithelial cells bears chondroitin sulfate and heparan sulfate glycosaminoglycans. *J Biol Chem* **260**, 11046-11052.
- Rodriguez-Boulan, E., and Gonzalez, A. (1999). Glycans in post-Golgi apical targeting: sorting signals or structural props? *Trends Cell Biol* **9**, 291-294.
- Rodriguez-Boulan, E., Musch, A., and Le Bivic, A. (2004). Epithelial trafficking: new routes to familiar places. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 436-442.
- Scheiffele, P., Peranen, J., and Simons, K. (1995). N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature* **378**, 96-98.
- Simons, K., and Vaz, W. L. (2004). Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **33**, 269-295.
- Simonsen, A., Stang, E., Bremnes, B., Roe, M., Prydz, K., and Bakke, O. (1997). Sorting of MHC class II molecules and the associated invariant chain (Ii) in polarized MDCK cells. *J Cell Sci* **110 (Pt 5)**, 597-609.
- Spiro, M. J., and Spiro, R. G. (2000). Sulfation of the N-linked oligosaccharides of influenza virus hemagglutinin: temporal relationships and localization of sulfotransferases. *Glycobiology* **10**, 1235-1242.
- Svennevig, K., Prydz, K., and Kolset, S. O. (1995). Proteoglycans in polarized epithelial Madin-Darby canine kidney cells. *Biochem J* **311 (Pt 3)**, 881-888.
- Tai, A. W., Chuang, J. Z., Bode, C., Wolfrum, U., and Sung, C. H. (1999). Rhodopsin's carboxy-terminal cytoplasmic tail acts as a membrane receptor for cytoplasmic dynein by binding to the dynein light chain Tctex-1. *Cell* **97**, 877-887.
- Tveit, H., Dick, G., Skibeli, V., and Prydz, K. (2005). A proteoglycan undergoes different modifications en route to the apical and basolateral surfaces of Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* **280**, 29596-29603.

- Urban, J., Parczyk, K., Leutz, A., Kayne, M., and Kondor-Koch, C. (1987). Constitutive apical secretion of an 80-kD sulfated glycoprotein complex in the polarized epithelial Madin-Darby canine kidney cell line. *J Cell Biol* **105**, 2735-2743.
- van Meer, G., and Simons, K. (1986). The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells. *Embo J* **5**, 1455-1464.
- Vuong, T. T., Prydz, K., and Tveit, H. (2006). Differences in the apical and basolateral pathways for glycosaminoglycan biosynthesis in Madin-Darby canine kidney cells. *Glycobiology* **16**, 326-332.
- Wang, E., Brown, P. S., Aroeti, B., Chapin, S. J., Mostov, K. E., and Dunn, K. W. (2000). Apical and basolateral endocytic pathways of MDCK cells meet in acidic common endosomes distinct from a nearly-neutral apical recycling endosome. *Traffic* **1**, 480-493.