

Mastergradsoppgave i molekylær biovitenskap
studieretning molekylærbiologi

Sorteringsstudier av serglysin-varianter i MDCK II-celler

Gro Live Fagereng

Omfang: 60 studiepoeng

Institutt for molekylær biovitenskap
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet
UNIVERSITETET I OSLO 12/2008



FORORD

Arbeidet presentert i denne oppgaven ble utført ved Institutt for molekylær biovitenskap, Universitetet i Oslo, under veiledning av professor Dr. scient Kristian Prydz og Dr. scient Heidi Tveit.

Først og fremst vil jeg takke professor Dr. scient Kristian Prydz og Dr. scient Heidi Tveit for å ha veiledet meg gjennom masterprosjektet. Takk for all oppfølging, råd og støtte. Jeg har lært enormt mye.

Dernest vil jeg takke alle på ”PG” gruppa. Dere er en fantastisk gjeng og jeg har kost meg masse sammen dere. Jeg vil spesielt takke Karéne Jensen for et godt vennskap og en herlig studietid.

Så vil jeg takke alle som har gjort kveldene og helgene på universitetet til en glede. Alf, Lise, Lene, Monica, Raimonda, Sanja, Betol og Helene dere vil alltid ha en spesiell plass i mitt hjerte.

Takk til alle mine venner fra politikken. Kjære Eirik N, Jokke, Brage, Christian S, DaSilva og Kenneth, vit at dere gjør i hvert fall min verden til et bedre sted.

Takk til venner og familie. Spesielt til mine tre beste venner Mira, Tuva og Thea, og ikke minst min kjære familie Pappa, Brage, Mamma, Vebjørn og Elisabeth dere står mitt hjerte nærmest.

Til sist vil jeg takke Eirik Ovrum fordi du er den fantastiske personen du er.

Oslo, 3. November

Gro Live Fagereng

SAMMENDRAG

Epitelcellelinjen "Madin-Darby canine kidney (MDCK)" er en velstudert polarisert cellelinje som danner tette cellelag med separate apikale og basolaterale membrandoméner. Proteoglykaner sorteres til både den apikale og den basolaterale side i MDCK-celler, men mekanismene bak sorteringen og transporten er i stor grad ukjente. Tidligere arbeid i forskningsgruppa har vist at mesteparten av det sekretoriske proteoglykanet serglysin skilles ut apikalt fra MDCK II-celler og at glykosaminoglykan (GAG)-kjedene hovedsakelig er kondroitinsulfat (CS)-kjeder (Tveit et al. 2005). Det ble videre vist at CS-kjedene som ble isolert fra serglysin i det basolaterale mediet var kortere, men betydelig mer sulfaterte enn de som var transportert apikalt. Det var også forskjeller i sulfateringen av linker-tetrasakkaridet til serglysin og i GAG-kjede sammensetningen (Vuong et al. 2006). Disse resultatene har åpnet for at sortering i apikal og basolateral retning kan skje tidlig i den sekretoriske vei, før GAG-kjedene er polymerisert. Dette gir grunn til å undersøke hvordan endringer i selve proteindelen av serglysin påvirker syntese og sortering av proteoglykanet. Det ble derfor konstruert plasmider med DNA som koder for ulike serglysin-varianter. Disse ble stabilt transfektert inn i MDCK II-celler og sekresjonsmønsteret ble studert. I dette arbeidet ble det vist at apikal sortering av serglysin betinger mer enn én CS-kjede. Endringer i serglysin sin proteinkonformasjon og forsterket intracellulær retensjon påvirket syntesen av GAG-kjeder, men ikke polariteten av sekresjonen.

Felles for de ulike variantene av serglysin uttrykt i MDCK-celler i denne oppgaven var at GAG-kjedene var mer sulfaterte basolateralt, uavhengig av om kjedesammensetningen var endret til bare CS-kjeder, til mer heparansulfat (HS)-kjeder eller om sorteringen var endret fra en polarisert apikal sortering til en upolarisert fordeling. Den mer intense sulfateringen av GAG-kjeder i den basolaterale sekretoriske vei i MDCK-celler ser dermed ut til å være en robust egenskap.

Serglysin kan akkumuleres tidlig i den sekretoriske vei, enten etter redusert transport av proteiner fra Golgi-apparatet til plasmamembranen med tilsetning av Brefeldin A (BFA) (upubliserte data fra forskningsgruppen) eller ved å uttrykke en serglysin-variant med en KDEL-sekvens helt C-terminalt, som utført i denne oppgaven. Når serglysin ble oppkonsentrert tidlig i den sekretoriske vei, ble noen serglysin-molekyler transportert direkte til det apikale mediet uten å passere gjennom Golgi-apparatet. Disse serglysin-molekylene ser ut til å inneholde noe av linker-regionen, men var uten polymeriserte GAG-kjeder eller modifikasjoner av linker-regionen.

FORKORTELSER

aa	Aminosyrer
AP	Adaptor-protein
BFA	Brefeldin A
bp	Basepar
BSA	Bovint serumalbumin
°C	Grader Celsius
ca.	Omtrent (Latin: <i>circa</i>)
cABC	Kondroitinase-ABC
C-terminal	Karboksylysyre-enden av et polypeptid
cm	Centimeter
CO ₂	Karbondioksid
COP	”Coat protein complex”
CRE	”Common recycling endosome”
CS	Kondroitinsulfat
Cys/met	Cystein/metionin
dH ₂ O	Destillert vann
DMEM	”Dulbecco`s modified Eagle`s medium”
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksiribonukleinsyre
dNTP	2`-deoksinukleosid-5`trifosfat
DS	Dermatansulfat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECM	Ekstracellulær matriks
EDTA	Etylen-diamin-tetra-acetat
ER	Endoplasmatisk retikulum
ERAD	ER-assistert degradering
ERES	”ER exit sites”
ERGIC	”ER-Golgi Intermediate Compartment”
et al	Og andre (Latin: <i>et alibi</i>)
EtBr	Etidium bromid
EXT	Eksostosin gen familien
FBS	Føtalt bovint serum
g	Gram
GAG	Glykosaminoglykan
GalNAc	N-acetyl-galaktosamin
GFP	Grønt fluorescerende protein
Glc	Glukose
GlcA	Glukuronsyre
GlcN	Glukosamin
GlcNAc	N-acetyl-glukosamin
GPI-anker	Glykosylfosfatidylinositol-anker
HBSS	”Hank`s Balanced Salt Solution”
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-piperazineetthanesulfonic acid)
HRP	”Horseradish peroxidase”
HS	Heparansulfat

FORKORTELSER

IC	Intermediate compartment
IdoA	Iduronsyre
IgG	Immunoglobulin G
In vivo	Prosesser i levende organismer
IP	Immunopresipitering også kalt immunofelling
kb	Kilo base par
kDa	Kilodalton
KDEL	Lysin-asparaginsyre-glutamat-leucin
KS	Keratansulfat
l	Liter
LB-medium	Luria/Bertani buljong
M6P	Mannose-6-fosfat
mA	Milliampere
Man	Mannose
mCi	Millicurie
MCS	multikloningssete
MDCK	”Madin-Darby canine kidney”
min	Minutter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	”messenger ribonucleic acid”
MQ-vann	MilliQ-vann
N-terminal	Amino-ende av et polypeptid
NaOH	Natriumhydroksid
NDST	”N-deacetylase-N-sulfotransferase”
ng	nanogram
nm	Nanometer
OD	”Optical density”
ON	Over natt
PAPS	”3`-phosphadenosine-5`-phosphosulfate”
PBS	”Phosphate-Buffered Salines”
PCR	Polymerase kjedereaksjon
PIPES	1,4-Peperazindietansulfonsyre
PVDF-membran	Polyvinylidendifluorid-membran
rGH	”rat growth hormone”
rpm	Rotasjoner per minutt
sek	Sekunder
SDS	Natrium dodecylsulfat
SDS-PAGE	Natrium dodecylsulfat polyakrylamid gelelektroforese
SOB	”Super Optimal Broth medium”
SRP	”Signal recognition particle”
TAE-buffer	Tris-Acetat-EDTA-buffer
TBS	”Tris-bufret salin”
tER	Transitionalt endoplasmatisk retikulum
TGN	<i>Trans</i> -Golgi nettverk
Tris	Tris (hydroksymetyl) aminometan
TTBS	Tris-Bufret salin tilsatt Tween 20
µg	Mikrogram

FORKORTELSER

μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
UTR	”Untranslated region”
UV-lys	Ultrafiolett lys
V	Volt
VIP36	Vesikulært intergralt membranprotein, 36 kDa
VSV-G	Vesikulær stomatitis virus glykoprotein
VTC	”Vesicular-tubular cluster”
WB	Western blott

INNHALDSFORTEGNELSE

FORORD	3
SAMMENDRAG.....	5
FORKORTELSER	7
INNHALDSFORTEGNELSE	11
1.0 INNLEDNING.....	15
1.1 EPITELCELLER.....	15
1.1.1 Generelt om epitelceller.....	15
1.1.2 Madin-Darby canine kidney (MDCK)-celler	16
1.2 DEN SEKRETORISKE VEI	16
1.2.1 Det endoplasmtiske retikulum (ER)	17
1.2.2 ERGIC	19
1.2.3 Golgi-apparatet	19
1.2.4 Transport fra <i>trans</i> -Golgi-nettverk (TGN)	21
1.3 POLARISERT TRANSPORT.....	22
1.3.1 Basolaterale sorteringssignaler	22
1.3.2 Apikale sorteringssignaler	22
1.3.3 Hvor skjer sorteringen av proteiner til apikal og basolateral side	24
1.4 SORTERING TIDLIG I DEN SEKRETORISKE VEIEN	25
1.5 PROTEOGLYKANER.....	26
1.5.1 Syntese av linker-regionen	26
1.5.2 Syntese av GAG-kjeder	27
1.5.3 Modifisering av linker-region og GAG-kjeder.....	28
1.5.4 Serglysin	29
MÅLET MED OPPGAVEN	31
2.0 METODER.....	33
2.1 ARBEID MED MIKROORGANSIMER	33
2.1.1 Tillaging av vekstskåler.....	33
2.1.2 Dyrking av bakteriestammer fra vekstskåler	34
2.1.3 Oppdyrking av <i>E. coli</i> fra frysekultur.....	34
2.1.4 Oppbevaring av <i>E. coli</i> i frysekultur	34
2.1.5 Transformering av DNA i <i>E. coli</i> -celler.....	34
2.1.5.1 Tillaging av kompetente <i>E. coli</i> -celler.....	35
2.1.5.2 Transformering av kompetente <i>E. coli</i> -celler	36
2.2 ARBEID MED DNA	36
2.2.1 ”Kvikksjekk”-metoden	36
2.2.2 Plasmidisolering	36
2.2.3 Agarosegelelektroforese	37
2.2.4 Rensing av DNA-fragmenter fra agarosegel	38
2.2.5 Kvantitering av DNA-konsentrasjon	38
2.3 SUBKLONING AV SERGLYSIN DNA	39

INNHOLDSFORTEGNELSE

2.3.1	Polymerase chain reaction (PCR).....	39
2.3.2	Restriksjonskutting av DNA.....	40
2.3.3	Ligering	41
2.4	SEKVENSERING	42
2.5	CELLEDYRKNINGSTEKNIKKER.....	42
2.5.1	Opptining av celler	42
2.5.2	Nedfrysning av MDCK II-celler.....	42
2.5.3	Trypsinering av MDCK II-celler.....	42
2.5.3.1	Trypsinering av MDCK II-celler i 75 cm ² /25 cm ² flasker	43
2.5.3.2	Trypsinering av MDCK II-celler i skåler.....	43
2.5.3.3	Trypsinering av MDCK II-celler i 6-brønners plater.....	43
2.5.4	Dyrkning av celler på filter.....	44
2.5.5	Høsting av MDCK II-celler på filter	44
2.5.6	Transfeksjon av MDCK II-celler.....	45
2.5.6.1	Transient transfeksjon med elektrisk puls.....	46
2.5.6.2	Stabil transfeksjon med FuGENE™ 6	46
2.5.6.3	Stabil transfeksjon med FuGENE™ HD	47
2.5.6.4	Fortynningsrekke av stabilt transfekterte celler	47
2.5.6.5	Plukking av positive kolonier av transfekterte celler.....	48
2.5.6.6	Identifisering av positive kolonier med tilfredsstillende uttrykk av serglysin ⁴⁹	
2.6	PROTEINANALYSER	49
2.6.1	Metabolsk innmerkning med radioaktiv isotop.....	49
2.6.2	Natrium dodecylsulfat polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE)	50
2.6.3	Rensing av proteiner	51
2.6.3.1	Immunfelling (IP) med Protein-A-sepharosekuler.....	51
2.6.3.2	Semi-dry Western Blotting (WB)	52
2.6.3.3	Stripping av membran.....	54
2.6.3.4	TrueBlot.....	54
2.6.4	Analyse av GAG-kjeder	56
2.6.4.1	Kondroitinase-ABC (cABC) behandling.....	56
2.6.4.2	HNO ₂ -behandling.....	56
2.6.4.3	NaOH-behandling.....	57
2.6.4.4	Behandling av MDCK II-celler med Brefeldin A.....	57
2.7	LOKALISERING AV PROTEINER I LEVENDE CELLER MED KONFOKALMIKROSKOP	
	57	
2.7.1	Ko-lokalisering av serglysin med ulike markører	57
3.0	RESULTATER	59
3.1	SUBKLONING AV SERGLYSIN-KONSTRUKTER.....	61
3.1.1	Subkloning av SG-UGAG	62
3.1.2	Subkloning av SG-1GAG	63
3.1.3	Subkloning av SG-KDEL.....	66
3.2	STABIL TRANSFEKSJON AV SERGLYSIN-KONSTRUKTENE	67
3.3	PROTEINDELEN OG SUKKER-KJEDENES INNFLYTTELSE PÅ SYNTES OG SORTERING	
	AV SERGLYSIN.....	69
3.3.1	Proteinkonformasjonens innflytelse på syntese og sortering av serglysin. 70	
3.3.1.1	Sortering av SG-SS.....	70

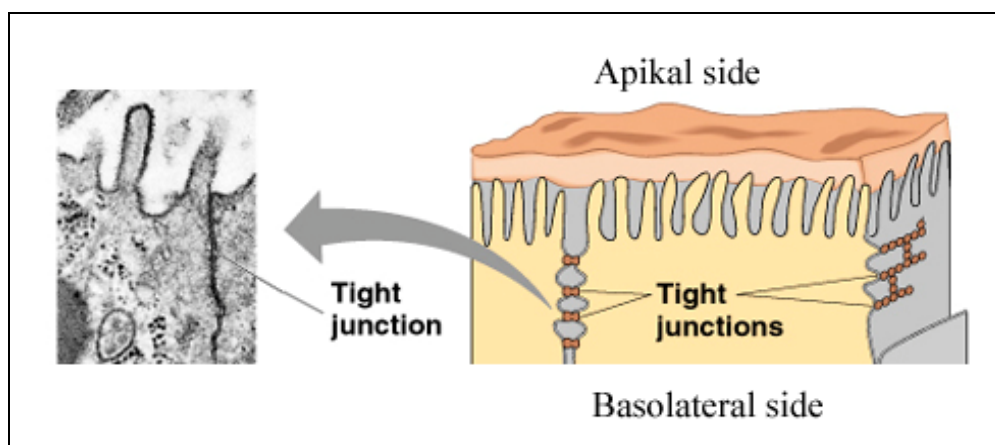
3.3.1.2 GAG-syntese på SG-SS	71
3.3.1.3 Antall GAG-kjeder og GAG-kjedelengden på serglysin	73
3.3.2 GAG-kjedenes påvirkning på syntese og sortering av serglysin.....	76
3.3.2.1 Sortering av serglysin uten GAG-kjeder.....	76
3.3.2.2 Sortering av SG-1GAG.....	77
3.3.2.3 GAG-syntese på SG-1GAG	78
3.4 SERGLYSIN TIDLIG I DEN SEKRETORISKE VEIEN.....	81
3.4.1 GAG-kjeder på SG-KDEL	82
3.4.2 GAG-modifikasjon av SG-KDEL	82
3.4.2.1 Sulfatering av GAG-kjedene til SG-KDEL	83
3.4.3 Sekreterte SG-KDEL	84
3.4.3.1 Sortering av sekreterte SG-KDEL	84
3.4.3.2 GAG-analyse av sekreterte SG-KDEL	85
3.4.4 Transporten til uglykosylert sekretert SG-KDEL.....	87
4.0 DISKUSJON.....	89
4.1 BETYDNINGEN AV DEN N-TERMINALE DISULFIDBROEN FOR SYNTese OG SORTERING AV SERGLYSIN	90
4.2 SUKKERKJEDENES PÅVIRKNING PÅ GAG-KJEDE-SYNTese OG SORTERING AV SERGLYSIN	91
4.3 SERGLYSIN TIDLIG I DEN SEKRETORISKE VEIEN.....	92
4.4 MODIFISERINGEN AV SERGLYSIN	93
4.5 TIDLIG SORTERING AV SERGLYSIN.....	94
4.6 EN VEI RUNDT GOLGI-APPARATET.....	95
VIDERE ARBEID.....	97
APPENDIKS 1.....	99
APPENDIKS 2.....	107
REFERANSER.....	117

1.0 Innledning

1.1 Epitelceller

1.1.1 Generelt om epitelceller

Epitelceller er de cellene som dekker alle kroppens ytre og indre overflater, slik som hud, svelg og tarmen. De danner tette cellelag som fungerer som selektive barrierer mellom kroppen og det ytre miljø. Epitelceller er bundet tett sammen ved hjelp av "tight junctions" (Gumbiner 1987). "Tight junctions" er et proteinkompleks som ligger som et belte rundt den øverste delen av en epitelcelle (Figur 1.1), og består blant annet av cadheriner som er kalsiumavhengige adhesjonsproteiner. Ved hjelp av disse og andre "tight junctions" proteiner hindrer epitelceller diffusjon av molekyler over cellelaget, men tillater selektiv passasje av ulike substanser.



Figur 1.1 "Tight junctions". "Tight junctions" danner en barriere på plasmamembranen som hindrer diffusjon av molekyler mellom det apikale og det basolaterale doménet. Bildet er hentet fra <http://www.fig.cox.miami.edu>

Plasmamembranen til epitelceller deles inn i tre områder. Det området av plasmamembranen som vender inn mot vevene i kroppen og forankrer epitelcellene til underliggende vev kalles det basale doménet, det området som ligger inntil nabocellene kalles det laterale doménet, og det som vender utover mot den ytre verden, inkludert kroppens indre hulerom, kalles det apikale doménet. Det basale og det laterale doménet henger sammen og omtales ofte samlet som det basolaterale doménet. Det apikale doménet er atskilt fra de andre doménene, fordi "tight junctions" hindrer lateral diffusjon av molekyler mellom det apikale doménet og det basolaterale doménet av plasmamembranen. Epitelceller betegnes som polariserte celler, fordi den apikale og den basolaterale delen av plasmamembranen har ulik protein- og lipid-sammensetning. Epitelcellene er festet til underlaget ved hjelp av

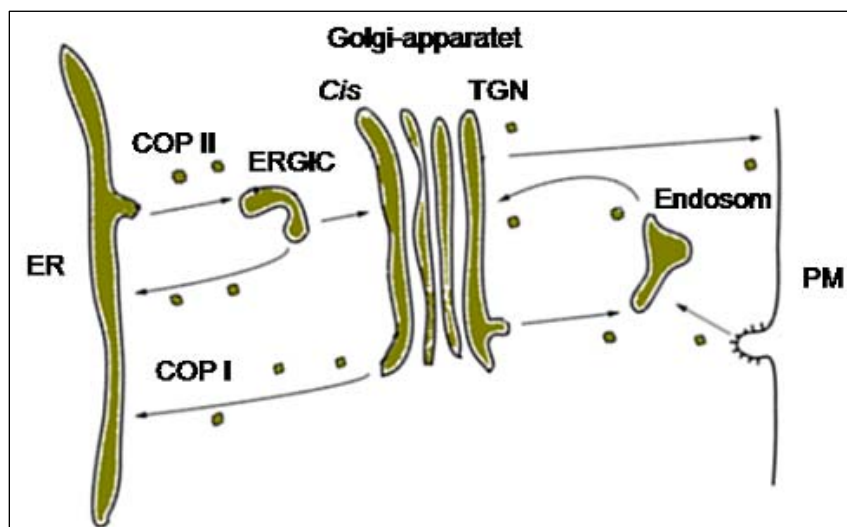
forankringer til den ekstracellulære matriks (ECM), blant annet ved hjelp av en klasse glykoproteiner som kalles integriner (Schoenenberger et al. 1994).

1.1.2 Madin-Darby canine kidney (MDCK)-celler

MDCK-celler er en heterogen cellelinje av nyreepitelceller isolert fra en hund (cocker spaniel) i 1958. MDCK-cellene er polariserte epitelceller som danner tette enkelt-cellelag i kultur, noe som gjør dem til et velegnet modellsystem for å studere polarisert intracellulær transport (Cereijido et al. 1978). Det foreligger to hovedvarianter av cellelinjen, MDCK I- og MDCK II-celler (Barker and Simmons 1981). Variantene har enkelte fysiologiske forskjeller som kommer av at de stammer fra forskjellige deler av nyretubuli. MDCK I-cellene har høyere elektrisk motstand over cellelaget, og har fellestrekk med celler fra distale tubuli og samlekanalen i urinveiene. MDCK II-celler har lavere elektrisk motstand over cellelaget og likner mer på cellene i proksimale tubuli i urinveiene (Richardson et al. 1981). Den elektriske motstanden over cellelaget reflekterer graden av passiv ionestrøm mellom cellene i cellelaget. MDCK II-celler har dermed større lekkasje av ioner enn MDCK I-celler.

1.2 Den sekretoriske vei

En celle er en kompleks og dynamisk struktur som er avhengig av å kontinuerlig produsere nye proteiner og lipider for å overleve. Proteinene som skal ut av cellen, til plasmamembran eller til lysosomer blir transportert inn i endoplasmatisk retikulum (ER) og gjennom den sekretoriske vei (Palade 1975). En oversikt over den sekretoriske vei finnes i figur 1.2.



Figur 1.2 Oversikt over den sekretoriske vei. Proteiner som skal ut av cellen, til plasmamembranen eller til lysosomer, transporteres gjennom den sekretoriske vei. ER: Endoplasmatisk retikulum. ERGIC: "ER-Golgi Intermediate Compartment". COP: "coat protein complex." TGN: *Trans*-Golgi nettverk. PM: plasmamembranen. Figuren er modifisert fra <http://www.biochemsoctrans.org/bst/033/0639/bst0330639f02.htm?resolution>

1.2.1 Det endoplasmatiske retikulum (ER)

Proteiner som skal gjennom den sekretoriske vei har vanligvis en N-terminal signalsekvens. Dette gjør at når proteinet syntetiseres i ribosomene, vil "signal recognition particle" (SRP) gjenkjenne signalsekvensen dette medfører en translasjonspause, og proteinet blir kotranslasjonelt translokert gjennom ER membranen og inn i ER lumen (Walter and Johnson 1994).

Flere ulike post-translasjonelle modifikasjoner av et protein kan skje i ER. Mange proteiner blir N-glykosylerte, og får dermed bundet oligosakkaridet $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ på asparagin til et bindingssete for N-glykaner. Dette bindingssetet består av aminosyresekvensen asparagin-x-serin/treonin (revidert av (Kornfeld and Kornfeld 1985)). Noen proteiner har en hydrofob C-terminal sekvens som forankrer proteinet i ER membranen etter translokering. Denne C-terminale sekvensen kan kuttes av og erstattes med et glykosylfosfatidylinositol (GPI)-anker, dersom proteinet har en signalsekvens som favoriserer dette. GPI-ankeret gjør at proteinet fortsatt er membranbundet (Low 1989).

For proteiner henger konformasjon og funksjon tett sammen, og cellen er derfor helt avhengig av at proteinene foldes riktig. Proteiner som transporteres inn i den sekretoriske vei foldes til sin teritærstruktur i ER. Her finnes det proteinfamilier som disulfidisomerasefamilien, som katalyserer dannelsen av disulfidbroer, samt flere familier av chaperoner, som calnexin/calreticulin. Disse chaperonene hjelper proteinene å folde seg til sin riktige konformasjon. Den rådende oppfatningen er at korrekt folding av et protein vanligvis er nødvendig for transport videre fra ER. Chaperonene holder feil-foldete proteiner tilbake og bidrar til deres "ER-assisterte"

INNLEDNING

degradering (ERAD). ERAD involverer gjenkjennelse av misfoldede proteiner, deglykosylering og retrotranslokering av proteinet til cytoplasma for ubiquitinylering, fulgt av proteindegradering ved hjelp av proteasomer. Kontrollen av proteinfolding er koblet sammen med endringer i N-glykan strukturen, for proteiner som har slik modifikasjon. For mens N-glykosylerte proteiner oppholder seg i ER, trimmes de to terminale glukose-enhetene av før calnexin/calreticulin binder. Ved riktig folding av proteinet, spaltes den siste glukose-enheten og muligens en mannose-enhet av fra proteinet, som så er klart for å transporteres ut av ER (revidert av (Williams 2006)).

Transporten av riktig foldete sekretoriske proteiner ut av ER skjer med variabel hastighet (Lodish et al. 1983), og uten at ER mister mange av sine egne proteiner (Pelham 1995). Dette er en selektiv transport av proteiner ut av ER som kan være avhengig av faktorer som "lipid rafts" (særskilt kolesterol- og glykosfingolipid-rike mikrodoméner (Simons and Ikonen 1997)), oligomerisering av proteiner og sorteringssignaler i proteinet. Transporten av GPI-forankrede proteiner ut av ER er foreslått å være avhengig av "lipid rafts" (Sutterlin et al. 1997), mens komplekse proteiner, som T-celle reseptorer, er avhengige av å oligomerisere før de får forlate ER (Hurtley and Helenius 1989). Det er også vist at flere enzymer som er involvert i de samme post-translasjonelle modifikasjoner i Golgi-apparatet oligomeriserer før de forlater ER (de Graffenried and Bertozzi 2004). I tillegg er det beskrevet signaler i proteinsekvenser som fremmer eksport av proteiner ut av ER. Det transmembrane lektinet ERGIC 53, som sirkulerer mellom ER og "ER-Golgi Intermediate Compartment (ERGIC)", er avhengig av et difenylalanin motiv i sin C-terminale hale for å kunne forlate ER (Kappeler et al. 1997), mens vesikulær stomatitis virus glykoprotein (VSV-G) har to sure aminosyrer i sin cytoplasmiske hale som er nødvendige for transport ut av ER (Nishimura and Balch 1997).

Eksporten av proteiner fra ER skjer fra spesialiserte områder i den glatte ER membranen kalt "ER exit sites" (ERES) eller "transitional ER" (tER) (Palade 1975). ERES finnes flere steder i ER membranen, men de er konsentrert i området nærmest *cis*-Golgi (Hammond and Glick 2000). Transporten av proteiner fra ER til ERGIC skjer i "coat protein complex (COP)" II vesikler (Barlowe et al. 1994). COP II komponenter er vist å binde seg til proteiner som skal transporteres ut av ER (Kuehn et al. 1998), og sekretoriske proteiner oppkonsentreres i COP II vesikler ved hjelp av sorteringsreseptorer (Belden and Barlowe 2001). I tillegg til COP II vesikler er det også observert store, tubulære strukturer som inneholder proteiner som skal ut av ER (Presley et al. 1997).

1.2.2 ERGIC

ERGIC (også kalt ”intermediate compartment”; IC og ”vesicular-tubular cluster ”; VTC) er et membransystem som ligger mellom ER og Golgi-apparatet, og som kan skilles fra ER og Golgi membranene både ved subcellulær fraksjonering og ved biokjemiske analyser (Schweizer et al. 1991). Både COP I og COP II vesikler dannes på ERGIC membranen. COP I vesikler er involvert i den retrograde transporten tilbake til ER, mens COP II vesikler frakter proteiner fra ER til ERGIC (Scales et al. 1997). Funksjonen til ERGIC er omdiskutert. En modell foreslår at ERGIC er en dynamisk struktur som dannes ved fusjon av COP II vesikler, og som igjen fusjonerer med eller blir til *cis*-Golgi (Scales et al. 1997). Et alternativt syn er at ERGIC fungerer som en stabil sorteringsstasjon mellom den retrograde transporten tilbake til ER og den anterograde transporten til Golgi-apparatet (Appenzeller-Herzog and Hauri 2006).

Både den anterograde transporten til Golgi-apparatet og den retrograde transporten tilbake til ER er signalavhengig. Mange proteiner som sirkulerer tidlig i den sekretoriske vei har aminosyresekvensen lysin-asparaginsyre-glutamat-leucin (KDEL) helt C-terminalt i proteinet, for å kunne transporteres tilbake til ER (Pelham 1989). Den retrograde transporten av proteiner med KDEL-sekvens medieres av KDEL-reseptoren som binder KDEL-sekvensen, og transporterer proteinet tilbake til ER i COP I vesikler (Munro and Pelham 1987; Lewis et al. 1990). Binding av KDEL-reseptoren til KDEL-sekvensen er pH-avhengig (Wilson et al. 1993). ER har en nøytral pH på 7,4, mens lumen i ERGIC er surere enn i ER, men ikke like sur som lumen i *trans*-Golgi nettverk (TGN) som har en pH på 6,4 (Wu et al. 2001). Dermed finnes det en pH-gradient langs den sekretoriske vei, denne pH-gradienten er nødvendig for at reseptorer skal kunne binde og slippe målproteiner, og det er vist at nøytralisering av pH-gradienten hindrer dissosiering av glykoproteiner fra reseptorer i ERGIC (Appenzeller-Herzog et al. 2004).

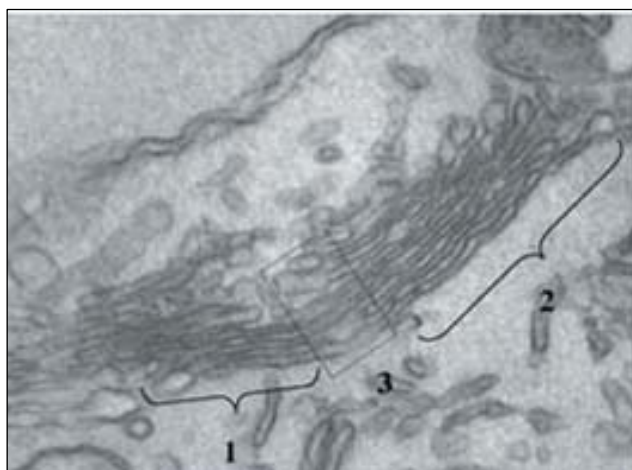
1.2.3 Golgi-apparatet

Golgi-apparatet er et organellesystem i eukaryote celler, bestående av membranomsluttede cisterner, som modifiserer og sorterer proteiner og lipider (Figur 1.3). Golgi-apparatet består av flere ”stacks” med flate, plateliknende cisterner (på latin: *cisterna*; *cisternae* i flertall). Organiseringen av Golgi-apparatet varierer mellom ulike cellyper, men i de fleste pattedyrceller er Golgi-apparatet lokalisert i nærheten av kjernen og består av en eller flere ”stacks” med *cisternae* som er bundet sammen med tubulære forbindelser (Farquhar and Palade 1981).

INNLEDNING

De fleste sekretoriske proteiner blir post-translasjonelt modifisert, og mange av disse modifikasjonene skjer i Golgi-apparatet, spesielt glykosyleringsmekanismer. I Golgi-apparatet modifiseres N-glykaner (revidert av (Kornfeld and Kornfeld 1985)), O-glykaner syntetiseres og modifiseres (Hang and Bertozzi 2005)) og glykosaminoglykan (GAG)-kjedene til proteoglykaner syntetiseres og modifiseres (revidert av (Prydz and Dalen 2000)).

Hver ”stack” i Golgi-apparatet kan deles inn i tre områder; *cis*-Golgi, *medial*-Golgi og *trans*-Golgi. Det siste området går over i TGN. Når proteiner transporteres gjennom Golgi-apparatet blir de modifisert, og de ulike modifiseringene skjer i forskjellige områder av Golgi-apparatet. Det er vist at mengden komplekse karbohydratstrukturer øker fra *cis*- til *trans*-Golgi (Rambourg et al. 1969), og at glykosyleringsenzymene er ulikt fordelt mellom de ulike områdene i en ”stack” (Roth and Berger 1982). Mengden kolesterol og sfingolipider i Golgi-membranen øker også mot *trans*-Golgi, noe som antakelig bidrar til at membranen i *trans*-Golgi er tykkere (Nezil and Bloom 1992).

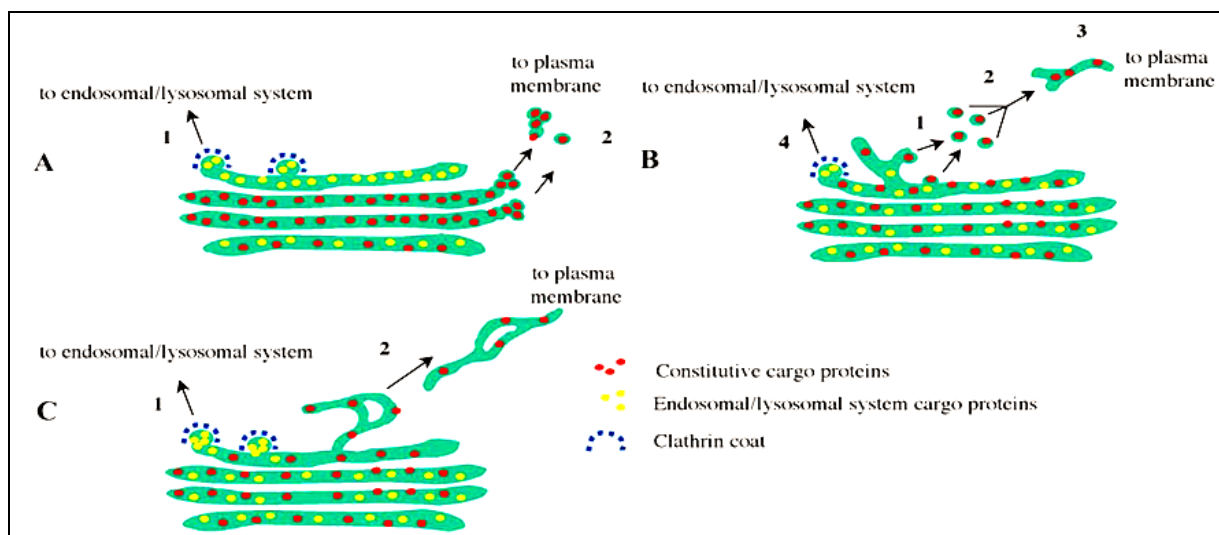


Figur 1.3 Golgi-apparatet. Golgi-apparatet kan bestå av flere ”stacks” (1 og 2) som er bundet sammen av tubulære strukturer (3). Bildet er modifisert fra (Polishchuk and Mironov 2004).

Det er to hovedmodeller for hvordan proteiner blir transportert gjennom Golgi-apparatet. I den ene modellen antar man at *cisternae* i Golgi-apparatet er statiske og at proteinene som skal gjennom Golgi-apparatet transporteres ved hjelp av vesikler mellom disse *cisternae* (Rothman and Wieland 1996). I den andre modellen ser man *cisternae* som dynamiske strukturer som i sin helhet beveger seg gjennom Golgi-apparatet. Proteinene oppholder seg da kun i en *cisternae*, mens enzyminnholdet endres ved at vesikler transporterer enzymene bakover fra en eldre *cisternae* til en yngre (Glick and Malhotra 1998). Nyere modeller forsøker å forene elementer fra begge disse modellene.

1.2.4 Transport fra *trans*-Golgi-nettverk (TGN)

Fra TGN transporteres proteiner i ulike hovedretninger: til endosomer og lysosomer, til plasmamembranen og ut av cellen. Det dannes vesikler både fra TGN og fra de *cisternae* som ligger helt på *trans*-siden av Golgi-apparatet, men vesikler med kappeproteinene clathrin dannes kun på TGN (Ladinsky et al. 1999). Tre modeller beskriver mulige transportruter fra TGN. Den første modellen foreslår at proteiner som skal i retning av endosomer/lysosomer transporteres i clathrinvesikler fra TGN, mens proteiner som skal til plasmamembranen transporteres i andre vesikler fra de to siste *cisternae* på *trans*-siden (Figur 1.4 A). Den andre modellen foreslår at alle proteiner forlater TGN i vesikler, men at vesiklene som inneholder proteiner som skal til plasmamembranen fusjonerer med hverandre (Figur 1.4 B). Den tredje modellen foreslår at clathrinvesikler inneholder proteiner som skal til endosomer/lysosomer, mens proteiner som skal til plasmamembranen forlater TGN i tubulære strukturer (Figur 1.4 C) (revidert av (Polishchuk and Mironov 2004)).



Figur 1.4 Oversikt over de tre modellene for transport fra TGN. Bildet er hentet fra (Polishchuk and Mironov 2004).

1.3 Polarisert transport

I polariserte celler har den apikale og den basolaterale delen av plasmamembranen ulik oppbygning. Denne forskjellen opprettholdes ved hjelp av polarisert transport av nysyntetiserte og resirkulerte proteiner og lipider (revidert av (Campo et al. 2005)).

1.3.1 Basolaterale sorteringssignaler

De fleste basolaterale sorteringssignaler som er identifisert består av aminosyrer i proteinkjeden. Det er funnet både tyrosin-baserte signaler (Brewer and Roth 1991) og leucin-baserte signaler (Hunziker Walter 1994; Wehrle-Haller and Imhof 2001). Flere av de basolaterale sorteringssignaler interagerer med adaptorprotein (AP)-komplekser (Folsch et al. 1999). AP-kompleksene er en familie proteinkomplekser som medierer sortering ved celleoverflaten og intracellulært (Traub 2005). AP1, AP3 og AP4 er lokalisert til TGN og endosomer, mens AP2 finnes på plasmamembranen. Både AP1, AP3 og AP4 er foreslått å delta i basolateral sortering (Nishimura et al. 2002; Simmen et al. 2002). AP1 har en epitelcelle-spesifikk subenhet, 1 μ B som er nødvendig for korrekt sortering av flere basolaterale proteiner, som LDL-reseptoren (Folsch et al. 1999; Ohno et al. 1999).

1.3.2 Apikale sorteringssignaler

I motsetning til de basolaterale sorteringssignalene, er de fleste foreslåtte apikale sorteringssignaler post-translasjonelle modifikasjoner som GPI-ankere, N-glykaner og O-glykaner.

GPI-forankrede proteiner finnes hovedsakelig i det apikale doménet av plasmamembranen i MDCK-celler (Brown et al. 1989). Innføring av bindingssete for GPI-anker i proteiner som normalt ikke har dette, fører til apikal sortering av flere proteiner som tidligere ikke har blitt transportert apikalt (Lisanti et al. 1989). N-glykaner kan også i mange tilfelle fungere som apikalt sorteringssignal. Innføring av to bindingsseter for N-glykaner endrer sorteringen til veksthormon fra rotte (rat growth hormone; rGH) fra å skilles ut upolarisert til å bli sortert apikalt, når dette proteinet uttrykkes i MDCK-celler (Scheiffele et al. 1995). Noen av de GPI-forankrede proteinene er også avhengige av N-glykaner for å sorteres apikalt (Benting et al. 1999). For andre proteiner er det O-glykaner, og ikke N-glykaner, som kreves for å gi apikal sortering (Alfalah et al. 1999; Yeaman et al. 1997). For noen apikale proteiner er det påvist et apikalt sorteringssignal i proteinkjeden. Både den cytoplasmatiske halen (Takeda et al. 2003) og det transmembrane doménet kan inneholde et slikt sorteringssignal (Kundu et al. 1996).

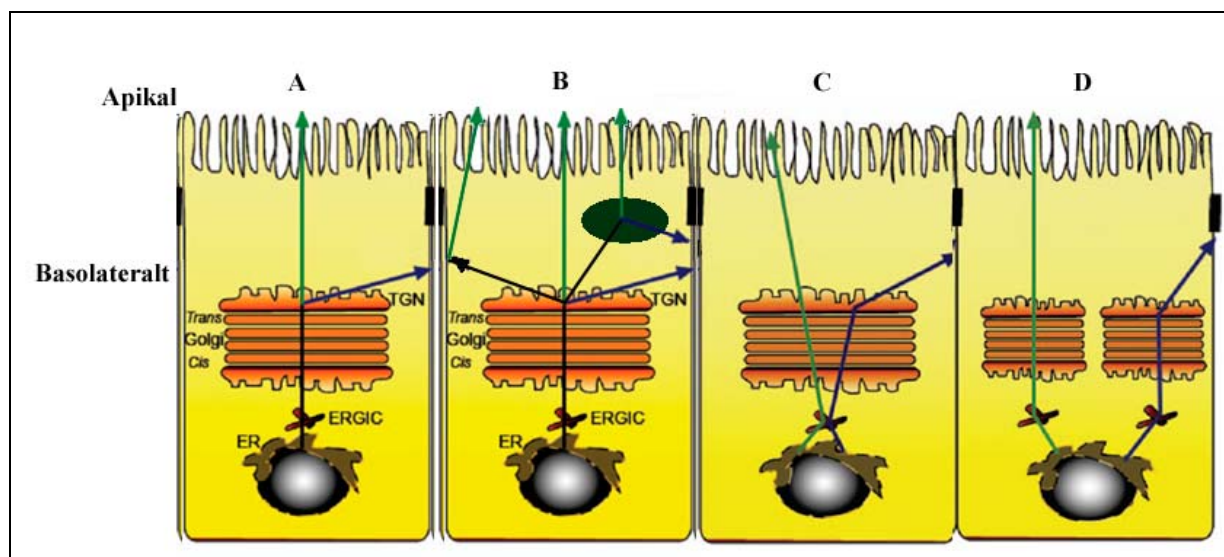
Siden den apikale delen av plasmamembranen er rik på sfingolipider og kolesterol, har det vært foreslått at proteiner selektivt kan inkorporeres i "lipid rafts" som transporteres til den apikale membranen (Simons and VanMeer 1988). Det er vist at sortering og transport i denne retningen er ekstra følsom for reduksjon av kolesterol- og sfingolipid-nivået (Mays et al. 1995; Keller and Simons 1998). Det at "lipid rafts" er rike på kolesterol, kan gjøre at membranen er tykkere i slike områder av membranen, og at lengden på det transmembrane doménet derfor er avgjørende for assosiering til "lipid rafts" (Scheiffele et al. 1997; Barman and Nayak 2000). Proteiner som normalt sorteres apikalt, for eksempel GPI-forankrede proteiner, assosieres med "lipid rafts" før de når plasmamembranen (Brown and Rose 1992). Det er vist at GPI-forankrede proteiner ikke bare er avhengige av "lipid rafts" for apikal sortering, men at de også må oligomeriseres (Hannan et al. 1993; Paladino et al. 2004). Proteiner kan være avhengige av sorteringsreseptorer som trenger å knytte flere proteiner til seg for og kunne assosieres med "lipid rafts".

Hos noen proteiner som får satt på mer enn en N-glykan kjede, er det vist at ikke alle N-glykan kjedene nødvendigvis bidrar til den apikale sorteringen. Mutasjoner i erythropoietin uttrykt i MDCK-celler har vist at bare ett av tre N-glykanseter er viktig for den apikale sorteringen (Kitagawa et al. 1994). For endolyn er det vist ved inaktivering at bare to av åtte N-glykanseter påvirker den apikale sorteringen (Potter et al. 2004). Siden N-glykaner kan spille en rolle i foldingen av proteinet, kan det være at glykanenes rolle i sortering først og fremst er indirekte, fordi de påvirker foldingen av proteinet. Ved fjerning av det basolaterale sorteringssignalet, vil noen proteiner holdes igjen i Golgi-apparatet (Gut et al. 1998). Proteiner som har både basolaterale og apikale sorteringssignaler får en apikal sortering når det basolaterale sorteringssignalet fjernes. Grunnen til at disse som full-lengde proteiner likevel vanligvis transporteres basolateralt, er at de apikale sorteringssignalene ofte er recessive i forhold til de basolaterale (Fiedler and Simons 1995).

1.3.3 Hvor skjer sorteringen av proteiner til apikal og basolateral side

Proteiner som transporteres gjennom den sekretoriske vei skal enten skilles ut av cellen, inkorporeres i plasmamembranen eller transporteres i retning av endosomer og lysosomer. Den rådende oppfatning er at sortering både i retning av lysosomer og til de ulike domènene av plasmamembranen skjer i TGN (Figur 1.5 A)(Griffiths and Simons 1986).

Modellen for hvordan man antar at transport og sortering av proteiner langs den sekretoriske vei foregår, har blitt modifisert flere ganger (Rodriguez-Boulan and Musch 2005). Det er for eksempel vist at i hepatocytter transporteres mange apikale proteiner først til den basolaterale membranen (Bartles and Hubbard 1988). Det er også vist at AP-kompleksene, som er involvert i basolateral sortering, sirkulerer mellom TGN og endosomer. Derfor er det foreslått at mange proteiner først transporteres til en post-Golgi sorteringsorganelle som "common recycling endosomes" (CRE), før de sorteres apikalt eller basolateralt (Figur 1.5 B) (Orzech et al. 2000; Ang et al. 2004).



Figur 1.5 Utvidet sorteringsmodell. Den rådende oppfatningen er at sortering til den apikale og den basolaterale membranen skjer i TGN (A). Senere har den rådende modellen blitt utvidet til at sortering også kan skje i post-Golgi sorteringsorganeller som CRE og ved den basolaterale membranen (B). Sorteringen kan også skje tidligere ved at proteinene sorteres til ulike områder av Golgi cisternae (C), eller at de sorteres til ulike "stacks" i Golgi-apparatet (D). Bildet er modifisert fra (Prydz et al. 2008).

Flere av de foreslåtte sorteringssignalene er post-translasjonelle modifikasjoner som settes på så tidlig i den sekretoriske veien, som i ER, og flere studier indikerer at sortering i apikal og basolateral retning også kan skje tidligere enn i TGN.

1.4 Sortering tidlig i den sekretoriske veien

Den rådende lærebok-oppfatningen er at sorteringen av apikale og basolaterale proteiner skjer i TGN eller i post-Golgi sorteringsstasjoner. Imidlertid skjer det allerede ved transport ut av ER en sortering mellom de proteinene som hører hjemme i ER og de korrekt foldete sekretoriske proteiner som skal videre i den sekretoriske vei. Flere studier som involverer mulige apikale sorteringssignaler indikerer at det skjer en sortering av apikale og basolaterale proteiner tidligere enn i TGN, kanskje så tidlig som i ER (Figur 1.5 C og D) (Ellis et al. 2006).

GPI-forankrede proteiner kan se ut til å segregeres lateralt fra andre proteiner i den sekretoriske vei allerede fra når de forlater ER. Dette er basert på observasjoner av ulik detergent-resistens, som indikerer tilhørighet til ulike lipid-omgivelser. Transporten av GPI-forankrede proteiner skiller seg også fra andre proteiner, fordi de er avhengige av COP I kappeproteiner og ceramider for transport ut av ER (Muniz et al. 2001). Både GPI-forankrede proteiner som sorteres apikalt og de som sorteres basolateralt assosieres med detergent uløselige "lipid rafts", men bare de GPI-forankrede proteinene som oligomeriserer sorteres apikalt (Paladino et al. 2004).

Det er foreslått at det skjer en grov-sortering av proteiner til "lipid rafts", og at disse "lipid rafts" deretter modnes gjennom Golgi-apparatet ved at molekyler som ikke hører hjemme fjernes (Brown and Rose 1992). Dannelsen av "lipid rafts" skjer før TGN (Muniz and Riezman 2000), kanskje så tidlig som i ER og dermed kan sortering i apikal og basolateral retning være godt i gang tidlig i den sekretoriske vei.

I ER får både apikale og basolaterale proteiner satt på seg mannoserike N-glykaner som blir modifisert videre i Golgi-apparatet. At apikale og basolaterale proteiner som ikke er ferdig modifisert i Golgi-apparatet kan skilles fra hverandre basert på deres affinitet for "lipid rafts," tyder på at de er lateralt segregert lenge før TGN (Alfalah et al. 2005). N-glykaner er også foreslått å bidra til sortering av apikale proteiner. Lektiner er proteiner som kan binde karbohydratstrukturer, og noen kan binde til N-glykaner og dermed fungere som sorteringsreseptorer. Flere mulige lektiner er foreslått å være involvert i sorteringen av N-glykaner, blant annet VIP-36, men bortsett fra M6P-reseptoren, er ikke disse lektinene lokalisert til TGN. I stedet sirkulerer flere av disse lektinene mellom ER og ERGIC (Schrag et al. 2003).

Proteoglykaner er proteiner som transporteres gjennom den sekretoriske vei og blir modifisert med GAG-kjeder i Golgi-apparatet. GAG-kjedene kan igjen modifiseres, blant annet ved sulfatering. Studier av proteoglykanet serglysin viste at det er forskjeller i GAG-kjedenes lengde og sulfateringsgrad for de serglysin-molekylene

som ble transportert apikalt i forhold til de som ble transportert basolateralt. GAG-kjedene som ble transportert basolateralt var kortere og langt mer sulfaterte enn GAG-kjedene til de molekylene som ble sortert apikalt. Forskjeller var også gjeldende for modifikasjoner som er antatt å skje tidlig i Golgi-apparatet. Dermed er det sannsynlig at sortering av serglysin skjer tidlig i den sekretoriske vei (Vuong et al. 2006; Tveit et al. 2005).

1.5 Proteoglykaner

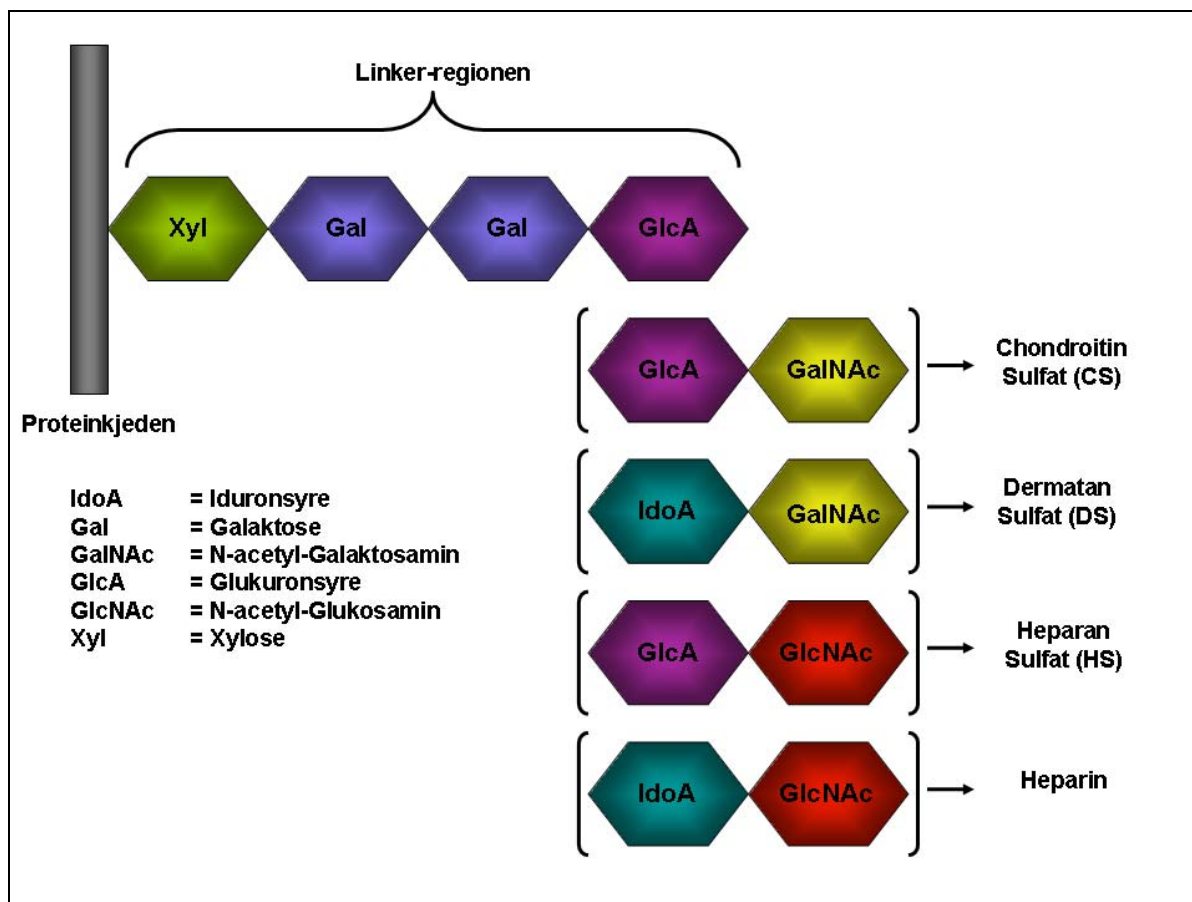
Proteoglykaner er en familie komplekse makromolekyler som har én eller flere GAG-kjeder kovalent bundet til en polypeptidkjede. Det er stor variasjon blant proteoglykaner med hensyn til størrelse, form og funksjon. Et proteoglykan kan ha over hundre GAG-kjeder, og hver GAG-kjede kan bestå av over hundre disakkarid-enheter. Ulike proteoglykaner har også ulike biologiske funksjoner, noen store sekretoriske proteoglykaner, som perlekan og versikan, er viktige komponenter i ECM, mens andre proteoglykaner, som syndekan og glypikan, sitter på celleoverflaten og er involvert i signaleringsmekanismer (Zimmermann and David 1999; Tsuda et al. 1999).

GAG-kjedene til proteoglykanene består av repeterende disakkarid-enheter. Basert på disakkarid-enhetene kan proteoglykanene deles inn i fire grupper. Hyaluronsyre, keratansulfat (KS), heparin/HS og CS/dermatansulfat (DS). Heparin/HS og CS/DS er de mest vanlige GAG-kjedene. Sulfateringsmønsteret til disakkarid-enhetene skiller heparin fra HS og DS fra CS. Hylauronsyre er egentlig ikke et proteoglykan, men bare en type GAG, fordi disse kjedene ikke er bundet til protein.

1.5.1 Syntese av linker-regionen

HS og CS har en felles linker-region som fester GAG-kjeder til proteinet (Figur 1.6). Linker-regionen består av de fire monosakkaridene xylose, galaktose, galaktose og glukuronsyre (GlcA) som er bundet sammen til et tetrasakkarid (Kjellén and Lindahl 1991). Xylose er det første monosakkaridet i linker regionen og er festet til en serin i et serin-glysin motiv i proteinkjeden. Denne koblingen er katalysert av xylosyltransferase I eller II (Gotting et al. 2000). Det første galaktose-enheten kobles til av galaktosyltransferase I, før den neste galaktose-enheten kobles til av galaktosyltransferase II (Bai et al. 2001; Almeida et al. 1999). GlcA kobles til linker-regionen av glukuronyltransferase I (Kitagawa et al. 1998). Det er de samme enzymene som syntetiserer linker-regionen for både HS- og CS-kjeder (Bai et al. 1999). Noen proteiner, som MHC klasse II, er ”deltids-proteoglykaner” og kan derfor eksistere både med og uten GAG-kjeder (Fransson 1987). Både sekvensen rundt

serin-glysin motivet og proteinkonformasjonen påvirker aktiviteten til xylosyltransferasene (Brinkmann et al. 1997).



Figur 1.6 Linker-regionen som er felles for CS/DS og HS/heparin.

1.5.2 Syntese av GAG-kjeder

Det er det første monosakkaridet som kobles på etter at linker-regionen er ferdiglaget som avgjør om GAG-kjeden blir en HS- eller CS-kjede, enzymene som setter på dette sukkeret er ikke de samme som polymeriserer resten av GAG-kjedene. Hvilke faktorer som avgjør hva slags GAG-kjede som dannes er fortsatt ikke avklart, men polymerisering av både HS- og CS-kjeder skjer i Golgi-apparatet (Spiro et al. 1991).

Den repeterende disakkarid-enheten til HS-kjeden består av N-Acetyl-glukosamin (GlcNAc) og GlcA. Det er enzymene EXT 1 og EXT 2 som utfører polymerisering av GlcNAc og GlcA (Lind et al. 1998). Syntese av HS-kjeden er antatt å skje tidligere i Golgi-apparatet enn CS-syntesen (Uhlen Hansen and Yanagishita 1993). CS-kjeder består av alternerende N-Acetyl-galaktosamin (GalNAc) og GlcA-enheter. Det er ulike kondroitinsulfat syntaser som utfører polymeriseringen av CS-kjedene (Uyama et al. 2002; Kitagawa et al. 2001). Både HS og CS har GlcA, i den repeterende

disakkaridenheten, GlcA kan omdannes til IdoA, noe som er vanlig når HS og CS omdannes videre til henholdsvis heparin og DS (Kjellén and Lindahl 1991).

Proteoglykaner får påsatt GAG-kjeder mens de transporteres gjennom den sekretoriske veien. De fire første monosakkaridene som utgjør tetrasakkaridet i linker-regionen settes på tidlig i den sekretoriske vei, et sted i ER og/eller tidlig i Golgi-apparatet, mens selve polymeriseringen og modifiseringen av GAG-kjedene skjer i Golgi-apparatet (revidert av (Silbert and Sugumaran 1995)).

1.5.3 Modifisering av linker-region og GAG-kjeder

Linker-regionen til GAG-kjedene kan modifiseres, og xylose i både CS og HS kan 2-O-fosforyleres under syntese av linker-regionen (Oegema et al. 1984; Fransson et al. 1985). Det er foreslått at fosforyleringen av xylose kan være en stabil modifisering (Ueno et al. 2001), men det har også vært hevdet at det er en transient modifisering som bare kan påvises under syntese av linker-regionen (Jonsson et al. 2003; Moses et al. 1997).

Begge galaktose-enhetene i linker-regionen til CS kan sulfateres. Den første galaktosen i linker-regionen kan modifiseres med 6-O-sulfat og den andre galaktosen kan modifiseres med 4-O eller 6-O sulfat (Sugahara et al. 1988; Dewaard et al. 1992). Det ene, eller begge, galaktosene i linker-regionen kan sulfateres, men sulfatering og fosforylering på samme tetrasakkarid er ikke blitt observert. Sulfatering av linker-regionen til HS-GAG-kjeden har ikke blitt påvist (Ueno et al. 2001).

Modifisering av sukker-enheter i GAG-kjedenes linker-region påvirker aktiviteten til enzymene som er involvert i syntesen. 2-O-fosforylering av xylose stimulerer aktiviteten til galaktosyltransferase I. 6-O-sulfatering av den første galaktose-enheten øker aktiviteten til glukuronyltransferase, mens 4-O-sulfatering av den første galaktose-enheten, og 4,6-O-disulfatering av den andre galaktose-enheten terminerer syntese av GAG-kjeden (Gulberti et al. 2005; Tone et al. 2008).

GAG-kjedene til proteoglykaner blir også modifisert, og den vanligste modifikasjonen er sulfatering. Sulfatering av GAG-kjeder gjøres av sulfotransferaser som har til felles at de alle bruker "3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS)" som sulfatdonor, men de har ulike glykansubstrater (Kusche-Gullberg and Kjellén 2003). Det er "N-deacetylase-N-sulfotransferase (NDST)" som initierer sulfatering av HS-kjeder (Pettersson et al. 1991). Det er påvist fire ulike NDST og de varierer i aktivitet og substratspesifisitet (Kusche-Gullberg and Kjellén 2003). CS-kjeder blir sulfatert av spesifikke enzymer, men ofte med mindre sulfat-tetthet enn det som er vanlig for HS-kjedene som resultat.

1.5.4 Serglysin

Serglysin er et lite, intracellulært proteoglykan på 17,6 kDa (Stevens et al. 1988). Det finnes hovedsakelig i hematopoetiske celler (Kolset and Gallagher 1990) og endotelceller (Schick et al. 2001). Serglysin har åtte mulige bindingssteder for GAG-kjeder, som vanligvis er av CS type, med unntak av i mastceller, hvor det dannes en hybrid av oversulfatert CS og heparin (Lidholt et al. 1995). GAG-kjeder festes til serin i serin-glysin bindingssteder, som er gjentatt åtte ganger i en enhet på 18 aminosyrer i midten av proteinet (Nicodemus et al. 1990). Det humane serglysin (swiss prot) består av 158 aminosyrer og genet består av tre eksoner lokalisert til kromosom 10. Det første eksonet inneholder 5`UTR og en signalsekvens (aminosyre 1-25) for ER-import. Det andre eksonet inneholder den N-terminale delen av serglysin (aminosyrene 26-73) og det tredje eksonet inneholder den C-terminale delen av serglysin, inkludert GAG-bindingssetene og 3`UTR (aminosyrene 74-152).

Det er foreslått at serglysin deltar i dannelsen (Schmidt et al. 2000), og/eller modning av sekretoriske granula (Abrink et al. 2004). ”Knock-out”-mus som mangler serglysin, utvikler seg normalt og er fruktbare, men i mastcellene er det redusert mengde proteaser og hisaminer i granula, selv om mRNA-nivået til disse proteinene er normale (Abrink et al. 2004).

MÅLET MED OPPGAVEN

Det apikale og det basolaterale doménet av plasmamembranen til epitelceller har ulike funksjoner, for eksempel når det kommer til næringsopptak og kommunikasjon. Det er også forskjeller i protein- og lipid-sammensetningen til det apikale og det basolaterale doménet. For å opprettholde denne forskjellen er epitelceller avhengige av å sortere alle nysyntetiserte og resirkulerte sekretoriske proteiner til enten det apikale eller det basolaterale doménet. Proteoglykaner er proteiner som modifiseres med lange sukkerkjeder, GAG-kjeder, i Golgi-apparatet i alle celledslag i kroppen. Proteoglykaner skiller ut både fra apikal og basolateral membranside i epitelceller.

Tidligere studier av proteoglykanet serglysin uttrykt i MDCK II-epitelceller har vist at serglysin bærer hovedsakelig CS-kjeder og har en polarisert apikal sekresjon i disse cellene. Studier av strukturen til GAG-kjedene viste at serglysin ble modifisert med lengre GAG-kjeder på vei til den apikale membranen, men GAG-kjedene på serglysin som ble skilt ut basolateralt var langt mer sulfatert (Vuong et al. 2006; Tveit et al. 2005). Disse studiene, og studier i andre laboratorier, åpnet for at sorteringen av proteiner i apikal og basolateral retning kan skje tidligere i den sekretoriske vei enn i dagens lærebokmodeller. Dersom sorteringen skjer tidlig i den sekretoriske vei, skjer den før GAG-kjedene er polymerisert og dermed kan ikke sorteringsinformasjonen finnes i HS- eller CS-kjedene, men snarere i proteindelen eller i de fire første sukkerenhetene som kobles til proteindelen og som kalles linker-regionen.

For å studere samspillet mellom proteinkonformasjon, GAG-kjede-syntese og polarisert sortering, skulle ulike varianter av serglysin konstrueres og uttrykkes i MDCK II-celler. Analysene skulle i første rekke utføres på konfluente, polariserte monolag av epitelceller dyrket på filtre, hvor makromolekyler utskilt til henholdsvis apikalt og basolateralt medium kan høstes separat. Serglysin-variantene skulle som tidligere uttrykkes med grønt fluorescerende protein (GFP) i den C-terminale delen og kan dermed alle påvises og anrikes ved hjelp av anti-GFP antistoff, enten ved Western blotting (WB) eller ved immunfelling (IP) i kombinasjon med SDS-PAGE og spesifikke degraderingsteknikker. IP utføres etter metabolsk merking med ^{35}S -sulfat eller ^{35}S -cystein/metionin (cys/met). Ved sammenlikning av disse innmerkingsmetodene, kan man bestemme sulfateringsgrad av de ulike serglysin-variantene.

For å studere proteinkonformasjonens mulige påvirkning på sorteringen, skulle to cystein-residier muteres til seriner. Disse er antatt å danne en disulfidbro i serglysin. En variant uten disulfidbro vil kunne ha en annen konformasjon enn den opprinnelige varianten, når begge uttrykkes i MDCK-celler.

MÅLET MED OPPGAVEN

For å undersøke hvordan sorteringen av serglysin avhenger av antall GAG-kjeder skulle varianter med ingen, eller med bare ett bindingssete for GAG-kjeder uttrykkes i MDCK II-celler. I tillegg skulle en serglysin-variant med en KDEL-sekvens helt C-terminalt uttrykkes, for å undersøke hvordan en forlenget oppholdstid tidlig i den sekretoriske vei påvirker syntese og sortering av GAG-kjeder.

2.0 Metoder

Metodedelen tar for seg teori og protokoller for de teknikkene som er blitt benyttet under arbeidet med denne masteroppgaven. Oppskrifter på de ulike løsningene som er brukt finnes i Appendiks 1.

2.1 Arbeid med mikroorganismer

Ved arbeid med og dyrkning av mikroorganismer er det viktig å jobbe med sterile løsninger og preparater. Grunnleggende sterilteknikker ble benyttet. Alle løsninger og alt utstyr ble autoklavert i 20 min ved 121 °C.

I denne oppgaven ble det brukt DH5α *E. coli*-bakterieceller, som kan gjøres kompetente, det vil si at de blir i stand til å ta opp ekstracellulært nakent DNA fra utsiden. På denne måten kan plasmider taes opp, oppbevares og kopieres opp i bakteriecellene. Plasmidene som ble brukt inneholdt et gen for antibiotikaresistens (ampicillin/kanamycin).

2.1.1 Tillaging av vekstskåler

Vekstskåler med LB-medium brukes til å så ut bakteriekulturer, for å kunne skille ulike bakterier i separate kolonier og LB-mediet inneholder de nødvendige næringsstoffene som *E. coli* trenger for å vokse. For å kunne velge ut bakterier som har tatt opp i seg plasmidet, tilsettes ampicillin/kanamycin. Dermed vokser kun bakterier som hadde tatt opp i seg det aktuelle plasmidet på skålen.

Prosedyre:

- LB-mediet med agar lages og autoklaveres.
- Vekstmediet avkjøles til under 50 °C og ønsket antibiotika kan tilsettes (ampicillin: 60 µg/ml, kanamycin: 50 µg/ml).
- Ønsket antall plastskåler settes frem i en sterilbenk, og vekstmediet helles over i plastskålene (halvfulle).
- Skålene settes oppå hverandre for avkjøling.
- Etter to timer snus skålene, stables i forseglede poser og lagres ved 4 °C.

2.1.2 Dyrking av bakteriestammer fra vekstskåler

Prosedyre:

I et 50 ml rør blandes:

- 5 ml LB-medium med ønsket seleksjonsmarkør (ampicillin/kanamycin).
- En bakteriekoloni plukkes med en steril pipettespiss og overføres til røret.
- Inkuberes med kraftig risting i 16-18 timer på 37 °C.

Bakteriekulturer med *E. coli* dyrkes normalt i beholdere som er 10 x større enn kulturvolumet.

2.1.3 Oppdyrking av *E. coli* fra frysekultur

Prosedyre:

- Frysekulturen hentes fra -80 °C, og oppbevares på is.
- Litt av frysekulturen overføres til et 50 ml rør med 5 ml LB-medium ved hjelp av en steril pipettespiss.
- LB-mediet med bakteriekulturen dyrkes i 16-18 timer på 37 °C ved kraftig risting.

2.1.4 Oppbevaring av *E. coli* i frysekultur

For langtidslagring av bakteriekulturer kan bakteriecellene fryses ned til -80 °C. Glycerol tilsettes bakteriekulturen for å hindre dannelsen av iskrystaller.

Prosedyre:

I et fryserør blandes:

- 850 µl fersk bakteriekultur.
- 150 µl autoklavert glyserol.
- Løsningen fryses ned til -80 °C.

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

Transformasjon er en metode for å innføre DNA i bakterieceller, slik at man kan få amplifisert plasmidet. For at bakteriecellene skal kunne ta opp plasmidet, må de være kompetente. Det finnes flere metoder for tillaging av kompetente bakterieceller, men de fleste baserer seg på behandling med iskalde løsninger som inneholder CaCl₂ og divalente kationer. Behandling med dimetylsulfoksid (DMSO) vil også kunne gjøre bakterier mer kompetente. Ved å sette blandingen av kompetente bakterieceller og plasmider på is, vil plasmidene legge seg rundt bakteriecellene. Et kort varmesjokk

gjør at bakteriene tar opp i seg plasmidet, og bakteriene settes deretter tilbake på is slik at celleveggen kan lukke seg igjen. For å selekere bakterieceller som har tatt opp plasmidet, inneholder plasmidet ofte et seleksjonsgen som gir antibiotikaresistens. Bakteriene vokser på skåler som tilsettes et antibiotikum som bare bakterieceller som har tatt opp plasmidet kan vokse i. Det brukes ofte høy-kopi plasmid som replikeres uavhengig av bakteriens eget DNA.

2.1.5.1 Tillaging av kompetente *E. coli*-celler

For å lage kompetente bakterieceller, dyrkes cellene i SOB-medium over natt (ON) til en tetthet som gir OD_{600} mellom 0,3 og 0,6. Bakteriene behandles deretter med iskald transformasjonsbuffer og DMSO. De kompetente cellene sjokkfryses ved hjelp av flytende nitrogen og lagres deretter ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Prosedyre:

- 10 – 12 bakteriekolonier plukkes fra et ferskt utstryk av bakteriestammen på SOB-skåler.
- Forkulturen lages ved å overføre kolonien til 100 ml SOB-medium i en 500 ml erlenmeyerkolbe, og inkuberes ved $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ med kraftig risting i 3-4 timer.
- OD_{600} måles etter ca. 3 timer. Deretter beregnes hvor mye av forkulturen som må tilsettes for å få $OD_{600} \approx 0,05$ i 250 ml SOB-medium.
- Kulturen inkuberes med 250 ml SOB-medium i en 1000 ml erlenmeyerkolbe ON (16 - 18 timer) ved $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ med kraftig risting. OD_{600} bør være mellom 0,3 og 0,6.
- Bakteriekulturen kjøles ned på is i 10 min og overføres til sterile sentrifugerør.
- Bakteriecellene høstes ved sentrifugering (2500 rpm) i 10 min ved $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Supernatanten fjernes og bakteriepelleten løses i 80 ml iskald transformasjonsbuffer.
- Løsningen inkuberes på is i 10 min og sentrifugeres ved 2500 rpm i 10 min ved $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Supernatanten fjernes forsiktig og pelleten løses opp i 20 ml transformasjonsbuffer.
- DMSO tilsettes til 3,5 %, løsningen blandes forsiktig og settes på is i 5 min.
- DMSO tilsettes til 7 %, løsningen blandes forsiktig og settes på is i 10 min.
- Bakteriesuspensjonen overføres til avkjølte eppendorfrør i alikvoter på $200\text{ }\mu\text{l}$ og sjokkfryses i flytende nitrogen. Oppbevares ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.
-

2.1.5.2 Transformering av kompetente *E. coli*-celler

Prosedyre:

- De kompetente bakteriecellene tines på is.
- Ligeringsløsningen blandes med bakteriecellene.
- Løsningen settes på is i 30 min.
- Bakteriecellene utsettes for et varmesjokk ved 42 °C i 1 min, og settes tilbake på is i 2-3 min.
- Bakteriecellene strykes ut på vekstskåler som er tilsatt ampicillin/kanamycin. Skålene inkuberes ved 37 °C ON.

Det kan være nødvendig å la platene stå utover neste dag for å få kolonier.

2.2 Arbeid med DNA

2.2.1 "Kvikksjekk"-metoden

"Kvikksjekk" er en enkel og rask metode for å se om mange bakteriekulturer inneholder et plasmid. Bakteriekulturene behandles med fenolkloroform-løsning som lyses bakteriene, slik at proteiner felles ut i fenolfasen, mens nukleinsyrer er i vannfasen.

Prosedyre:

I et eppendorfrør blandes:

- 100 µl bakteriekultur.
- 50 µl fenolkloroform (1:1).
- 10 µl 6 x loading buffer.

Blandingen ristes kraftig i 10 sek og sentrifugeres ved 10 000 rpm i 3 min ved romtemperatur. 25 µl av den øvre vannfasen appliseres på en 0,8 % agarosegel. Elektroforese utføres ved 100 V i ca. 30 min (Kapittel 2.2.3). Agarosegelen legges på en UV-transilluminator for å synliggjøre DNA-båndene.

2.2.2 Plasmidisolering

Plasmid kan isoleres i ulik skala ved å utføre en maxi- midi- eller mini-presipitering. I denne oppgaven ble både QIAprep Miniprep og Highspeed Plasmid Midi-kit brukt for å isolere plasmider.

Begge metodene baserer seg på at bakteriecellene lyses i en NaOH/ Natrium dodecylsulfat (SDS) buffer. SDS løser opp fosfolipider og proteiner i cellemembranen, mens NaOH denaturerer proteiner (inkludert endonukleaser), kromosomalt DNA og plasmid-DNA. Lysatet tilsettes så en nøytraliseringsbuffer med høy saltkonsentrasjon, som gjør at SDS presippiterer sammen med de denaturerte proteinene og kromosomalt DNA, mens plasmid-DNA renaturerer og forblir løselig.

I QIAprep Miniprep kittet overføres løsningen med de renaturerte plasmidene til en QIAspin kolonne hvor plasmidet binder seg til glassmatriksen, mens proteiner går gjennom. Saltet vaskes bort før plasmidet elueres med MQ-vann eller Tris-buffer.

I Highspeed Plasmid Midi kittet filtreres kromosomalt DNA bort og plasmid-DNA bindes til QIAGEN Anion Exchange Resin. Proteiner og salter vaskes bort og plasmidet kan elueres i en buffer med en høy salt konsentrasjon. Deretter blir plasmidet oppkonsentrert og avsaltet ved utfelling med isopropanol. Renset plasmid elueres i MQ-vann eller Tris-buffer. Normalt utbyttet gir en konsentrasjon på mellom 200 - 1000 ng/µl plasmid DNA i 1 ml.

Protokollene for plasmidisoleringen fulgte med kittene, og ble gjennomført som beskrevet:

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

<http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000096>

2.2.3 Agarosegelelektroforese

Elektroforese av en agarosegel er en standard metode for å separere, identifisere og rens DNA-fragmenter. Agarose er lineære polysakkaridpolymere som er ekstrahert fra sjøgress. Når gelen stivner, dannes et nettverk der tettheten er bestemt av konsentrasjonen av agarose. Konsentrasjoner av agarose opp mot 2 % separerer små DNA-fragmenter godt, og en agarosekonsentrasjon på 0,8 % separerer fragmenter mellom 0,5 til 10 kb. Når agarosegelen utsettes for et elektrisk felt, vil DNA som er negativt ladd ved nøytral pH vandre mot anoden. Graden av vandring er bestemt av parametere som størrelse, konformasjon, agarosekonsentrasjonen og spenning. Små DNA-fragmenter vandrer raskere gjennom gelen enn store fragmenter, og sirkulære DNA-fragmenter vandrer raskere enn lineære. Etidium bromid (EtBr) tilsettes for å synliggjøre DNA-molekylene på agarosegelen. EtBr interkalerer mellom basene i DNAet og bestråling av agarosegelen med UV-lys gjør at interkalert EtBr avgir lys. DNA-fragmentene kan kuttes ut av gelen og renses.

METODER

Prosedyre for tillaging av 0,8 % agarosegel:

- 0,75 g agarose.
- 75 ml 1 x TAE.
- 3 µl EtBr (0,5 µg/ml).

Agarose og 1 x TAE blandes og varmes opp til det koker, slik at løsningen har blitt blank. EtBr tilsettes og løsningen helles i en gelform. Brønnekamrene plasseres i formen og blandingen vil stivne i løpet av ca. 20 min. Når gelen er stiv overføres gelformen med gelen til elektroforeseapparatet. Kammeret fylles opp med 1 x TAE til hele gelen er dekket og brønnekammeret fjernes. DNA-prøvene appliseres, og elektroforesen kjøres i ca. 30 min ved 100 V. Agarosegelen legges deretter på UV-transilluminatoren for visualisering av DNA-molekylene.

2.2.4 Rensing av DNA-fragmenter fra agarosegel

For å rense DNA-fragmenter løses agarose-gelbiten opp ved oppvarming i en buffer med $\text{pH} \leq 7,5$. Deretter overføres DNA-fragmentet til en QIAquick membran-kolonne. DNA vil binde kolonnen ved nøytral pH slik at primere og andre urenheter kan vaskes bort. Eluering skjer ved lav saltkonsentrasjon og basisk pH. Opptil 10 µg DNA kan bindes til membranen i kolonnen.

Ved rensing av DNA-fragmenter fra agarosegel ble QIAquick Gel extraction Kit benyttet i tråd med protokollen som fulgte med kittet:

<http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000252>

2.2.5 Kvantitering av DNA-konsentrasjon

Bestemmelse av DNA-konsentrasjon gjøres ved hjelp av UV-absorbansmålinger, som baser seg på nukleotidenes evne til å absorbere lys i den ultrafiolette delen av lysspektret. Det er de aromatiske ringene til nukleotidene som absorberer lys. Absorpsjonsmaksimum for DNA er ved 260 nm, og renheten bestemmes av forholdet mellom 260 og 280 nm. Ved 280 nm absorberer også eventuelle proteiner som forurensere prøven. Et BioPhotometer spektrofotometer ble brukt til kvantitering av DNA.

2.3 Subkloning av serglysin DNA

2.3.1 Polymerase chain reaction (PCR)

I en polymerase kjedereaksjon ("Polymerase chain reaction"; PCR) amplifiseres en DNA-sekvens ved hjelp av DNA-polymerase. DNA-polymerasen er avhengig av primere for å kunne binde seg til DNA-sekvensen. Primere er oligonukleotider som fester seg til en komplementær DNA-sekvens. Ved å bruke primere som er komplementære til sekvensene som flankerer selve målsekvensen, får man amplifisert kun målsekvensen. PCR går i flere sykler og konsentrasjonen av målsekvensen øker eksponentielt. DNA-polymerasen er varmostabil, slik at den ikke inaktiveres etter denatureringstrinnet i syklusen.

Polymerasen som ble brukt var Advantage® 2 polymerase miks (Appendiks 1). Denne polymerasen vil sette på et A-overheng terminalt på noen av PCR-produktene, noe som er nødvendig når PCR-produktet skal liggeres inn i kloningsvektoren pGEM-T Easy vektor (Kapittel 2.3.3).

PCR er en syklisk prosess som består av tre trinn. Antall sykler varierer mellom 20 og 40.

Trinn 1. **Denaturering:** ved 94 °C brytes hydrogenbindingene som holder dobbelttrådet DNA sammen.

Trinn 2. **Annealing:** ved å senke temperaturen til 50 – 60 °C vil primerne kunne feste seg til målsekvensen. Det vil dannes stabile bindinger mellom templatet og de tilnærmet komplementære primerne.

Trinn 3. **Elongering:** (temperaturen avhenger av hvilken DNA-polymerase som benyttes). En varmostabil DNA-polymerase forlenger i 5' - 3' retning og lager en kopi av DNAet mellom primerne. Tiden for elongeringssteget er avhengig av størrelsen på sekvensen som kopieres, 1 min per kb.

Prosedyre:

I et PCR rør blandes:

- 50 ng DNA-templat.
- 20 pmol 5' primer.
- 20 pmol 3' primer.

METODER

- 2,0 µl dNTP-miks (10 mM).
- 5,0 µl 10 x reaksjon buffer.
- 1,0 µl Advantage® 2 polymerase miks.

Fyll opp til 50 µl med MQ-H₂O.

PCR program

- Steg 1 94 °C i 1 min og 30 sek.
- Steg 2 94 °C i 30 sek.
- Steg 3 53 – 60 °C i 30 sek (gradient blokk).
- Steg 4 68 °C i 6 min.
- Steg 5 Go to step 2, gjenta 35 sykler.
- Steg 6 68 °C i 10 min.
- Steg 7 4 °C, ∞.
- Steg 8 End.

PCR-produktene isoleres ved og appliseres på en 0,8 % agarosegel (Kapittel 2.2.3). Etter elektroforese kuttes PCR-produktet ut og renses ved hjelp av QIAquick Gel Extraction Kit (Kapittel 2.2.4).

2.3.2 Restriksjonskutting av DNA

Restriksjonsenzymmer er enzymer som binder og kutter dobbeltrådet DNA. Restriksjonsenzymene, også kalt endonukleaser, deles inn i tre kategorier, hvorav type II er mest brukt i kloningsarbeid. Type II restriksjonsenzymmer gjenkjenner spesifikke sekvenser i DNA-molekylet, typisk palindromersekvenser på 4 til 6 nukleotider, og vil kutte i slike sekvenser. Noen restriksjonsenzymmer kutter begge DNA-trådene tvert og danner stumppe ender, mens andre restriksjonsenzymmer kutter trådene slik at det dannes base-overheng på DNA-molekylene.

Prosedyre:

I et eppendorfrør blandes:

- 10 µl DNA-preparat.
- 2,0 µl Bovint serumalbumin (BSA) (10x).
- 2,0 µl buffer (hvilken er avhengig av restriksjonsenzymene).
- 4,0 µl MQ-H₂O.
- 1,0 µl restriksjonsenzym

Hvis man skal kutte med to restriksjonsenzymmer, så kan man enten kutte sekvensielt, eller samtidig dersom samme buffer kan brukes. Blandingen inkuberes i fra 1 til 16 timer ved 37 °C, avhengig av om det kuttes midt i en DNA-sekvens, eller i endene.

2.3.3 Ligering

DNA-ligaser er enzymer som katalyserer dannelsen av fosfodiesterbindinger mellom 3`hydroksylgrupper og 5`fosfatgrupper i nærliggende DNA-fragmenter. DNA-ligase benyttes for å lime DNA-fragmenter inn i en kuttet vektor. Molarforholdet mellom vektor og innskudd bør være mellom 1:1 og 1:3, med et overskudd av innskuddet. Ligerings Temperaturen er et kompromiss mellom hensynet til optimaltemperaturen til enzymet og stabiliteten til bindingen mellom DNA-fragmentet og vektoren.

Prosedyre for ligering inn i kloningsvektoren pGEM-T Easy:

Kloningsvektoren pGEM-T Easy har T-overheng i kuttsetet og dermed liggeres PCR-produkter med A-overheng lett inn (Appendiks 2).

I et eppendorfrør blandes:

- 14 µl PCR-produkt.
- 14 µl 2 x pGEM-T Easy ligeringsbuffer.
- 0,5 µl pGEM-T Easy vektor.
- 1 µl pGEM-T Easy ligase.

Inkuberes ved romtemperatur i minst 1 time.

pGEM-T Easy vektor inneholder et seleksjonsgen for ampicillinresistens. PCR-produktet liggeres inn mellom to kuttseter for restriksjonsenzymet *EcoRI*. Ligeringsblandingen transformeres inn i DH5α *E. coli*-celler (Kapittel 2.1.5.2) og strykes ut på vekstskåler som inneholder ampicillin (Kapittel 2.1.1).

Prosedyre for ligering inn i ekspresjonsvektorene pEGFP-N3 og pEGFP-C1

I et mikrorør blandes:

- 6 µl ferdig restriksjonskuttet DNA-fragment.
- 1 µl 10 x T4-ligase buffer.
- 0,5 µl ferdig restriksjonskuttet ekspresjonsvektor.
- 1,5 µl MQ-H₂O.
- 1 µl T4 DNA-ligase.

La stå på 16 °C ON. Ekspresjonsvektorene pEGFP-N3 og pEGFP-C1 inneholder seleksjonsgen for kanamycinresistens (Appendiks 2).

Ligeringsblandingen transformeres inn i DH5α *E. coli*-celler (Kapittel 2.1.5.2) og strykes ut på vekstskåler som inneholder kanamycin (Kapittel 2.1.1).

2.4 Sekvensering

Sekvenseringen ble gjort av sekvenseringslaboratoriet ved Institutt for molekylær biovitenskap/Biologisk institutt.

2.5 Celledyrkningsteknikker

MDCK II-celler dyrkes som regel i 75 cm² plastflasker med komplett dyrkningsmedium i en inkubator som holder 37 °C med 5 % CO₂. Alt arbeid med celledyrkning foregår sterilt og alle løsninger holder 37 °C.

2.5.1 Opptining av celler

Prosedyre:

- Cellene hentes fra en nitrogentank eller en -80 °C fryser og tines i vannbadet ved 37 °C.
- Cellene overføres til en 75 cm² plastflaske med 20 ml komplett dyrkningsmedium

2.5.2 Nedfrysning av MDCK II-celler

MDCK II-celler oppbevares normalt i en nitrogentank som holder en temperatur på -192 °C. Cellene fryses ned i nærvær av 10 % DMSO, fordi DMSO hindrer dannelse av iskrystaller når cellene fryses ned.

Prosedyre:

- Cellene dyrkes tette i 75 cm² plastflasker før de trypsineres (Kapittel 2.5.3.1).
- Løsningen overføres til et 15 ml sentrifugerør, før de spennes ned ved 1500 rpm i 3-4 min.
- Supernatanten helles av, mens pelleten løses i 1 ml frysemedium.
- Cellene overføres til fryserør og plasseres ved -80 °C i minst to timer før de flyttes over i en nitrogentank.

2.5.3 Trypsinering av MDCK II-celler

MDCK II-celler bør overføres til nye flasker eller skåler når cellelaget er tett. Dette kalles å splitte cellene. Hvor mange ganger MDCK II-cellerne er splittet tilsvarer hvilken passasje cellene er i. De tette forbindelsene mellom MDCK II-celler i et cellelag er avhengige av Ca²⁺. Etylen-diamin-tetra-acetat (EDTA) binder opp Ca²⁺ sånn at de tette celleforbindelsene forstyrres og trypsin-EDTA kan diffundere mellom

cellene til undersiden og bryte bindingene mellom cellene og underlaget, slik at cellene løsner.

2.5.3.1 Trypsinering av MDCK II-celler i 75 cm²/25 cm² flasker

Prosedyre:

- Dyrkningsmediet helles av.
- Cellene vaskes to ganger med 5 ml PBS med EDTA.
- 5 ml (75 cm²)/2 ml (25 cm²) trypsin-EDTA tilsettes i hver flaske. Trypsinet helles av når cellene har begynt å runde seg opp.
- 2 ml (75 cm²)/1 ml (25 cm²) trypsin-EDTA tilsettes og flasken settes i inkubatoren (37 °C, 5 % CO₂) til cellene har løsnet.
- 10 ml (75 cm²)/5 ml (25 cm²) dyrkningsmedium tilsettes flasken og cellene resuspenderes. Ønsket mengde av de resuspenderte cellene overføres til nye flasker eller skåler.

2.5.3.2 Trypsinering av MDCK II-celler i skåler

Prosedyre:

- Dyrkningsmediet suges av.
- Cellen vaskes to ganger med 2 ml PBS med EDTA.
- 2 ml trypsin-EDTA tilsettes skålen. Trypsinet helles av når cellene har begynt å runde seg opp.
- 1 ml trypsin-EDTA tilsettes og skålen settes i inkubatoren (37 °C, 5 % CO₂) til cellene har løsnet.
- Ønsket mengde celler overføres til nye flasker eller skåler.

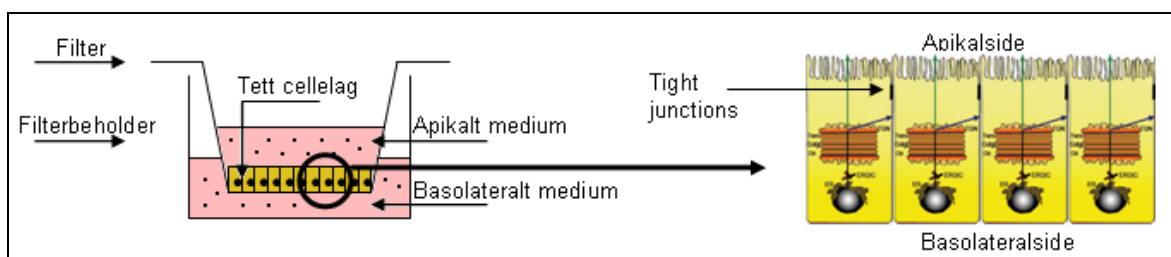
2.5.3.3 Trypsinering av MDCK II-celler i 6-brønners plater

Prosedyre:

- Dyrkningsmediet suges av.
- Cellene vaskes to ganger med 2 ml PBS med EDTA.
- 1 ml trypsin-EDTA tilsettes brønnene. Trypsinet suges av når cellene har begynt å runde seg opp.
- 0,5 ml trypsin-EDTA tilsettes hver brønn. Skålen settes i inkubatoren (37 °C, 5 % CO₂) til cellene har løsnet.
- Ønsket mengde celler overføres til nye flasker eller skåler.

2.5.4 Dyrkning av celler på filter

MDCK II-celler er polariserte epitelceller som har en apikal og en basolateral side. I studier av proteinsortering i epitelceller er det nødvendig å kunne isolere makromolekylene som skilles ut i det apikale mediet fra de som skilles ut i det basolaterale mediet. For å kunne gjøre dette, dyrkes cellene på filtre med en porestørrelse på 0,2 μm slik at molekyler slipper gjennom, mens cellene ikke kan passere. Filtret og cellelaget fungerer som en barriere mellom det apikale og det basolaterale mediet, slik at de ulike mediene kan høstes separat (Figur 2.1).



Figur 2.1 Polarisert kultur av MDCK II-celler på filter. Cellene blir sådd ut på et filter hvor de danner et enkelt tett cellelag som likner cellelaget *in vivo*.

Prosedyre:

- Cellene dyrkes tette i 75 cm² plastflasker før de trypsineres (Kapittel 2.5.3.1).
- Løsningen overføres til et 15 ml sentrifugerør, før de spinnes ned ved 1500 rpm i 3-4 min.
- Supernatanten helles av og cellene resuspendes i 10 ml komplett dyrkningsmedium.
- 90 ml komplett dyrkningsmedium tilsettes autoklaverte glasskåler med 6 filterholdere.
- Hvert filter (4,7 cm²) tilsettes 1,6 ml resuspendert celleløsning, samtidig som det settes ned i en filterholder.
- Cellene plasseres i inkubator (37 °C, 5 % CO₂).

I løpet av 3-4 dager dannes det tette cellelag på filtrene og de kan flyttes over i brønner i 6-brønners plater. Det tilsettes 1 ml serumfritt medium apikalt og 1,5 ml basolateralt. Cellene høstes vanligvis etter 20-24 timer.

2.5.5 Høsting av MDCK II-celler på filter

Siden medium tilsatt serum kan inneholde proteaser som er aktive ved romtemperatur kjøles høstet medium ned på is, og det tilsettes proteasehemmere for å unngå proteindegradering. Ved høsting spinnes det apikale mediet ned for å fjerne løse celler, og cellelysate spinnes ned for å fjerne store aggregater og cellerester.

Prosedyre:

- Det apikale mediet overføres til eppendorfrør, før det spennes ned i 3 min ved 3600 rpm.
- Supernatanten overføres til et nytt eppendorfrør, og fryses ned.
- Det basolaterale mediet overføres til et eppendorfrør, og fryses ned.
- Filtret vaskes to ganger med iskald PBS. 2 ml PBS tilsettes både over og under filtret, og filtret settes på is med vipping i 15 min.
- Vaskeløsningen suges av etter hver vask.
- 1 ml kald IP-lyseringsløsning med proteasehemmer tilsettes på apikal side. Filtret settes på is med vipping i minimum 45 min.
- Cellelysate overføres til eppendorfrør, før det spennes ned i 3 min ved 3600 rpm.
- Supernatanten overføres til et nytt eppendorfrør, og fryses ned.

2.5.6 Transfeksjon av MDCK II-celler

Transfeksjon er en generell prosess som har til formål å bringe nytt DNA inn i eukaryote celler. Det er to hovedvarianter, transient og stabil transfeksjon. I transient transfeksjon blir plasmidet ført inn i cellene, men ikke integrert i genomet. Dermed blir transient transfeksjon en midlertidig transfeksjon hvor plasmidet fortynnes etter noen celledelinger og effekten tapes. Fordelen er at prosedyren tar kort tid. Ved stabil transfeksjon blir DNA-konstruktene stabilt integrert i cellenes genom. Stabilt transfekterte celler forblir transfekterte også etter celledeling. Fordelen med denne varianten er at forsøk kan gjentas på samme transfekterte cellelinje. I denne oppgaven ble både stabil og transient transfeksjon utført. For å kunne selekere celler som har tatt opp i seg nytt DNA, er de forskjellige konstruktene satt inn i ekspresjonsvektorene pEGFP-N3 eller pEGFP-C1, som inneholder et gen som gir resistens mot G-418. G-418 er et antibiotikum som hemmer funksjonen til ribosomene og som dermed dreper ikke-resistente celler.

Transient transfeksjon ble gjort ved elektroporering, mens FuGENE™ 6 eller FuGENE™ HD ble brukt som transfeksjonsreagens for stabil transfeksjon. FuGENE er et lipidbasert transfeksjonsreagens som danner komplekser med DNA og transporterer disse kompleksene gjennom cellemembranen og inn i cellene.

2.5.6.1 Transient transfeksjon med elektrisk puls

Ved elektroporering utsettes cellene for en elektrisk puls som permeabiliserer deler av plasmamembranen. Porene som dannes i cellemembranen lukkes etter en kort periode, men før de lukkes igjen, kan ekstracellulære komponenter som DNA entre cellen.

Prosedyre

- Cellene overføres til 75 cm² plastflasker dagen før transfeksjonen slik at de er 70 – 90 % tette ved transfeksjon.
- Cellene trypsineres (Kapittel 2.5.3.1), og spinnes ned (1200 rpm i 5 min).
- Cellene resupenderes i PBS.
- Cellene telles, slik at det blir ca. 2×10^6 celler per filter.
- 90 ml komplett dyrkningsmedium tilsettes til en autoklavert glasskål med 6 filterholdere. Filtrene (4,7 cm²) settes oppi filterholderne med 1 ml komplett dyrkningsmedium på oversiden.
- Cellepelletten suges fri for PBS og resupenderes i 40 µl R-løsning.
- 3 x 10 µl mikroporeringer gjøres per filter.
- Etter mikroporering overføres disse cellene direkte til apikalt medium over filtret, og cellene fordeles ved å bevege skålen forsiktig.

Elektroporeringen ble utført ved hjelp av microelectroporator. For MDCK II-celler er det best å bruke 10 µl pipettespisser og en puls på 1600 V som varer i 20 ms. Etter transfeksjon kan cellene dyrkes på filter som beskrevet i kapittel 2.5.4.

2.5.6.2 Stabil transfeksjon med FuGENE™ 6

Prosedyre:

- MDCK II-celler overføres til plastskåler noen dager før transfeksjonen, slik at de er 50 – 70 % konfulente ved transfeksjon.
- 88 µl serumfritt medium (Opti-MEM) tilsettes et eppendorfrør.
- 12 µl FuGENE™ 6 tilsettes mediet uten at det kommer i kontakt med veggene i eppendorfrøret. Innholdet blandes og inkuberes ved romtemperatur i 5 min.
- 4 µg plasmid-DNA tilsettes, slik at det blir et 3:1 forhold mellom FuGENE™ 6 og plasmid-DNA.
- Løsningen blandes og inkuberes ved romtemperatur i 15 - 45 min.
- Løsningen tilsettes dråpevis til cellene i skålene, og skålene settes i inkubatoren (37 °C, 5 % CO₂) i 72 timer, før mediet byttes og nytt dyrkningsmedium med G-418 tilsettes. En kontrollskål uten DNA lages parallelt.

2.5.6.3 Stabil transfeksjon med FuGENE™ HD

Prosedyre:

- MDCK II-celler overføres til plastskåler noen dager før transfeksjonen, slik at de er 50 – 70 % konfulente ved transfeksjon.
- 90 µl serumfritt medium (Opti-MEM) tilsettes et eppendorfrør.
- 10 µl FuGENE™ HD tilsettes mediet uten å komme i kontakt med veggene i røret.
- 4 µg plasmid-DNA tilsettes løsningen slik at forholdet blir 5:2 mellom FuGENE™ HD og plasmid-DNA.
- Løsningen blandes og inkuberes ved romtemperatur i 15 - 45 min.
- Løsningen tilsettes dråpevis til cellene i skålene, og skålene settes i inkubatoren (37 °C, 5 % CO₂) i 72 timer, før mediet byttes og nytt dyrkningsmedium med G-418 tilsettes. En kontrollskål uten DNA lages parallelt.

2.5.6.4 Fortynningsrekke av stabilt transfekterte celler

Når skålene med de stabilt transfekterte cellene har stått i 72 timer, lages det en fortynningsrekke av cellene. Dette gjøres fordi transfeksjonseffektiviteten ikke er kjent, og man ønsker en optimal tetthet av positive kloner. For å selektere for transfekterte celler, tilsettes et antibiotikumet G-418, til mediet med en sluttkonsentrasjon på 1 mg/ml. Kontrollskålene tilsettes også G-418. Først når alle cellene på kontrollskålene er døde, kan kolonier plukkes fra skåler med transfekterte celler.

Prosedyre:

Først trypsineres de transfekterte cellene (Kapittel 2.5.3.2).

Skålen med transfekterte trypsinerte celler (1 ml) fordeles på fire nye skåler i ulik fortynning:

Skål 1:	1:250	I totalt 10 ml komplett dyrkningsmedium tilsettes 40 µl (1/250*10ml = 40 µl) fra den trypsinerte skålen.
Skål 2:	1:100	I totalt 10 ml komplett dyrkningsmedium tilsettes 100 µl (1/100*10ml = 100 µl) fra den trypsinerte skålen.
Skål 3:	1:30	I totalt 10 ml komplett dyrkningsmedium tilsettes 333 µl (1/30*10ml = 333 µl) fra den trypsinerte skålen.

METODER

Skål 4: Resten I totalt 10 ml komplett dyrkningsmedium tilsettes 527 μ l fra den trypsinerte skålen.

Kontrollskålen fordeles på to ny skåler med ulik fortynning:

Kontrollskål 1: 1:30 I totalt 10 ml komplett dyrkningsmedium tilsettes 333 μ l (1/30 = 333 μ l) fra den trypsinerte kontrollskålen.

Kontrollskål 2: Resten I totalt 10 ml komplett dyrkningsmedium tilsettes 667 μ l fra den trypsinerte kontrollskålen.

Skålene settes i inkubatoren (37 °C, 5 % CO₂) og kolonier av transfekterte celler plukkes når alle kontrollcellene er døde etter ca. 2 uker. Mediet byttes jevnlig for å fjerne døde celler.

2.5.6.5 Plukking av positive kolonier av transfekterte celler

Når alle kontrollcellene er døde, skal i prinsippet alle cellene som vokser i de transfekterte skålene ha tatt opp i seg det tilsatte plasmidet. På skålen vil det dannes kolonier av celler som stammer fra en celle som har tatt opp i seg plasmidet. Kolonier av celler som er over 1 cm i diameter og som ikke har vokst sammen med andre kolonier kan plukkes. Dette gjøres ved å trypsinere kun området hvor kolonien sitter og overføre disse cellene til en ny beholder.

Prosedyre:

- Koloniene merkes på undersiden av skålen.
- Dyrkningsmediet fjernes fra skålen.
- En metallring plasseres over kolonien av celler som er merket.
- 200 μ l trypsin-EDTA tilsettes metallringen.
- Skålen settes inn i inkubatoren (37 °C, 5 % CO₂) til alle cellene har løsnet.
- Cellene overføres til en 25 cm² celleflaske eller til en brønn i en 6-brønners plater skåler med totalt 4 ml komplett dyrkningsmediet som inneholder G-418. Cellene settes i inkubatoren (37 °C, 5 % CO₂).

2.5.6.6 Identifisering av positive kolonier med tilfredsstillende uttrykk av serglysin

Alle konstruktene som er brukt i oppgaven inneholder genet som koder for grønt fluorescerende protein (GFP). GFP er isolert fra maneten *Aequorea victoria*, og er et mye brukt reporterprotein. Hvis cellene uttrykker serglysin fusert til GFP, vil cellene lyse fluorescerende grønt (507 nm) når de blir eksitert med blått lys (488 nm). Dette er en enkel måte å undersøke om serglysin-variantene med GFP uttrykkes, hvor i cellen serglysin-variantene uttrykkes og med hvilket uttrykksnivå. Identifiseringen av positive kolonier ble gjort ved hjelp av konfokalt fluorescensmikroskop IX81.

2.6 Proteinanalyser

2.6.1 Metabolsk innmerkning med radioaktiv isotop

Celler som dyrkes på filter kan merkes metabolsk med ulike radioaktive isotoper for studier av sortering og modifisering av proteiner. Ved å tilsette de svovelholdige aminosyrene cystein og metionin med radioaktivt svovel til dyrkningsmediet, [^{35}S]-cystein/metionin ([^{35}S]-cys/met), vil de fleste proteiner etter en viss inkubasjonstid kunne påvises og kvantiteres. Hvis man i stedet tilsetter radioaktivt [^{35}S]-sulfat, vil det meste av dette gjenfinnes assosiert med GAG-kjedene til proteoglykaner, og dermed kan sulfatering av GAG-kjeder visualiseres og kvantiteres. Noe radioaktivt sulfat vil også inkorporeres i N-glykaner eller bindes til tyrosin i polypeptidkjeder. Radioaktivt glukosamin ([^3H]-GlcN) tilsatt mediet vil inngå i heksosamin-metabolismen og kan inkorporeres i GAG-kjeder, N-glykaner og enkelte andre glykaner. Ved hjelp av noen enkle biokjemiske prosedyrer kan mengden av GAG-kjeder visualiseres og kvantiteres.

Prosedyre:

- Cellene dyrkes på filter (Kapittel 2.5.4).
- Før innmerking overføres filterne til 6-brønners plater eller tilsvarende, avhengig av filterstørrelse.
- Basolateralt tilsettes 1,5 ml medium til hver brønn i en 6-brønners plate. Mediet har redusert innhold av cystein/metionin, sulfat eller glukose, avhengig av om den ønskede radioaktive isotopen er henholdsvis [^{35}S]-cys/met, [^{35}S]-sulfat eller [^3H]-GlcN. Isotopen tilsettes til det basolaterale mediet til en sluttkonsentrasjon på 0,2 mCi/ml.
- Apikalt tilsettes 1 ml cys/met-, sulfat- eller glukose-fritt medium, uten den radioaktive isotopen.

METODER

- Filtrene plasseres i inkubator (37 °C, 5 % CO₂) i 24 timer.

Etter metabolsk merking høstes medier og cellelysater. Proteiner og proteoglykaner modifisert med GFP isoleres vanligvis ved IP og separeres og kvantiteres ved hjelp av natrium dodecylsulfat polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE). [³⁵S]-innmerkede geler tørkes, legges på screen i en kassett ON og scannes ved hjelp av en Typhoon 9400 Variable Mode Imager for digitalt avtrykk av radioaktiviteten i gelen. De ulike båndene kan kvantiteres ved hjelp av ImageQuant. [³H]-innmerkede geler tørkes og legges på High performance autoradiography film ved -80 °C i 1-3 uker, avhengig av mengde radioaktivitet. Etter endt eksponeringstid fremkalles filmen ved hjelp av en Kodak M-35 fremkallermaskin.

2.6.2 Natrium dodecylsulfat polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE er en metode som benyttes til å separere proteiner i en gel basert på molekylmasse under denaturerende betingelser. Proteiner denatureres ved tilsetning av dithiothreitol (DTT) og SDS. DTT vil bryte disulfidbroene i proteinet, og SDS vil denaturere proteinet ved å danne et kompleks med proteinet, hvor omtrent ett SDS-molekyl vil binde seg per to aminosyrer. Ladningen til proteinet blir maskert ved at SDS er negativt ladd, slik at den opprinnelige ladningen til proteinet blir irrelevant. Dermed blir det størrelsen på proteinet og porestørrelsen til gelen som avgjør hvor langt ned i gelen proteinet vandrer.

Porestørrelsen i gelen kan varieres med ulike konsentrasjoner av bisakrylamid i gelen.

Prosedyre:

- Prøvene tilsettes SDS og DTT før de kokes på 96 °C i 5 min, og spinnes deretter ned i 5 min ved 3600 rpm.
- Prøvene appliseres på enten en ferdigstøpt 4-12 % gradient gel eller en ferdigstøpt 10 % gel.
- XT-MOPS buffer tilsettes til øvre og nedre gelkammer.
- Gelen kjøres i ca. 90 min, ved 180 V og 90 mA.

Hvilken gel som er brukt i hvert enkelt eksperiment er spesifisert i figurtekstene. For å denaturere prøvene ble 4 x Sample buffer og 20 x Reducing Agent benyttet siden disse løsningene inneholder henholdsvis SDS og DTT.

2.6.3 Rensing av proteiner

Alle serglysin-konstruktene studert i denne oppgaven har et GFP protein i det C-terminale doménet. MDCK II-celler som stabilt uttrykker serglysin ble dyrket på filter i 3 døgn før serglysin ble isolert ved å benytte antistoff mot GFP (Appendiks 1).

2.6.3.1 Immunfelling (IP) med Protein-A-sepharosekuler

Ved immunfelling, også kalt immunpresipitering (IP), med protein-A koblet til sepharose-kuler, isoleres proteiner fra mediet ved binding til antistoff. Protein-antistoff-komplekset kan deretter presipiteres med protein-A festet til sepharose-kuler, fordi protein-A binder Fc-regionen til antistoffet. Hele komplekset kan dermed isoleres ved å sentrifugere ned kulene til bunnen av et eppendorfrør. Ved gjentatte vasketrinn anrikes antigenet som er bundet til antistoffet. På denne måten kan serglysin-variantene isoleres fra resten av proteinene i mediet eller cellelysatsat.

Prosedyre:

Før IP av serglysin-variantene dyrkes MDCK II-celler som stabilt uttrykker en av serglysin-variantene på filtre i 3 døgn (Kapittel 2.5.4). Deretter merkes cellene metabolsk med radioaktiv isotop i 24 timer (Kapittel 2.6.1), før mediefraksjonene og cellelysatsatene høstes (Kapittel 2.5.5). For å hindre degradering av protein holdes alle prøvene på is etter høsting og alle løsninger som benyttes er iskalde.

Klargjøring av kuler:

- Ønsket mengde protein-A-sepharosekuler (60 µl per prøve) tilsettes et 15 ml sentrifugerør.
- Sentrifugerøret fylles opp med PBS med 1 % BSA. Rørene settes ON på kjølerom (4 °C) med rotasjon.
- Kulene spinnes ned og supernatanten helles av.
- Kulene vaskes to ganger med PBS uten BSA.
- Kulene sentrifugeres ned og supernatanten helles av.
- Sentrifugerøret tilsettes PBS uten BSA til en 1:1 løsning av kuler og PBS (kalles slurry).
- Cellene høstes som beskrevet (Kapittel 2.5.5).
- 60 µl 1:1 slurry tilsettes hver prøve. Rørene settes på kjølerom (4 °C) med rotasjon i en time.
- Kulene spinnes ned. Supernatanten overføres til nye eppendorfrør og kulene kastes. Proteiner med evne til uspesifikk binding til sepharose-kuler fjernes på denne måten.

METODER

Binding av antistoff til antigen:

- 1 µl polyklonalt 290 A antistoff mot GFP tilsettes til hvert eppendorfrør med mediet eller cellelysat (Appendiks 1). Rørene roterer ON på kjølerom (4 °C).
- 60 µl 1:1 slurry tilsettes til hvert eppendorfrør. Rørene roterer på kjølerom (4 °C) i 3 timer.

Vask:

- Kulene spinnes ned og vaskes 4 ganger med IP-vaskeløsning med 1 % BSA. For hvert vasketrinn roterer rørene i 10 min på kjølerom (4 °C).
- Kulene spinnes ned og vaskes 3 ganger på samme måte med IP-vaskeløsning uten BSA.

Eluering:

- Kulene spinnes ned og supernatanten fjernes. Kulene resuspenderes i 10 µl IP-vaskeløsning uten BSA.
- Kulene tilsettes 10 µl 4 x XT Sample Buffer og 1 µl 20 x XT Reducing Agent.

Fremkalling:

- Prøvene analyseres ved hjelp av SDS-PAGE (Kapittel 2.6.2), og 2 µl [¹⁴C] Protein Molecular Weight Markers benyttes som molekylvektstandard.
- Etter endt elektroforese legges gelen i en fikseringsløsning i 40 min med langsom vipping.
- Fikseringsløsningen erstattes med Amplify™ i 20 min.
- Gelen tørkes i geltørker i omtrent 1 ½ time ved 70 °C, før den legges på screen i en kassett ON og scannes ved hjelp av Typhoon 9400 Variable Mode Imager.

2.6.3.2 Semi-dry Western Blotting (WB)

Western blotting (WB) er en teknikk hvor proteiner først separeres ved hjelp av SDS-PAGE (Kapittel 2.6.2) for så å bli overført til en membran. I denne oppgaven skjer overføringen ved en "halvtørr" metode, hvor gelen og membranen plasseres mellom to filtre som er fuktet med elektroforesebuffer. Immunoblotting er en variant av WB hvor antistoff blir brukt til å påvise proteinet på membranen. Polyklonalt 6556 antistoff mot GFP (Appendiks 1) ble brukt som primær-antistoff for å binde proteinet. For å påvise primær-antistoffet brukes det ett sekundært-antistoff som binder det primære antistoffet i tillegg til å ha egenskaper som gjør at det kan visualiseres (det ble benyttet to forskjellige sekundære antistoffer, NA934 og NIF363756 (Appendiks 1)).

Prosedyre:

MDCK II-celler som stabilt uttrykker en serglysin-variant ble dyrket på filter som beskrevet tidligere (Kapittel 2.5.34), og etter 3 døgn ble filtret overført til 6-brønners plater med serumfritt medium, før mediefraksjonene og cellelysatsatet ble høstet etter ytterligere ett døgn (Kapittel 2.5.5). For å veie opp volum forskjellene i det basolaterale mediet i forhold til det apikale og cellefraksjonen, så fortynnes det apikale mediet og cellefraksjonen med 0,5 ml dH₂O.

Overføring til membran:

- 10 µl av prøvene blandes med 10 µl 4 x Sample buffer og 2 µl 20 x Reducing Agent, før proteinene ble separert ved SDS-PAGE (Kapittel 2.6.2). 3 µl Kaleidoscope™ Precision Plus Protein™ Standard benyttes som molekylvektstandard.
- Etter elektroforese legges gelen i et kar med katodebuffer for avkjøling. To filtre fuktes med anodebuffer og to med katodebuffer.
- PVDF-membranen aktiveres ved å legges i et kar med metanol i 10 sek.
- PVDF-membranen legges i et kar med anodebuffer i 5 min.
- Blottingen skjer i en Trans blotter Semi-dry transfer cell. Først legges et lag med de to filtrene som er fuktet med anodebuffer, deretter kommer PVDF-membranen, så gelen og til sist de to filtrene fuktet med katodebuffer.
- Blottingen utføres ved 25 V, 170 mA og 100 W i 1 time.

Blokkering

- Etter overføringen blokkeres PVDF-membranen i "Tris-bufret salin" (TBS) tilsatt tween 20 (TTBS) med 5 % tørrmelk i 1 time med vipping ved romtemperatur.

Inkubering med primært og sekundært antistoff:

- Det primære-antistoffet fortynnes (1:5000) i TTBS med 1 % tørrmelk.
- PVDF-membranen inkuberes med fortynnet primær-antistoff ON med vipping ved 4 °C i kjølerom.
- Membranen vaskes 3 x 15 min med TTBS.
- Sekundær-antistoffet fortynnes (1:10 000) i TTBS med 1 % tørrmelk.
- PVDF-membranen inkuberes med fortynnet sekundær-antistoff i 1 time ved romtemperatur med vipping.
- Membranen vaskes 3 x 15 min med TTBS.
- Membranen vaskes 15 min med TBS.
- Deteksjonsreagens tilsettes membranen som beskrevet i protokollen.

METODER

To fremkallingssmetoder ble benyttet. Det ene sekundær-antistoffet (NIF363756) er koblet til alkalisk fosfatase, ved å tilsette et substrat, som avgir fluorescens når en fosfatgruppe blir spaltet av, kan proteinene detekteres. Tørr membran skannes med Typhoon 9400 Variable Mode Imager. Det andre sekundær-antistoffet (NA934) er koblet til "horseradish peroxidase" (HRP), som vil reagere med et peroksidase-substrat og danne et produkt som avgir lys som kan leses av på High performance chemiluminescence film. Filmen fremkalles ved hjelp av Kodak M-35 fremkallingsmaskin. Sekundær-antistoffet NA934 ga best resultater, og dette antistoffet er brukt i alle WB-bildene i resultatdelen.

2.6.3.3 Stripping av membran

Etter deteksjon av proteinuttrykket på membranen i WB (Kapittel 2.6.3.2), kan det primære- og det sekundære-antistoffet fjernes fra membranen, slik at proteinene også kan påvises med andre antistoff.

Prosedyre:

- Membranen legges i stripebuffer ved 50 °C i 30 min.
- Membranen vaskes 2 x 10 min i TTBS ved romtemperatur.
- Membranen blokkeres i TTBS med 5 % tørrmelk.
- Vanlig prosedyre for påvisning med primært- og sekundært-antistoff følges (Kapittel 2.6.3.2).

2.6.3.4 TrueBlot

TrueBlot er en kombinasjon av IP og WB, der proteinet først isoleres ved hjelp av IP, for deretter og appliseres og separeres på SDS-PAGE, etterfulgt av overføring til en PVDF-membran. Proteinene påvises med primær- og sekundær-antistoff som i konvensjonell WB. Fordelen med TrueBlot er at proteinet isoleres med ett antistoff og detekteres med et annet. Utfordringen med TrueBlot er at sekundær-antistoffet som brukes i WB vil kunne binde seg til tung- og lett-kjeden til antistoffet som innledningsvis blir brukt til isolering av proteinet ved IP. For å hindre dette, brukes sekundær-antistoffer som detekterer den ikke-reduerte formen av primær-antistoff, siden antistoffet som blir brukt under IP blir redusert ved bruk av SDS før applisering på SDS-PAGE.

Prosedyre:

Klargjøring av kuler:

- 500 µl av prøvene preinkuberes med 50 µl av "Anti-Rabbit" IgG-kuler i et eppendorfrør.
- Røret settes på is i 30 min.
- Prøvene spinnes ned (10.000 rpm) i 3 min og supernatanten overføres til nye eppendorfrør.

IP:

- 0,5 µl av primær-antistoffet (Polyklonalt 290 antistoff mot GFP) tilsettes supernatantene. Rørene settes på is i 1 time.
- 50 µl "Anti-Rabbit" IgG-kuler tilsettes prøvene. Rørene settes på is i 1 time med vipping.
- Kulene spinnes ned (10 000 rpm) i 1 min og supernatanten fjernes.
- Kulene vaskes tre ganger med 500 µl lysis buffer.
- Kulene spinnes ned og supernatanten fjernes.
- 30 µl 4 x XT Sample buffer og 1,5 µl XT Reducing Agent tilsettes hver prøve.
- Prøvene kokes ved 95 °C i 10 min.
- Kulene spinnes ned (10 000 rpm) i 3 min.
- Prøvene separeres ved hjelp av SDS-PAGE (Kapittel 2.6.2).

WB:

- Proteinene overføres fra gelen til en PVDF-membran ved hjelp av semi-dry WB (Kapittel 2.6.3.2)
- Etter en blokkering fuktes membranen i transfer-buffer før den plasseres i en TrueBlot™ Enhancer Solution i 2 min.
- Membranen vaskes med TTBS.
- Membranen blokkeres med 5 % TrueBlot™ Blocker i TrueBlot™ Assay Buffer ON ved 4 °C.
- Membranen inkuberes med primær-antistoff (Polyklonalt 6556 antistoff mot GFP) i 5 % TrueBlot™ Blocker i TrueBlot™ Assay Buffer med vipping i 2 timer ved romtemperatur.
- Membranen vaskes med TTBS i 6 min. Gjenta 10 ganger.
- Membranen inkuberes med Rabbit IgG TrueBlot™ i en 1:1000 fortykning i 5 % TrueBlot™ Blocker i TrueBlot™ Assay Buffer i 1 time ved romtemperatur.
- Membranen vaskes med TTBS i 6 min. Gjenta 10 ganger.
- Deteksjonsreagens påføres membranen som beskrevet i protokollen.
- Membranen fremkalles ved å legges på en High performance chemiluminescence film.

METODER

TrueBlot kittet som ble brukt i denne oppgaven er Rabbit TrueBlot™ Western Blot Kit.

2.6.4 Analyse av GAG-kjeder

2.6.4.1 Kondroitinase-ABC (cABC) behandling

Enzymet kondroitinase ABC (cABC) er et kommersielt tilgjengelig enzym isolert fra bakterien *Proteus vulgaris* som bryter ned CS- og DS-kjeder, ved å bryte bindingene mellom GalNac og GlcA. Hele GAG-kjeden blir degradert, med unntak av de seks første suktermolekylene, nærmest proteinkjeden. Behandling med cABC brukes for å påvise tilstedeværelsen av CS og DS på proteoglykaner.

Prosedyre:

I et eppendorfrør blandes:

- 1,6 µl 10 x cABC-buffer.
- 1,2 µl cABC-enzym.
- 10 µl prøve.
- La stå ON på 37 °C

10 µl 4 x XT Sample buffer og 1 µl 20 x XT Reducing Agent tilsettes før applisering på SDS-PAGE (Kapittel 2.6.2).

2.6.4.2 HNO₂-behandling

HNO₂-behandling brukes for å påvise GAG-kjeder av heparin eller HS type. HNO₂ bryter bindingen mellom N-sulfatert GlcNAc og GlcA.

Prosedyre:

- Et likt volum av 0,5 M H₂SO₄ og 0,5 M Ba(NO₂)₂ blandes. Begge løsningene bør være iskalde.
- Blandingene sentrifugeres slik at BaSO₄ felles ut, og HNO₂ er i vannfasen.
- 10 µl av HNO₂ reagens og 10 µl prøve blandes. La stå 15 min ved romtemperatur.
- Reaksjonen stoppes ved å tilsette 2M Na₂CO₃ til prøven oppnår nøytral pH.
- 10 µl 4 x XT Sample buffer og 2,5 µl 20 x XT Reducing Agent tilsettes før applisering på SDS-PAGE (Kapittel 2.6.2).

2.6.4.3 NaOH-behandling

Behandling med NaOH bryter O-glykosidbindinger mellom serin og xylose, slik at alle GAG-kjeder spaltes av proteoglykanenes proteinkjerner.

Prosedyre:

- 1,0 µl NaOH (5 M) tilsettes 10 µl av prøven som skal behandles.
- Blandingen inkuberes ved romtemperatur ON.
- Reaksjonen stoppes ved å tilsette 5,0 M HCl til nøytral pH.
- 10 µl 4 x XT Sample buffer og 1,0 µl 20 x XT Reducing Agent tilsettes før applisering på SDS-PAGE (Kapittel 2.6.2).

2.6.4.4 Behandling av MDCK II-celler med Brefeldin A

Prosedyre:

- Cellene dyrkes på filter som beskrevet i kapittel 2.5.34.
- Filtrene overføres til nye brønner og tilsettes serumfritt medium med ønsket konsentrasjon av Brefeldin A (BFA). Det tilsettes 1 ml serumfritt medium apikalt, og 1,5 ml serumfritt medium basolateralt.
- Filtrene plasseres i inkubatoren (37 °C, 5 % CO₂). Cellene høstes etter 16 timer som beskrevet i kapittel 2.5.5 og analyseres videre ved hjelp av WB (Kapittel 2.6.3.2).

2.7 Lokalisering av proteiner i levende celler med konfokalmikroskop

Celler såes ut i Glass Bottom Microwell Dishes, som er spesiallaget for å se på levende celler i konfokalmikroskopiet, et døgn før mikroskopering, med en tetthet som gjør at enkeltceller kan skilles fra hverandre dagen etter. Blå fluorescens (Hoechst-farge) ble brukt til å farge kjernen, rød fluorescens (ER-TrackerTM) ble brukt for å farge ER-membranen og ceramid-komplekser med rød fluorescens ble brukt til å farge Golgi-apparatet.

2.7.1 Ko-lokalisering av serglysin med ulike markører

Prosedyre:

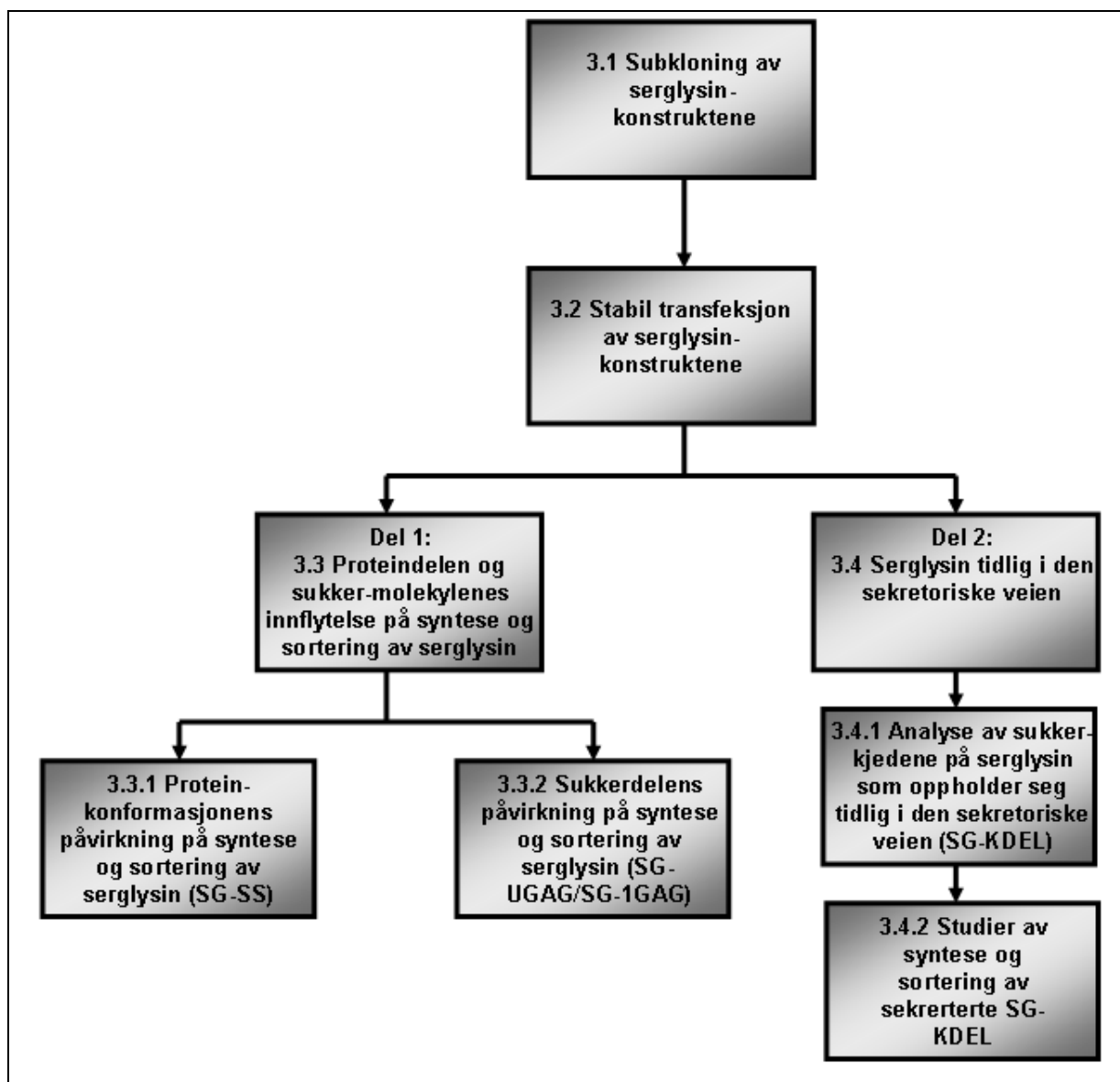
- Cellene vaskes flere ganger med "Hank`s Balanced Salt Solution" (HBSS).
- Cellene inkuberes i 30 min ved 4 °C med 5 µM ceramid-BSA i 1 ml 4-(2-hydroxyethyl)-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)-medium.
- Cellene vaskes flere ganger med iskaldt HEPES-medium.

METODER

- 1 ml HBSS-medium tilsettes.
- 5 μ l av Hoechst-løsningen (1 μ g/ml) og ER-Tracker tilsettes til en sluttkonsentrasjon på 1 μ M.
- Cellene inkuberes i inkubatoren (37 °C, 5 % CO₂) i 30 min.
- Cellene vaskes flere ganger med nytt medium og undersøkes ved hjelp av et konfokalmikroskop.

Både ER- og Golgi-markøren lyser rødt fluoriserende og ble derfor ikke brukt samtidig. Ved bare bruk at kjerne- og ER-markøren ble ikke de to første punktene av prosedyren utført. Lokaliseringen ble bestemt ved hjelp av et konfokalt fluorescensmikroskop IX81. For visualisering av kjernen, Golgi-apparatet og ER, samt serglysin ble henholdsvis 405, 513 og 488 nm lasere benyttet.

3.0 Resultater



Figur 3.1 Oversikt over arbeidet som er utført i denne oppgaven.

I polariserte epitelceller sorteres alle sekretoriske proteiner enten til den apikale, eller til den basolaterale siden av celledaget. Proteoglykaner sorteres til både den apikale og den basolaterale siden i MDCK II-celler, men mekanismene bak sorteringen og transporten er i stor grad ukjent. Arbeidet utført i denne oppgaven omfatter studier av syntese og sortering av varianter av et transfektert-proteoglykan (serglysin). Resultatene oppnådd i oppgaven kan deles i to hoveddeler (Figur 3.1). Alle variantene av proteoglykanet serglysin er uttrykt med GFP i den C-terminale enden. GFP-delen benyttes til påvisning av proteoglykan-variantene ved

RESULTATER

konfokalmikroskopi, ved IP og WB. I navnsetting av de ulike serglysin-varianter senere i oppgaven er likevel GFP utelatt i navnet.

Del 1:

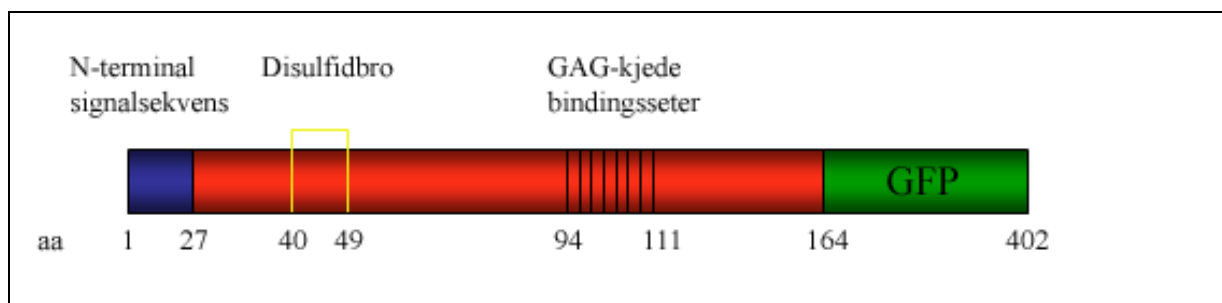
Sortering og syntese av humant serglysin er blitt studert i MDCK II-celler tidligere (Vuong et al. 2006; Tveit et al. 2005), men det var ønskelig å studere i hvilken grad endringer i proteindelen og antall GAG-kjeder bundet til serglysin påvirker syntese og sortering av proteoglykanet.

For å undersøke hvordan endringer i proteindelen innvirker på syntese og sortering av serglysin, ble konformasjonen til proteoglykanet forandret ved å mutere bort de to N-terminale cysteinene (til serin) som kan delta i en mulig disulfidbro (SG-SS) (Figur 3.3). En intern disulfidbro har ikke vært direkte påvist i serglysin, men området mellom og omkring de to cysteinene er svært konservert mellom arter hvor disulfidbroer er identifisert (Chanat et al. 1993; Cool et al. 1995; Kromer et al. 1998). Basert på disse studiene er det all grunn til å anta at mutasjon av cysteinene N-terminalt i serglysin vil medføre en konformasjonsendring i proteindelen.

For å undersøke hvordan GAG-kjedene innvirker på syntese og sortering av serglysin, ble det laget to serglysin-varianter; en uten bindings seter for GAG-kjeder i proteindelen (SG-UGAG), og en med kun ett bindings sete for GAG-kjeder (SG-1GAG). Disse to serglysin-variantene ble sammenliknet med serglysin som har åtte mulige bindings seter for GAG-kjeder, men hvor det ikke er kjent hvor mange som faktisk er i bruk.

Del 2:

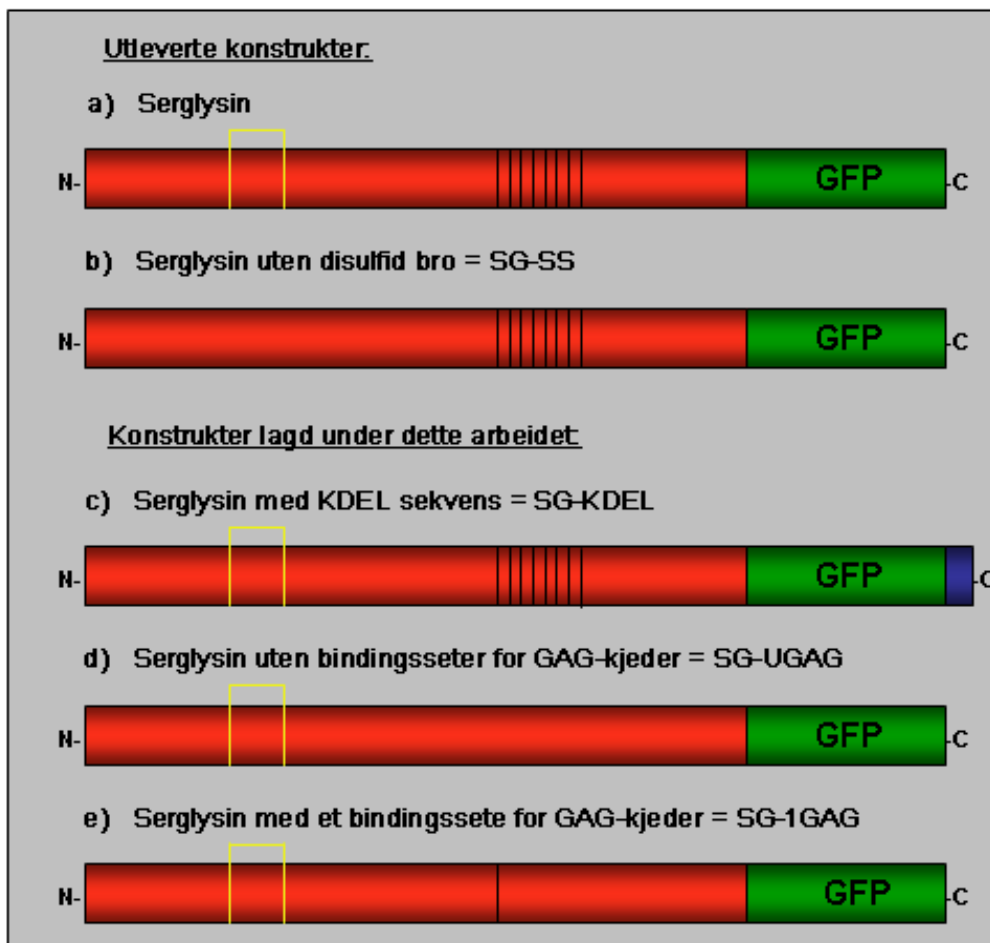
I den andre delen av denne oppgaven, ønsket vi å studere et proteoglykan som kan oppholde seg lenger i den tidlige delen av den sekretoriske veien (mellom ER og Golgi). Det ble derfor laget en serglysin-variant med en C-terminal KDEL-sekvens (SG-KDEL). KDEL-sekvensen vil sørge for at proteoglykanet kan sirkulere mellom ER og Golgi-apparatet. Vi ønsket å undersøke om et slikt proteoglykan hadde deler av linker-regionen på GAG-kjedene laget ferdig, og om disse sukker-molekylene eventuelt var sulfaterte. Noe av SG-KDEL som oppholder seg i ER-Golgi området vil kunne unnsnippe og bli transportert ut av MDCK II-cellene. Vi ønsket derfor også å studere sortering, transport og GAG-syntese av SG-KDEL.



Figur 3.2 Serglysin. (Størrelseforholdet mellom serglysin og GFP er ikke tatt hensyn til)
 GFP = grønt fluorescerende protein GAG = Glykosaminoglykan. aa = aminosyre.

3.1 Subkloning av serglysin-konstrukt

To av serglysin-konstruktene var laget ferdig i ekspresjonsvektoren pEGFP-N3; serglysin, og serglysin hvor disulfidbroen var fjernet ved å mutere cystein nummer 40 og 49 til seriner (SG-SS). Tre av serglysin-konstruktene ble laget ved hjelp av PCR. Subkloning av disse tre konstruktene ble gjort på tre forskjellige måter. SG-UGAG som vist i figur 3.4, SG-1GAG som vist i figur 3.6 og SG-KDEL som vist i figur 3.8. SG-1GAG og SG-UGAG ble subklonet inn i ekspresjonsvektoren pEGFP-N3, og SG-KDEL ble subklonet inn i ekspresjonsvektoren pEGFP-C1. En oversikt over serglysin-konstruktene er vist i figur 3.3, og en oversikt over primerne og konstruktene er vist i Appendiks 2.

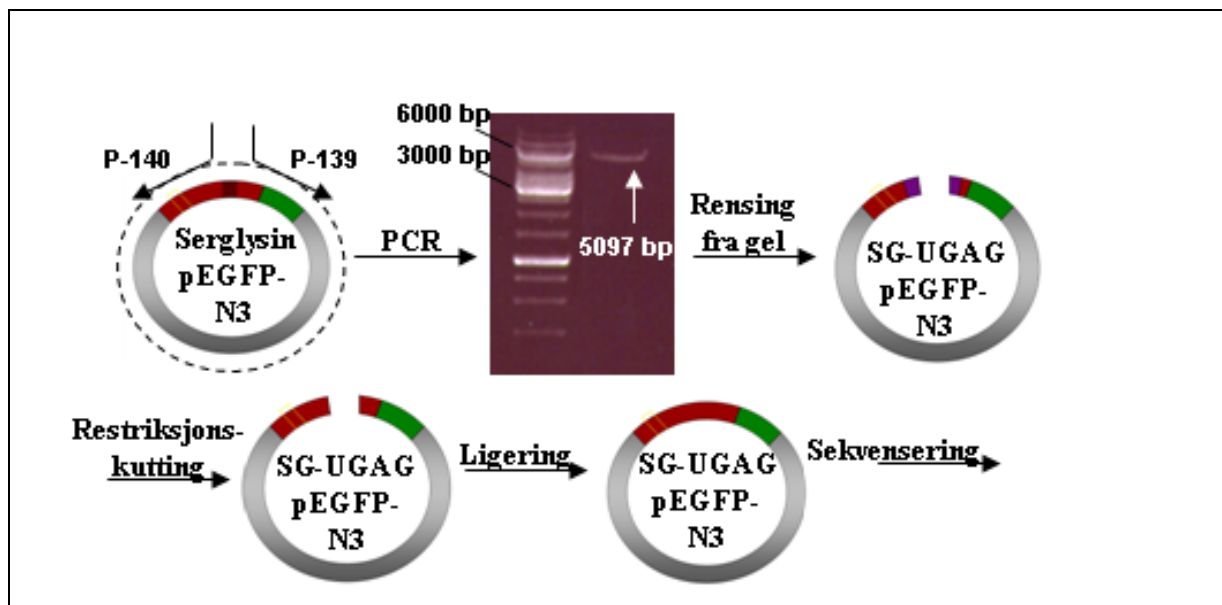


Figur 3.3 Oversikt over serglysin-konstruktene. GFP = grønt fluorescerende protein. GAG = Glukosaminoglykan. En oversikt over konstruktene finnes også i (Appendiks 2).

3.1.1 Subkloning av SG-UGAG

En oversikt over subkloningsprosessen for SG-UGAG er vist i figur 3.4. For å fjerne de åtte bindingssetene for GAG-kjeder i serglysin ble hele pEGFP-N3 vektoren med serglysin amplifisert opp, med unntak av det området som inneholdt bindingssetene for GAG-kjeder (aminosyrene 94-111). Både forover-primer (P-139) og revers-primer (P-140) inneholdt kuttseter for restriksjonsenzymet *MluI* (Appendiks 2). PCR-reaksjonen ble utført som beskrevet i kapittel 2.3.1, og PCR-produktet på 5097 bp ble analysert på 0,8 % agarosegel (Figur 3.4). Deretter ble PCR-produktet renset opp og endene til PCR-produktet ble kuttet med restriksjonsenzymet *MluI*. Etter restriksjonskutting ble PCR-produktet ligert sammen og transformert inn i kompetente DH5α *E. coli*-bakterieceller. De transformerte bakteriecellene ble sådd ut på vekstskåler tilsatt kanamycin, og kolonier ble plukket dagen etter.

Bakteriecellene ble dyrket opp og kvikksjekk ble utført. Plasmidet ble isolert og sendt til sekvensering ved sekvenseringslaboratoriet ved Institutt for molekylær biovitenskap/Biologisk institutt. Det ble deretter laget frysekultur og midipresipitering av det ferdige plasmidet.

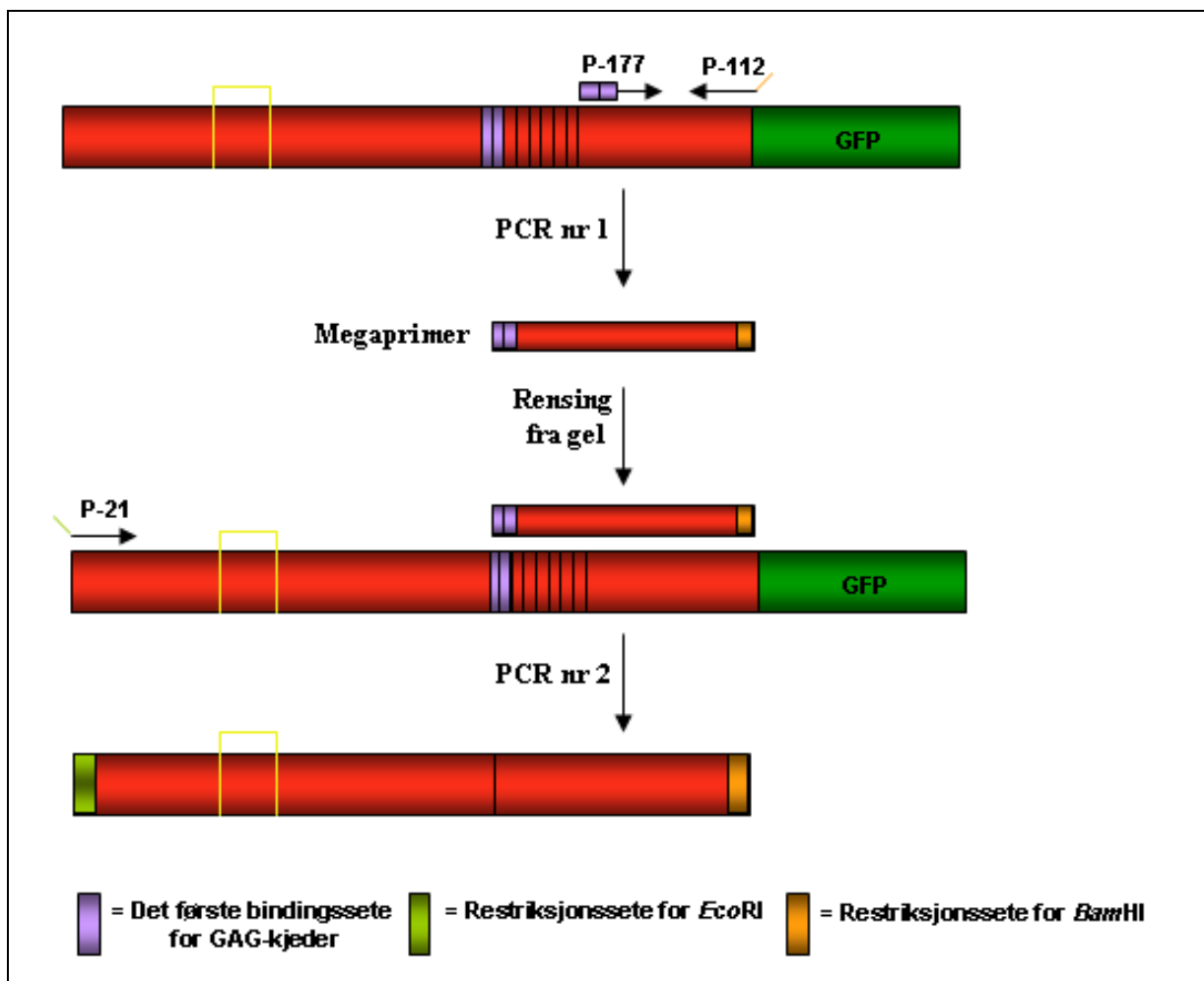


Figur 3.4 Subkloning av SG-UGAG. SG-UGAG ble amplifisert ved hjelp av PCR med primere som har kuttsete for *MluI*. Det amplifiserte PCR-produktet ble applisert på en 0,8 % agarosegel, rensset fra gel, restriksjonskuttet med *MluI* og ligert sammen.

3.1.2 Subkloning av SG-1GAG

En oversikt over subkloningsprosessen for SG-1GAG er vist i figur 3.6. For å lage SG-1GAG ble megaprimer-metoden benyttet. I første PCR ble det brukt en forover-primer (P-177), som inneholdt området oppstrøms for de åtte bindingssetene for GAG-kjeder, men syv av bindingssetene var fjernet, slik at det bare var ett GAG-kjede-bindingssete igjen, og en revers primer (P-112) som vist i figur 3.5. Det første PCR-produkt, på 174 bp (figur 3.6), ble rensset fra en agarosegel og ble brukt som en revers-primer i neste PCR sammen med forover-primeren P-21.

RESULTATER

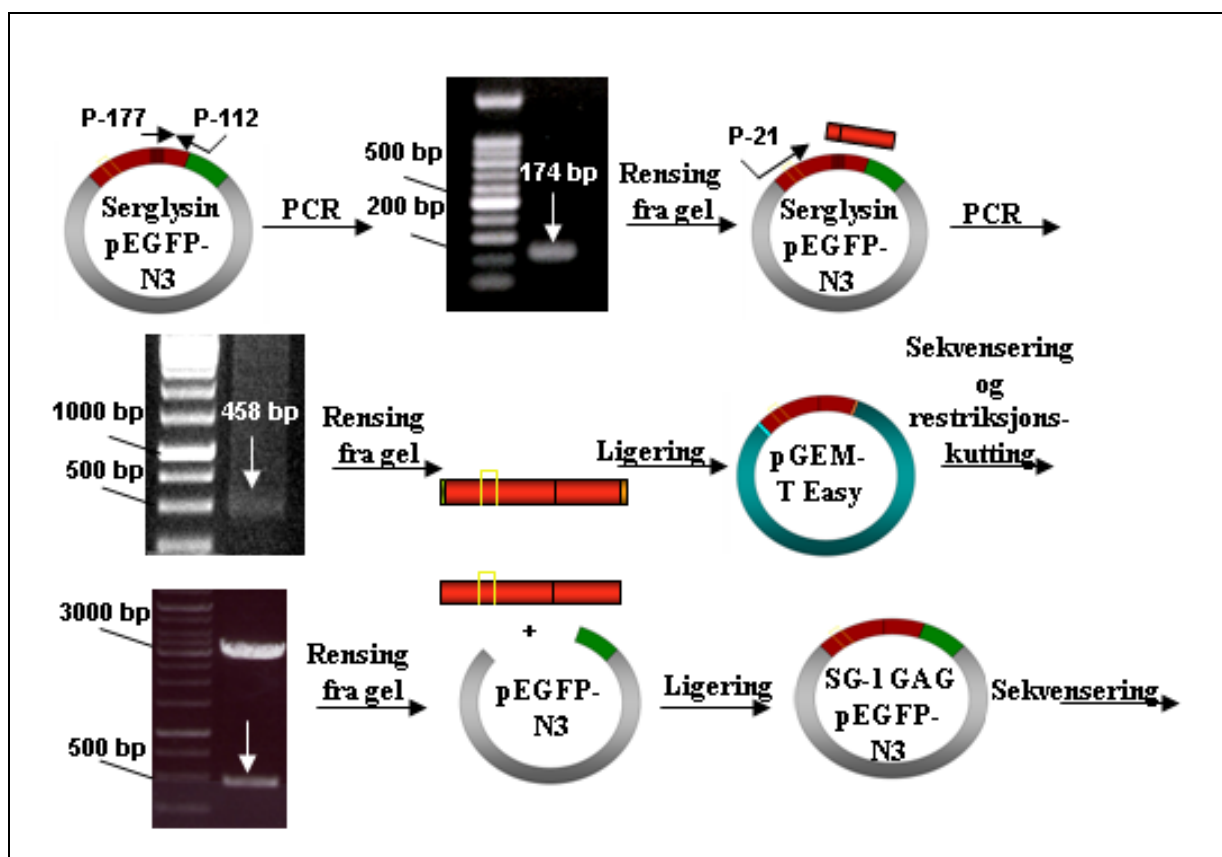


Figur 3.5 PCR av SG-1GAG. Det C-terminale domønet på serglysin med åtte bindingsseter for GAG-kjeder ble amplifisert med en forover-primer (P-177), der syv av bindingssetene mangler, men med sekvensen oppstrøms for GAG-kjede-setene, og en revers-primer (P-112). PCR-produktet på 174 bp ble rensset fra en agarosegel og brukt som revers-primer i neste PCR, sammen med forover-primeren som starter helt N-terminalt serglysin (P-21). Det ferdige PCR-produktet flankeres av kuttseter for restriksjonsenzymene *EcoRI* og *BamHI*.

PCR-produkt fra den andre PCR ble applisert på en agarosegel og rensset fra gelen, før det ble ligert inn i kloningsvektoren pGEM-T Easy. Den ligerte kloningsvektoren ble transformert inn i kompetente DH5 α *E. coli*-bakterieceller, som ble strøket ut på vekstskåler tilatt ampicillin. Bakteriekolonier ble plukket, dyrket opp og kvikksjekk ble utført. Plasmidet ble isolert og restriksjonskuttet for å sjekke størrelsen på innskuddet, etterfulgt av sekvensering. Det riktig sekvenserte PCR-produktet ble så kuttet ut av kloningsvektoren med restriksjonsenzymene *EcoRI* og *BamHI*, ligert inn i restriksjonskuttet ekspresjonsvektor pEGFP-N3 (*EcoRI* og *BamHI*).

Vektoren pEGFP-N3 har innsatt GFP nedstrøms for vektorens multikloningssete (MCS), så når vektoren kuttet med *EcoRI* og *BamHI* kan SG-1GAG settes inn oppstrøms for, og i samme leseramme som GFP. Etter ligering inn i vektoren vil derfor SG-1GAG ha GFP helt C-terminalt.

Da det sekvenserte PCR-produktet var ligert inn i restriksjonskuttet ekspresjonsvektor, ble ligeringsblandingen transformert inn i DH5α *E. coli*-bakterieceller og strøket ut på vekstskåler tilsatt kanamycin. Bakteriekolonier ble plukket, dyrket opp og kvikksjekk ble utført. Plasmider ble isolert fra antatte positive transformanter, og analysert ved restriksjonskutting med henholdsvis *EcoRI* og *BamHI* før plasmidet ble sendt til sekvensering. Det ble deretter laget frysekultur og midi-presipitering av det ferdig sekvenserte plasmidet.

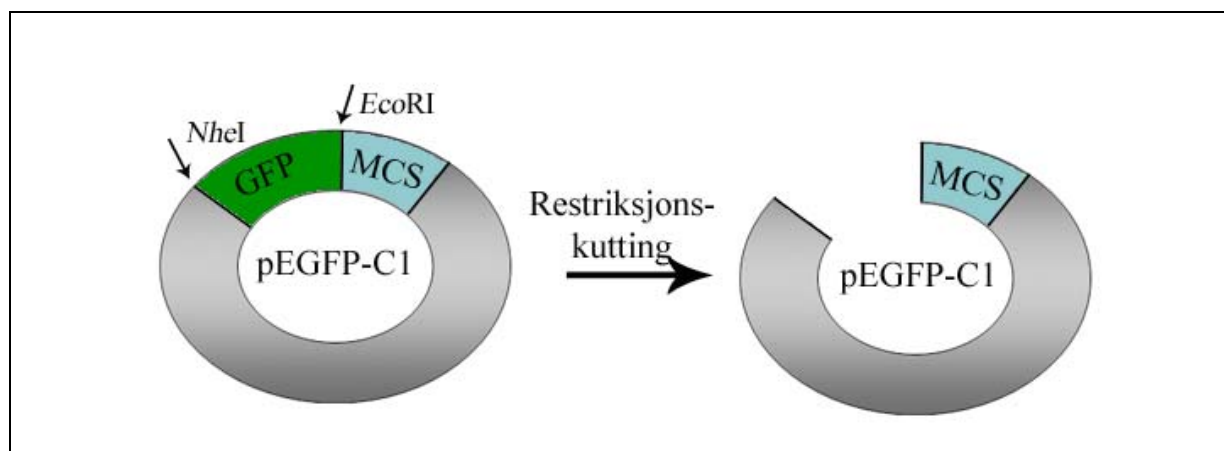


Figur 3.6 Subkloning av SG-1GAG. Første PCR ble utført ved å bruke en forover-primer der syv av GAG-kjede-bindingssetene var fjernet, og en revers-primer som begynner i enden av serglysin. PCR-produktet som er på 174 bp ble så brukt som en megaprimer i neste PCR (for detaljer, se figur 3.5). PCR-produktet ble ligert inn i kloningsvektoren pGEM-T Easy, og sendt til sekvensering. Riktig plasmid ble restriksjonskuttet med *EcoRI* og *BamHI*, og ligert inn i *EcoRI* og *BamHI* restriksjonskuttet ekspresjonsvektoren (pEGFP-N3).

3.1.3 Subkloning av SG-KDEL

En oversikt over subkloningsprosessen for SG-KDEL er vist i figur 3.8. SG-KDEL ble amplifisert ved hjelp av en PCR, der forover-primer (P-197) har innlagt kuttsete for *NheI*, mens revers-primeren har innlagt baser som koder for aminosyrene KDEL, samt kuttsete for *EcoRI*. PCR-reaksjonen ble utført som beskrevet i kapittel 2.3.1, og PCR-produktet ble applisert på en 0,8 % agarosegel, renset fra gel og ligert inn i kloningsvektoren pGEM-T Easy. Ligeringsblandingen ble transformert inn i kompetente DH5 α *E. coli*-bakterieceller som ble strøket ut på vekstskåler tilsatt ampicillin. Bakteriekolonier ble plukket dagen etter, dyrket opp og kvikksjekk ble utført. Plasmidet ble isolert fra antatte positive transformanter og restriksjonsanalyse ble utført før plasmidet ble sendt til sekvensering. SG-KDEL plasmidene med riktig sekvens ble kuttet ut av kloningsvektoren med restriksjonsenzymene *NheI* og *EcoRI* og ligert inn i restriksjonskuttet ekspresjonsvektor pEGFP-C1 (*NheI* og *EcoRI*).

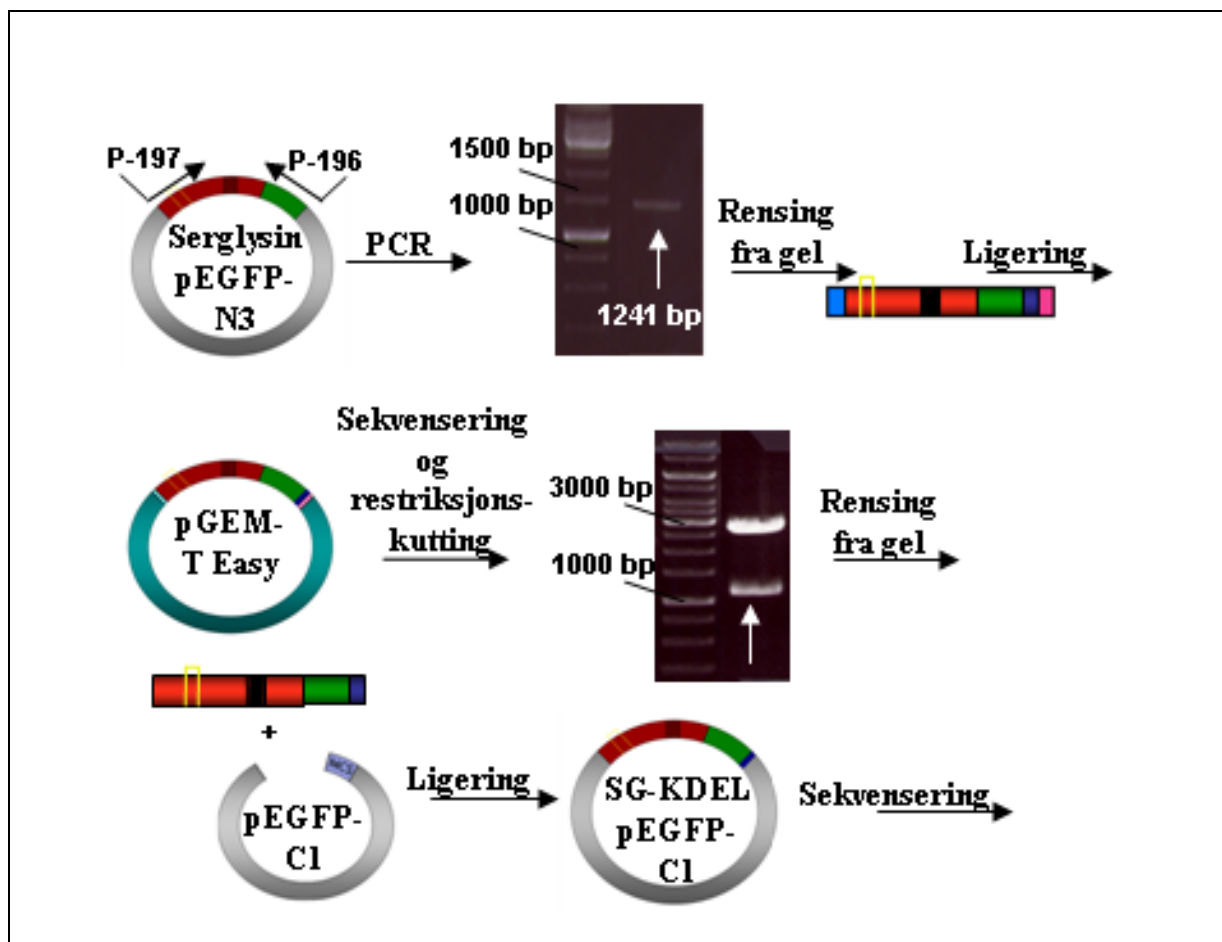
Det ferdigsekvenserte serglysin-konstruktet består av serglysin med C-terminal GFP, etterfulgt av en KDEL-sekvens før stoppkodon. Vektoren pEGFP-C1 har innsatt GFP oppstrøms for vektorens MCS, men når restriksjonsenzymene *NheI*, som kutter oppstrøms for GFP, og *EcoRI* brukes, kuttet den opprinnelige GFPen fra vektoren ut, og et PCR-produkt med GFP kan ligeres inn i vektoren (Figur 3.3).



Figur 3.7. Ekspresjonsvektoren pEGFP-C1 og SG-KDEL. GFP ble kuttet ut av ekspresjonsvektoren ved hjelp av restriksjonsenzymene *NheI* og *EcoRI*. GFP: Grønt fluorescerende protein MCS: multikloningssete.

Da det sekvenserte PCR-produktet var ligert inn i restriksjonskuttet ekspresjonsvektor, ble ligeringsblandingen transformert inn i DH5 α *E. coli*-bakterieceller og strøket ut på vekstskåler tilsatt kanamycin. Bakteriekolonier ble plukket, dyrket opp og kvikksjekk ble utført. Plasmider ble isolert fra antatte positive transformanter, og analysert ved restriksjonskutting med henholdsvis *NheI* og *EcoRI*

før det ble sendt til sekvensering. Det ble laget frysekultur og midi-presipitering av de ferdige plasmidene.



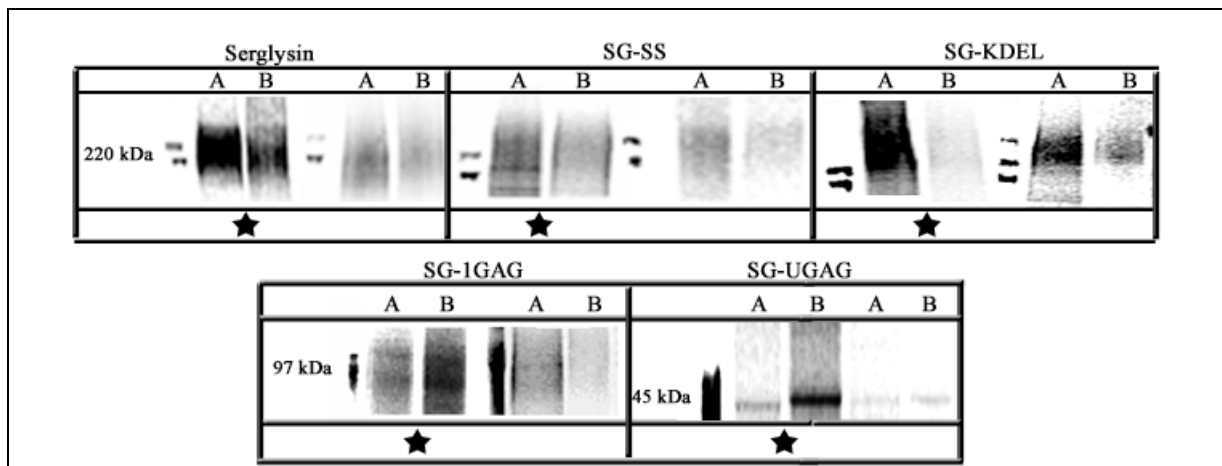
Figur 3.8 Subkloning av SG-KDEL. PCR-produktet ble amplifisert ved hjelp av en forover-primer med innsatt *NheI* restriksjonssete, og en revers-primer med innsatte baser som koder for aminosyrene KDEL, samt *EcoRI*-restriksjonssetet. PCR-produktet ble applisert på en 0,8 % agarosegel, renses fra gelen, og ligert inn i kloningsvektoren pGEM-T Easy. Etter sekvensering, ble PCR-produktet kuttet ut av kloningsvektoren ved hjelp av restriksjonsenzymene *NheI* og *EcoRI* og ligert inn i restriksjonskuttet ekspresjonsvektoren pEGFP-C1 (*NheI* og *EcoRI*).

3.2 Stabil transfeksjon av serglysin-konstruktene

Serglysin-konstruktene serglysin, SG-SS, SG-UGAG og SG-1GAG var ligert inn i pEGFP-N3 ekspresjonsvektoren, mens SG-KDEL var ligert inn i pEGFP-C1 ekspresjonsvektoren. Alle fem serglysin-konstruktene ble stabilt transfektert inn i MDCK II-celler ved hjelp av FuGENE™ 6 eller FuGENE™ HD transfeksjonsreagens (Kapittel 2.5.6). Alle serglysin-variantene inneholdt GFP og positive kolonier ble høstet etter seleksjonstrykk med G-418, etterfulgt av undersøkelse i konfokalmikroskop. Positive transfektanter med tilstrekkelig proteinuttrykk ble etter konfokalstudier analysert ved hjelp av IP med 290 A antistoff

RESULTATER

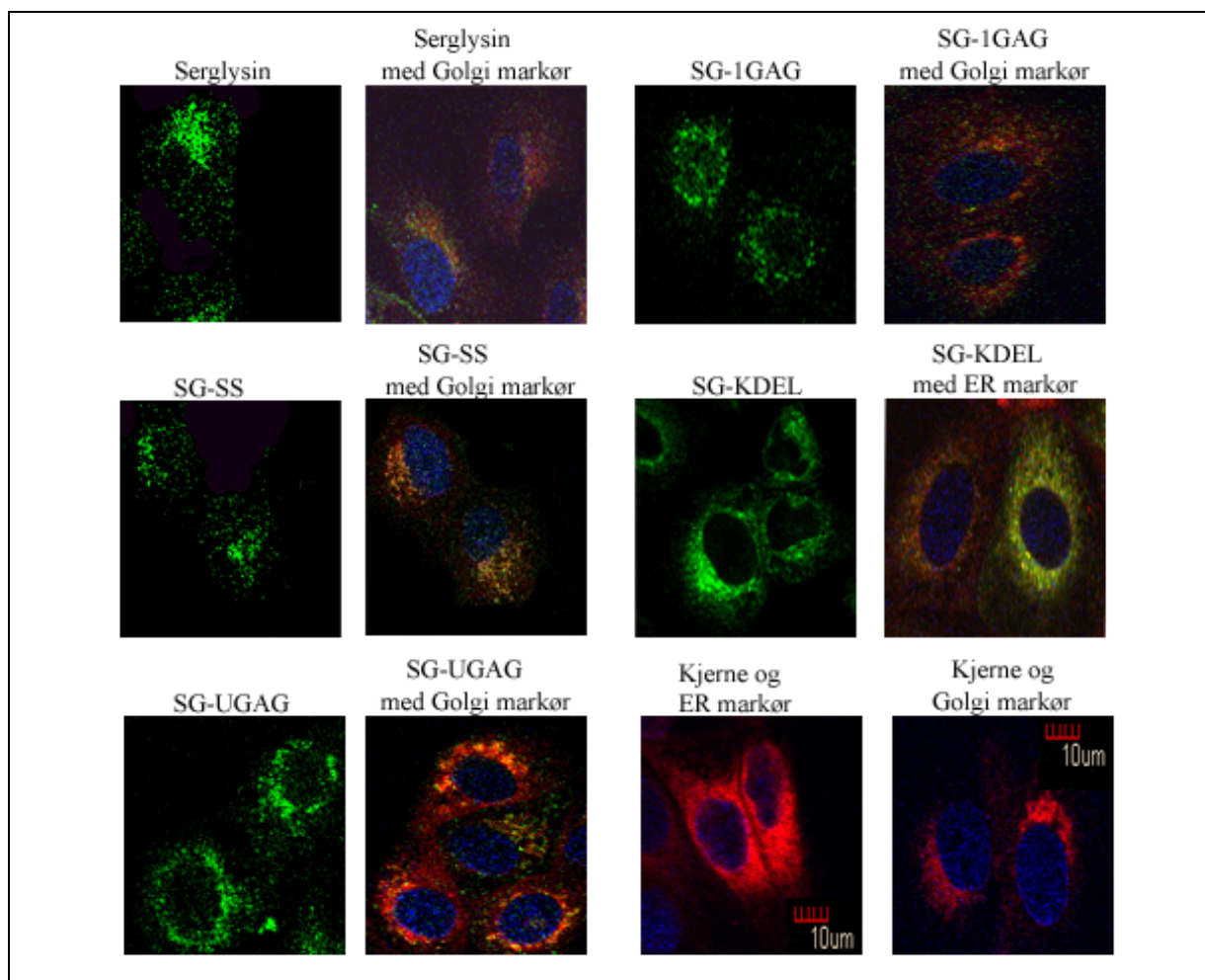
mot GFP (Figur 3.9), og en celleklon av hver serglysin-variant (*) ble valgt ut for videre analyser. For å velge celleklonene ble MDCK II-celler som stabilt uttrykte de ulike serglysin-variantene dyrket på filter og merket inn med ^{35}S -cys/met. Serglysin-variantene ble isolert fra apikal og basolateral side ved hjelp av IP og analysert på en 4-12 % Bis-Tris SDS-PAGE (Figur 3.9).



Figur 3.9. IP av serglysin-varianter. MDCK II-celler som stabilt uttrykker de forskjellige serglysin-variantene ble dyrket på filter i tre døgn og metabolsk merket med ^{35}S -cys/met. Etter 24 timer ble det apikale (A) og det basolaterale (B) mediet høstet separat, og serglysin-variantene ble IP med polyklonalt 290 A antistoff mot GFP, før applisering på en 4-12 % Bis-Tris SDS-PAGE.

Det ble valgt en celleklone for hver serglysin-variant for videre studier. De fem utvalgte MDCK II-cellekloner som uttrykte hvert sin serglysin-variant, ble sådd ut i brønner med glassbunn, slik at cellene kunne studeres levende i konfokalmikroskopet.

Alle serglysin-konstruktene har en N-terminal signalsekvens for ER-import og transporteres derfor gjennom den sekretoriske vei og til plasmamembranen. Siden SG-KDEL i tillegg har en KDEL-sekvens helt C-terminalt som kan bindes av KDEL-reseptorer i post-ER organeller og mediere tilbaketransport til ER, vil dette proteoglykanet kunne sirkulere mellom ER og tidlig Golgi. Alle serglysin-konstruktene, med unntak av SG-KDEL, kolokaliserte i stor grad med en fluorescent Golgi-markør. SG-KDEL viste en mer ER-lik lokalisering og kolokaliserer med en fluorescent ER-markør. En oversikt over lokaliseringen til alle serglysin-konstruktene er vist i figur 3.10.



Figur 3.10 Serglysin-varianter i MDCK II-celler. Stabilt transfekterte MDCK II-celler ble dyrket på Glass Bottom Microwell Dishes, og proteinuttrykket og lokaliseringen ble studert ved hjelp av konfokal fluorescensmikroskopi. Lokaliseringen ble studert ved hjelp av kjerne-, ER- og Golgi-markør. Bildene er tatt med 60x objektiv ved hjelp av et invertert konfokalmikroskop.

3.3 Proteindelen og sukker-kjedenes innflytelse på syntese og sortering av serglysin

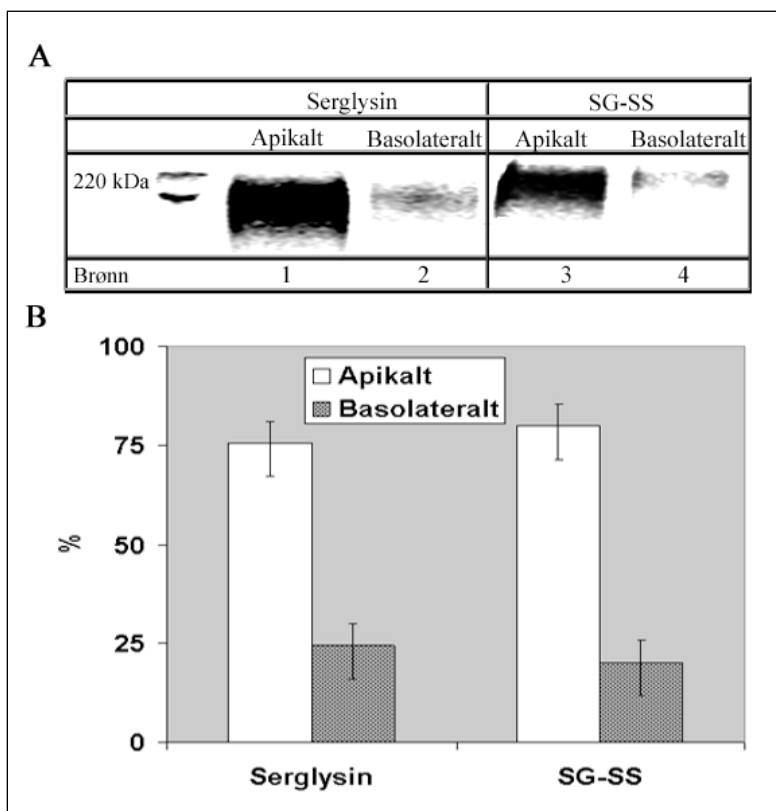
Ved å benytte ulike tilnærminger var det ønskelig å studere hva som påvirker de tidlige trinnene i syntese og sortering av serglysin. Det første del-studiet gikk ut på å studere hvilken innflytelse protein-konformasjonen og GAG-kjedene til serglysin har på sortering og syntese.

3.3.1 Proteinkonformasjonens innflytelse på syntese og sortering av serglysin

Som tidligere diskutert, vil det å mutere en cystein, som antas å danne en intern disulfidbro, sannsynligvis gi en serglysin-variant med endret konformasjon (SG-SS). GAG-kjede-syntesen og sorteringen til SG-SS ble sammenliknet med det opprinnelige serglysin. Molekylmassen til serglysin og SG-SS uten GAG-kjeder er estimert til 41 kDa.

3.3.1.1 Sortering av SG-SS

Vi ønsket å finne ut av om endringer i proteindelen til serglysin kunne påvirke GAG-syntese og intracellulær sortering. Ved å mutere bort den antatte N-terminale disulfidbroen til serglysin, vil man kunne studere effekten av den resulterende konformasjonsendringen. MDCK II-celler som stabilt uttrykker henholdsvis serglysin og SG-SS ble dyrket på filter og merket inn med ³⁵S-cys/met. Serglysin og SG-SS fra apikal og basolateral side ble isolert ved hjelp av IP og analysert på en 4-12 % Bis-Tris SDS-PAGE (Figur 3.11).



Figur 3.11 Serglysin og SG-SS. MDCK II-celler som stabilt uttrykker henholdsvis serglysin og SG-SS ble dyrket på filtre i tre døgn, og metabolsk merket med ³⁵S-cys/met. Etter 24 timer ble de apikale og de basolaterale mediene høstet separat, og serglysin og SG-SS ble IP med polyklonalt 290 A antistoff mot GFP, før applisering på en 4-12 % Bis-Tris SDS-PAGE (A). Den grafiske fremstillingen av sorteringen er basert på tre uavhengige forsøk, og kvantiteringen ble utført ved hjelp av ImageQuant (B).

Uttrykksnivået er ikke helt likt for serglysin og SG-SS, men like stor andel av SG-SS som av serglysin ble skilt ut i det apikale og det basolaterale mediet. Rundt 75 % av serglysin og SG-SS ble transportert til den apikale siden, mens 25 % ble transportert til den basolaterale siden. Endret konformasjon ved å mutere bort den N-terminale disulfidbroen, førte ikke til noen endringer i sorteringsmønsteret til serglysin.

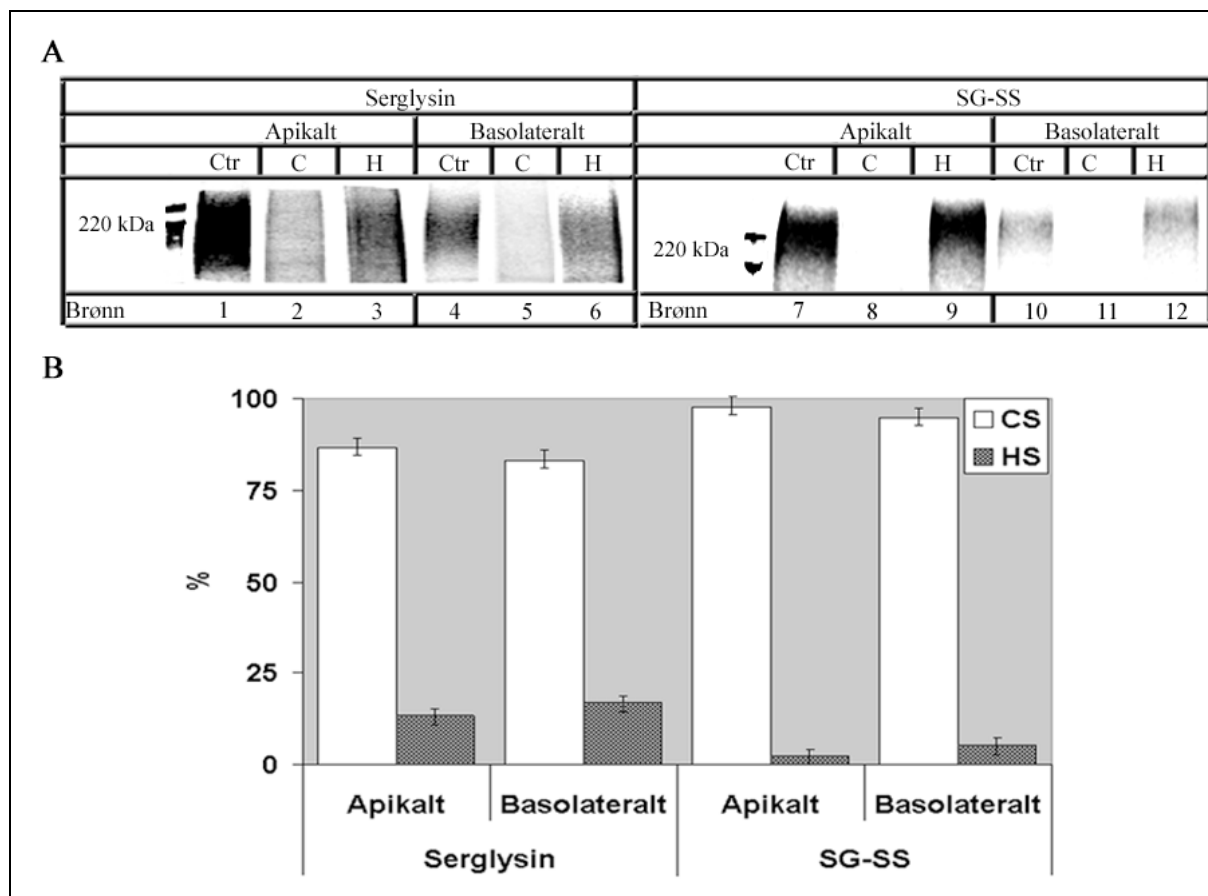
3.3.1.2 GAG-syntese på SG-SS

Det er vist tidligere at serglysin enten bare har GAG-kjeder av CS-typen, eller uttrykkes som en hybrid med både CS- og HS-kjeder. Serglysin har åtte potensielle GAG-kjede-bindingssteder, men hvor mange av disse som er modifisert i ulike celledslag er ikke klarlagt. Foruten forskjeller i antall GAG-kjeder, så kan GAG-kjedene variere i både lengde og grad av sulfatering (Vuong et al. 2006; Tveit et al. 2005). Når syntesen av GAG-kjedene til serglysin ble studert, undersøkte vi først CS/HS-sammensetningen, før vi forsøkte å finne ut av antall GAG-kjeder og/eller GAG-kjedenes lengde, og tilslutt i hvilken grad GAG-kjedene var sulfatert.

CS/HS-sammensetningen på SG-SS

Det er vist tidligere at serglysin uttrykt i MDCK-celler har mest GAG-kjeder av typen CS, men også noe HS (Vuong et al. 2006). For å undersøke om mutering av de N-terminale cysteinene forandrer CS/HS-sammensetningen, ble MDCK II-celler som stabilt uttrykker serglysin og SG-SS dyrket på filter og merket inn med ³⁵S-cys/met. Serglysin og SG-SS fra apikal og basolateral side ble isolert ved hjelp av IP og GAG-kjedene ble degradert med cABC- (degraderer CS-kjeder slik at man sitter igjen med HS-kjeder) og HNO₂-behandling (degraderer HS-kjeder slik at man sitter igjen med CS-kjeder). Prøvene ble applisert på en 4-12 % Bis-Tris SDS-PAGE (Figur 3.12).

RESULTATER

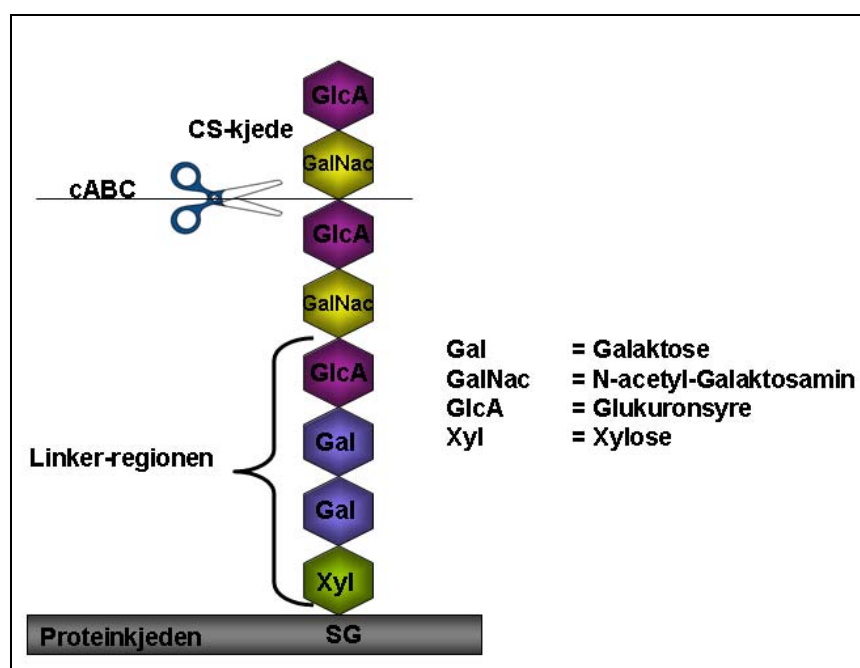


Figur 3.12 CS/HS-sammensetningen på serglysin og SG-SS. MDCK II-celler som stabilt uttrykker serglysin eller SG-SS ble dyrket på filtre i tre døgn, og metabolsk merket med ^{35}S -cys/met. Etter 24 timer ble de apikale og de basolaterale mediene høstet separat, og serglysin-variantene ble IP med polyklonalt 290 A antistoff mot GFP. Alle de isolerte serglysin-variantene ble delt i tre like alikvoter, hvorav en forble ubehandlet (Ctrl), mens de to andre ble behandlet med henholdsvis cABC (C) og HNO_2 (H), før applisering på en 4-12 % Bis-Tris SDS-PAGE (**A**). Den grafiske fremstillingen av CS/HS-sammensetningen er basert på tre uavhengige forsøk og kvantiteringen ble utført ved hjelp av ImageQuant (**B**).

Serglysin skilt ut apikalt og basolateralt har omtrent samme CS/HS-sammensetningen, 85 % CS og 15 % HS (Figur 3.12 B). SG-SS, derimot, har bare påviselige CS-kjeder, siden alle GAG-kjedene blir brutt ned ved behandling med cABC (Figur 3.12 A, brønn 8 og 11). Degradering av HS-kjedene (Figur 3.12 A, brønn 9 og 12) ga liten reduksjon i SG-SS-området av gelen. I gjennomsnitt består SG-SS molekyler av 95 % CS-kjeder og 5 % HS-kjeder (Figur 3.12 B). Selv om serglysin og SG-SS sorteres relativt likt (Figur 3.11), så var CS/HS-sammensetningen noe endret for SG-SS sammenliknet med serglysin.

3.3.1.3 Antall GAG-kjeder og GAG-kjedelengden på serglysin

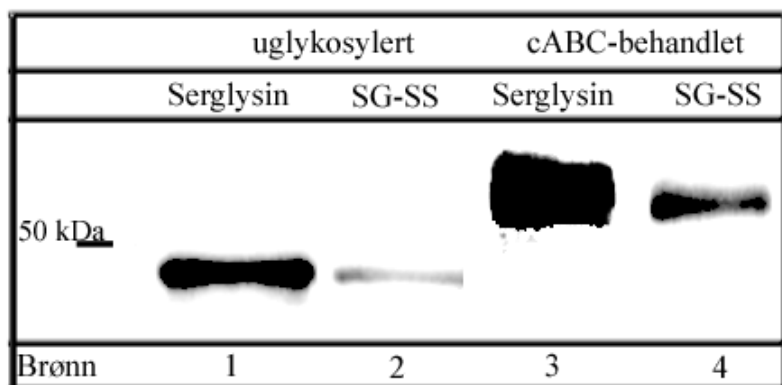
Serglysin har åtte potensielle bindingssteder for GAG-kjeder, men om alle er i bruk i MDCK II-celler er ikke kjent. I figur 3.11 ligger SG-SS høyere opp i gelen enn serglysin, men begge proteinkjedene har i utgangspunktet like stor molekylmasse (41 kDa), så den ulike mobiliteten i gelen skyldes mest sannsynlig forskjeller i GAG-kjedene. Enten har SG-SS flere GAG-kjeder, eller så er GAG-kjedene lengre. Likevel er det viktig å verifisere at nakent protein for de to variantene har lik mobilitet på gel. Dette ble gjort ved å analysere cellefraksjoner fra de to cellelinjene (MDCK-serglysin og MDCK-SG-SS) ved hjelp av WB. Ved samtidig å analysere serglysin og SG-SS isolert fra dyrkningsmediet, vil man kunne få indikasjoner på om det er påviselige forskjeller i antall GAG-kjeder. Serglysin-varianter som utelukkende er modifisert med CS, vil etter cABC-behandling bestå av proteindelen, og seks sukker-molekyler bundet til hvert GAG-sete som er i bruk (Figur 3.13).



Figur 3.13 CS degradering med cABC.

Hvis det er forskjell i antall GAG-seter som er i bruk på serglysin og SG-SS, vil det gi ulik molekylmasse etter degradering med cABC. For å undersøke dette ble MDCK II-celler som stabilt uttrykker serglysin eller SG-SS ble dyrket på filter, og cellefraksjonen og det apikale mediet ble høstet. Alikvoter av det apikale mediet ble cABC-behandlet før cellefraksjonen og det apikale mediet ble applisert på en 10 % Bis-Tris SDS-PAGE, og proteinene ble visualisert ved hjelp av WB som vist i figur 3.14.

RESULTATER



Figur 3.14 Serglysin og SG-SS. MDCK II-celler som stabilt uttrykker henholdsvis serglysin og SG-SS ble dyrket på filtre, og etter tre døgn ble filtrene flyttet over i nye brønner med serumfritt medium. Cellefraksjonene (brønn 1 og 2) og de apikale mediene (brønn 3 og 4) ble høstet etter 16 timer, og alikvoter av de apikale mediene ble behandlet med cABC. Prøvene ble applisert på en 10 % Bis-Tris SDS-PAGE og WB ble utført med polyklonalt 6556 antistoff mot GFP.

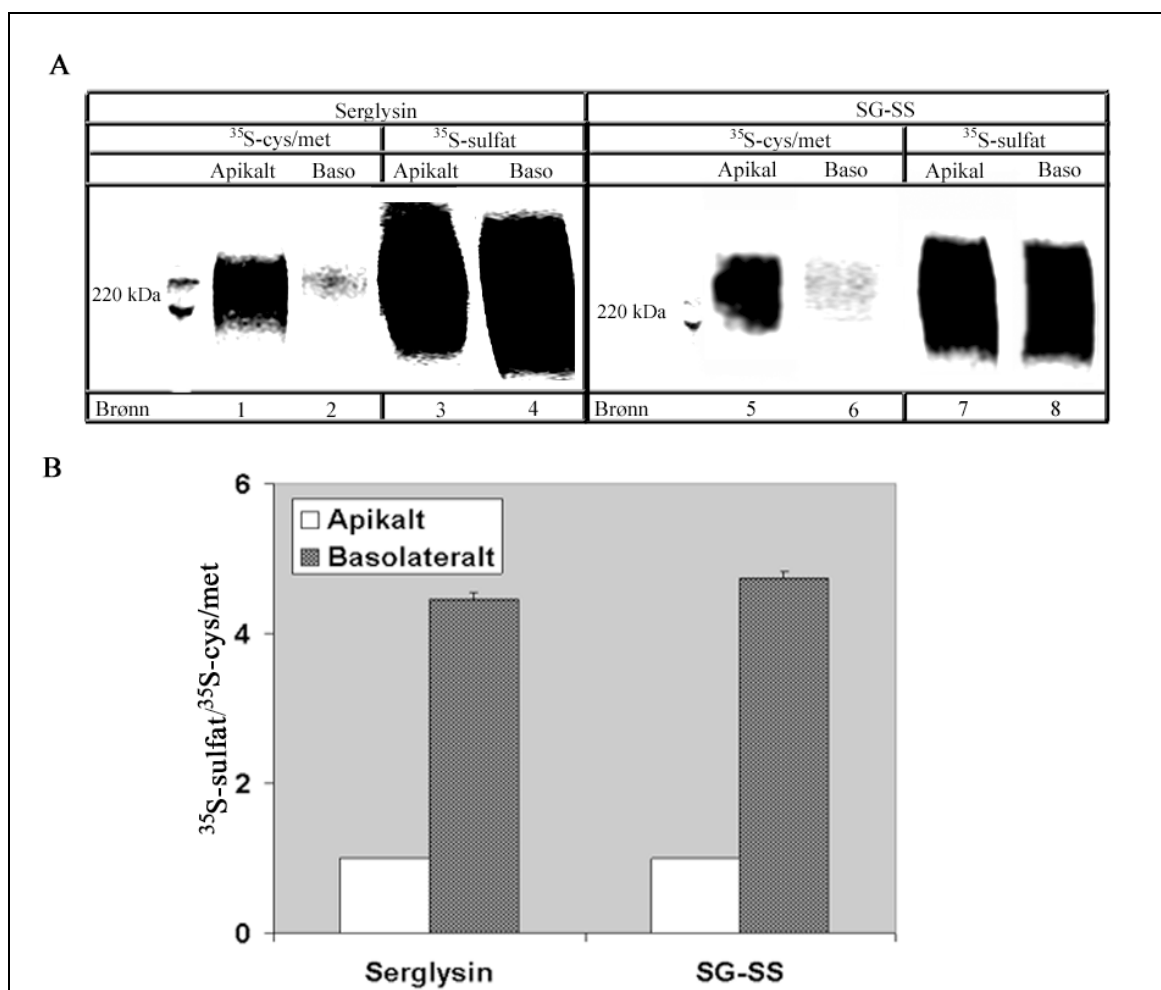
I figur 3.11 ligger SG-SS fra både det apikale og det basolaterale mediet høyere opp i gelen enn serglysin, så da videre sammenlikning av serglysin og SG-SS skulle utføres, ble bare prøver fra apikalt medium applisert på gelen. I cellefraksjonen er en betydelig andel av serglysin og SG-SS ennå ikke glykosylert (med molekylmasse på 41 kDa), som vist (Figur 3.14, brønn 1 og 2). Etter cABC-behandling av serglysin og SG-SS isolert fra det apikale mediet (Figur 3.14, brønn 3 og 4), ser vi at molekylmassen også her er tilnærmet lik. Behandling med cABC fjerner hele CS/DS-kjeder unntatt seks sukker-molekyler på hvert bindingssete som er benyttet (Figur 3.13), så dersom ulikt antall GAG-kjede-bindingsseter er i bruk, vil molekylmassen etter cABC-behandling være forskjellig for de to serglysin-variantene. En forskjell på seks sukker-enheter medfører en masseforskjell på 1,5-2 kDa som vil kunne observeres ved SDS-PAGE. Forskjellen i molekylmasse i figur 3.11 skyldes dermed ulik lengde på GAG-kjedene, og ikke ulikt antall GAG-kjeder.

Det kan dermed se ut som om mutasjon av to N-terminale cysteiner til seriner, som kan danne en disulfidbro N-terminalt i serglysin, fører til en forlengelse av GAG-kjedene. Dette kan verifiseres og studeres nærmere ved å utføre mer detaljert analyse av GAG-kjedene.

Sulfatering av GAG-kjedene til SG-SS

Det er vist tidligere at sulfateringsgraden og sulfateringsmønsteret for serglysin utskilt til apikalt er forskjellig fra det for serglysin som skilles ut basolateralt (Tveit et al. 2005). Vi ønsket å undersøke om denne forskjellen fortsatt var tilstede for SG-SS med muterte cysteiner og lengre GAG-kjeder.

For å undersøke sulfateringsgraden til serglysin og SG-SS, ble MDCK II-celler som stabilt uttrykker SG-SS dyrket på filtre og metabolsk merket med ^{35}S -cys/met eller ^{35}S -sulfat. Serglysin-variantene ble isolert ved hjelp av IP og analysert ved 4-12 % Bis-Tris SDS-PAGE (Figur 3.15).



Figur 3.15 Sulfatering av serglysin og SG-SS. MDCK II-celler som stabilt uttrykket serglysin og SG-SS ble dyrket på filtre i 3 døgn og metabolsk merket med ^{35}S -cys/met eller ^{35}S -sulfat i 24 timer. Apikalt og basolateralt (Baso) medium ble høstet separat, og serglysin og SG-SS ble isolert ved hjelp av IP med polyklont 290 A antistoff mot GFP, før analyse ved 4-12 % Bis-Tris SDS-PAGE (**A**). I **B** vises den grafiske fremstillingen av sulfateringen av GAG-kjedene i forhold til mengden protein (^{35}S -sulfat/ ^{35}S -cys/met). Tre uavhengige forsøk ble gjort, og kvantiteringen ble utført ved hjelp av ImageQuant.

RESULTATER

Som vist tidligere (Tveit et al. 2005), er GAG-kjedene til serglysin utskilt basolateralt langt mer sulfaterte enn GAG-kjedene til apikalt serglysin (Figur 3.15 A). Beregning av inkorporert sulfat (^{35}S -sulfat innmerking) relativt til proteindelen (^{35}S -cys/met innmerking), viser at GAG-kjedene på basolateral side er omtrent 4,5 ganger mer sulfatert enn det apikale motstykket (Figur 3.15 B). Det er derfor forskjellig modifisering langs den apikale og den basolaterale transportveien i disse cellene, og dette stemmer overens med tidligere studier av serglysin (Tveit et al. 2005).

De fleste SG-SS molekylene skilles også ut i det apikale mediet, og kun en mindre andel kan gjenfinnes i det basolaterale mediet (Figur 3.15 A, brønn 5 og 6). Allikevel bærer det basolateralt utskilte SG-SS (Figur 3.15 A, brønn 8) omtrent like mye ^{35}S -sulfat som det apikale (Figur 3.15 A, brønn 7). Når man beregner sulfat (^{35}S -sulfat innmerking) relativt til protein (^{35}S -cys/met innmerking), viser dette at GAG-kjedene på basolateralt SG-SS er omtrent 5 ganger mer sulfatert enn GAG-kjedene til apikalt sortert SG-SS (Figur 3.15 B). Selv om SG-SS har en annen CS/HS-sammensetning og GAG-kjedelengde enn serglysin, så fører ikke dette til en endring i den apikal til basolateral sulfateringsratio for GAG-kjeder på serglysin.

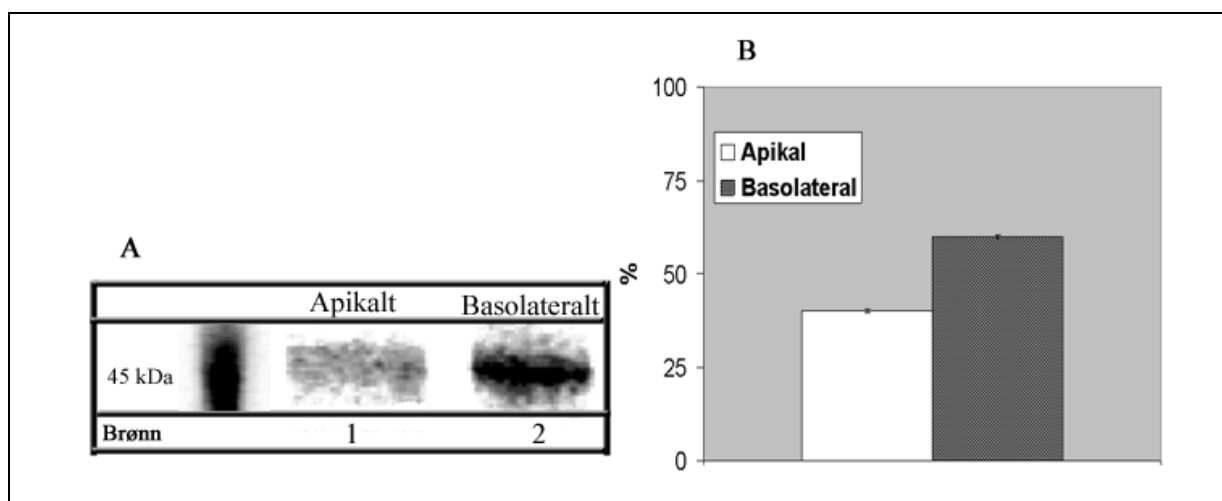
3.3.2 GAG-kjedenes påvirkning på syntese og sortering av serglysin

GAG-kjedene til proteoglykaner er blitt foreslått som sorteringssignaler i polarisert transport i epitelceller. Transporten av serglysin uten sukkerkjeder, vil kunne gi informasjon om sukkerkjedene er viktige som sorteringssignaler i polarisert transport av serglysin, eller om proteindelen er avgjørende. Når vi studerer syntese av GAG-kjeder og transport av serglysin, kan det være enten CS-, HS- eller både CS- og HS-kjeder som påvirker transportretningen. Serglysin har åtte potensielle seter for GAG-syntese, men det ville være enklere å studere GAG-kjedenes betydning for serglysin med bare ett mulig bindingssete for GAG-kjeder. Vi laget derfor en serglysin-variant uten seter for GAG-kjedesyntese (SG-UGAG), og en variant med bare ett sete for GAG-kjedesyntese (SG-1GAG).

3.3.2.1 Sortering av serglysin uten GAG-kjeder

Det er blitt foreslått at GAG-kjeder kan være sorteringsdeterminanter i polarisert transport i epitelceller, og noen CS-xylosider er vist å bli sortert apikalt (Kolset et al. 1999). Glypikan med HS-kjeder transporteres imidlertid hovedsakelig basolateralt, men transporteres mer apikalt dersom HS-kjedene fjernes (Mertens et al. 1996). Det er derfor interessant å se hvilken betydning GAG-kjedene til serglysin har for intracellulær sortering i MDCK II-celler.

MDCK II-celler som stabilt uttrykker SG-UGAG ble dyrket på filtre, metabolsk merket med ^{35}S -cys/met, før SG-UGAG fra apikalt og basolateralt medium ble IP og analysert ved 10 % Bis-Tris SDS-PAGE (Figur 3.16).

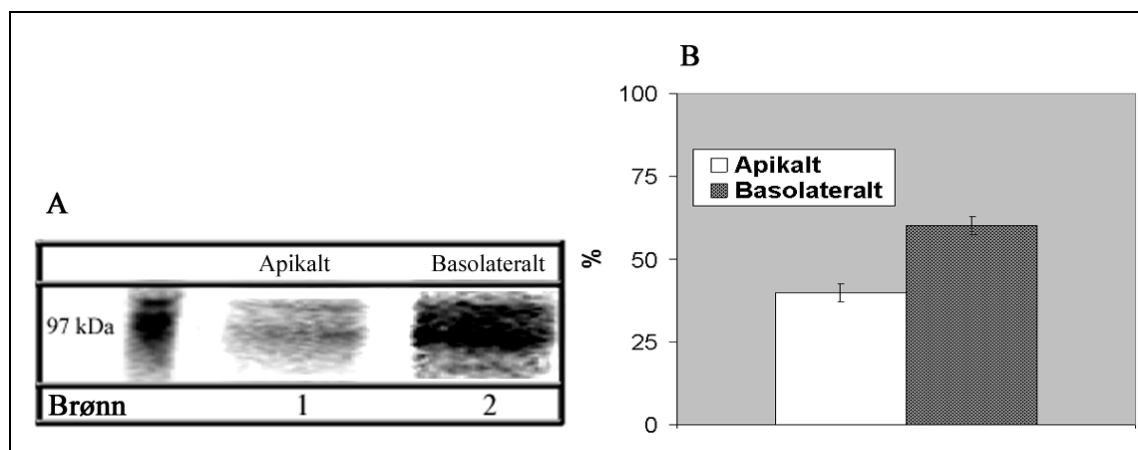


Figur 3.16 Sortering av SG-UGAG. MDCK II-celler som stabilt uttrykket SG-UGAG ble dyrket på filtre i tre døgn, metabolsk merket med ^{35}S -cys/met, og høstet etter 24 timer. Det apikale og det basolaterale mediet til SG-UGAG ble høstet separat, og SG-UGAG ble IP med polyklonalt 290 A antistoff mot GFP, før applisering på en 10 % Bis-Tris SDS-PAGE (A). Den grafiske fremstillingen av sorteringen til SG-UGAG er basert på tre uavhengige forsøk, og kvantiteringen ble utført ved hjelp av ImageQuant (B).

Figur 3.16 viser at SG-UGAG ikke har GAG-kjeder, og har en størrelse på ca. 45 kDa. SG-UGAG transporteres mest til det basolaterale mediet (Figur 3.16 A, brønn 2) og minst til det apikale mediet (Figur 3.16 A, brønn 1). I gjennomsnitt ble 40 % av SG-UGAG transportert til det apikale mediet, mens 60 % ble transportert basolateralt. Fjerningen av alle GAG-kjedene til serglysin endret sorteringen fra hovedsakelig apikal transport (75 %) til en mer upolarisert sortering (40-60 %). Dette tyder på at serglysin er avhengig av GAG-kjedene for apikal sortering.

3.3.2.2 Sortering av SG-1GAG

For å ytterligere kunne studere GAG-kjedenes betydning i sorteringen av serglysin, ble en serglysin-variant med bare et bindingssete for GAG-kjeder laget (SG-1GAG). For å studere sorteringen av SG-1GAG ble MDCK II-celler som stabilt uttrykker SG-1GAG ble dyrket på filter, metabolsk merket med ^{35}S -cys/met, før SG-1GAG fra apikalt og basolateralt medium ble IP og analysert på en 10 % Bis-Tris SDS-PAGE.



Figur 3.17 Sortering av SG-1GAG. MDCK II-celler som stabilt uttrykker SG-1GAG ble dyrket på filtre i tre døgn, metabolsk merket med ^{35}S -cys/met, og høstet etter 24 timer. SG-1GAG ble IP med polyklonalt 290 A antistoff mot GFP, før applisering på 10 % Bis-Tris SDS-PAGE (A). Den grafiske fremstillingen av fordelingen av SG-1GAG er basert på tre uavhengige forsøk, kvantiteringen ble utført ved hjelp av ImageQuant (B).

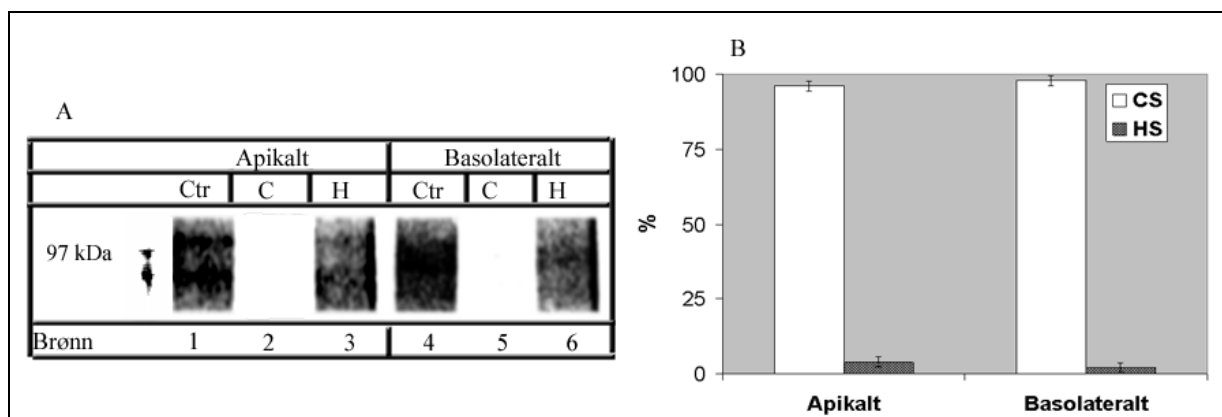
Med en enkelt GAG-kjede har SG-1GAG en størrelse på ca. 97 kDa (Figur 3.17 A), i forhold til serglysin som ligger rundt 220 kDa. SG-1GAG transporteres i noe større grad til det basolaterale mediet (Figur 3.17 A, brønn 2) enn til det apikale mediet (Figur 3.17 A, brønn 1). I gjennomsnitt ble 40 % av SG-1GAG skilt ut i det apikale mediet, mens 60 % ble transportert til det basolaterale mediet. Fordelingsmønsteret for SG-1GAG likner på det som ble observert for serglysin uten GAG (Figur 3.16), og har en tilnærmet upolarisert sortering (Figur 3.17 B) En GAG-kjede er dermed ikke nok for til å mediere apikal sortering av serglysin.

3.3.2.3 GAG-syntese på SG-1GAG

CS-kjeder er den dominerende type GAG-kjede på serglysin som uttrykkes i MDCK II-celler, men en viss andel er hybrid proteoglykaner og modifiseres med både CS- og HS-kjeder (Tveit et al. 2005). I sammenheng med apikal og basolateral sortering er type GAG-kjede interessant, siden CS-kjeder hovedsakelig påvises på proteoglykan som er transportert i apikal retning i konfluente MDCK-celler (Kolset et al. 1999). Samtidig medfører HS-kjedene på glypikan at dette proteoglykanet transporteres mer basolateralt (Mertens et al. 1996). Mekanismene bak disse observasjonene er imidlertid ikke kjent. SG-1GAG hadde en mer upolarisert sortering enn serglysin, og det var dermed interessant å se hva slags GAG-kjede SG-1GAG ble modifisert med, og hvordan sulfateringsgraden var for denne GAG-kjeden.

CS/HS-sammensetningen på SG-1GAG

For å undersøke om SG-1GAG var modifisert med CS- eller HS-kjeder, ble MDCK II-celler som stabilt uttrykker SG-1GAG dyrket på filtre og merket metabolsk med ^{35}S -cys/met. SG-1GAG ble isolert fra apikalt og basolateralt medium ved hjelp av IP og GAG-kjedene ble degradert ved cABC- (degraderer CS-kjeder) eller HNO_2 -behandling (degraderer HS-kjeder). Prøvene ble applisert på en 10 % Bis-Tris SDS-PAGE (Figur 3.18).



Figur 3.18 CS/HS-sammensetningen på SG-1GAG. MDCK II-celler som stabilt uttrykker SG-1GAG ble dyrket på filtre i tre døgn, metabolsk merket med ^{35}S -cys/met, og høstet etter 24 timer. SG-1GAG ble IP med polyklonalt 290 A antistoff mot GFP, delt i tre like alikvoter, hvorav en forble ubehandlet (Ctr), mens de to andre ble behandlet med henholdsvis cABC (C) og HNO_2 (H), før applisering på en 10 % Bis-Tris SDS-PAGE (A). Den grafiske fremstillingen av CS/HS-sammensetningen for SG-1GAG er basert på tre uavhengige forsøk, og kvantiteringen ble utført ved hjelp av ImageQuant (B).

Figur 3.18 viser at GAG-kjeden til SG-1GAG bare er av CS-typen. Degradering med cABC førte til at i praksis alt SG-1GAG med molekylmasse 97 kDa ble degradert både for apikal og basolateral prøve (Figur 3.18 A, brønn 2 og 5). Degradering av HS-kjedene gav en minimal reduksjon i tilsvarende område av gelen (Figur 3.18 A, brønn 3 og 6). I gjennomsnitt ga bestemmelsen av type GAG-kjede bundet til SG-1GAG-molekylene 97 % CS kjeder og 3 % HS-kjeder (Figur 3.18 B). Det var liten forskjell på apikal og basolateral SG-1GAG, noe som indikerer at en enkelt CS-kjede ikke er nok for å mediere apikal sortering.

GAG-kjedelengden på serglysin

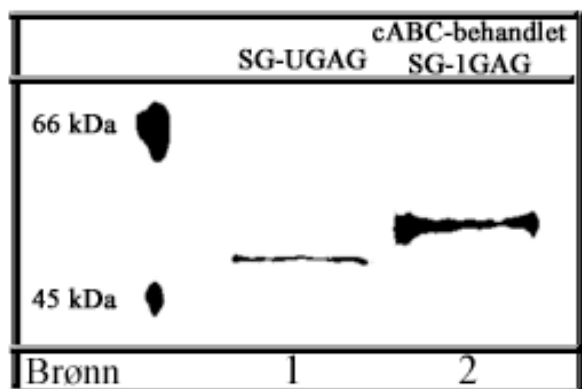
Det ble ikke gjort noen direkte studier på lengden til GAG-kjeden på SG-1GAG, men ut fra figur 3.18, synes apikal og basolateral SG-1GAG å vandre like langt i gelen, så sukkerkjeden ser ut til å være like lang på begge sider. Både serglysin og SG-SS har en molekylmasse på 220 kDa eller mer. Når serglysin bare har en GAG-kjede, er molekylmassen rundt 100 kDa, og siden proteindelen til SG-1GAG er beregnet til 40 kDa, utgjør en CS-GAG omtrent 60 kDa. Dette er omtrent samme størrelse som

RESULTATER

tidligere ble beregnet fra gelfiltreringsdata for CS-kjeder på apikal serglysin - 67 kDa. Basolaterale CS-GAG-kjeder på serglysin var imidlertid kortere – 43 kDa (Vuong et al. 2006).

Basert på figur 3.11 og 3.14, konkluderer vi med at forskjellen i molekylmasse i figur 3.11, skyldes lengre GAG-kjeder og ikke at flere bindingssteder for GAG-kjeder er benyttet. Hvis vi sammenlikner SG-UGAG som ikke har GAG-kjeder, med cABC-behandlet SG-1GAG som består av serglysin med seks sukker-enheter bundet (figur 3.13) til ett GAG-bindingssete, kan vi få et inntrykk av hvor stor endring disse seks sukker-molekylene medfører for vandringen i en SDS-PAGE.

Vi dyrket opp MDCK II-celler som stabilt uttrykker henholdsvis SG-UGAG og SG-1GAG på filtre. Etter tre døgn ble cellene metabolsk merket med ^{35}S -cys/met, og cellene ble høstet etter 24 timer. Serglysin-variantene i det apikale mediet ble IP og applisert på en 10 % Bis-Tris SDS-PAGE (Figur 3.19).



Figur 3.19. SG-1GAG og SG-UGAG.

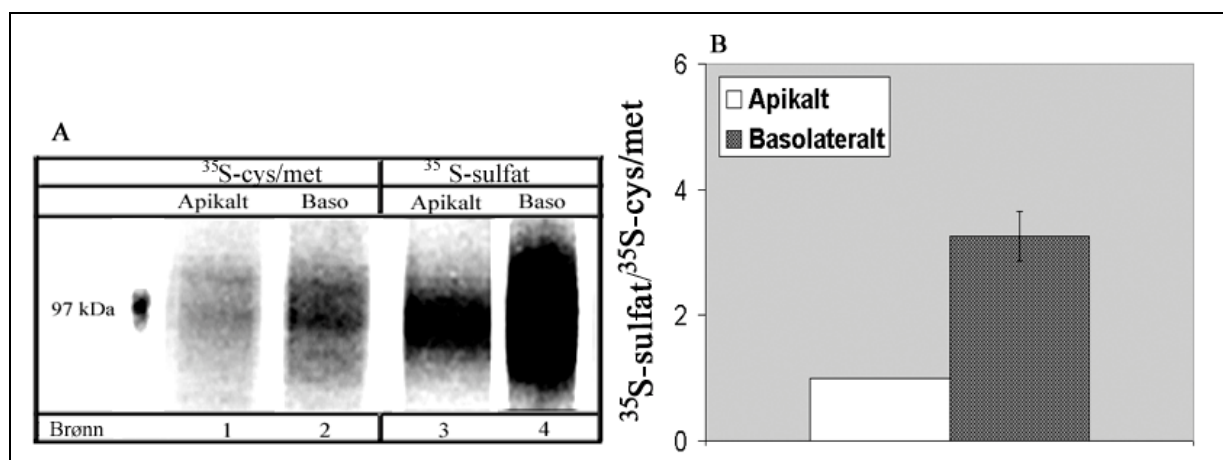
MDCK II-celler som stabilt uttrykker henholdsvis SG-UGAG (brønn 1) og SG-1GAG (brønn 2) ble dyrket på filtre, og etter tre døgn ble cellene metabolsk merket med ^{35}S -cys/met, og høstet etter ett døgn. Serglysin-variantene fra de apikale mediene ble IP med polyklont 290 A antistoff mot GFP, og SG-1GAG ble behandlet med cABC som bryter ned CS-kjedene, og lar seks sukker-enheter være igjen per GAG-bindingssete. Prøvene ble så applisert på en 10 % Bis-Tris SDS-PAGE.

Serglysin med seks sukker-enheter på ett GAG-kjede-sete (Figur 3.19 brønn 2) ligger påviselig høyere i gelen enn serglysin uten GAG-kjeder (Figur 3.19 brønn 1). Dette styrker vår antakelse om at serglysin og SG-SS har samme antall CS-GAG-kjeder (Figur 3.14), siden en forskjell på en enkelt degradert CS-kjede helt klart kan observeres ved SDS-PAGE.

Sulfateringsgraden til SG-1GAG

Figur 3.15 B viser at både serglysin og SG-SS i basolateral medium har mer sulfaterte GAG-kjeder, sammenliknet med tilsvarende molekyler i apikalt medium. Vi ønsket å undersøke om en slik forskjell i sulfatering for apikale og basolaterale GAG-kjeder også kunne påvises for den ene GAG-kjeden på SG-1GAG. For å undersøke sulfateringsgraden til SG-1GAG ble MDCK II-celler som stabilt uttrykker SG-1GAG ble dyrket på filtre i tre døgn og metabolsk merket med ^{35}S -cys/met eller ^{35}S -sulfat i

ett døgn, før det apikale og det basolaterale mediet ble høstet. SG-1GAG fra det apikale og det basolaterale mediet ble isolert ved IP og analysert på en 10 % Bis-Tris SDS-PAGE (Figur 3.20).



Figur 3.20 Sulfatering av SG-1GAG. MDCK II-celler som stabilt uttrykket SG-1GAG ble dyrket på filtre i 3 døgn, metabolsk merket med $^{35}\text{S-cys/met}$ eller $^{35}\text{S-sulfat}$ og høstet etter 24 timer. SG-1GAG ble isolert fra apikalt og basolateralt (baso) medium ved IP med polyklonalt 290 A antistoff mot GFP, før applisering på en 10 % Bis-Tris SDS-PAGE (A). I B vises den grafiske fremstillingen av sulfateringen av GAG-kjedene i forhold til mengden protein ($^{35}\text{S-cys/met}/^{35}\text{S-sulfat}$). Tre uavhengig forsøk ble gjort, og kvantiteringen ble utført ved hjelp av ImageQuant.

SG-1GAG har i motsetning til serglysin et upolarisert transportmønster, og mesteparten (ca. 60 %) av SG-1GAG skilles ut på basolateral side (Figur 3.17 A, brønn 1 og 2). Basolaterale SG-1GAG bærer mye sulfat (Figur 3.20 A, brønn 3 og 4), og når vi kvantiterer mengde innmerket sulfat og sammenlikner dette med innmerket $^{35}\text{S-cys/met}$ kan vi estimere at de basolaterale GAG-kjedene er omtrent 3 ganger mer sulfaterte enn de apikale GAG-kjedene (Figur 3.20 B). Differensiell sulfateringsintensitet for serglysin i den apikale og den basolaterale sekretoriske vei kan altså observeres selv når serglysin bare har en enkelt GAG-kjede og har en upolarisert sortering.

3.4 Serglysin tidlig i den sekretoriske veien

I del to av denne oppgaven var formålet å studere serglysin tidlig i den sekretoriske vei. Data fra egen forskningsgruppe og også fra andre har indikert at den apikale og basolaterale sekretoriske vei kan skille lag tidligere enn det som er den rådende ”lærebokoppfatning”, kanskje allerede før inngangen til Golgi-apparatet (Prydz et al. 2008). Serglysin ble derfor modifisert med en KDEL-sekvens C-terminalt i GFP-delen, slik at proteoglykanet ville oppholde seg lengre i den tidlige delen av den sekretoriske vei. Dette ville kunne gjøre det mulig å oppnå en bedre forståelse av de tidlige syntesetrinn, spesielt syntesen av linker-regionen.

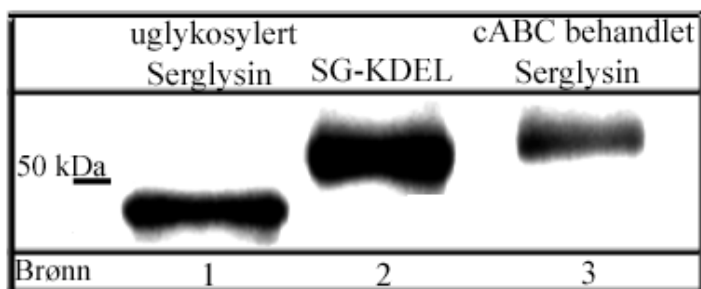
3.4.1 GAG-kjeder på SG-KDEL

Syntese av linker-regionen (Figur 1.6) til et proteoglykan er antatt å begynne i ER eller mellom ER og Golgi-apparatet. Hvor syntesen av linker-regionen gjøres ferdig og hvordan dette påvirker videre syntese og transport av proteoglykaner er ikke avklart. Linker-regionen til CS-kjeden kan være modifisert med sulfat (Sugahara et al. 1988; Dewaard et al. 1992), og det er blitt vist tidligere at linker-regionen til serglysin er mer sulfatert for basolateralt enn for apikalt serglysin (Tveit et al. 2005). For å få bedre innblikk i de tidligste trinnene i GAG-kjede-syntese, ble proteinkjedene til serglysin modifisert med en C-terminal KDEL-sekvens, som gjør at proteinet kan bindes av KDEL-reseptoren. Denne reseptoren kan bringe proteiner med KDEL-sekvens tilbake til ER når de har unnsloppet i retning av Golgi-apparatet. Vi ønsket å undersøke hvor mange sukker-enheter som er bundet til SG-KDEL som sirkulerer mellom ER og Golgi-apparatet, og om disse sukker-enhetene er sulfaterte.

3.4.2 GAG-modifikasjon av SG-KDEL

For å undersøke hvor mange og hvor lange GAG-kjeder som syntetiseres på SG-KDEL, ble MDCK II-celler som stabilt uttrykker henholdsvis serglysin og SG-KDEL dyrket på filtre i tre døgn og deretter tilsatt serumfritt medium ett døgn, før cellene ble høstet. Serglysin fra det apikale mediet ble cABC-behandlet (degraderer CS-kjeder). Prøvene ble applisert på en 10 % Bis-Tris SDS-PAGE og visualisert ved hjelp av WB (Figur 3.21).

Figur 3.21 Serglysin-varianter med og uten linker-region. MDCK II-celler som stabilt uttrykker serglysin og SG-KDEL ble dyrket på filtre i tre døgn før cellene ble tilsatt serumfritt medium. Etter 16 timer ble cellefraksjonene og det apikale mediet høstet. Cellefraksjonen fra serglysin (brønn 1) og SG-KDEL (brønn 2) ble applisert på en 10 % Bis-Tris SDS-PAGE, mens serglysin fra det apikale mediet ble cABC-behandlet (degraderer CS-kjeder) før applisering (brønn 3). Proteinene ble visualisert ved WB med polyklonalt antistoff 6556 mot GFP.



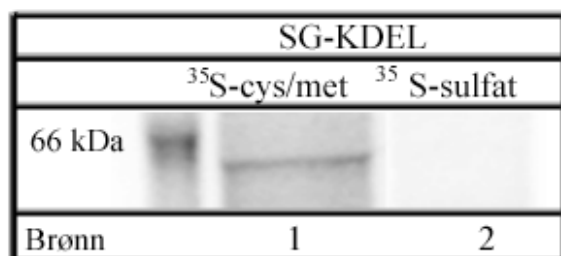
Apikal serglysin som er cABC-behandlet, har linker-regionen (fire sukker-enheter) og ytterligere to sukker-enheter på hvert GAG-bindingssete, slik at det til sammen er seks sukker-enheter gjenværende for hvert GAG-bindingssete etter cABC-behandling (Figur 3.13). SG-KDEL i cellefraksjonen har høyere molekylmasse enn uglykosylert serglysin (Figur 3.21 brønn 1). Dette skyldes ikke KDEL-vedhenget (0,56 kDa) alene, slik at SG-KDEL i cellefraksjonen er modifisert med noen sukker-enheter (Figur 3.21, brønn 2). Molekylmassen er imidlertid litt mindre enn for cABC-

behandlet serglysin isolert fra dyrkningsmediet som bærer seks sukker-enheter for hvert GAG-sete som er i bruk. Hvis vi forutsetter at like mange GAG-bindingssteder er i bruk i serglysin og SG-KDEL, bærer sistnevnte isolert fra cellefraksjonen færre enn seks sukker-enheter på disse setene (Figur 3.21, brønn 3).

3.4.2.1 Sulfatering av GAG-kjedene til SG-KDEL

Det er vist tidligere at linker-regionen til serglysin er sulfatert, og at linker-regionen til basolateralt utskilt serglysin er mer sulfatert enn for den apikale motpart (Tveit et al. 2005). Det er imidlertid ikke kjent når i syntese- og transport-forløpet linker-regionen blir sulfatert. Skjer dette under syntese av linker-regionen, tidlig i den sekretoriske vei, eller blir linker-regionen sulfatert samtidig med resten av GAG-kjeden sent i Golgi-apparatet? Vi ønsket derfor å undersøke om sukker-enhetene på SG-KDEL i cellefraksjonen, som bare har oppholdt seg i området mellom ER og Golgi-apparatet, er blitt sulfaterte.

For å undersøke sulfateringen av linker-regionen til SG-KDEL ble MDCK II-celler som stabilt uttrykker SG-KDEL dyrket på filtre i tre døgn, og metabolsk merket med ^{35}S -cys/met og ^{35}S -sulfat i ett døgn før cellene ble høstet. SG-KDEL fra cellefraksjonen ble IP, og applisert på en 4-12 % SDS-PAGE (Figur 3.22).



Figur 3.22 Sulfatering av SG-KDEL. MDCK II-celler som stabilt uttrykker SG-KDEL ble dyrket på filter i tre døgn, cellene ble metabolsk merket med ^{35}S -cys/met (brønn 1) eller ^{35}S -sulfat (brønn 2) og høstet etter 24 timer. SG-KDEL ble isolert fra cellefraksjoner ved IP med polyklonalt 290 A antistoff mot GFP, før applisering på en 4-12 % Bis-Tris SDS-PAGE.

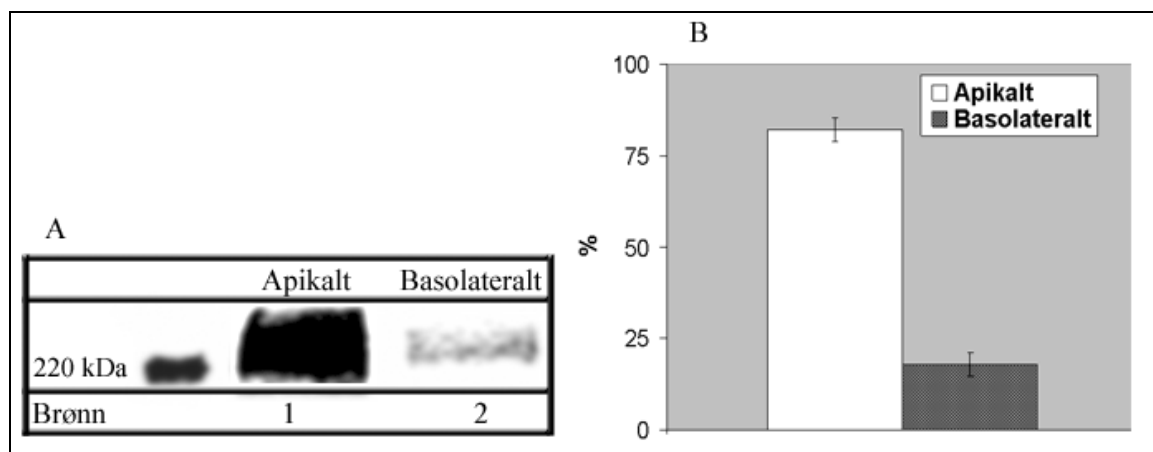
Gelutsnittet i figur 3.22 viser at det ikke er mulig å påvise sulfatert SG-KDEL i cellefraksjonen. Dette antyder at de 3-5 sukker-enhetene som denne proteinkjeden er modifisert med ikke er sulfatert. Det har vært utført flere tilsvarende eksperimenter, og det har ikke vært mulig å påvise sulfat på sukker-enhetene til SG-KDEL i cellefraksjonen.

3.4.3 Sekreterte SG-KDEL

Selv om KDEL-signalet gjør at SG-KDEL sirkulerer tidlig i den sekretoriske veien, vil alltid noen molekyler unnsnippe KDEL-reseptoren og bli transportert ut av cellen. Vi ønsket å undersøke om den andelen av SG-KDEL som unnslipp resirkuleringsmekanismen tidlig i den sekretoriske veien hadde endret syntese- og sorteringsmønster sammenliknet med serglysin.

3.4.3.1 Sortering av sekreterte SG-KDEL

For å undersøke sorteringen til SG-KDEL ble MDCK II-celler som stabilt uttrykker SG-KDEL ble dyrket på filtre i tre døgn, og metabolsk merket med ^{35}S -cys/met i ett døgn, før det apikale og det basolaterale mediet ble høstet. SG-KDEL fra apikalt og basolateralt medium ble isolert med IP og analysert på en 4-12 % Bis-Tris SDS-PAGE (Figur 3.23).



Figur 3.23 Sortering av sekreterte SG-KDEL. MDCK II-celler som stabilt uttrykker SG-KDEL ble dyrket på filtre i tre døgn, metabolsk merket med ^{35}S -cys/met i ett døgn før cellene ble høstet. SG-KDEL fra apikalt og basolateralt medium ble IP med polyklonalt 290 A antistoff mot GFP, før applisering på en 4-12 % Bis-Tris SDS-PAGE (A). Den grafiske fremstillingen av sorteringen til utskilt SG-KDEL er basert på tre uavhengige forsøk, og kvantiteringen ble utført ved hjelp av ImageQuant (B).

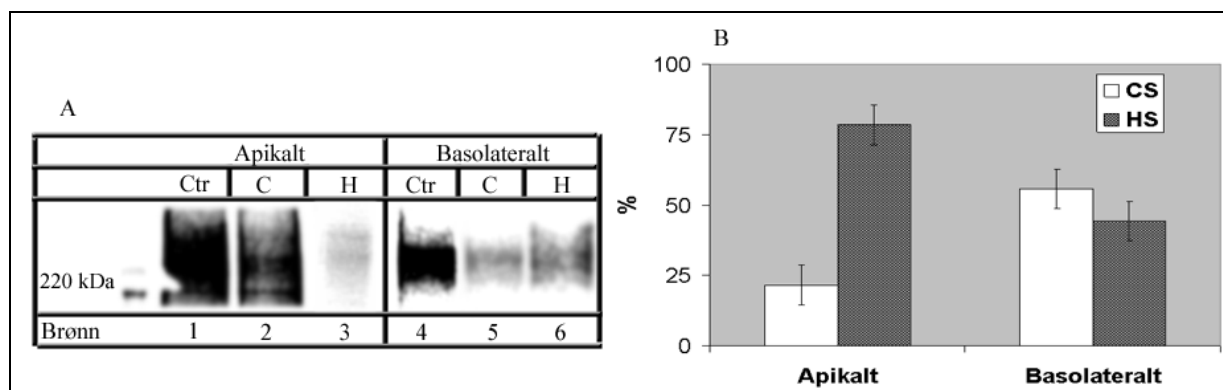
Utskilt SG-KDEL med GAG-kjeder har en molekylmasse, slik som serglysin, på omtrent 220 kDa (Figur 3.23 A). SG-KDEL sorteres også hovedsakelig til det apikale mediet (Figur 3.23 A, brønn 1 og 2), og i gjennomsnitt ble 82 % av de SG-KDEL-molekylene som ble skilt ut påvist i det apikale mediet (Figur 3.23 B). SG-KDEL skiller derfor ut fra MDCK II-celler med en polaritet som er svært lik den som er funnet for serglysin.

3.4.3.2 GAG-analyse av sekreterte SG-KDEL

Enzymene som forlenger og modifierer CS- og HS-kjeder er lokalisert til ulike deler av Golgi-apparatet (for oversikt, se: Prydz og Dalen. 2000). Derfor kan det være interessant å se om forlenget opphold av serglysin tidlig i den sekretoriske veien endrer CS/HS-sammensetningen og/eller sulfateringsgraden til SG-KDEL.

CS/HS-sammensetning på SG-KDEL

For å studere GAG-kjedene til SG-KDEL, ble MDCK II-celler som stabilt uttrykker SG-KDEL dyrket på filtre i tre døgn, metabolsk merket med ^{35}S -cys/met i ett døgn, før det apikale og det basolaterale mediet ble høstet. SG-KDEL fra apikal og basolateral side ble isolert med IP, og GAG-kjedene ble degradert ved cABC- (fjerner CS-kjeder) eller HNO_2 -behandling (fjerner HS-kjeder). Prøvene ble analysert på en 4-12 % Bis-Tris SDS-PAGE (Figur 3.24).



Figur 3.24 CS/HS-sammensetningen på SG-KDEL. MDCK II-celler som stabilt uttrykker SG-KDEL ble dyrket på filtre i tre døgn, metabolsk merket med ^{35}S -cys/met i ett døgn, før cellene ble høstet. SG-KDEL fra apikalt og basolateral medium ble IP med polyklonalt 290 A antistoff mot GFP. De isolerte SG-KDEL-molekylene ble delt i tre like aliquoter, hvorav en forble ubehandlet (Ctr), mens de to andre ble behandlet med henholdsvis cABC (C) og HNO_2 (H), før applisering på en 4-12 % Bis-Tris SDS-PAGE (A). Den grafiske fremstillingen av CS/HS-sammensetningen er basert på tre uavhengige forsøk, og kvantiteringen ble utført ved hjelp av ImageQuant (B).

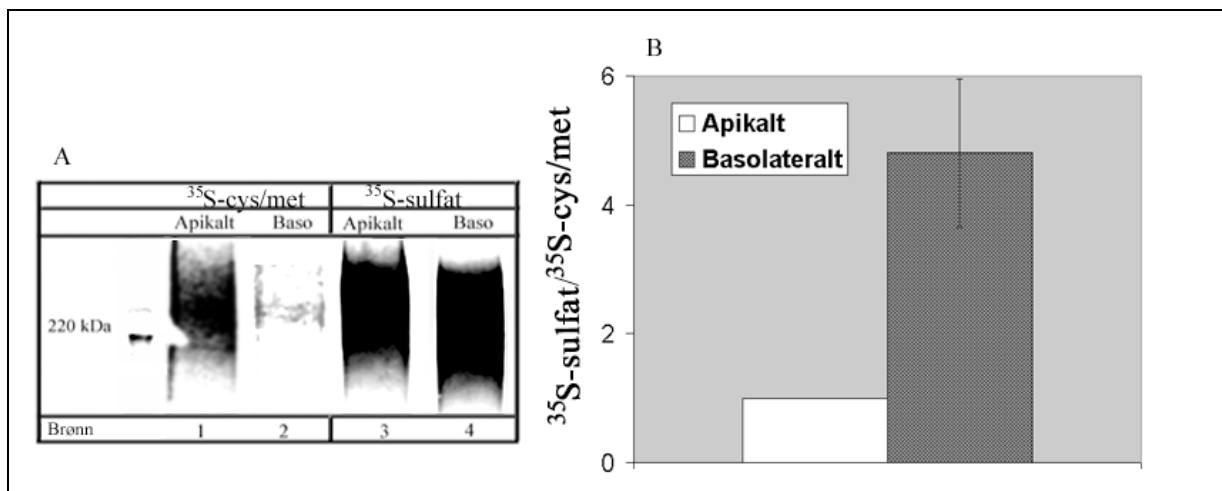
Figur 3.24 viser at SG-KDEL bærer både CS- og HS-kjeder og dermed kan karakteriseres som et hybrid proteoglykan. Både degradering av CS-kjedene (Figur 3.24 A, brønn 2 og 5) og HS-kjedene (Figur 3.24 A, brønn 3 og 6) ga en reduksjon av signalet fra SG-KDEL med en molekylvekt på ca. 220 kDa. I gjennomsnitt bærer SG-KDEL som skilles ut apikalt 20 % CS-kjeder og 80 % HS-kjeder (Figur 3.24 B), mens SG-KDEL som skilles ut basolateralt bærer 55 % CS-kjeder og 45 % HS-kjeder (Figur 3.24 B). GAG-kjede-sammensetningen til SG-KDEL er derfor veldig ulik den som er observert for serglysin (Figur 3.12), SG-SS (Figur 3.12) og SG-1GAG (Figur 3.18). Selv om forlenget opphold tidlig i den sekretoriske vei ikke endret sorteringen

RESULTATER

til SG-KDEL (Figur 3.23), ble GAG-kjede-sammensetningen endret i retning av mer HS-kjeder.

Sulfateringsgraden til sekreterte SG-KDEL

For å undersøke sulfateringsmønstret til SG-KDEL, ble MDCK II-celler som stabilt uttrykker SG-KDEL dyrket på filtre i tre døgn, og metabolsk merket med ^{35}S -cys/met eller ^{35}S -sulfat i ett døgn. SG-KDEL fra det apikale og det basolaterale mediet ble isolert ved hjelp av IP, og analysert på en 4-12 % Bis-Tris SDS-PAGE (Figur 3.25).

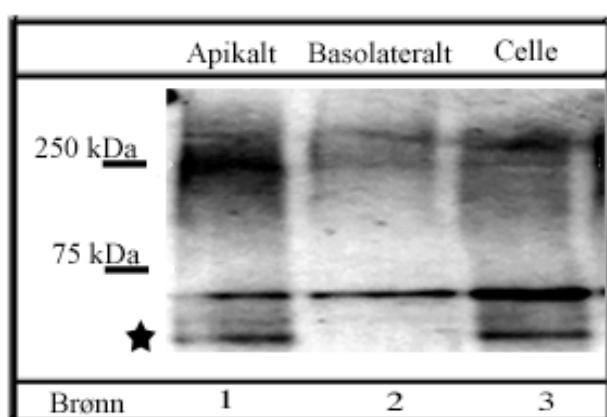


Figur 3.25 Sulfatering av SG-KDEL. MDCK II-celler som stabilt uttrykker SG-KDEL ble dyrket på filtre i tre døgn og metabolsk merket med ^{35}S -cys/met eller ^{35}S -sulfat i ett døgn før høsting. SG-KDEL fra de apikale og de basolaterale mediene ble isolert ved IP med polyklonalt 290 A antistoff mot GFP, og de isolerte SG-KDEL molekylene ble applisert på en 4-12 % Bis-Tris SDS-PAGE (**A**). I **B** vises den grafiske fremstillingen av sulfateringen av GAG-kjedene i forhold til mengden protein (^{35}S -sulfat/ ^{35}S -cys/met). Tre uavhengige forsøk ble gjort, og kvantiteringen ble utført ved hjelp av ImageQuant.

De fleste SG-KDEL molekylene skilles ut i det apikale mediet (Figur 3.25 A, brønn 1), og kun en mindre andel kan gjenfinnes i det basolaterale mediet (Figur 3.25 A, brønn 2). Allikevel bærer det basolateralt utskilt SG-KDEL mer ^{35}S -sulfat enn det apikale (Figur 3.25 A, brønn 3 og 4). Når man beregner sulfat (^{35}S -sulfat innmerkning) relativt til protein (^{35}S -cys/met innmerkning), viser dette at GAG-kjedene på basolateralt SG-KDEL er omtrent 5 ganger mer sulfatert enn apikalt SG-KDEL (Figur 3.25 B). Dermed er sulfateringsmønstret til SG-KDEL og serglysin relativt likt selv om GAG-kjede-sammensetningen er ulik.

3.4.4 Transporten til uglykosylert sekretert SG-KDEL

Ved å koble en KDEL-sekvens til serglysin kan dette proteoglykanet sirkulere mellom membransystemer lokalisert tidlig i den sekretoriske vei. Noen SG-KDEL-molekyler unnslipper KDEL-reseptoren og passerer gjennom Golgi-apparatet hvor de blir glykosylert før de transporteres ut av cellen, i tråd med tidligere observasjoner av tilsvarende molekyler (Jonsson et al. 2003). Da transporten av SG-KDEL ble undersøkt (Kapittel 3.4.3.1), viste figur 3.23 utskilte SG-KDEL molekyler med GAG-kjeder. Figur 3.26 viser at også SG-KDEL-molekyler som i liten grad er glykosylert (*) skilles ut på apikal side.



Figur 3.26 SG-KDEL. MDCK II-celler som stabilt uttrykker SG-KDEL ble dyrket på filtre i tre døgn, og tilsatt serumfritt medium i 16 timer før cellene ble høstet. Det apikale og det basolaterale mediet, samt cellefraksjonen (Celle) ble applisert på en 10 % Bis-Tris SDS-PAGE. Proteine ble visualisert ved hjelp av WB med polyklonalt antistoff 6556 mot GFP.

I forskningsgruppen er det blitt vist at når BFA tilsettes til MDCK II-celler som uttrykker serglysin, induseres en "Golgi-bypass" vei ut til plasmamembranen (upublisert manuskript). Ved lav konsentrasjon av BFA (2 µg/ml) skilles serglysin uten GAG-kjeder ut på apikal side, mens ved høyere konsentrasjoner av BFA (5-50 µg/ml), skjer dette også basolateralt. Figur 3.26 viser at SG-KDEL uten GAG-kjeder skilles ut i det apikale mediet (Figur 3.26 brønn 1) uten at cellene er behandlet med BFA, samtidig som uglykosylert SG-KDEL ikke kan påvises i det basolaterale mediet (Figur 3.26 brønn 2). Uglykosylerte SG-KDEL har enten gått gjennom Golgi-apparatet og ikke fått polymerisert GAG-kjeder eller nådd den apikale membranen på en Golgi-uavhengig måte. I og med at Golgi-syntese og -transport ikke er hemmet på noen måte, er det mest sannsynlig at SG-KDEL blir transportert utenom Golgi-apparatet.

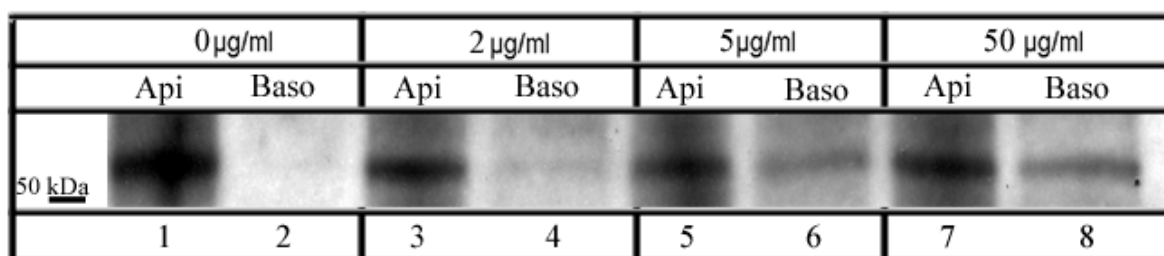
Vi ønsket dernest å undersøke om BFA kunne initiere en "Golgi-bypass" vei for SG-KDEL også til den basolaterale side av cellelaget.

RESULTATER

Transport av SG-KDEL ved behandling med Brefeldin A

Behandling av MDCK II-celler med 2 µg/ml BFA fører til redusert transport av serglysin gjennom Golgi-apparatet til plasmamembranen, mens en uglykosylert variant av serglysin skilles ut i det apikale mediet. Ved høyere konsentrasjoner av BFA reduseres også transporten fra ER til Golgi-apparatet, og serglysin skilles også ut basolateralt som en uglykosylert variant fra MDCK II-cellene (upublisert data).

Effekten av ulike konsentrasjoner av BFA på utskillelsen av SG-KDEL ble undersøkt ved at MDCK II-celler som stabilt uttrykker SG-KDEL ble dyrket på filtre i tre døgn, tilsatt serumfritt medium med ulike BFA-konsentrasjoner i ett døgn før cellene ble høstet. Medium fra apikale og basolaterale mediefraksjoner ble applisert på en 10 % Bis-Tris SDS-PAGE, og proteinene ble visualisert ved hjelp av WB (Figur 3.27).



Figur 3.27 Transport av SG-KDEL ved BFA-behandling. MDCK II-celler som stabilt uttrykker SG-KDEL ble dyrket på filtre i tre døgn, det ble deretter byttet til serumfritt medium med 0, 2, 5 eller 50 µg/ml BFA før cellene ble høstet 16 timer senere. De apikale og de basolaterale mediene ble applisert på en 10 % Bis-Tris SDS-PAGE. Proteinene ble visualisert ved hjelp av WB med polyklonalt antistoff 6556 mot GFP.

I figur 3.27 ser vi at den uglykosylerte varianten av SG-KDEL også skilles ut gradvis mer i det basolaterale mediet ved økende mengde tilsatt BFA, mens det er vanskelig å påvise en økning i apikal transport av den uglykosylerte varianten av SG-KDEL.

4.0 Diskusjon

Proteoglykaner er proteiner som modifiseres med lange, lineære sukkerkjeder som kalles GAG-kjeder. Proteoglykaner kan være membranbundne via et GPI-anker eller et transmembran-doméne, eller de skiller ut av cellene. Proteoglykaner syntetiseres i alle virveldyr, og i modellarter som *Drosophila melanogaster* og *Caenorhabditis elegans*.

I fysiologisk sammenheng er polariserte epitelceller forankret i en ECM. Proteoglykaner som skiller ut fra epitelceller er viktige bestanddeler i ECM, mens andre proteoglykaner forankrer cellene til ECM. For eksempel sorteres det transmembrane proteoglykanet syndekan til den basolaterale membranen og deltar i forankringen til ECM (Miettinen et al. 1994). Konfluente, polariserte cellelag av epitelcellelinjen MDCK sorterer sekretoriske proteoglykaner til enten det apikale eller det basolaterale mediet. For eksempel sorteres CS-proteoglykanet versikan til det apikale mediet, mens HS-proteoglykanet perlekan skiller ut i det basolaterale mediet (Svennevig et al. 1995). De vanligste GAG-kjedene bundet til proteoglykaner er CS- og HS-kjeder, men vi vet fortsatt lite om hva som bestemmer hvilken type av GAG-kjeder som dannes på et modifisert serin-glysin bindingssete.

Syntese og sortering av proteoglykanet serglysin er blitt studert i MDCK II-celler tidligere (Vuong et al. 2006; Tveit et al. 2005), men det var nå ønskelig å studere i hvilken grad endringer i proteindelen og variasjon i antall seter for GAG-modifikasjon påvirker syntese og sortering av serglysin. I tillegg ønsket vi å undersøke modifikasjonene som skjer tidlig i den sekretoriske veien. Dette omfatter syntese og modifisering av linker-regionen til GAG-kjedene, altså de fire første sukkerenhetene, og den videre polymeriseringen av kjedene. I disse studiene benyttet vi serglysin med et KDEL-doméne C-terminalt som gjør at SG-KDEL oppholder seg lenger tidlig i den sekretoriske vei, i området mellom ER og Golgi-apparatet (Miesenbock and Rothman 1995).

4.1 Betydningen av den N-terminale disulfidbroen for syntese og sortering av serglysin

I tidligere studier av proteoglykaner er proteinkonformasjonen vist å kunne være viktig for korrekt transport (Day et al. 1999), og GAG-kjede-syntese (Brinkmann et al. 1997). Derfor ble GAG-kjede-syntese og sortering av serglysin uten den N-terminale disulfidbroen (SG-SS) studert og sammenliknet med serglysin. Selv om det ikke er direkte vist at de muterte cysteinene er involvert i en disulfidbro, gjør sammenlikning med andre proteiner det sannsynlig (Cool et al. 1995; Chanut et al. 1993; Kromer et al. 1998). Både serglysin og SG-SS sorteres hovedsakelig apikalt i MDCK II-celler. Sorteringsmønsteret til serglysin ble ikke endret når de to cysteinene i den N-terminale delen av serglysin ble endret til seriner (Figur 3.11), men både CS/HS-forholdet og GAG-kjede-lengden ble endret (Figur 3.12 og 3.14). Serglysin uttrykkes i MDCK II-celler i utgangspunktet både som et rent CS-proteoglykan og som en CS/HS-hybrid med mest CS-kjeder, mens SG-SS uttrykkes med CS-kjeder (Figur 3.12). Siden serglysin og SG-SS ser ut til å ha like mange bindingssteder for GAG-kjeder i bruk (Figur 3.14), kan forskjellene i GAG-kjedenes lengde enten skyldes at CS-kjedene er lengre enn HS-kjedene eller at CS-kjedene til SG-SS er lengre enn CS-kjedene til serglysin. Hvis CS-kjedene var lengre enn HS-kjedene, ville sannsynligvis SG-KDEL, som har mer HS-kjeder enn serglysin, ha lavere molekylmasse enn serglysin. Siden dette ikke er tilfelle, kan vi anta at CS-kjedene til SG-SS antagelig er lengre enn CS-kjedene til serglysin.

Det er identifisert seks enzymer som kan delta i syntese av CS-kjeder, og det er også vist at hvilke av disse enzymene som deltar i forlengelse av CS-kjedene påvirker CS-kjedenes lengde (Izumikawa et al. 2008). Det at GAG-kjedene får en annen CS/HS-sammensetning og blir lengre ved mutasjon av N-terminale cysteiner, kan dermed komme av at det er andre CS-forlengende enzymer som syntetiserer disse GAG-kjedene. En slik forskjell kan imidlertid ikke enkelt forklares i sammenheng med vår nåværende forståelse av hvordan Golgi-apparatet er organisert. En annen mulig forklaring er at SG-SS oppholder seg i lengre tid i den delen av Golgi-apparatet hvor CS-GAG-kjedene polymeriseres og at dette tillater ytterligere forlengelse av CS-kjedene.

4.2 Sukkerkjedenes påvirkning på GAG-kjede-syntese og sortering av serglysin

GAG-kjedene er tidligere blitt vist å være viktig for transportretningen for proteoglykaner (Seo et al. 2005). Da alle bindingssetene for GAG-kjeder ble fjernet fra serglysin (SG-UGAG) ble sorteringen endret fra en klar apikal sortering til en mer upolarisert sortering (Figur 3.16). Selv om GAG-kjedene til serglysin er nødvendig for apikal sortering, så er ikke en enkelt GAG-kjede nok for apikal sortering av serglysin. SG-1GAG får koblet på en CS-kjede i Golgi-apparatet, men har på samme måte som SG-UGAG en mer upolarisert sortering (Figur 3.17). Serglysin er derfor enten avhengig av flere GAG-kjeder, eller minst en HS-kjede for apikal sortering. Hvor mange GAG-bindingssteder som faktisk er i bruk i serglysin uttrykt i MDCK II-celler har ikke vært bestemt, men basert på sammenlikninger av forskjeller i molekylmasse etter cABC-behandling, kan det se ut som serglysin bære tre til fire CS-GAG-kjeder (Figur 3.19). SDS-PAGE er imidlertid en svært omtrentlig metode i denne sammenheng.

Det er tidligere vist at N-glykaner kan betinge apikal sortering av proteiner i MDCK II-celler. Imidlertid har det i flere tilfelle vist seg at ikke alle N-glykaner har betydning. I erythropoietin er bare en av N-glykangruppene viktig (Kitagawa et al. 1994), mens i endolyn er to av åtte N-glykaner essensielle (Potter et al. 2004). Hvis tilsvarende er tilfelle for GAG-kjedene til serglysin, kunne dette kreve et omfattende karleggingsarbeid. Nå er imidlertid GAG-setene til serglysin plassert i sekvens uten mellomrom av betydning, slik at dersom man fjerner kjeder skulle det være vilkårlig hvilke som ble tatt bort. Man kan derfor anta at det er antallet kjeder som er av betydning.

Av GAG-kjede-variantene er CS-kjeder tidligere foreslått som mulig apikalt sorteringssignal (Kolset et al. 1999), mens HS-kjeder er i utgangspunktet foreslått å fremme basolateral sortering (Mertens et al. 1996). Endringer i sammensetningen av GAG-kjeder for serglysin mot enten bare CS-kjeder, som observert for SG-SS (Figur 3.12) eller mot mer HS-kjeder, som observert for SG-KDEL (Figur 3.24), endret ikke sorteringen til serglysin. Selv om serglysin er avhengig av flere GAG-kjeder for å sorteres apikalt, så ga endringer i GAG-kjede-sammensetningen ikke en endret sortering (Figur 3.11 og 3.23). Dette indikerer at type GAG-kjeder ikke er avgjørende for apikal sortering, men snarere antall GAG-kjeder.

Det at serglysin er avhengig av flere GAG-kjeder for å sorteres apikalt, uten at CS/HS-sammensetningen er avgjørende, kan forklares på flere måter. GAG-kjedene kan stabilisere strukturer som er nødvendige for binding til sorteringsreseptorer. En

slik stabiliserende funksjon er vist for N-glykan-kjeden til CD2 (Wyss et al. 1995). Det kan også tenkes at GAG-kjedene er nødvendig for at serglysin skal assosieres med andre proteiner eller "lipid rafts", slik det er foreslått for post-translasjonelle modifikasjoner som N-glykaner og GPI-ankere (Rodriguez-Boulan and Gonzalez 1999). Siden linker-regionen til serglysin er lik for både CS- og HS-kjeder, så er det mulig at det er enzymene som er involvert i syntese og modifisering av linker-regionen som er nødvendig for den apikale sorteringen. Sorteringen i den sekretoriske vei ble tidligere antatt å foregå hovedsakelig i siste del av Golgi-apparatet, TGN, men forskning har i den senere tid åpnet for at dette kan skje tidlig i den sekretoriske vei, det vil si før GAG-kjeder er polymerisert, men i det området hvor linker-regionen kobles på proteinet (Prydz et al. 2008).

4.3 Serglysin tidlig i den sekretoriske veien

Linker-regionen til CS- og HS-kjeder er et tetrasakkarid som består av xylose-(galaktose)₂-GlcA (Kjellén and Lindahl 1991). Etter linker-regionen settes det på et aminosukker (GalNAc eller GlcNAc), noe som avgjør om GAG-kjeden blir en CS- eller HS-kjede. I utgangspunktet er det antatt at hele linker-regionen kobles på og modifiseres tidlig i den sekretoriske vei, ved utgangen fra ER og mellom ER og Golgi-apparatet. Resultatene i dette arbeidet indikerer at når serglysin sirkulerer tidlig i den sekretoriske veien (SG-KDEL), blir deler eller hele linker-regionen til GAG-kjedene koblet på (Figur 3.21). Tidligere studier av decorin med KDEL-sekvens foreslår at hele linker-regionen og de første sukker-molekylene av GAG-kjeden settes på tidlig i den sekretoriske vei, før *medial*-Golgi (Jonsson et al. 2003). Dette stemmer overens med hva som er foreslått for CS-syntese, for selv om CS-kjedene i de fleste celler forlenges i TGN, så er det foreslått at enzymene som initierer CS-kjedene ikke er de samme som polymeriserer disse (Sato et al. 2003). Dermed kan enzymene som bestemmer om det blir CS- eller HS-kjeder være lokalisert tidlig i den sekretoriske veien. Selv om serglysin som sirkulerer tidlig i den sekretoriske veien, får satt på linker-regionen, så er denne regionen ikke påviselig sulfatert (Figur 3.22). Det er antatt at linker-regionen sulfateres tidlig i den sekretoriske vei, siden det er vist at sulfatering av linker-regionen påvirker aktiviteten til noen av enzymene som syntetiserer siste del av linker-regionen til CS-kjedene (Gulberti et al. 2005). Det at linker-regionen til SG-KDEL ikke er sulfatert, kan komme av at SG-KDEL har mest HS-kjeder og sulfatering er bare vist for linker-regionen til CS-kjeder, at linker-regionen sulfateres på et senere tidspunkt i Golgi-apparatet, eller at SG-KDEL har blitt utsatt for sulfataser.

Selv om SG-KDEL hovedsakelig sirkulerer tidlig i den sekretoriske vei, unnslipper noen SG-KDEL molekyler ut til plasmamembranen. Sirkulering tidlig i den

sekretoriske vei endret ikke sorteringen av serglysin (Figur 3.23), men GAG-kjede-sammensetningen ble markant endret fra å være mest CS-kjeder til å bli mest HS-kjeder (Figur 3.24). Enzymene som forlenger CS- og HS-kjedene er lokalisert til ulike deler av Golgi-apparatet i de fleste celledslag (oversikt i: (Prydz and Dalen 2000)). Forlengelse og modifisering av CS-kjeder er antatt å skje så sent i Golgi-apparatet som i TGN (Sugumaran et al. 1992), mens HS-kjedene er antatt å bli polymerisert tidligere i Golgi-apparatet (Uhlin Hansen and Yanagishita 1993). Serglysin som sirkulerer tidlig i den sekretoriske veien (SG-KDEL) får satt på flere HS-kjeder enn "vill-type" serglysin. Dette kan være fordi sirkulering tidlig i den sekretoriske veien tillater mer kontakt med enzymer involvert i HS-syntese. Proteoglykanet leprekan, som har en naturlig KDEL-sekvens, har imidlertid hovedsakelig CS-kjeder (Wassnehove-McCarthy and McCarthy 1999), men er ikke studert i MDCK II-celler eller andre epitelceller. I noen celledslag finnes evnen til å danne CS-kjeder også tidlig i Golgi-apparatet. I motsetningen til leprekan så har ikke serglysin en naturlig KDEL-sekvens, derfor kan allikevel sirkulering tidlig i den sekretoriske veien endre GAG-kjede-sammensetningen til serglysin ved at SG-KDEL tilbringer mer tid med HS-produserende enzymer. Vi kan heller ikke utelukke at SG-KDEL bringes tilbake til ER av KDEL-reseptoren etter å ha blitt HS-modifisert og deretter transporteres til celleoverflaten via en Golgi-uavhengig vei.

4.4 Modifiseringen av serglysin

Det er vist at sulfateringen av GAG-kjedene er viktig for funksjonen til proteoglykaner (Jemth et al. 2002), men det kan også være at sulfateringsgraden til GAG-kjedene kan ha betydning for polarisert sortering. Sammenlikning viser at basolateralt sortert serglysin er mer sulfatert enn apikalt sortert serglysin (Tveit et al. 2005). Det at GAG-kjedene til serglysin er mer sulfatert basolateralt, også når sorteringen er upolarisert (SG-1GAG), kan tolkes dit hen at sulfateringsgraden ikke er et signal for polarisert sortering (Figur 3.20). Dette tyder på at apikale og basolaterale proteoglykaner sorteres fra hverandre før de sulfateres.

Sulfatering av GAG-kjedene er antatt å skje samtidig med polymeriseringen. CS-kjedene antas å forlenges og sulfateres i TGN (Spiro et al. 1991), mens HS-kjedene er antatt å forlenges og sulfateres før TGN (Uhlin Hansen and Yanagishita 1993). Siden sulfateringsmønsteret ikke endres, selv om GAG-kjede-sammensetningen endres (Figur 3.15 og 3.25), så er antakelig både HS-kjedene og CS-kjedene mer sulfatert basolateralt. Dette indikerer at serglysin sorteres til den apikale eller den basolaterale transportvei før TGN. Det er tidligere vist at det ikke bare er forskjeller i modifisering av GAG-kjedene til serglysin, men også GAG-kjedenes lengde og linker-regionens sulfatering er forskjellig for apikalt og basolateralt serglysin (Tveit et al. 2005; Vuong

et al. 2006). Dette indikerer at serglysin sorteres tidlig i den sekretoriske vei, siden sulfateringen av linker-regionen er antatt å skje så tidlig som mellom ER og Golgi-apparatet (Gulberti et al. 2005).

4.5 Tidlig sortering av serglysin

Den rådende oppfatning er altså at proteiner som skal til den apikale eller den basolaterale membranen transporteres sammen gjennom Golgi-apparatet, før de sorteres fra hverandre i TGN (Figur 1.5 A). Siden serglysin-molekylene i det apikale og det basolaterale løp mot overflaten er ulikt modifisert, så har de sannsynligvis møtt forskjellige modifiseringsenzymmer under transport gjennom Golgi-apparatet. Dette kan skyldes at apikale og basolaterale molekyler kan transporteres gjennom ulike deler av *cisternae* i Golgi-apparatet (Figur 1.5 C), eller det kan det være at transporten foregår gjennom ulike, spesialiserte "stacks" i Golgi-apparatet (Figur 1.5 D). Apikale proteiner er foreslått å kunne sorteres via "lipid rafts" (Simons and Vanmeer 1988). Hvis denne sorteringen skjer i ER/ERGIC-området så kan dette regulere hvilke modifiseringsenzymmer som assosieres med de apikale proteinene. En lateral sortering innen samme membranomsluttede organelle er mulig dersom det dannes spesialiserte områder i membranen. Dersom Golgi-apparatet består av flere "stacks," og at de apikale og de basolaterale proteinene transporteres gjennom Golgi-apparatet i ulike løp (Prydz et al. 2008), vil sorteringen skje forut for Golgi-apparatet, for eksempel ved utgangen fra ERGIC. En arbeidsdeling mellom ulike "stacks" i Golgi-apparatet er tidligere vist i nerveceller og i *Drosophila*-celler (Ye et al. 2007; Yano et al. 2005) hvor Golgi "stacks" i det siste tilfelle ikke er samlokalisert nær kjernen, men fordeler seg rundt i cytoplasma.

4.6 En vei rundt Golgi-apparatet

Den tradisjonelle oppfatningen er at proteiner som skal ut av cellen transporteres inn i ER, gjennom Golgi-apparatet og ut til plasmamembranen. På veien mellom ER og Golgi-apparatet får proteoglykaner satt på linker-regionen, mens selve GAG-kjedene blir forlenget i Golgi-apparatet. I vår forskningsgruppe er det vist at en "Golgi bypass" rute kan induseres ved å behandle MDCK II-celler med Brefeldin A (BFA; manuskript). Ved BFA-behandling hopper serglysin seg opp i den sekretoriske vei, og noen uglykosylerte serglysin-molekyler transporteres ut i det apikale mediet uten polymeriserte GAG-kjeder. Sannsynligvis skjer denne transporten direkte fra ER/ERGIC-området utenom Golgi-apparatet og til den apikale membranen. Ved høyere konsentrasjoner av BFA vil den uglykosylerte varianten også transporteres til det basolaterale mediet. Serglysin som sirkulerer tidlig i den sekretoriske vei (SG-KDEL) kommer ut i det apikale mediet både med og uten GAG-kjeder (Figur 3.26). Det er tidligere vist at noen proteoglykaner er deltids-proteoglykaner, som kan transporteres gjennom Golgi-apparatet uten å få satt på GAG-kjeder (Aono et al. 2004). Men siden deler av linker-regionen til serglysin er satt på i MDCK-cellene, uten at GAG-kjedene er forlenget, er det mer sannsynlig at disse serglysin-molekylene ikke transporteres gjennom Golgi-apparatet. Dette betyr at det sannsynligvis eksisterer en transportvei fra ER/ERGIC-området, som går rundt Golgi-apparatet, og rett til den apikale membranen.

En slik transportvei rett fra ER-området til den apikale membranen er tidligere foreslått for kolesterol som syntetiseres på ER-membranen (Urbani and Simoni 1990). Siden den apikale membranen til MDCK II-celler er rikere på kolesterol enn den basolaterale membranen (Simons and Ikonen 1997), så er det mulig at uglykosylert SG-KDEL transporteres sammen med kolesterol til den apikale membranen. Nøyaktig fra hvor denne transportruten går er usikkert, men det er observert at deler av ERGIC membranen strekker seg mot plasmamembranen i voksende nerveceller, noe som indikerer at det kan finnes en direkte transportrute fra ERGIC til plasmamembranen (Marie et al. 2008; Sannerud et al. 2006). Det er derfor mulig at SG-KDEL kan transporteres sammen med kolesterol direkte fra ERGIC til den apikale membranen.

VIDERE ARBEID

For å forstå GAG-setenes rolle i sorteringen av serglysin, kan ytterligere varianter uttrykkes i MDCK II-celler. Det vil være interessant å undersøke forholdet mellom antall mulige GAG-seter og hvor mange som faktisk er i bruk. I tillegg vil det være interessant å vite om det er likegyldig om man fjerner de første eller de siste serin-glysin-setene i forhold til en fenylalanin som etterfølger de to første serin-glysin-setene (-SGSGFSGSGSGSGSGSG-). Det vil også være interessant å kunne bestemme lengden til GAG-kjedene på SG-SS ved hjelp av gelfiltrering.

Når man har belyst hvor mange GAG-kjeder som kreves for apikal sortering, vil det være naturlig å bestemme hva som er den faktiske sorteringsinformasjonen. Siden vi har fokus på tidlige stadier i den sekretoriske vei, vil det være naturlig å undersøke linker-regionen i større detalj. Linker-regionen er tilsynelatende ikke sulfatert for serglysin-varianter som når den apikale celleoverflaten via en Golgi-”bypass” vei, men er det hos serglysin som har vandret gjennom Golgi-apparatet. Det vil derfor være interessant å bestemme hvor mange sukkere som er koblet på proteindelen til SG-KDEL som skilles ut i det apikale mediet uten polymeriserte GAG-kjeder, og til serglysin som følger samme vei når cellene behandles med Brefeldin A. Dette kan gjøres ved massespektrometri etter at disse variantene av serglysin er isolert ved IP. Det vil også være interessant å undersøke om den alternative transportveien til den apikale celleoverflaten og utenom Golgi-apparatet, er involvert i kolesterol-transport. Dette kan undersøkes ved å ekstrahere kolesterol fra cellene og/eller ved å hemme syntesen av kolesterol.

APPENDIKS 1

Materialer

Bakterieceller:

E. coli DH5 α

SupE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi1, relA1, λ -, deoR, delta (lacZYA-argF), U169, ϕ 80lacZ-delta-M15, F-.

Cellelinjer:

MDCK II-celler

Fra ATCC

Restriksjonsenzymmer:

Enzymer	Buffer	Leverandør
<i>EcoRI</i>	Buffer H	Promega
<i>BamHI</i>	Buffer E	Promega
<i>MluI</i>	NEBuffer 3	Invitrogen
<i>EcoRI</i>	Multicore	Fermentas
<i>NheI</i>	Multicore	Fermentas

Øvrige enzymer:

Enzymer	Buffer	Leverandør
Advantage® 2 Polymerase	Advantage® 2 Buffer	Clontech
Bakteriofag T4 DNA ligase	T4 DNA ligase buffer	Fermentas
cABC	10 x cABC buffer	Seikagaku corporation

Kit:

DNA-ekstraksjonssett, QIAquick Gel Extraction kit	QIAGEN
ECF Western blotting deteksjonsreagenser	GE Healthcare
ECL Western blotting deteksjonsreagenser	GE Healthcare
pGEM-T Easy Vector System	Promega
Plasmid-isoleringssett, Hispeed Plasmid Midi Kit	QIAGEN
Plasmid-isoleringssett, QIAprep Miniprep Kit	QIAGEN
TrueBlot	Ebioscience

Antistoffer:

Rabbit polyklonalt mot GFP (290)	Abcam
Rabbit polyklonalt mot GFP (6556 – affinitetsbehandlet)	Abcam
Anti-Rabbit IgG Peroxidase Linked (NA934)	Amersham Biosciences
Anti-Rabbit IgG + IgM Alkaline Phosphatase linked	GE Healthcare

APPENDIKS 1

whole antibody (NIF363756)
Rabbit IgG-Trueblot Ebioscience

Utstyr:

Type	Leverandør
Agarosegel elektroforese kammer	VWR
Autoklav	TOMY Autoclave SS-325
BioPhotometer (Nanodrop)	Saveen-Werner
Brønnplater (6 brønner)	Sartstedt
Celleflasker (25 cm ² og 75 cm ²)	Sarstedt
Criterion XT gel 4-12 % Bis-Tris gel	Bio-Rad
Criterion XT gel 10 % Bis-Tris gel	Bio-Rad
DNA Sekvensering MegaBace 1000 DNA Analysis System	Amersham Biosciences
Elektroforese, strømforsyning	EPS 600, Pharmacia
Eppendorfrør, 1,5 og 2 ml	Sarstedt
Erlenmeyerkolber	Diverste leverandrører
Filter, porestørrelse 0,2 µm	Nalgene
Filterpapir, Extra Thick Blot Paper	Bio-Rad
Filterplater (Transwell 6 brønner, diameter 24 mm, porestørrelse 0,4 µm)	Costar
Glass Bottom Microwell Dishes	MatTek Corporation, P06G-1.5-14-F
Glass petriskåler (14 cm ²)	Sarstedt
High performance autoradiography film	GE Healthcare
High performance chemiluminescence	GE Healthcare
Hybond-P PVDF-membran	GE Healthcare
Microporator (MP-100)	NanoEnTek
Inkubatorer	Modell T-51, New Brunswick Scientific Incubator Shaker, New Brunswick Scientific
Kodak M-35	Kodak
Konfokalt fluorescensmikroskop IX81	Olympus
Kvartskuvetter (1mL)	Starna Ltd
Membranfilter, porestørrelse 0,45 µm	Millipore
Mikrorør	Sarstedt
Fryserør	Sarstedt
PCR blokk: PTC-200	Axygen Scientific
pH-meter	Bergman
Plastrør (3 ml, 15 ml og 50 ml)	Sarstedt
Plastskåler, 10 cm ²	Sarstedt
Sentrifuger	Centrifuge 5415R, Eppendorf Centrifuge GS-15R, Beckman LE-80K Ultracentrifuge, Beckman
Sentrifugerør til ultrasentrifuge	Beckman
Sprøyter; 5, 10, 20 og 50 ml	Terumbo

Sterile 5 ml, 10 ml og 25 ml pipetter	Sarstedt
Trans Blotter Semi-dry Transfer Cell	Bio-Rad
Typhoon 9400 Variable Mode Imager	Amersham Biosciences
UV-transilluminator	UVI tec
Varmebad	Tempette junior TE-8J, Techne
Varmeblokk	DB-2D, Techne
Vippebord	Dumomax 1030, Heidoph
Vortexer	Snijders

Kjemikalier

Stoff	Leverandør
100 bp DNA-markør, GeneRuler™	Fermentas
1 kb DNA-markør, GeneRuler™	Fermentas
¹⁴ C merket Rainbow	GE Healthcare
1,4-Peperazindietansulfonsyre (PIPES)	Merck
³⁵ S-Svovelsyre	Montebello
³⁵ S-Met label	Montebello
6 x Loading Dye Solution	Fermentas
Agar	Merck
Agarose	Gibco
Ampicillin, natriumsalt	Sigma
Amplify	Amersham Biosciences
Aquaphenol	Obiogene
Bactoagar	BD
Bactotryptone	BD
Bactoyeastextract	BD
Bariumnitrat monohydrat (BaNO ₂)	Fluka
BenchMarker™ Fluorescent Proteiner	Invitogen
Bio-Safe™ Coomassie	Bio-Rad
Blotting Grade Blocker Non-Fat Dary Milk	Bio-Rad
Bovint Serumalbumin	Sigma
Brefeldin A	Sigma
Complete Mini, EDTA Free Protease Inhibitor	Roche
Cocktail Tablets	
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Duchefa
Ditiotreitol (DTT)	Sigma
dNTP (100 mM av hver)	Fermentas
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Bio Whittaker, BE 12-614F
DMEM uten cystein/metionin	Bio Whittaker
Eddiksyre (AcOH)	Merck
ER-Tracker™	Invitrogen
Etanol (rektifisert- og absolutt-alkohol)	Arcus
Etidiumbromid (EtBr)	Sigma
Etylendiamin tetraeddiksyre (EDTA)	Sigma
Fenol	Merck
Fenylmetansulfonyl fluorid (PMSF)	Sigma

APPENDIKS 1

FuGENE™6 og HD transfeksjonsreagens	Roche
Føtal bovint serum (FBS)	Integro b.v. Holland
G-418 disulfat	Sigma
Glukosamin hydroklorid D-[6- ³ H(N)]	PerkinElmer
Glyserol	Norsk Medisinaldepot/Prolabo
Golgi-markør	Invitrogen
HBSS	Sigma
HEPES	Sigma
Hoechst Stains	Invitrogen
Kaleidoscope	BioRad
Kaliumklorid (KCl)	Merck
Kanamycin, sulfat	Sigma
Kloroform	Prolabo
LB-broth Low Salt	Duchefa
L-Glutamin	BioWhittaker, BE 17-605E
Magnesiumklorid (MgCl ₂ x 2H ₂ O)	Merck
Metanol	BDH
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Natriumkarbonat	ProLABO
Natriumklorid (NaCl)	BDH
Natriumhydroksid (NaOH)	SDS
Nonidet P-40	BioChemika
Opti-MEM	BioWhittaker
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	BioWhittaker, DE17-602E
Fenylmetyl sulfonyl fluorid (PMFS)	Sigma
Precision Plus Protein™Kaleidoscope™Standard	Bio-Rad
Propan-2-ol (isopropanol)	Prolabo
Saltsyre (HCl)	Prolabo
Svovelsyre (H ₂ SO ₄)	Merck
Tris/CAPS (10x)	BioRad
Tris-base (TRIZMA®-base)	Sigma
Tris-HCl (TRIZMA®-hydroklorid)	Sigma
Trypsin-EDTA	Gibco
Tørrmelk	Biorad
Tween-20	Fluka
XT Redusing Agent (20 x)	Bio-Rad
XT Sample Buffer (4x)	Bio-Rad
XT-MOPS Running Buffer	Bio-Rad

Løsninger

0,8 % agarose:

Tilsett 8 gram agarose til 1000 ml 1xTAE. Varm opp løsningen i mikrobølgeovn til kokepunktet. Løsningen skal være blank. NB! Agarose støtkoker. Sett løsningen i varmeskap ved 50 °C.

Fenolkloroform løsning (1:1):

Like mengder fenol og kloroform blandes og oppbevares i en mørk flaske (med aluminiumsfolie rundt) ved 4 °C.

Fikseringsløsning:

Bland metanol, dH₂O og eddiksyre i et 1:5:1 forhold.

Frysemedium:

Tilsett 10 % FSB (varmeinaktivert ved 56 °C i 30 min), 1 % Penicillin-stretomycin, 1 % L-glutamin og 10 % DMSO i dyrkningsmediet.

Komplett dyrkningsmedium:

Tilsett 5 % FCS (varmeinaktivert ved 56 °C i 30 min), 1 % Penicillin-streptomycin og 1 % L-glutamin i dyrkningsmediet.

LB-medium:

20 g LB-broth tilsettes 1000 ml MQ-vann. Løsningen autoklaveres og avkjøles til 50 °C før enten 500 µl ampicillin (60 µg/ml) eller 500 µl kanamycin (50 µg/ml) tilsettes.

Lysis buffer:

5 g (1 %) Nonidet P-40 (NP40), 0,3722 g (2 mM) EDTA, 18,75 ml 4M NaCl (150 mM), 25 ml 1M Tris (50 mM) pH 7,5. MQ-vann til 500 ml.

MilliQ-vann:

Ultrarent destillert vann renses på Millipore MQ-system. Vannet blir i tillegg autoklavert før bruk.

SOB-medium:

20 g bactotryptone, 5 g bacto yeast extract og 0,5 g NaCl tilsettes 950 ml MQ-vann. Bland løsningen. Tilsett 10 ml 250 mM KCl. Juster pH til 7,0. Autoklaver. Før bruk tilsett 5 ml MgCl₂.

APPENDIKS 1

SOB-skåler:

20 g bacto tryptone, 5 g bacto yeast extract, 15 g bacto agar og 0,5 g NaCl tilsettes 950 ml MQ-vann. Bland løsningen. Tilsett 10 ml 250 mM KCl. Juster pH til 7,0.

Autoklaver. Før bruk tilsett 5 ml $MgCl_2$ og 5 ml $MgCl_2$. Deretter helles løsningen over i plasskåler, slik at hver plastskål blir halvfull, og lokket settes på. Skålene stables oppå hverandre for å hindre kondens. Skålene tørkes i et par timer og lagres deretter opp ned i forseglede plastposer ved 4 °C

Transformasjonsbuffer:

10 mM PIPES, 15 mM $CaCl_2$, 250 mM KCl, 55 mM $MnCl_2$, pH justeres til 6,7 med 5M KOH.

Vekstskåler:

20 g LB-broth og 15 g agar tilsettes 1000 ml MQ vann. Løsningen autolaveres og avkjøles til 50 °C før enten 500 µl ampicillin (60 µl/ml) eller 500 µl kanamycin (50 µl/ml) tilsettes. Deretter helles løsningen over i plasskåler, slik at hver plastskål blir ca. halvfull, og lokket settes på. Skålene stables oppå hverandre for å hindre kondens. Skålene tørkes i et par timer og lagres deretter opp ned i forseglede plastposer ved 4 °C.

50 x TAE:

242 g Tris-base, 57,1 ml iseddik, 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0. MQ-vann til 1000 ml. Filteres og autoklaveres.

10 x PBS (1000 ml):

2,55 g $NaH_2PO_4 \times H_2O$, 22,5 g $NaH_2PO_4 \times 7H_2O$, 87,65 g NaCl, dH_2O til 1000 L. Autoklaveres. Etter fortykning skal pH være 7,4.

10 x PBS-EDTA (1000 ml):

2,55 g $NaH_2PO_4 \times H_2O$, 22,5 g $NaH_2PO_4 \times 7 H_2O$, 87,65 g NaCl, 18,61 g EDTA. dH_2O til 1000 ml. Autoklaveres.

G-418 Disulfat (500 mg/ml stockløsning):

G-418 = $C_{20}H_{40}N_4H_{10} \times 2H_2SO_4$

Formelmasse G-418 = 692,7 g/mol

Formelmasse H_2SO_4 = 98,0 g/mol

G-418 stock-løsning:

H_2SO_4 utgjør $(2 \times 98,0 \text{ g/mol}) / (692,7 \text{ g/mol}) \times 100 \% = 28 \%$ av det totale volumet som må veies opp. Til 1 ml MQ-vann tilsettes derfor $x \text{ 72 \%} / 100 \% = 500 \text{ mg} \rightarrow x = 694,4 \text{ mg}$ G-418 Disulfat. Sterilfilteres.

Til en flaske totalt dyrkningsmedium tilsettes 1 ml G-418 stock-løsning.
Sluttkonsentrasjon i 500 ml medium blir 1 mg/ml.

IP-Lyseringsbuffer:

5 g (1 %) Nonidet P-40 (NP-40), 0,3722 g (2 mM) EDTA, 17,5 mg (35 µg/ml) phenylmethyl sulfonyl fluorid (PMFS), 18,75 ml 4 M NaCl (150 mM), 25 ml 1M Tris (50 mM) pH 7,5. MQ-vann til 500 ml. Supplementeres med Comple, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets.

10 % SDS (100 ml):

10 g SDS, 90 ml dH₂O.

Tris-HCl (1 M):

121, g TrisBase, fyll opp til 1000 ml dH₂O. Juster pH til ønsket pH ved hjelp av HCl.

SDS-PAGE

XT-MOPS Running Buffer 1000 ml (BioRad):

50 ml XT-MOPS (20 x), dH₂O til 1000 ml.

Western blotting

Vaskebuffer (10 x TBS):

80 g NaCl, 200 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,4) og 1000 ml dH₂O.

Vaskebuffer (1 x TTBS):

100 ml 10 x TBS, 1 ml Tween 20 og 900 ml dH₂O.

Anode buffer 1000 ml (Bio-Rad):

100 ml 10 x Tris/CAPS, 150 ml metanol og 750 ml dH₂O.

Katode buffer 1000 ml (Bio-Rad):

100 ml 10 x Tris/CAPS, 10 ml 10 % SDS og 890 ml dH₂O.

Blokkeringsbuffer:

1 x TTBS tilsatt 5 % (w/v) fettfri tørrmelk.

Inkuberingsbuffer:

1 x TTBS tilsatt 1 % (w/v) fettfri tørrmelk.

APPENDIKS 1

Lysis Buffer:

50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% NP-40

Strippebuffer:

100 mM 2-mercaptoetanol, 2 % SDS, 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7.

Immunoprespiptering

IP-vaskeløsning:

50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,05 % Triton x-100 og evt (1 % BSA). Fyll opp til 500 ml med dH₂O.

IP-lyseringbuffer:

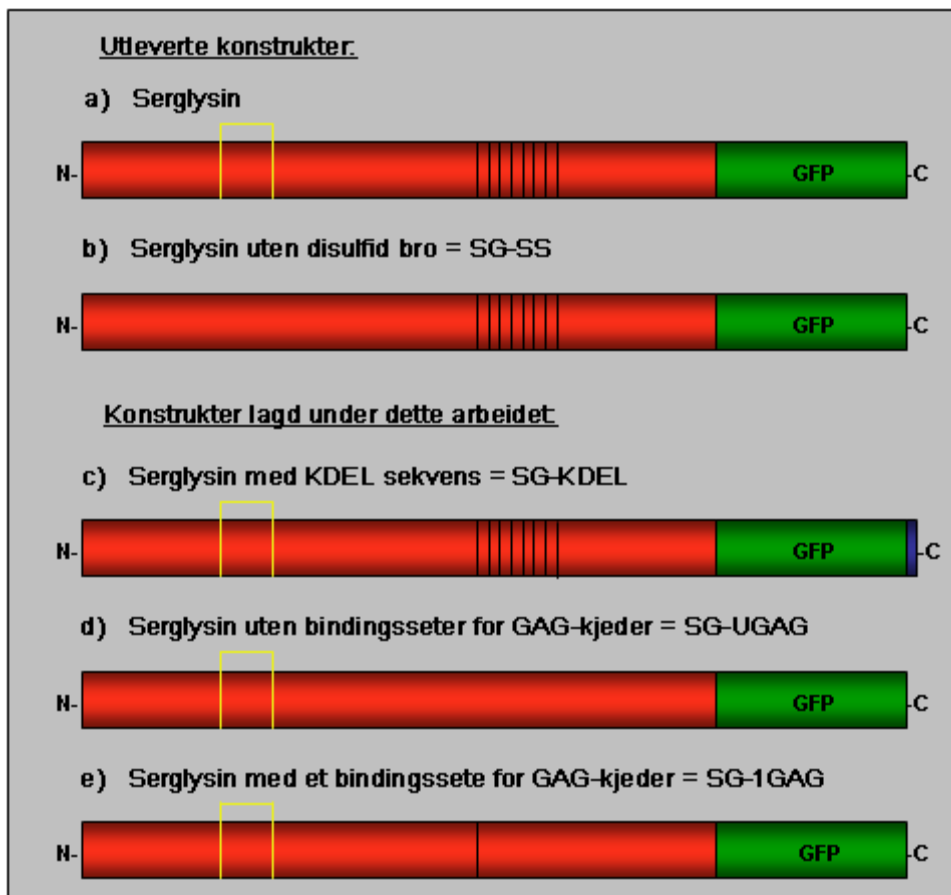
1 % NP-40, 50 mM Tris pH 7,5, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 35 µg/ml PMSF. Fyll opp til 500 ml med dH₂O.

PBS med 1 % BSA (1000 ml):

2,55 g NaH₂PO₄ x H₂O, 22,5 g NaH₂PO₄ x 7 H₂O, 87,65 g NaCl, 18,61 g EDTA, 10 g BSA og dH₂O til 1000 ml. Autoklaveres.

APPENDIKS 2

Serglysin-variantene:



Oversikt over alle serglysin variantene. a) serglysin med disulfidbro (C40 og C49), åttebindingssteder for GAG (94-111) og GFP. b) Serglysin uten disulfidbro (SG-SS) hvor C40 og C49 er mutert til S40 og S49. c) Serglysin med KDEL sekvens helt C-terminalt (SG-KDEL). d) Serglysin uten bindingssteder for GAG-kjeder hvor aminosyre 94-111 er fjernet (SG-UGAG). e) Serglysin med et bindingssete for GAG-kjeder hvor aminosyre 96-111 er fjernet (SG-1GAG). Disulfidbroen i gult. GFP i grønt. KDEL-sekvens i blått.

Primere

Primere benyttet under dette arbeidet var fra Eurogentec.

Primere brukt ved sekvensering av pGEM®-T Easy vektor:

SP6-primer (revers): 5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3' $T_m = 52,0\text{ }^\circ\text{C}$
 T7-primer (forover): 5'-AATACGACTCACTATAGGG-3' $T_m = 54,0\text{ }^\circ\text{C}$

Primere brukt ved sekvensering av pEGFP-C1 og pEGFP-N3 vektor:

P-118 (revers): 5'TGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAA-3' $T_m = 47,9\text{ }^\circ\text{C}$
 P-158 (forover): 5'-GGCGTGTACGGTGGGAGGTC-3' $T_m = 56,0\text{ }^\circ\text{C}$

APPENDIKS 2

Primere brukt ved PCR:

Primer	Sekvens	Kuttsete	Konstrukt	T _m
p-21 (forover):	5' ATCGGAATTCAT GATGCAGAAGCT ACTCAA-3'	<i>EcoRI</i>	SG-1GAG	T _m = 55,4 °C
p-112 (revers):	5' TTGCAACGTACG ATGGATCCTAACA TAAAATCCTCTT- 3'	<i>BamHI</i>	Megaprimer	T _m = 57,8 °C
p-139 (forover):	5' TATACGCGTTTC CTAACGGAAATG GAACAGGATT-3'	<i>MluI</i>	SG-UGAG	T _m = 57,7 °C
p-140 (revers):	5' ATCACGCGTGTA GTCCTCAGAAAGT GGGAAGATAC-3'	<i>MluI</i>	SG-UGAG	T _m = 60,4 °C
p-177 (forover):	5' CTGAGGACTCTG GATTCCTAACGGA AATGGAACA-3'		Megaprimer	T _m = 60,5 °C
p-196 (revers):	5' GAATTC TTAAAG TTCGTCTTCTTGT ACAGCTCGTC 3'	<i>EcoRI</i>	SG-KDEL	T _m = 57,3 °C
p-197 (forover):	5' ATGCTAGCATG ATGCAGAAGCTAC TCAA 3'	<i>NheI</i>	SG-KDEL	T _m = 53,6 °C

Kuttsete for restriksjonsenzym

Restriksjonsenzym	Kuttsete
<i>EcoRI</i>	5'-G AATTC-3' 3'-CTTAA G-5'
<i>BamHI</i>	5'-G GATCC-3' 3'-CCTAG G-5'
<i>NheI</i>	5'-G CTAGC-3' 3'-CGATC G-5'
<i>MluI</i>	5'-A CGCGT-3' 3'-TGCGC A-5'

DNA Sekvenser

Rødt = signalsekvens til serglysin

Sort = serglysin

Gult = C-resider som inngår i disulfidbro

Lilla = bindingssete for GAG-kjeder

Grønt = Grønt fluorescerende protein (GFP)

Blå = KDEL sekvens

Human serglysin (P10124): <http://kr.expasy.org/uniprot/P10124>**Serglysin:**

ATGATGCAGAAGCTACTCAAATGCAGTCGGCTTGTCTGGCTCTTGCCCTCATCCTGGTT
 CTGGAATCCTCAGTTCAAGGTTATCCTACGCAGAGAGCCAGGTACCAATGGGTGCGCTG
 CAATCCAGACAGTAATTCTGCAAACCTGCTTGAAGAAAAAGGACCAATGTTTCAACTAC
 TTCCAGGTGAATCCAACAAGATCCCCGTCTGAGGACTGACCTTTTTTCAAAGACGAGA
 ATCCAGGACTTGAATCGTATCTTCCCCTTTCTGAGGACTACTCTGGATCAGGCTTCGGC
 TCCGGCTCCGGCTCTGGATCAGGATCTGGGAGTGGCTTCCTAACGGAAATGGAACAGGA
 TTACCAACTAGTAGACGAAAGTGATGCTTTCCATGACAACCTTAGGTCTCTTGACAGGA
 ATCTGCCCTCAGACAGCCAGGACTTGGGTCAACATGGATTAGAAGAGGATTTTATGTTA
 GGATCCATCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCAT
 CCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCG
 AGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTG
 CCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTACGCCG
 TACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGT
 CCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGA
 AGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAG
 GACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATAT
 CATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATC
 GAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACG
 GCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGAC
 CCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCAC
 TCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

SG-SS

ATGATGCAGAAGCTACTCAAATGCAGTCGGCTTGTCTGGCTCTTGCCCTCATCCTGGTT
 CTGGAATCCTCAGTTCAAGGTTATCCTACGCAGAGAGCCAGGTACCAATGGGTGCGCAG
 CAATCCAGACAGTAATTCTGCAAACAGCCTTGAAGAAAAAGGACCAATGTTTCAACTAC
 TTCCAGGTGAATCCAACAAGATCCCCGTCTGAGGACTGACCTTTTTTCAAAGACGAGA
 ATCCAGGACTTGAATCGTATCTTCCCCTTTCTGAGGACTACTCTGGATCAGGCTTCGGC
 TCCGGCTCCGGCTCTGGATCAGGATCTGGGAGTGGCTTCCTAACGGAAATGGAACAGGA
 TTACCAACTAGTAGACGAAAGTGATGCTTTCCATGACAACCTTAGGTCTCTTGACAGGA
 ATCTGCCCTCAGACAGCCAGGACTTGGGTCAACATGGATTAGAAGAGGATTTTATGTTA
 GGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGA
 GCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT
 GCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCC
 CTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTACGCCGCTACCCCGA
 CCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGC

APPENDIKS 2

GCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAG
GGCGACACCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCA
ACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCC
GACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACG
GCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTG
CTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGA
GAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCA
TGGACGAGCTGTACAAGTAA

SG-KDEL

ATGATGCAGAAGCTACTCAAATGCAGTCGGCTTGTCTGGCTCTTGCCCTCATCCTGGTT
CTGGAATCCTCAGTTCAAGGTTATCCTACGCAGAGAGCCAGGTACCAATGGGTGCGCTG
CAATCCAGACAGTAATTCTGCAAACGGCTTGAAGAAAAAGGACCAATGTTGAACTAC
TTCCAGGTGAATCCAACAAGATCCCCCGTCTGAGGACTGACCTTTTTTCAAAGACGAGA
ATCCAGGACTTGAATCGTATCTTCCCCTTTCTGAGGACTACTCTGGATCAGGCTTCGGC
TCCGGCTCCGGCTCTGGATCAGGATCTGGGAGTGGCTTCCTAACGGAAATGGAACAGGA
TTACCAACTAGTAGACGAAAGTGATGCTTTCCATGACAACCTTAGGTCTCTTGACAGGA
ATCTGCCCTCAGACAGCCAGGACTTGGGTCAACATGGATTAGAAGAGGATTTTATGTTA
GGATCCATCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCAT
CCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCG
AGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTG
CCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGC
TACCCCGACCATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGT
CCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGA
AGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAG
GACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATAT
CATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATC
GAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACG
GCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGAC
CCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCAC
TCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGAAAGACGAACTT

SG-UGAG

ATGATGCAGAAGCTACTCAAATGCAGTCGGCTTGTCTGGCTCTTGCCCTCATCCTGGTT
CTGGAATCCTCAGTTCAAGGTTATCCTACGCAGAGAGCCAGGTACCAATGGGTGCGCTG
CAATCCAGACAGTAATTCTGCAAACGGCTTGAAGAAAAAGGACCAATGTTGAACTAC
TTCCAGGTGAATCCAACAAGATCCCCCGTCTGAGGACTGACCTTTTTTCAAAGACGAGA
ATCCAGGACTTGAATCGTATCTTCCCCTTTCTGAGGACTACACGCGTTTCTTAACGGAA
ATGGAACAGGATTACCAACTAGTAGACGAAAGTGATGCTTTCCATGACAACCTTAGGTC
TCTTGACAGGAATCTGCCCTCAGACAGCCAGGACTTGGGTCAACATGGATTAGAAGAGG
ATTTTATGTTAGGATCCATCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGG
GTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTG
CGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCA
CCGGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAG
TGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC
GAAGGCTACGTCCAGGAGCGACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCG
CGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATC
GACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCC

ACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATC
CGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCC
CATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC
TGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCC
GCCGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

SG-1GAG

ATGATGCAGAAGCTACTCAAATGCAGTCGGCTTGTCTGGCTCTTGCCCTCATCCTGGTT
CTGGAATCCTCAGTTCAAGGTTATCCTACGCAGAGAGCCAGGTACCAATGGGTGCGCTG
CAATCCAGACAGTAATTCTGCAAACCTGCTTGAAGAAAAAGGACCAATGTTTCGAACTAC
TTCCAGGTGAATCCAACAAGATCCCCGTCTGAGGACTGACCTTTTTCCAAAGACGAGA
ATCCAGGACTTGAATCGTATCTTCCCACTTTCTGAGGACTACTCTGGATTTCCTAACGGAA
ATGGAACAGGATTACCAACTAGTAGACGAAAGTGATGCTTTCCATGACAACCTTAGGTC
TCTTGACAGGAATCTGCCCTCAGACAGCCAGGACTTGGGTCAACATGGATTAGAAGAGG
ATTTTATGTTAGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCC
ATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGG
CGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGC
TGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCC
GCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTAC
GTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGT
GAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGG
AGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTAT
ATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACA
TCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGAC
GGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGA
CCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCA
CTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

Aminsoyre-sekvenser

Rødt = signalsekvens til serglysin

Sort = serglysin

Gult = C-resider som inngår i disulfidbro

Lilla = bindingssete for GAG-kjeder

Grønt = Grønt fluorescerende protein (GFP)

Blå = KDEL sekvens

Serglysin

MMQKLLKCSRLVLALALILVLESSVQGYPTQRARYQWVRCNPDSNSANCLEEKGPMFELLP
GESNKIPRLRTDLFPKTRIQDLNRIFPLSEDYSGSGFGSGSGSGSGSFLTEMEQDYQLVDE
SDAFHDNLRSLDRNLPSDSQDLGQHGLEEDFMLGSIATMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVN
GHKFSVSGEGEGDATYGKLTLFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDF
KSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGLTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYN
SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS
KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK

SG-SS

MMQKLLKCSRLVLALALILVLESSVQGYPTQRARYQWVRSNPDSNSANSLEEKGPMFELLP
GESNKIPRLRTDLFPKTRIQDLNRIFPLSEDYSGSGFGSGSGSGSGSFLTEMEQDYQLVDE

APPENDIKS 2

SDAFHDNLRSLDRNLPSDSQDLGQHGLEEDFMLGSIATMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVN
GHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDF
KSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYN
SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS
KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK

SG-KDEL

MMQKLLKCSRLVLALALILVLESSVQGYPTQRARYQWVR^CNPDSNSAN^CLEEKGPMFELL
GESNKIPRLRTDLFPKTRIQDLNRIFPLSE^{DY}SGSGFGSGSGSGSGSGFLTEMEQDYQLVDE
SDAFHDNLRSLDRNLPSDSQDLGQHGLEEDFMLGSIATMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVN
GHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDF
KSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYN
SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS
KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK**KDEL**

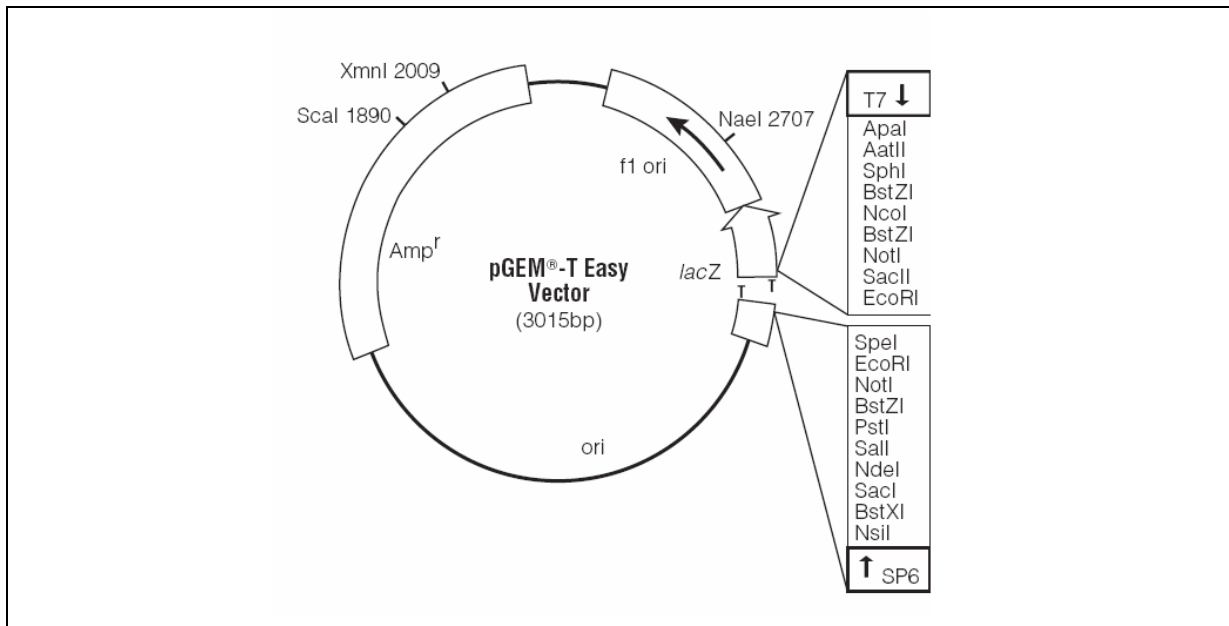
SG-UGAG

MMQKLLKCSRLVLALALILVLESSVQGYPTQRARYQWVR^CNPDSNSAN^CLEEKGPMFELL
GESNKIPRLRTDLFPKTRIQDLNRIFPLSE^{DY}FLTEMEQDYQLVDES
SDAFHDNLRSLDRNLPS
DSQDLGQHGLEEDFMLGSIATMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY
GKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFF
DDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIK
VNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS
KDPNEKRDHMLLEFV
TAAGITLGMDELYK

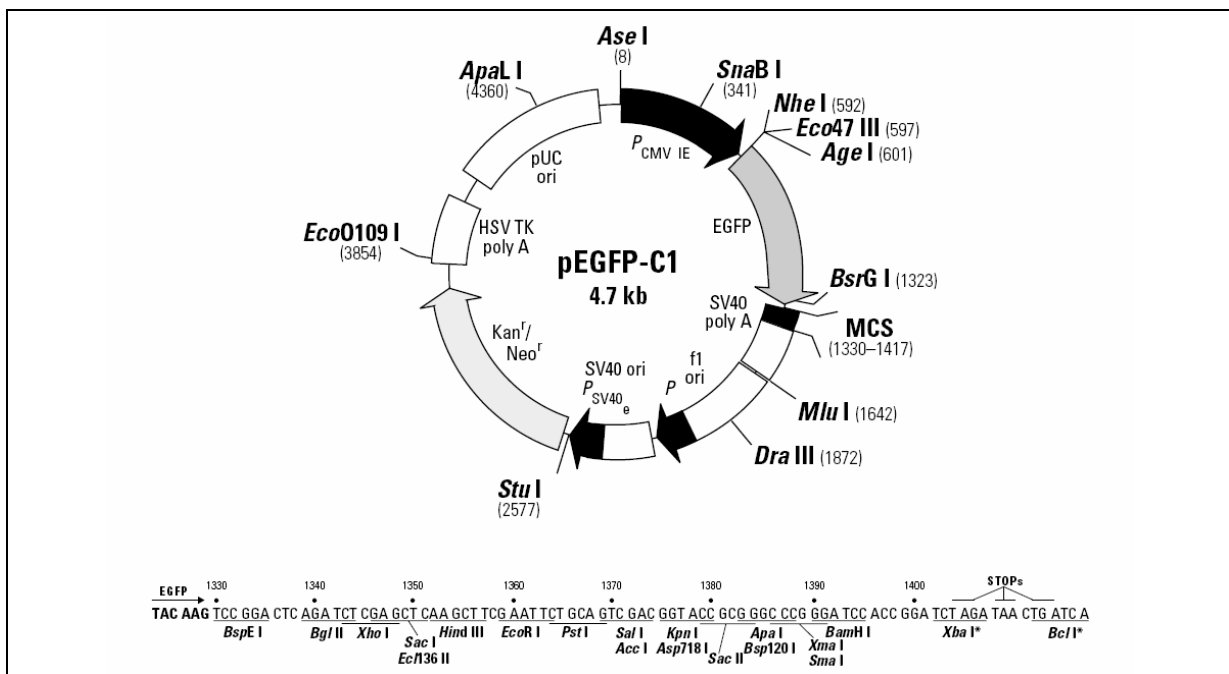
SG-1GAG

MMQKLLKCSRLVLALALILVLESSVQGYPTQRARYQWVR^CNPDSNSAN^CLEEKGPMFELL
GESNKIPRLRTDLFPKTRIQDLNRIFPLSE^{DY}SGFLTEMEQDYQLVDES
SDAFHDNLRSLDRNL
PSDSQDLGQHGLEEDFMLGSIATMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDAT
YGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFF
KDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGI
KVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS
KDPNEKRDHMLLEF
VTAAGITLGMDELYK

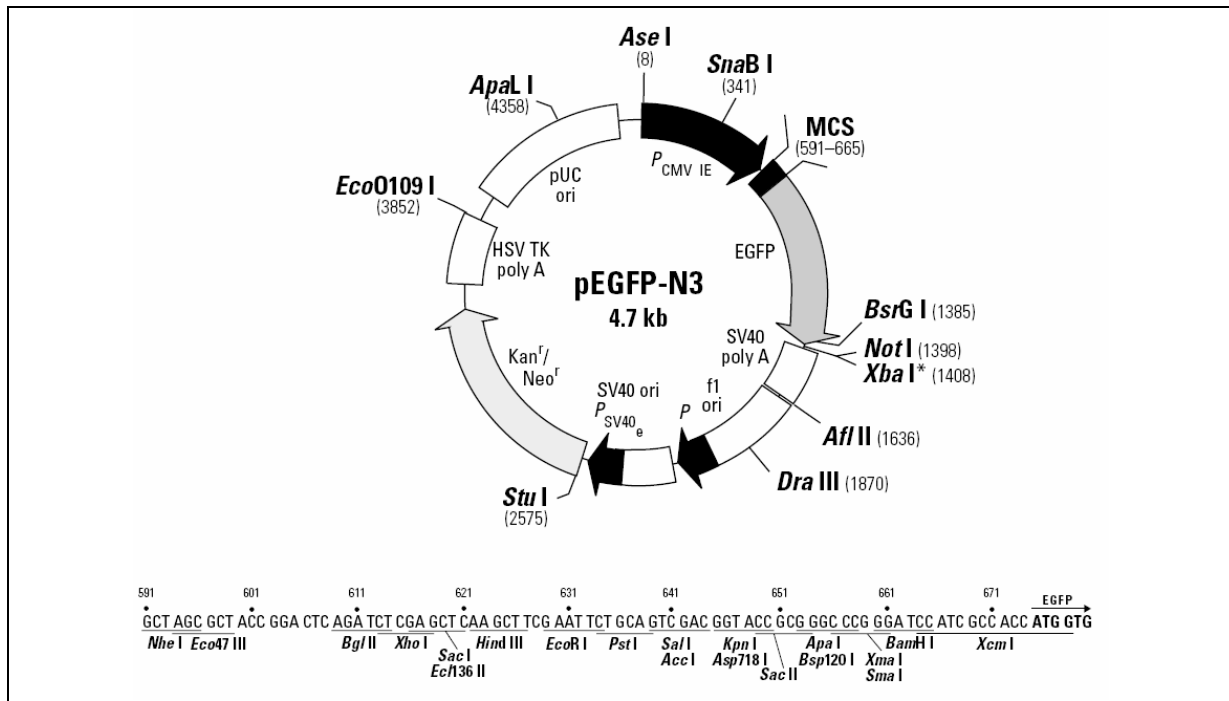
Vektorkart



pGEM®-T Easy vektor (Promega): Vektoren er kuttet med restriksjonsenzymet *EcoRV* og tilført 3' terminal thymidine til hver ende. Dette øker liggeringseffekten av PCR-produkter med A-overheng og begrenser religering av vektoren. pGEM®-T Easy vektoren har gen for ampicillin resistens. Vektoren inneholder T7 og SP5 RNA-polymerase promotor seter som flankerer MCS.

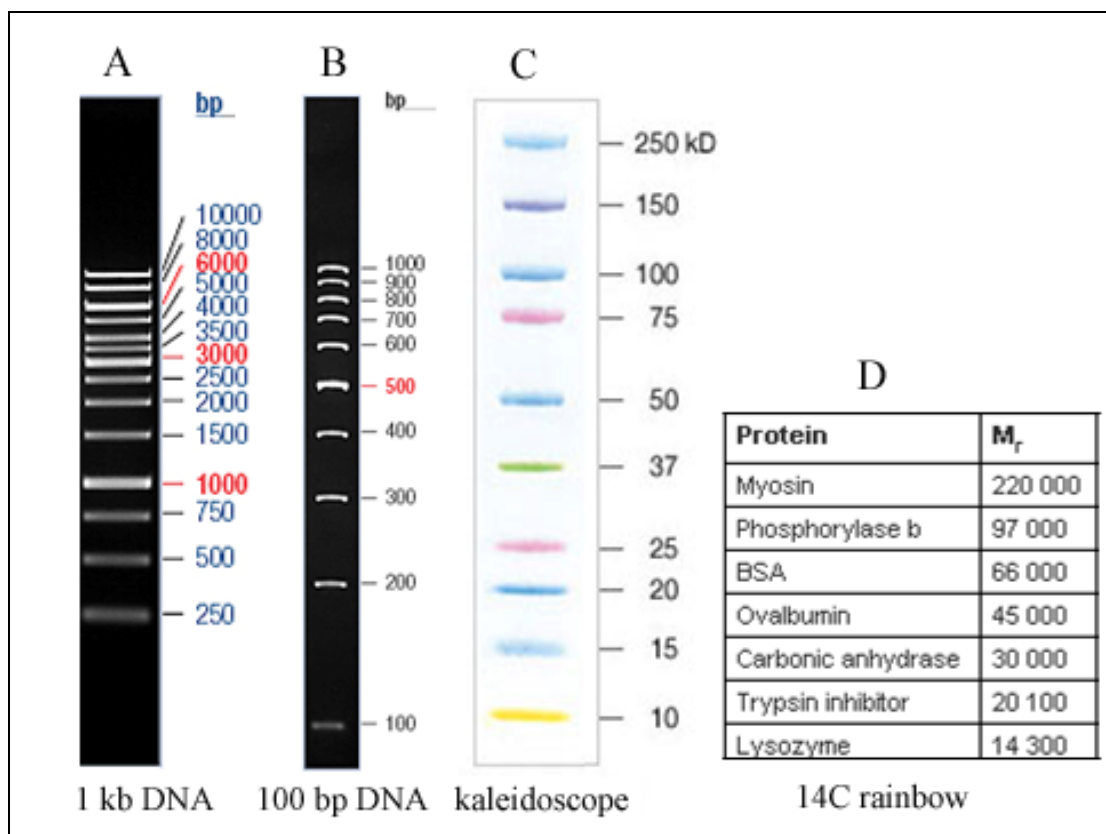


pEGFP-C1 ekspresjonsvektor (Clontech): Vektoren er en eukaryot ekspresjonsvektor, med CMS-promotor. Oppstrøms for MCS sitter fusjonsproteinet GFP (grønt fluoriserende protein) i riktig leseramme som innsatt DNA i N-terminale enden. Vektoren inneholder kanamycin resistens for seleksjon i *E. coli* og G418 for seleksjon i eukaryote celler.



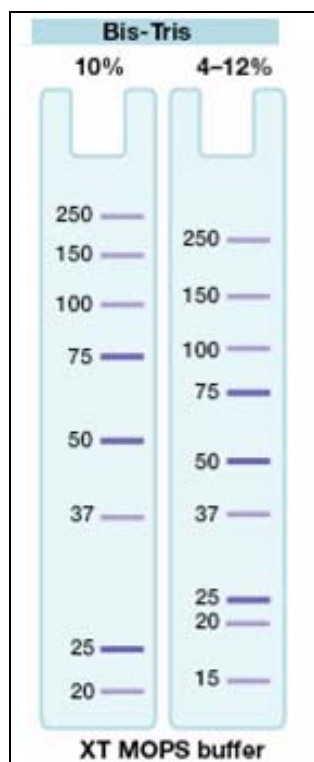
pEGFP-N3 ekspresjonsvektor (Clontech): Vektoren er en eukaryot ekspresjonsvektor, med CMS-promotor. Nedstrøms for MCS sitter fusjonsproteinet GFP (grønt fluoriserende protein) i riktig leseramme som innsatt DNA i C-terminale enden. Vektoren inneholder kanamycin resistens for seleksjon i *E. coli* og G418 for seleksjon i eukaryote celler.

DNA- og molekylvekt-standarder



DNA- og molekylvekt-standarder: **A:** 1 kb DNA-standard (fermentas). Figur er modifisert fra <http://www.fermentas.com/catalog/electrophoresis/generulers.htm#1kb>. **B:** 100 bp DNA-standard (fermentas). Figur er modifisert fra <http://www.fermentas.com/catalog/electrophoresis/generulers.htm>. **C:** Kaleidoscope™ Precision Plus Protein™ Standard (BioRad). Figuren er modifisert fra http://www.biorad.com/B2B/BioRad/product/br_category.jsp?BV_SessionID=@@@@0961612442.1220458065@@@@&BV_EngineID=cccfaedfdhgdjhdhdcfngcfkmdhkkdfm.0&categoryPath=%2fCatalogs%2fLife+Science+Education%2fEquipment+and+Supplies%2fProteins+and+Proteomic+Studies%3a+Equipment+and+Reagents%2fProtein+Electrophoresis+Size+Standards%2f&divName=Informationcs+%7c+Sadtler&loggedIn=false&lang=English&country=NO&catLevel=5&catOID=-19482&isPA=false&serviceLevel=Lit+Request&searchStr=kaleidoscope&cateName=Ordering+Information. **D:** [¹⁴C] Protein Molecular Weight Markers (GE-Healthcare). Figur er modifisert fra <http://www6.gelifesciences.com/APTRIX/upp01077.nsf/Content/Products?OpenDocument&parentid=40402&moduleid=40426&zone=Elpho>.

Bis-Tris geler



Bis-Tris geler: 10 % Bis-Tris gel gir bedre separasjon i området mellom 75 og 37 kDa, mens 4-12 % Bis-Tris gel gir bedre separasjon i området mellom 250 og 100 kDa. Figuren er modifisert fra:

http://www.bi-rad.com/B2B/BioRad/product/br_category.jsp?BV_SessionID=@@@@1565704783.1222450338@@@@&BV_EngineID=cccdadefhfejkecfngcfkmdhkkdfll.0&categoryPath=%2fCatalogs%2fLife+Science+Research%2fElectrophoresis%2fPrecast+Gel+Systems%2fCriterion+Precast+Gel+System%2fCriterion+Gels+for+SDS-PAGE+and+Native+PAGE%2fCriterion+XT+Bis-Tris+and+Tris-Acetate+Gels&catLevel=7&divName=Life+Science+Research&loggedIn=false&lang=English&country=HQ&catOID=-24719&isPA=false&serviceLevel=Lit+Request

REFERANSER

- Abrink, M., M. Grujic, and G. Pejler. 2004. Serglycin is essential for maturation of mast cell secretory granule. *Journal of Biological Chemistry* 279 (39):40897-40905.
- Alfalah, M., R. Jacob, U. Preuss, K. P. Zimmer, H. Naim, and H. Y. Naim. 1999. O-linked glycans mediate apical sorting of human intestinal sucrase-isomaltase through association with lipid rafts. *Curr Biol* 9 (11):593-596.
- Alfalah, M., G. Wetzel, I. Fischer, R. Busche, E. E. Sterchi, K. P. Zimmer, H. P. Sallmann, and H. Y. Naim. 2005. A novel type of detergent-resistant membranes may contribute to an early protein sorting event in epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 280 (52):42636-42643.
- Almeida, R., S. B. Levery, U. Mandel, H. Kresse, T. Schwientek, E. P. Bennett, and H. Clausen. 1999. Cloning and expression of a proteoglycan UDP-galactose :beta-xylose beta 1,4-galactosyltransferase I - A seventh member of the human beta 4-galactosyltransferase gene family. *Journal of Biological Chemistry* 274 (37):26165-26171.
- Ang, A. L., T. Taguchi, S. Francis, H. Folsch, L. J. Murrells, M. Pypaert, G. Warren, and I. Mellman. 2004. Recycling endosomes can serve as intermediates during transport from the Golgi to the plasma membrane of MDCK cells. *J Cell Biol* 167 (3):531-543.
- Aono, S., Y. Tokita, T. Shuo, S. Yamauchi, F. Matsui, K. Nakanishi, K. Hirano, M. Sano, and A. Oohira. 2004. Glycosylation site for chondroitin sulfate on the neural part-time proteoglycan, neuroglycan C. *Journal of Biological Chemistry* 279 (45):46536-46541.
- Appenzeller-Herzog, C., and H. P. Hauri. 2006. The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *Journal of Cell Science* 119 (11):2173-2183.
- Appenzeller-Herzog, C., A. C. Roche, O. Nufer, and H. P. Hauri. 2004. pH-induced conversion of the transport lectin ERGIC-53 triggers glycoprotein release. *Journal of Biological Chemistry* 279 (13):12943-12950.
- Bai, X. M., G. Wei, A. Sinha, and J. D. Esko. 1999. Chinese hamster ovary cell mutants defective in glycosaminoglycan assembly and glucuronosyltransferase I. *Journal of Biological Chemistry* 274 (19):13017-13024.

REFERANSER

- Bai, X. M., D. P. Zhou, J. R. Brown, B. E. Crawford, T. Hennet, and J. D. Esko. 2001. Biosynthesis of the linkage region of glycosaminoglycans - Cloning and activity of galactosyltransferase II, the sixth member of the beta 1,3-galactosyltransferase family (beta 3GalT6). *Journal of Biological Chemistry* 276 (51):48189-48195.
- Barker, G., and N. L. Simmons. 1981. Identification of two strains of cultured canine renal epithelial cells (MDCK cells) which display entirely different physiological properties. *Q J Exp Physiol* 66 (1):61-72.
- Barlowe, C., L. Orci, T. Yeung, M. Hosobuchi, S. Hamamoto, N. Salama, M. F. Rexach, M. Ravazzola, M. Amherdt, and R. Schekman. 1994. Copii - a Membrane Coat Formed by Sec Proteins That Drive Vesicle Budding from the Endoplasmic-Reticulum. *Cell* 77 (6):895-907.
- Barman, S., and D. P. Nayak. 2000. Analysis of the transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II transmembrane glycoprotein, for apical sorting and raft association. *Journal of Virology* 74 (14):6538-6545.
- Bartles, J. R., and A. L. Hubbard. 1988. Plasma-Membrane Protein Sorting in Epithelial-Cells - Do Secretory Pathways Hold the Key. *Trends in Biochemical Sciences* 13 (5):181-184.
- Belden, W. J., and C. Barlowe. 2001. Role of Erv29p in collecting soluble secretory proteins into ER-derived transport vesicles. *Science* 294 (5546):1528-1531.
- Benting, J. H., A. G. Rietveld, and K. Simons. 1999. N-Glycans mediate the apical sorting of a GPI-anchored, raft-associated protein in Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* 146 (2):313-320.
- Brewer, C. B., and M. G. Roth. 1991. A single amino acid change in the cytoplasmic domain alters the polarized delivery of influenza virus hemagglutinin. *J Cell Biol* 114 (3):413-421.
- Brinkmann, T., C. Weilke, and K. Kleesiek. 1997. Recognition of acceptor proteins by UDP-D-xylose proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 272 (17):11171-11175.
- Brown, D. A., B. Crise, and J. K. Rose. 1989. Mechanism of membrane anchoring affects polarized expression of two proteins in MDCK cells. *Science* 245 (4925):1499-1501.

- Brown, D. A., and J. K. Rose. 1992. Sorting of Gpi-Anchored Proteins to Glycolipid-Enriched Membrane Subdomains During Transport to the Apical Cell-Surface. *Cell* 68 (3):533-544.
- Campo, C., A. Mason, D. Maouyo, O. Olsen, D. Yoo, and P. A. Welling. 2005. Molecular mechanisms of membrane polarity in renal epithelial cells. In *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*, 47-99.
- Cerejido, M., E. S. Robbins, W. J. Dolan, C. A. Rotunno, and D. D. Sabatini. 1978. Polarized Monolayers Formed by Epithelial-Cells on a Permeable and Translucent Support. *Journal of Cell Biology* 77 (3):853-880.
- Chanat, E., U. Weiss, W. B. Huttner, and S. A. Tooze. 1993. Reduction of the Disulfide Bond of Chromogranin-B (Secretogranin-I) in the Trans-Golgi Network Causes Its Missorting to the Constitutive Secretory Pathway. *Embo Journal* 12 (5):2159-2168.
- Cool, D. R., M. Fenger, C. R. Snell, and Y. P. Loh. 1995. Identification of the Sorting Signal Motif within Proopiomelanocortin for the Regulated Secretory Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 270 (15):8723-8729.
- Day, J. M., A. D. Murdoch, and T. E. Hardingham. 1999. The folded protein modules of the C-terminal G3 domain of aggrecan can each facilitate the translocation and secretion of the extended chondroitin sulfate attachment sequence. *Journal of Biological Chemistry* 274 (53):38107-38111.
- de Graffenried, C. L., and C. R. Bertozzi. 2004. The roles of enzyme localisation and complex formation in glycan assembly within the Golgi apparatus. *Current Opinion in Cell Biology* 16 (4):356-363.
- Dewaard, P., J. F. G. Vliegenthart, T. Harada, and K. Sugahara. 1992. Structural Studies on Sulfated Oligosaccharides Derived from the Carbohydrate-Protein Linkage Region of Chondroitin-6-Sulfate Proteoglycans of Shark Cartilage .2. 7 Compounds Containing 2 or 3 Sulfate Residues. *Journal of Biological Chemistry* 267 (9):6036-6043.
- Ellis, M. A., B. A. Potter, K. O. Cresawn, and O. A. Weisz. 2006. Polarized biosynthetic traffic in renal epithelial cells: sorting, sorting, everywhere. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 291 (4):F707-F713.
- Farquhar, M. G., and G. E. Palade. 1981. The Golgi-Apparatus (Complex) (1954-1981) from Artifact to Center Stage. *Journal of Cell Biology* 91 (3):S77-S103.

REFERANSER

- Fiedler, K., and K. Simons. 1995. The role of N-glycans in the secretory pathway. *Cell* 81 (3):309-312.
- Folsch, H., H. Ohno, J. S. Bonifacino, and I. Mellman. 1999. A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* 99 (2):189-198.
- Fransson, L. A. 1987. Structure and Function of Cell-Associated Proteoglycans. *Trends in Biochemical Sciences* 12 (10):406-411.
- Fransson, L. A., I. Silverberg, and I. Carlstedt. 1985. Structure of the Heparan Sulfate-Protein Linkage Region - Demonstration of the Sequence Galactosyl-Galactosyl-Xylose-2-Phosphate. *Journal of Biological Chemistry* 260 (27):4722-4726.
- Glick, B. S., and V. Malhotra. 1998. The curious status of the Golgi apparatus. *Cell* 95 (7):883-889.
- Gotting, C., J. Kuhn, R. Zahn, T. Brinkmann, and K. Kleesiek. 2000. Molecular cloning and expression of human UDP-D-xylose : proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase and its first isoform XT-II. *Journal of Molecular Biology* 304 (4):517-528.
- Griffiths, G., and K. Simons. 1986. The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* 234 (4775):438-443.
- Gulberti, S., V. Lattard, M. Fondeur, J. C. Jacquinet, G. Mullier, P. Netter, J. Magdalou, M. Ouzzine, and S. Fournel-Gigleux. 2005. Phosphorylation and sulfation of oligosaccharide substrates critically influence the activity of human beta 1,4-galactosyltransferase 7 (GalT-I) and beta 1,3-glucuronosyltransferase I (GlcAT-I) involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of Proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry* 280 (2):1417-1425.
- Gumbiner, B. 1987. Structure, biochemistry, and assembly of epithelial tight junctions. *Am J Physiol* 253 (6 Pt 1):C749-758.
- Gut, A., F. Kappeler, N. Hyka, M. S. Balda, H. P. Hauri, and K. Matter. 1998. Carbohydrate-mediated Golgi to cell surface transport and apical targeting of membrane proteins. *Embo Journal* 17 (7):1919-1929.
- Hammond, A. T., and B. S. Glick. 2000. Dynamics of transitional endoplasmic reticulum sites in vertebrate cells. *Molecular Biology of the Cell* 11 (9):3013-3030.

- Hang, H. C., and C. R. Bertozzi. 2005. The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13 (17):5021-5034.
- Hannan, L. A., M. P. Lisanti, E. Rodriguezboulant, and M. Edidin. 1993. Correctly Sorted Molecules of a Gpi-Anchored Protein Are Clustered and Immobile When They Arrive at the Apical Surface of Mdk Cells. *Journal of Cell Biology* 120 (2):353-358.
- Hunziker Walter, F. C. 1994. A di-leucine motif mediates endocytosis and basolateral sorting of macrophage IgG Fc receptors in MDCK cells. *Embo J* 13 (13):2963-2969.
- Hurtley, S. M., and A. Helenius. 1989. Protein Oligomerization in the Endoplasmic-Reticulum. *Annual Review of Cell Biology* 5:277-307.
- Izumikawa, T., T. Koike, S. Shiozawa, K. Sugahara, J. I. Tamura, and H. Kitagawa. 2008. Identification of chondroitin sulfate glucuronyltransferase as chondroitin synthase-3 involved in chondroitin polymerization - Chondroitin polymerization is achieved by multiple enzyme complexes consisting of chondroitin synthase family members. *Journal of Biological Chemistry* 283 (17):11396-11406.
- Jemth, P., J. Kreuger, M. Kusche-Gullberg, L. Sturiale, G. Gimenez-Gallego, and U. Lindahl. 2002. Biosynthetic oligosaccharide libraries for identification of protein-binding heparan sulfate motifs - Exploring the structural diversity by screening for fibroblast growth factor (FGF) 1 and FGF2 binding. *Journal of Biological Chemistry* 277 (34):30567-30573.
- Jonsson, M., E. Eklund, L. A. Fransson, and A. Oldberg. 2003. Initiation of the decorin glycosaminoglycan chain in the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. *Journal of Biological Chemistry* 278 (24):21415-21420.
- Kappeler, F., D. R. C. Klopfenstein, M. Foguet, J. P. Paccard, and H. P. Hauri. 1997. The recycling of ERGIC-53 in the early secretory pathway - ERGIC-53 carries a cytosolic endoplasmic reticulum exit determinant interacting with COPII. *Journal of Biological Chemistry* 272 (50):31801-31808.
- Keller, P., and K. Simons. 1998. Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin. *Journal of Cell Biology* 140 (6):1357-1367.
- Kitagawa, H., Y. Tone, J. Tamura, K. W. Neumann, T. Ogawa, S. Oka, T. Kawasaki, and K. Sugahara. 1998. Molecular cloning and expression of glucuronyltransferase I involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry* 273 (12):6615-6618.

REFERANSER

- Kitagawa, H., T. Uyama, and K. Sugahara. 2001. Molecular cloning and expression of a human chondroitin synthase. *Journal of Biological Chemistry* 276 (42):38721-38726.
- Kitagawa, Y., Y. Sano, M. Ueda, K. Higashio, H. Narita, M. Okano, S. I. Matsumoto, and R. Sasaki. 1994. N-Glycosylation of Erythropoietin Is Critical for Apical Secretion by Madin-Darby Canine Kidney-Cells. *Experimental Cell Research* 213 (2):449-457.
- Kjellén, L., and U. Lindahl. 1991. Proteoglycans - Structures and Interactions. *Annual Review of Biochemistry* 60:443-475.
- Kolset, S. O., and J. T. Gallagher. 1990. Proteoglycans in Hematopoietic-Cells. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1032 (2-3):191-211.
- Kolset, S. O., T. T. Vuong, and K. Prydz. 1999. Apical secretion of chondroitin sulphate in polarized Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. *Journal of Cell Science* 112 (11):1797-1801.
- Kornfeld, R., and S. Kornfeld. 1985. Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides. *Annual Review of Biochemistry* 54:631-664.
- Kromer, A., M. M. Glombik, W. B. Huttner, and H. H. Gerdes. 1998. Essential role of the disulfide-bonded loop of chromogranin B for sorting to secretory granules is revealed by expression of a deletion mutant in the absence of endogenous granin synthesis. *Journal of Cell Biology* 140 (6):1331-1346.
- Kuehn, M. J., J. M. Herrmann, and R. Schekman. 1998. COPII-cargo interactions direct protein sorting into ER-derived transport vesicles. *Nature* 391 (6663):187-190.
- Kundu, A., R. T. Avalos, C. M. Sanderson, and D. P. Nayak. 1996. Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells. *Journal of Virology* 70 (9):6508-6515.
- Kusche-Gullberg, M., and L. Kjellén. 2003. Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis. *Current Opinion in Structural Biology* 13 (5):605-611.
- Ladinsky, M. S., D. N. Mastrorade, J. R. McIntosh, K. E. Howell, and L. A. Staehelin. 1999. Golgi structure in three dimensions: Functional insights from the normal rat kidney cell. *Journal of Cell Biology* 144 (6):1135-1149.
- Lewis, M. J., D. J. Sweet, and H. R. B. Pelham. 1990. The Erd2 Gene Determines the Specificity of the Luminal Er Protein Retention System. *Cell* 61 (7):1359-1363.

- Lidholt, K., I. Eriksson, and L. Kjellen. 1995. Heparin Proteoglycans Synthesized by Mouse Mastocytoma Contain Chondroitin Sulfate. *Biochemical Journal* 311:233-238.
- Lind, T., F. Tufaro, C. McCormick, U. Lindahl, and K. Lidholt. 1998. The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 are glycosyltransferases required for the biosynthesis of heparan sulfate. *Journal of Biological Chemistry* 273 (41):26265-26268.
- Lisanti, M. P., I. W. Caras, M. A. Davitz, and E. Rodriguezboulan. 1989. A Glycophospholipid Membrane Anchor Acts as an Apical Targeting Signal in Polarized Epithelial-Cells. *Journal of Cell Biology* 109 (5):2145-2156.
- Lodish, H. F., N. Kong, M. Snider, and G. Strous. 1983. Hepatoma Secretory Proteins Migrate from Rough Endoplasmic-Reticulum to Golgi at Characteristic Rates. *Nature* 304 (5921):80-83.
- Low, M. G. 1989. The Glycosyl-Phosphatidylinositol Anchor of Membrane-Proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta* 988 (3):427-454.
- Marie, M., R. Sannerud, H. A. Dale, and J. Saraste. 2008. Take the 'A' train: on fast tracks to the cell surface. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65 (18):2859-2874.
- Mays, R. W., K. A. Siemers, B. A. Fritz, A. W. Lowe, G. Vanmeer, and W. J. Nelson. 1995. Hierarchy of Mechanisms Involved in Generating Na/K-ATPase Polarity in Mdkc Epithelial-Cells. *Journal of Cell Biology* 130 (5):1105-1115.
- Mertens, G., B. VanderSchueren, H. vandenBerghe, and G. David. 1996. Heparan sulfate expression in polarized epithelial cells: The apical sorting of glypican (GPI-anchored proteoglycan) is inversely related to its heparan sulfate content. *Journal of Cell Biology* 132 (3):487-497.
- Miesenbock, G., and J. E. Rothman. 1995. The Capacity to Retrieve Escaped Er Proteins Extends to the Trans-Most Cisterna of the Golgi Stack. *Journal of Cell Biology* 129 (2):309-319.
- Miettinen, H. M., S. N. Edwards, and M. Jalkanen. 1994. Analysis of Transport and Targeting of Syndecan-1 - Effect of Cytoplasmic Tail Deletions. *Molecular Biology of the Cell* 5 (12):1325-1339.
- Moses, J., A. Oldberg, F. Cheng, and L. A. Fransson. 1997. Biosynthesis of the proteoglycan decorin - Transient 2-phosphorylation of xylose during formation of the trisaccharide linkage region. *European Journal of Biochemistry* 248 (2):521-526.

REFERANSER

- Muniz, M., P. Morsomme, and H. Riezman. 2001. Protein sorting upon exit from the endoplasmic reticulum. *Cell* 104 (2):313-320.
- Muniz, M., and H. Riezman. 2000. Intracellular transport of GPI-anchored proteins. *Embo Journal* 19 (1):10-15.
- Munro, S., and H. R. B. Pelham. 1987. A C-Terminal Signal Prevents Secretion of Luminal Er Proteins. *Cell* 48 (5):899-907.
- Nezil, F. A., and M. Bloom. 1992. Combined Influence of Cholesterol and Synthetic Amphiphilic Peptides Upon Bilayer Thickness in Model Membranes. *Biophysical Journal* 61 (5):1176-1183.
- Nicodemus, C. F., S. Avraham, K. F. Austen, S. Purdy, J. Jablonski, and R. L. Stevens. 1990. Characterization of the Human Gene That Encodes the Peptide Core of Secretory Granule Proteoglycans in Promyelocytic Leukemia HL-60 Cells and Analysis of the Translated Product. *Journal of Biological Chemistry* 265 (10):5889-5896.
- Nishimura, N., and W. E. Balch. 1997. A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science* 277 (5325):556-558.
- Nishimura, N., H. Plutner, K. Hahn, and W. E. Balch. 2002. The delta subunit of AP-3 is required for efficient transport of VSV-G from the trans-Golgi network to the cell surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (10):6755-6760.
- Oegema, T. R., E. L. Kraft, G. W. Jourdian, and T. R. Vanvalen. 1984. Phosphorylation of Chondroitin Sulfate in Proteoglycans from the Swarm Rat Chondrosarcoma. *Journal of Biological Chemistry* 259 (3):1720-1726.
- Ohno, H., T. Tomemori, F. Nakatsu, Y. Okazaki, R. C. Aguilar, H. Foelsch, I. Mellman, T. Saito, T. Shirasawa, and J. S. Bonifacino. 1999. mu 1B, a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells. *Febs Letters* 449 (2-3):215-220.
- Orzech, E., S. Cohen, A. Weiss, and B. Aroeti. 2000. Interactions between the exocytic and endocytic pathways in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Journal of Biological Chemistry* 275 (20):15207-15219.
- Palade, G. 1975. Intracellular Aspects of Process of Protein-Synthesis. *Science* 189 (4200):347-358.

- Paladino, S., D. Sarnataro, R. Pillich, S. Tivodar, L. Nitsch, and C. Zurzolo. 2004. Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins. *Journal of Cell Biology* 167 (4):699-709.
- Pelham, H. R. B. 1989. Control of Protein Exit from the Endoplasmic-Reticulum. *Annual Review of Cell Biology* 5:1-23.
- Pelham, H. R. B. 1995. Sorting and Retrieval between the Endoplasmic-Reticulum and Golgi-Apparatus. *Current Opinion in Cell Biology* 7 (4):530-535.
- Pettersson, I., M. Kusche, E. Unger, H. Wlad, L. Nylund, U. Lindahl, and L. Kjellen. 1991. Biosynthesis of Heparin - Purification of a 110-Kda Mouse Mastocytoma Protein Required for Both Glucosaminyl N-Deacetylation and N-Sulfation. *Journal of Biological Chemistry* 266 (13):8044-8049.
- Polishchuk, R. S., and A. A. Mironov. 2004. Structural aspects of Golgi function. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61 (2):146-158.
- Potter, B. A., G. Ihrke, J. R. Bruns, K. M. Weixel, and O. A. Weisz. 2004. Specific N-glycans direct apical delivery of transmembrane, but not soluble or glycosylphosphatidylinositol-anchored forms of endolyn in Madin-Darby canine kidney cells. *Molecular Biology of the Cell* 15 (3):1407-1416.
- Presley, J. F., N. B. Cole, T. A. Schroer, K. Hirschberg, K. J. M. Zaal, and J. LippincottSchwartz. 1997. ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* 389 (6646):81-85.
- Prydz, K., and K. T. Dalen. 2000. Synthesis and sorting of proteoglycans - Commentary. *Journal of Cell Science* 113 (2):193-205.
- Prydz, K., G. Dick, and H. Tveit. 2008. How Many Ways Through the Golgi Maze? *Traffic* 9 (3):299-304.
- Rambourg, A., Hernande.W, and C. P. Leblond. 1969. Detection of Complex Carbohydrates in Golgi Apparatus of Rat Cells. *Journal of Cell Biology* 40 (2):395-&.
- Richardson, J. C. W., V. Scalera, and N. L. Simmons. 1981. Identification of 2 Strains of Mdck Cells Which Resemble Separate Nephron Tubule Segments. *Biochimica Et Biophysica Acta* 673 (1):26-36.
- Rodriguez-Boulan, E., and A. Gonzalez. 1999. Glycans in post-Golgi apical targeting: sorting signals or structural props? *Trends in Cell Biology* 9 (8):291-294.

REFERANSER

- Rodriguez-Boulan, E., and A. Musch. 2005. Protein sorting in the Golgi complex: Shifting paradigms. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1744 (3):455-464.
- Roth, J., and E. G. Berger. 1982. Immuno-Cytochemical Localization of Galactosyltransferase in Hela-Cells - Codistribution with Thiamine Pyrophosphatase in Trans-Golgi Cisternae. *Journal of Cell Biology* 93 (1):223-229.
- Rothman, J. E., and F. T. Wieland. 1996. Protein sorting by transport vesicles. *Science* 272 (5259):227-234.
- Sannerud, R., M. Marie, C. Nizak, H. A. Dale, K. Pernet-Gallay, F. Perez, B. Goud, and J. Saraste. 2006. Rab1 defines a novel pathway connecting the pre-Golgi intermediate compartment with the cell periphery. *Molecular Biology of the Cell* 17 (4):1514-1526.
- Sato, T., M. Gotoh, K. Kiyohara, T. Akashima, H. Iwasaki, A. Kameyama, H. Mochizuki, T. Yada, N. Inaba, A. Togayachi, T. Kudo, M. Asada, H. Watanabe, T. Imamura, K. Kimata, and H. Narimatsu. 2003. Differential roles of two N-acetylgalactosaminyltransferases, CSGalNAcT-1, and a novel enzyme, CSGalNAcT-2 - Initiation and elongation in synthesis of chondroitin sulfate. *Journal of Biological Chemistry* 278 (5):3063-3071.
- Scales, S. J., R. Pepperkok, and T. E. Kreis. 1997. Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COPII and COPI. *Cell* 90 (6):1137-1148.
- Scheiffele, P., J. Peranen, and K. Simons. 1995. N-Glycans as Apical Sorting Signals in Epithelial-Cells. *Nature* 378 (6552):96-98.
- Scheiffele, P., M. G. Roth, and K. Simons. 1997. Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *Embo Journal* 16 (18):5501-5508.
- Schick, B. P., J. F. Gradowski, and J. D. S. Antonio. 2001. Synthesis, secretion, and subcellular localization of serglycin proteoglycan in human endothelial cells, 449-458.
- Schmidt, K., H. Dartsch, D. Linder, H. F. Kern, and R. Kleene. 2000. A submembranous matrix of proteoglycans on zymogen granule membranes is involved in granule formation in rat pancreatic acinar cells. *Journal of Cell Science* 113 (12):2233-2242.

- Schoenenberger, C. A., A. Zuk, G. M. Zinkl, D. Kendall, and K. S. Matlin. 1994. Integrin Expression and Localization in Normal Mdkc Cells and Transformed Mdkc Cells Lacking Apical Polarity. *Journal of Cell Science* 107:527-541.
- Schrag, J. D., D. O. Procopio, M. Cygler, D. Y. Thomas, and J. J. M. Bergeron. 2003. Lectin control of protein folding and sorting in the secretory pathway. *Trends in Biochemical Sciences* 28 (1):49-57.
- Schweizer, A., K. Matter, C. M. Ketcham, and H. P. Hauri. 1991. The Isolated Er-Golgi Intermediate Compartment Exhibits Properties That Are Different from Er and Cis-Golgi. *Journal of Cell Biology* 113 (1):45-54.
- Seo, N. S., A. M. Hocking, M. Hook, and D. J. McQuillan. 2005. Decorin core protein secretion is regulated by N-linked oligosaccharide and glycosaminoglycan additions. *Journal of Biological Chemistry* 280 (52):42774-42784.
- Silbert, J. E., and G. Sugumaran. 1995. Intracellular membranes in the synthesis, transport, and metabolism of proteoglycans. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes* 1241 (3):371-384.
- Simmen, T., S. Honing, A. Icking, R. Tikkanen, and W. Hunziker. 2002. AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells. *Nature Cell Biology* 4 (2):154-159.
- Simons, K., and E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387 (6633):569-572.
- Simons, K., and G. Vanmeer. 1988. Lipid Sorting in Epithelial-Cells. *Biochemistry* 27 (17):6197-6202.
- Spiro, R. C., H. H. Freeze, D. Sampath, and J. A. Garcia. 1991. Uncoupling of Chondroitin Sulfate Glycosaminoglycan Synthesis by Brefeldin-A. *Journal of Cell Biology* 115 (5):1463-1473.
- Stevens, R. L., S. Avraham, M. C. Gartner, G. A. P. Bruns, K. F. Austen, and J. H. Weis. 1988. Isolation and Characterization of a Cdna That Encodes the Peptide Core of the Secretory Granule Proteoglycan of Human Promyelocytic Leukemia HL-60 Cells. *Journal of Biological Chemistry* 263 (15):7287-7291.
- Sugahara, K., I. Yamashina, P. Dewaard, H. Vanhalbeek, and J. F. G. Vliegenthart. 1988. Structural Studies on Sulfated Glycopeptides from the Carbohydrate-Protein Linkage Region of Chondroitin 4-Sulfate Proteoglycans of Swarm Rat

REFERANSER

Chondrosarcoma - Demonstration of the Structure Gal(4-O-Sulfate)-Beta-1-3-Gal-Beta-1-4xyl-Beta-1-O-Ser. *Journal of Biological Chemistry* 263 (21):10168-10174.

Sugumaran, G., M. Katsman, and J. E. Silbert. 1992. Effects of Brefeldin-a on the Localization of Chondroitin Sulfate-Synthesizing Enzymes - Activities in Subfractions of the Golgi from Chick-Embryo Epiphyseal Cartilage. *Journal of Biological Chemistry* 267 (13):8802-8806.

Sutterlin, C., T. L. Doering, F. Schimmoller, S. Schroder, and H. Riezman. 1997. Specific requirements for the ER to Golgi transport of GPI-anchored proteins in yeast. *Journal of Cell Science* 110:2703-2714.

Svennevig, K., K. Prydz, and S. O. Kolset. 1995. Proteoglycans in Polarized Epithelial Madin-Darby Canine Kidney-Cells. *Biochemical Journal* 311:881-888.

Takeda, T., H. Yamazaki, and M. G. Farquhar. 2003. Identification of an apical sorting determinant in the cytoplasmic tail of megalin. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 284 (5):C1105-C1113.

Tone, Y., L. C. Pedersen, T. Yamamoto, T. Izumikawa, H. Kitagawa, J. Nishihara, J.-i. Tamura, M. Negishi, and K. Sugahara. 2008. 2-O-phosphorylation of xylose and 6-O-sulfation of galactose in the protein linkage region of glycosaminoglycans influence the glucuronyltransferase-I activity involved in the linkage region's synthesis, *Journal of Biological Chemistry* 283 (24): 16804-16807.

Traub, L. M. 2005. Common principles in clathrin-mediated sorting at the Golgi and the plasma membrane. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1744 (3):415-437.

Tsuda, M., K. Kamimura, H. Nakato, M. Archer, W. Staatz, B. Fox, M. Humphrey, S. Olson, T. Futch, V. Kaluza, E. Siegfried, L. Stam, and S. B. Selleck. 1999. The cell-surface proteoglycan Dally regulates Wingleless signalling in Drosophila. *Nature* 400 (6741):276-280.

Tveit, H., G. Dick, V. Skibeli, and K. Prydz. 2005. A proteoglycan undergoes different modifications en route to the apical and basolateral surfaces of Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 280 (33):29596-29603.

Ueno, M., S. Yamada, M. Zako, M. Bernfield, and K. Sugahara. 2001. Structural characterization of heparan sulfate and chondroitin sulfate of syndecan-1 purified from normal murine mammary gland epithelial cells - Common phosphorylation of xylose and differential sulfation of galactose in the protein linkage region tetrasaccharide sequence. *Journal of Biological Chemistry* 276 (31):29134-29140.

Uhlin Hansen, L., and M. Yanagishita. 1993. Differential Effect of Brefeldin-a on the Biosynthesis of Heparan-Sulfate and Chondroitin Dermatan Sulfate Proteoglycans in Rat Ovarian Granulosa-Cells in Culture. *Journal of Biological Chemistry* 268 (23):17370-17376.

Urbani, L., and R. D. Simoni. 1990. Cholesterol and Vesicular Stomatitis Virus-G Protein Take Separate Routes from the Endoplasmic-Reticulum to the Plasma-Membrane. *Journal of Biological Chemistry* 265 (4):1919-1923.

Uyama, T., H. Kitagawa, J. Tamura, and K. Sugahara. 2002. Molecular cloning and expression of human chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase - The key enzyme for chain initiation and elongation of chondroitin/dermatan sulfate on the protein linkage region tetrasaccharide shared by heparin/heparan sulfate. *Journal of Biological Chemistry* 277 (11):8841-8846.

Vuong, T. T., K. Prydz, and H. Tveit. 2006. Differences in the apical and basolateral pathways for glycosaminoglycan biosynthesis in Madin–Darby canine kidney cells. *Glycobiology* vol. 16.

Walter, P., and A. E. Johnson. 1994. Signal Sequence Recognition and Protein Targeting to the Endoplasmic-Reticulum Membrane. *Annual Review of Cell Biology* 10:87-119.

Wassnehove-McCarthy, D. J., and K. J. McCarthy. 1999. Molecular characterization of a novel basement membrane-associated proteoglycan, leprecan. *Journal of Biological Chemistry* 274 (35):25004-25017.

Wehrle-Haller, B., and B. A. Imhof. 2001. Stem cell factor presentation to c-kit - Identification of a basolateral targeting domain. *Journal of Biological Chemistry* 276 (16):12667-12674.

Williams, D. B. 2006. Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science* 119 (4):615-623.

Wilson, D. W., M. J. Lewis, and H. R. B. Pelham. 1993. Ph-Dependent Binding of Kdel to Its Receptor In vitro. *Journal of Biological Chemistry* 268 (10):7465-7468.

Wu, M. M., M. Grabe, S. Adams, R. Y. Tsien, H. P. H. Moore, and T. E. Machen. 2001. Mechanisms of pH regulation in the regulated secretory pathway. *Journal of Biological Chemistry* 276 (35):33027-33035.

Wyss, D. F., J. S. Choi, J. Li, M. H. Knoppers, K. J. Willis, A. R. N. Arulanandam, A. Smolyar, E. L. Reinherz, and G. Wagner. 1995. Conformation and Function of the

REFERANSER

N-Linked Glycan in the Adhesion Domain of Human Cd2. *Science* 269 (5228):1273-1278.

Yano, H., M. Yamamoto-Hino, M. Abe, R. Kuwahara, S. Haraguchi, I. Kusaka, W. Awano, A. Kinoshita-Toyoda, H. Toyoda, and S. Goto. 2005. Distinct functional units of the Golgi complex in *Drosophila* cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (38):13467-13472.

Ye, B., Y. Zhang, W. Song, S. H. Younger, L. Y. Jan, and Y. N. Jan. 2007. Growing dendrites and axons differ in their reliance on the secretory pathway. *Cell* 130 (4):717-729.

Yeaman, C., A. H. LeGall, A. N. Baldwin, L. Monlauzeur, A. LeBivic, and E. RodriguezBoulan. 1997. The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells. *Journal of Cell Biology* 139 (4):929-940.

Zimmermann, P., and G. David. 1999. The syndecans, tuners of transmembrane signaling. *Faseb Journal* 13:S91-S100.