

Betydningen av karbonisk anhydrase 9 (CA9) som kardioprotektiv substans.

Kan en oppregulering av CA9 i HL-1 kardiomyocytter virke kardioprotektivt?

Medisinstudent Magnar Eek



Avdeling for fysiologi under professor Guro Valens gruppe, institutt for basalmedisinsk forskning, det medisinske fakultet.

UNIVERSITETET I OSLO

11.09.2012

Abstract:

AIMS: Gene therapy to protect the heart from ischemic reperfusion injury is clinically attractive. We investigated if delivery of DNA encoding for Carbonic Anhydrase 9 (CA9) to HL-1 cells is protective against H₂O₂ stimulation in vitro.

MAIN METHODS: Plasmid DNA with CA9 incorporated (PcDNA 3,1 CA9 2,1) had been pre-made and incorporated into a bacteria. We grew the bacteria and isolated the pcDNA for transfection experiments with HL-1 cells. CA9 protein were detected after transfection using Western blot, and band density was measured and compared to HL-1 cells transfected with empty vector. Transfection rate was evaluated using EGFP and Hoechst staining of cells, and calculated. A model of cell injury using H₂O₂ was established. PcDNA 3,1 CA9 2,1 transfected HL-1 cells and empty vector transfected HL-1 cells were injured with 300mM H₂O₂, and cell death were analyzed using Flow Cytometry (propidium iodid) and measurements of lactate dehydrogenase (LDH) release into the medium.

KEY FINDINGS: Lipofectamin transfected HL-1 cells had a transfection rate of 22% as evaluated by EGFP. Transfection lead to a 50 times increase of CA9 expression as evaluated by western blot. H₂O₂ injury of HL-1 cells increased the number of propidium iodide positive cells, and increased release of LDH. Weather or not CA9 protects against H₂O₂ stimulation still remains unknown. More experiments have to be done.

SIGNIFICANCE: This observation do not have clinical potential at this point. Too many questions remain unanswered. However we have collected some of the pieces in the puzzle and laid grounds for completing the scientific question which was raised.

1 Innholdsfortegnelse

2. Innledning

| | |
|--------------------------------|-----|
| 2.1 Oppgavevalgets begrunnelse | 5 |
| 2.2 Bakgrunn for oppgaven | 5-7 |
| 2.3 Problemstilling | 7 |

3. Metode.

| | |
|--|-------|
| 3.1 PcDNA 3,1 CA9 2,1 konstrukt | 8 |
| 3.1.1 Fremstilling av DNA | 8 |
| 3.1.2 Identifisering av DNA ved southern blot | 8 |
| 3.2 Dyrking av HL-1 celler | 8-11 |
| 3.2.1 Pre- coating av flasker og brønnplater | 8-9 |
| 3.2.2 Tining av HL-1 celler | 9 |
| 3.2.3 Daglig dyrkning | 9 |
| 3.2.4 Splitting av cellekulturer | 10 |
| 3.2.5 Nedfrysing av celler | 11 |
| 3.3 H ₂ O ₂ dose respons forsøk av ikke transfekterte HL-1 celler | 11 |
| 3.4 PcDNA 3,1 CA9 2,1 transfeksjon av HL-1 celler | 12 |
| 3.4.1 Amaxa | 12 |
| 3.4.2 Lipofectamin | 12 |
| 3.5 Dokumentasjon av transfeksjonsgrad ved hjelp av EGFP og Hoext kjernefarging | 12-13 |
| 3.6 Proteinekstraksjon og western blot | 13 |
| 3.6.1 Transfeksjon | 13 |
| 3.6.2 Cellehøsting | 13 |
| 3.6.3 Proteinekstraksjon | 14 |
| 3.6.4 Western blot | 14 |
| 3.7 Flowcytometrisk måling av celledød blant H ₂ O ₂ stimulerede HL-1 celler, transfektert med pcDNA 3,1 CA9 2,1, eller empty vector | 14 |
| 3.8 Laktat dehydrogenase (LDH) måling av H ₂ O ₂ stimulerede og transfekterte HL-1 celler | 15-17 |
| 3.8.1 LDH Forsøk 1: | 15-16 |
| 3.8.2 LDH Forsøk 2: | 16-17 |

4. Resultater.

| | |
|--|-------|
| 4.1 Samlede resultater oppsumert | 18 |
| 4.2 PcDNA 3,1 CA9 2,1 konstrukt fremstilt og identifisert | 18-19 |
| 4.3 EGFP lar seg lipofectamintransfektore til HL-1 celler med en transfeksjonsgrad på 22%. | 19 |

| | |
|--|-------|
| 4.4 PcDNA 3,1 CA9 2,1 transfekterte HL-1 celler produserer karbonisk anhydrase 9 analysert med western blot. | 20 |
| 4.5 300µM H₂O₂ induserer celledød i HL-1 celler evaluert med flowcytometri | 20-22 |
| 4.6 Lavt antall telte transfekterte og H₂O₂ stimulerte HL-1 celler, evaluert med flowcytometri | 22 |
| 4.4 Ingen registrert forskjell i H₂O₂ industert celledød mellom pcDNA 3,1 CA9 2,1 transfekterte HL-1 celler og empty vector transfekterte HL-1 celler | 22-23 |
| 4.4.1 Resultat LDH forsøk 1 | 22-23 |
| 4.4.2 Resultat LDH forsøk 2 | 23 |
| 5. Diskusjon | 24-25 |
| 6. Kildehenvisninger | 26 |

2 Innledning

2.1 Oppgavevalgets begrunnelse

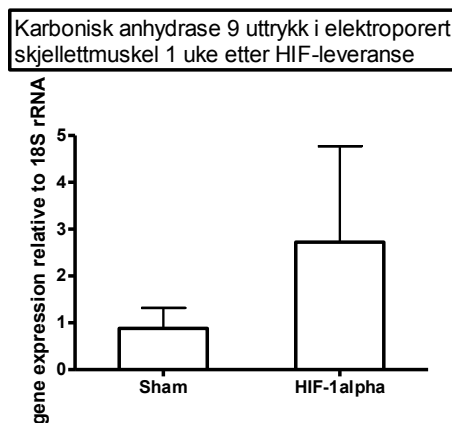
Basalmedisinsk forskning har de senere årene gjennomgått en rivende utvikling. Jeg har tro på at dette felt kommer til å få en stadig viktigere rolle i medisinen. Det er etter mitt syn, viktig å ha kjennskap og forståelse for grunnforskningens prinsipper også som kliniker. Samtidig er det begrenset hvor mye praktisk erfaring man får med de ulike basalmedisinske analysemetoder gjennom studiet. Å forstå, samt bli fortrolig med eksperimentell metode, er viktig for meg. Derfor var dette en gylden mulighet, uavhengig av senere karrierevalg, til å innarbeide en god vitenskapelig metodikk som jeg kan ta med meg videre i yrkeslivet. Grunnen til at temaet falt på akkurat hjerteceller handlet mer om valg av en dyktig veileder, som jeg har god erfaring med fra tidligere PBL- undervisning.

2.2 Bakgrunn for oppgaven

Ifølge statistisk sentralbyrå døde ca 5500 personer i 2010 av akutt hjerteinfarkt eller andre iskemiske hjertesykdommer i Norge. På verdensbasis er iskemisk hjertesykdom den ledende årsak til død. [1] Hjertet kan skades av mangel på oksygen (hypoksi), eller ved reintroduksjon av molekylært oksygen (reperfusjon). Ischemi-reperfusjonsskade kan føre til arrytmier, redusert pumpefunksjon, og celledød i pasienter ved PCI, åpen hjertekirurgi, og infarkt. Genterapi kan gi muligheter for pasienter i påvente av hjertetransplantasjon, utsatte grupper og pasienter som ikke er egnet for konvensjonell behandling.

Dr. Med. Gabor Czibik disputerte i 2008 på avhandlingen ”Mending the broken heart – the emerging concept of remote genetic cardioprotection by Hypoxia- inducible factor 1 alpha” (HIF- 1 α). [2] I avhandlingen ga han DNA kodende for HIF-1 α i skjelettmuskel (m. quadriceps) til mus. Ved elektroporering økte han opptaket av DNA til cellekjernene, og dette førte til beskyttelse mot hjerteskaade induisert av okklusjon ved omsnøring av LAD (Left Anterior Descending artery) 1,5mm nedenfor aurikkeltuppen. Mekanismen for dette antas å være knyttet til frisetting av faktorer i blodbanen som føres fra den behandlede skjelettmuskelen til hjertet.

HIF-1 α er en av to subenheter i en transkripsjonsfaktor involvert i å øke oksygentilførselen til organer. Under normoksi vil HIF-1 α nedbrytes av protosomet. Ved hypoksi stabiliseres imidlertid HIF-1 α i cytoplasmaet og migrerer til kjernen hvor det slår seg sammen med den andre subenheten, HIF-1 β . Denne heterodimeren transkriberer så sine målgener. Et av funnene til Czibik var at flere av disse genene nedstrøms for HIF promotoren potensielt kan ha en kardioprotektiv effekt. En av faktorene som var oppregulert var karbonisk anhydrase 9 (CA9). Siden HIF1 α ga en generell angiogenese som potensielt kan være uheldig ved cancer ville forskergruppen gjerne utforske nedstrømsfaktorer med tanke på kardioproteksjon.



Figur 1: Fra G. Czibiks avhandling.

Karbonisk anhydrase er en familie av zinkholdige enzymer som deltar i ionetransport og pH-regulering. Det finnes 16 typer hos pattedyr. I hjertet finner vi isoformene 14 og 9. [3] Lite er kjent om betydningen av karbonisk anhydrase i hjertet. En nyere studie viser at hypoksi samt kjemiske komponenter som forstyrrer oksygensensibiliteten øker uttrykket av karbonisk anhydrase 9 i primære rotte kardiomyocytter og i udødelige H9C2 kardiomyocytter i en HIF avhengig signalvei. [4] I denne studien spekuleres det i at dette er en beskyttende signalvei for hjertet.

In vitro er voksne kardiomyocytter vanskelig å jobbe med, både fordi de har svært begrenset delingspotensial og fordi de er sårbare for ytre påkjenninger og derved gjennomgår apoptose eller blir nekrotiske. Særlig i studier hvor transfeksjon skal gjøres, er voksne hjertemuskelceller vanskelige. Samtidig mister de mye av sin fenotype og differensiering. I 1997 klarte William C. Claycomb å avlede en kardiell muskelcellelinje, kalt udødelige murine HL-1 celler (heretter kalt HL-1 celler), fra en tumorlinje blant atrielle kardiomyocytter fra AT-1 mus. [5] HL-1 celler kan dyrkes og splittes, men allikevel beholde sin evne til kontraksjon samt sin differensierte morfologi, biokjemi og elektrofysiologi. Av denne grunn

er HL-1 cellene gunstigere for eksperimentelle forsøk med CA9 in vitro hvor transfeksjon er et viktig verktøy.

2.3 Problemstilling

Vi ønsket å studere betydningen av CA9 i HL-1 celler under normale forhold og ved stimuleringsforsøk med H₂O₂ som en modell på reperfusjonsskade.

Hovedmålet var å finne ut om HL-1 celler oppregulert med CA9 er beskyttende mot skade sammenliknet med empty vector.

For å kvalitetsbedømme vårt eget arbeid, ble transfeksjonseffekten bedømt på protein nivå.

3 Metode

3.1 PcDNA 3,1 CA9 2,1 konstrukt

3.1.1 Fremstilling av DNA

Postdoc Julia Sagave designet DNA for CA9, og inkorporerte det i plasmid DNA (pc DNA 3,1). Dette ble klonet på følgende måte. Ved første dag tok vi 5µl bakterier med pcDNA 3,1 CA9 2,1, og blandet med 5ml LB-BROTH og 10µl ampicillin (50mg/ml) i en liten kolbe. Blandingen stod over natten og neste dag overførte vi den til en større kolbe og tilsatte nye 300ml LB-BROTH og 600µl ampicillin. Igjen lot vi blandingen stå over natten og på tredje dag isolerte vi DNA ved å sentrifugere blandingen ved 8000rpm under 4°C, med rett rotor i 15 minutter. Deretter fulgte vi vanlig protokoll før konsentrasjonen ble målt ved bruk av Nanodrop.

3.1.2 Identifisering av DNA ved Southern blot

For å bedømme kvaliteten på vårt klonete DNA brukte vi Southern blot. Agarosegel ble laget av ½ agarose, 50ml TBE- buffer og 4µl etidiumbromid. Det ble benyttet en 220µl loading buffer samt en DNA-stige på 1kb. Poenget med DNA-stigen var å se hvor langt DNA sekvenser av en gitt størrelse vandret i vår selvlagede agarosegel. Xba 1 og HIND3 ble benyttet som restriksjonsenzymmer. Det hele ble kjørt på 100V. Vi identifiserte pcDNA 3,1 CA9 2,1 ved å sammenlikne båndene med en referansestige. Referansestigen tilsvarer DNA-stigen, og gir opplysninger om størrelsen på båndene.

3.2 Dyrkning av HL-1 celler

3.2.1 Pre- coating av flasker og brønnplater

For at HL-1 cellene skal vokse og trives trenger de et egnet underlag og feste seg til. Gelatin/fibronectin ble laget etter følgende oppskrift og nedfrost i merkede 15ml reagensrør på -20°C. 0,1g gelatin ble løst i 500ml dobbelt destilert H₂O og deretter autoclavert. 1ml fibronectin ble under avtrekksbenken og sterile forhold, tilsatt 199ml av den autoclaverte 0,02% gelatin løsningen.

Gelatin/ fibronectin ble tint i vannbad før bruk. Flasker (T75 og T25) og brønnplater (6-brønnsplate) ble coatet med gelatin/ fibronectin (6ml/T75, 3ml/T25 og 1ml/brønn) under avtrekk, før de ble korket og inkubert på 37°C i minimum fire timer før tilsetning av celler. Gelatin/ fibronectin løsningen ble aspirert bort før tilsetning av celler, slik at bare et tynt lag coating lå igjen på plastoverflaten.

3.2.2 Tining av HL-1 celler

Mens flaskene ble inkubert ble medium laget. Fullverdig medium består av 87ml claycomb medium, 10ml fetal bovine serum, 1ml penicillin/ streptomycin, 1ml nordadrenalin (se oppskrift under) og 1ml L-Glutamine. Noradrenalin ble laget av 0,59g ascorbinsyre løst i 100ml dobbel destilert (dd) H₂O (endelig konsentrasjon 30mM). Deretter ble 80mg nordadrenalin løst i 25 ml av ascorbinsyre løsningen (10mM). Vi benyttet maske og hansker ved håndtering av noradrenalin som er toksisk ved inhalasjon. Vaskemedium ble laget av 94ml claycomb medium, 5ml fetal bovine serum og 1ml penicillin/ streptomycin. Etter fire timer ble gelatin/ fibronectin aspirert bort og 10ml Medium (37°C) tilført flasken og plassert i inkubatoren. Medium tilsetningene er etter anbefaling fra William Claycomb, som laget og ga bort cellene (W.C.Claycomb 2004).

I et 15ml sentrifugerør ble 10ml vaskemedium tilsatt og inkubert i et 37°C vannbad. HL-1 celler lagret på flytende nitrogen ble tint i 2 min i eget eppendorf rør i 37°C vannbad og deretter overført vaskemediet i sentrifugerøret. Deretter ble røret sentrifugert på 500G i 5min. Vaskemediet ble fjernet ved aspirasjon uten å ødelegge pelletten. Deretter ble pelletten forsiktig slemmet opp i nye 5ml fullverdig medium og overført til T75 flasken for videre inkubering. Etter nye fire timer forsikret vi oss om at cellene hadde festet seg til underlaget ved direkte mikroskopi og 15ml friskt fullverdig medium ble tilsatt. Flasken ble inkubert videre til cellene nådde full konfluens.

3.2.3 Daglig dyrkning

Cellekulturene ble gitt fullverdig medium daglig, med unntak av fredag da tilsetningene ble doblet for at cellene skulle klare seg over helgen. Gammelt medium ble aspirert vekk etter at nytt medium var forvarmet til 37°C i vannbad. Middommengden som ble tilsatt varierte med størrelsen på flaskene eller brønnplatene: T75 flasken tilsatte vi 15ml medium, T25 flasken

ble tilsatt 5ml medium, 6 brønnsplaten 2ml medium per brønn og 12 brønnsplaten 1ml medium per brønn.

3.2.4 Splitting av cellekulturer

Kulturene ble splittet når cellene var konfluente konstatert ved mikroskopiering. Trypsin/EDTA ble laget på forhånd av 100ml 0,5% Trypsin EDTA, som ble løst under sterile forhold med 900ml HBSS. Løsningen ble fordelt i 12ml alikvoter og lagret på -20°C. I tillegg ble vaskemedium laget etter samme oppskrift som under avsnittet om tining av HL-1 celler. Trypsin inhibitor ble fremstilt ved å løse 25mg soyabønne trypsin inhibitor i 100ml PBS gjennom filtersterilisering. Alle reagenser benyttet i splittingprosessen ble varmet opp til 37°C før tilsetning til cellene.

Prosessen ble igangsatt ved at fullverdig medium ble aspirert vekk. Den konfluente flasken ble rensert kortvarig med trypsin/EDTA. Vi benyttet 3ml trypsin/EDTA per T25 flaske og 6ml per T75 flaske. Vi forsøkte å unngå treffe cellene direkte med enzymet, slik at cellene ikke ble påført unødig skade. Deretter aspirerte vi vekk trypsin/EDTA løsningen før vi igjen tilsatte en ny runde trypsin/EDTA. Denne gangen 1,3ml per T25 flaske og 3ml per T75 flaske. Flasken med trypsin/EDTA ble nå inkubert i 37°C i to minutter. Ved samtidig mikroskopiering så vi at cellene trakk seg gradvis mer sammen. Etter to minutter aspirerte vi igjen bort trypsin/EDTA og tilsatte en tredje gang samme mengde enzym. Deretter inkuberte vi igjen i 2-3 minutter og slo forsiktig kanten av flasken mot benken, slik at cellene løsnet fra underlaget. Vi registrerte om de hadde løsnet ved mikroskopiering. For å inaktivere enzymet tilsatte vi trypsin inhibitor (1,3ml per T25 og 3ml per T75). Blandingen ble overført til et 15ml sentrifuge rør. Flasken ble i tillegg rensert med 5ml vaskemedium og overført til det samme 15ml sentrifugerøret.

Avslutningsvis sentrifugerte vi røret på 500xg i 5 min. I mellomtiden tok vi de ferdig coatede flaskene ut av inkubasjonsskapet, gelatin/fibronectin løsningen ble aspirert vekk og fullverdig medium tilsatt. Da røret med cellene var ferdig sentrifugert, aspirerte vi vekk løsningen uten å fjerne pelleten i bunnen. Pelleten resuspenderte vi i fullverdig medium og fordelte blandingen 1:2 eller 1:6 i de nye flaskene etter behov.

3.2.5 Nedfrysing av celler

Vaskemedium ble laget på forhånd. I tillegg ble frysemedium laget av 95% FBS/ 5% DMSO. Innholdet i en konfluent T75 flaske ble deretter frosset i et fryserør. For å få dette til fulgte vi stegene i splittingprotokollen. Fryserørene ble plassert i en Nalgene fryseboks med isopropanol og plassert i -80°C fryseren. Seks timer senere ble fryserørene overført til en tank med flytende nitrogen. Passagenummeret ble notert ned.

3.3 H₂O₂ dose respons forsøk av ikke transfekterte HL-1 celler

HL-1 cellene ble sådd ut på gelatin/fibronectin coatede 6-brønns plater med en tetthet på 5×10^5 celler/brønn. Cellene ble videre dyrket i et døgn til de nådde 90-95% konfluens. Deretter byttet vi til 1ml sultemedium i hver brønn. Sultemedium bestående av 93ml MEM medium, 5ml fetal bovine serum, 1ml L-Glutamine og 1ml penicillin/ streptomycin ble laget på forhånd. Etter 24 timer skiftet vi sultemedium igjen og tilsatte H₂O₂ i doser fra 100µM til 500µM i de ulike brønnene og inkuberte i fire timer. Etter å ha peilet oss inn på en antatt passende dose gjentok vi prosessen, men tilsatte 300µM H₂O₂ i tre brønner, samtidig som tre brønner ble benyttet som kontroller uten H₂O₂. Ut ifra dette kunne vi gjøre en uparret t-test.

Registreringen av celledød ble foretatt med flowcytometri av propidium iodide (PI) merkede celler. 1µg PI ble tilsatt 0,55ml løst PBS per brønn. Vi benyttet også en brønn uten PI som blank kontroll. Mediumet i brønnene ble pipettert over i 15ml falcon rør. Brønnene ble deretter trypsinert med 750µl Trypsin og inkubert ved 37°C i 4-5 minutter slik at cellene løsnet fra underlaget. Deretter tilsatte vi 750µl Trypsin inhibitor til brønnene og pipetterte cellene forsiktig over i de korresponderende 15ml falcon rør. Rørene ble sentrifugert på 250xg i 5 minutter. Supernatanten ble aspirert vekk og 500µl PI/PBS ble tilsatt hver prøve. Prøvene ble inkubert i romtemperatur, samt komplett mørke i 5 minutter, da PI er lyssensitivt. Til slutt vasket vi prøvene ved å sentrifugere de på 250xg i 5 minutter, for deretter å fjerne supernatanten og resuspendere i 500µl rent PBS.

300µM H₂O₂ ble benyttet videre i senere stimuleringsforsøk.

3.4 PcDNA 3,1 CA9 2,1 transfeksjon av HL-1 celler

3.4.1 Amaxa

Amaxa nucleofector ble i begynnelsen benyttet for transfeksjon. Protokollen var kortfattet og enkel, men det viste seg at transfeksjonen slet mer på cellene og førte til høy celledød.

Metoden ble derfor erstattet med lipofectamintransfeksjon.

3.4.2 Lipofectamin.

24 timer før transfeksjonen ble 5×10^5 celler per brønn sådd ut i en 6-brønnsplate. Burker chamber ble brukt til å estimere celleantallet i prøvene. 2 timer før transfeksjonen byttet vi fra fullverdig medium til 1ml transfeksjons medium. Cellene var på dette tidspunktet 90-95% konfluente. Transfeksjonsmediumet besto av 94ml claycomb medium, 5ml fetal bovine serum og 1ml L-Glutamine. 1,6 μ l pcDNA 3,1 CA9 2,1 ble løst i 100 μ l Opti-MEM. 4 μ l lipofectamin 2000 ble tilsatt 100 μ l Opti-MEM og inkubert i 5 minutter i romtemperatur. 100 μ l løst pcDNA ble deretter mikset med 100 μ l lipofectamin/Opti-MEM og inkubert i 20 minutter i romtemperatur. 200 μ l DNA/lipofectamin ble så overført til hver brønn og inkubert ved 37°C i fire timer. Etter fire timer ble transfeksjonsmediumet byttet tilbake til 2ml fullverdig medium og cellene inkubert videre i nye 24 timer. Etter 24 timer ble mediumet igjen byttet og cellene inkubert i 24 timer enda en gang. Den samme transfeksjonsprotokollen ble benyttet med EGFP og empty vector.

3.5 Dokumentasjon av transfeksjonsgrad ved hjelp av EGFP og Hoechst kjernefarging

Den samme transfeksjonsprotokollen som ble benyttet ved CA9 transfeksjon ble benyttet til å dokumentere transfeksjonsgraden. Eneste unntak var at pcDNA 3,1 CA9 2,1 ble byttet ut med DNA kodene for EGFP og det ble sådd ut 3×10^5 celler. Etter transfeksjonen ble grønt fluoriserende protein (GFP) detektert ved mikroskopiering med egnet filter. Før dette måtte vi imidlertid aspirere bort mediumet samt vaske brønnene med PBS. Deretter fikserte vi brønnene i 15 minutter med 3% PFA etterfulgt av to nye vask med PBS. Brønnene lot vi så lufttørke før vi tilsatte en dråpe prolong gold antifade med DAPI. Prolong gold antifade supprimerer lysblekningen og bevarer fluoresensen til GFP. DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) er en fluoriserende kjernefarging som ble overflødig da vi ikke hadde

mikroskopfilter til å detektere det. Derfor ble samtlige celler også farget med Hoechst kjernefarging. Dette ble gjort etter fikseringen ved å først permeabilisere med 0,1% TritonX i PBS i 5 minutter på is. Deretter vasket vi med PBS og 1:1000 Hoechst dye. Igjen lot vi brønnene lufttørke, før vi tilslutt vasket en siste gang med PBS/ Glyserol.

Vi mikroskopierte direkte på brønnplaten og fotograferte samme synsfelt med et filter for GFP og et annet filter for Hoechst. På denne måten kunne vi i etterkant legge bildene oppå hverandre i photoshop og kvantifisere hvor mange celler som produserte GFP i forhold til det totale antall celler.

3.6 Proteinekstraksjon og western blot

3.6.1 Transfeksjon

Fem brønner med HL-1 celler ble lipofectamin transfektert med pcDNA 3,1 CA9 2,1. Fem andre brønner ble lipofectamin transfektert med empty vector, et plasmid uten proteinkodende DNA. En enkelt brønn ble transfektert med EGFP og en siste brønn gjennomgikk lipofectamin transfeksjonsprotokollen uten å få tilsatt noe DNA. I alt var dette altså to 6-brønnsplater. Etter fullført transfeksjon ble EGFP brønnen mikroskopiert som en kontroll på vellykket transfeksjon.

3.6.2 Cellehøsting

RIPA- buffer ble laget etter følgende oppskrift: 500µl tris (ph 8), 100µl SDS, 1000µl triton NP40, 300µl 5M NaCl, 1000µl protease inhibitor (10x/ en halv tablett), 200µl 0,1M Na₃VO₄, 500µl diocycholat, 500µl 0,2M NaF og vann fylt opp til 10ml.

Det fullverdige mediumet i brønnene ble først aspirert bort. Deretter ble cellene vasket to ganger med PBS. Brønnplatene ble satt på is og cellene i hver enkelt brønn ble tilført 300µl RIPA-buffer og samtidig skrapet løs fra coatingen. Etter skrapingen ble cellene pipettert over i hvert sitt eppendorf rør med hettelås og deretter lagt i flytende nitrogen etter merking. Når prosessen var gjentatt for alle brønnene, ble prøvene overført fra flytende nitrogen til -80°C fryseren.

3.6.3 Proteinekstraksjon

Prøvene ble etter cellehøstingen hentet fra -80°C fryseren, tinet og knust med ultralydstav i 20 sekunder, før de ble sentrifugert på maks hastighet i 4°C i 5 minutter. Supernatanten med proteinekstrakt ble overført til nye merkede rør. Samtidig ble en liten fraksjon pipetert ut. Denne fraksjonen ble brukt til å måle proteinkonsentrasjonen ved hjelp av BCAssay, protein kvantifiserings kit fra Uptima. Avlesningen ble gjort spektrofotometrisk med bølgelengde 542nm og standardkurve.

For å denaturere proteinene tilsatte vi 5x laemmli sample buffer og varmet prøvene i 5 minutter i en "heat block". Til slutt lagret vi prøvene på -20°C.

3.6.4 Western blot

Vi benyttet ferdigstøpte Criterion geler til å separere proteinene. Proteinene ble kjørt på 100V i ca en time. Overføring til nitrocellulosemembran ble gjort etter protokoll fra BioRad. Membranen ble farget med 0,1% Ponceau S og bloket med 5% melk i Tris buffered saline (TBST) i en time. Deretter tilsatte vi CA9 antistoff og lot det stå over natten ved 4°C. Neste dag vasket vi tre ganger med TBST før vi tilsatte anti-kanin og heste pepperrot feroxidase og lot dette stå i en time ved romtemperatur. Til slutt vasket vi igjen tre ganger med TBST og tilsatte chemiluminiscence reagens. Bilder ble tatt på mørkerom med eksponeringstid på to sekunder. Båndene ble kvantifisert i forhold til proteinladning i dataprogrammet ImageQuant.

3.7 Flowcytometrisk måling av celledød etter H₂O₂ stimulering av HL-1 celler, transfektert med pcDNA 3,1 CA9 2,1, eller empty vector

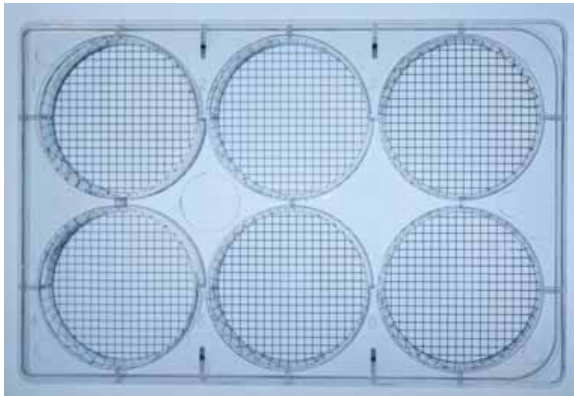
Celler ble dyrket som beskrevet tidligere. 3×10^5 celler ble sådd ut per brønn i en 6-brønnsplate. Tre brønner ble lipofektamintransfekttert med pcDNA 3,1 CA9 2,1. To brønner ble lipofektamintransfekttert med empty vector og den siste brønnen gjennomgikk transfeksjonsprotokollen uten å få tilsatt noe form for DNA. Brønnene ble stimulert med 300µM H₂O₂ etter samme protokoll som ved doseresponsforsøkene. Celledød ble målt ved hjelp av PI og flowcytometri etter samme protokoll som ved doseresponsforsøket.

3.8 Laktat dehydrogenase (LDH) måling av H₂O₂ stimulerte og transfekterte HL-1 celler

Cytotoxicity Detection Kit Plus (protokoll version december 2006) ble benyttet til å måle frisetting av LDH i medium fra supernatantene. Absorbansen ble avlest ved hjelp av en ELISA Reader.

3.8.1 LDH Forsøk 1:

Det ble sådd ut 5×10^5 celler per brønn i to 6- brønnsplater. To brønner i en tredje 6-brønnsplate ble også tilsatt like mye fullverdig medium uten celler. Disse to brønnene ble benyttet som lav kontroll. Brønnene ble lipofectamintransfektet og stimulert etter protokoll gjengitt tidligere. Innholdet i hver enkelt brønn er presentert i tabellform under.



| Brønnplate 1: | |
|---------------|--|
| Brønn 1 | CA9 pluss H ₂ O ₂ |
| Brønn 2 | CA9 pluss H ₂ O ₂ |
| Brønn 3 | CA9 pluss H ₂ O ₂ |
| Brønn 4 | Empty vector pluss H ₂ O ₂ |
| Brønn 5 | Empty vector pluss H ₂ O ₂ |
| Brønn 6 | Empty vector pluss Lysis |

| Brønnplate 2: | |
|---------------|--|
| Brønn 1 | CA9 pluss H ₂ O ₂ |
| Brønn 2 | CA9 minus H ₂ O ₂ |
| Brønn 3 | CA9 minus H ₂ O ₂ |
| Brønn 4 | Empty vector pluss H ₂ O ₂ |
| Brønn 5 | Lipofectamin u/DNA minus H ₂ O ₂ |
| Brønn 6 | Empty vector+ Lysis |

| Brønnplate 3: | |
|---------------|----------------------------|
| Brønn 1 | Medium u/celler minus H2O2 |
| Brønn 2 | Medium u/celler pluss H2O2 |
| Brønn 3 | Tom |
| Brønn 4 | Tom |
| Brønn 5 | Tom |
| Brønn 6 | Tom |

3.8.2 LDH Forsøk 2:

Det ble sådd ut 5×10^5 celler per brønn i fire 6- brønnsplater. Cellene ble transfektert og stimulert etter tidligere beskrevet protokoller. Innholdet i hver enkelt brønn er presentert i tabellform under.

| Brønnplate 1: | |
|---------------|-------------------------|
| Brønn 1 | CA9 pluss H2O2 |
| Brønn 2 | CA9 pluss H2O2 |
| Brønn 3 | CA9 pluss H2O2 |
| Brønn 4 | Empty vector pluss H2O2 |
| Brønn 5 | Empty vector pluss H2O2 |
| Brønn 6 | Empty vector minus H2O2 |

| Brønnplate 2: | |
|---------------|-------------------------------|
| Brønn 1 | CA9 pluss H2O2 |
| Brønn 2 | CA9 pluss H2O2 |
| Brønn 3 | CA9 minus H2O2 |
| Brønn 4 | Lipofectamin u/DNA pluss H2O2 |
| Brønn 5 | Lipofectamin u/DNA pluss H2O2 |
| Brønn 6 | Lipofectamin u/DNA minus H2O2 |

| Brønnplate 3: | |
|---------------|--------------------------------------|
| Brønn 1 | Ikke transfekterte celler minus H2O2 |
| Brønn 2 | Ikke transfekterte celler pluss H2O2 |
| Brønn 3 | Ikke transfekterte celler pluss H2O2 |
| Brønn 4 | Empty vector pluss H2O2 |
| Brønn 5 | Empty vector pluss H2O2 |
| Brønn 6 | Empty vector pluss H2O2 |

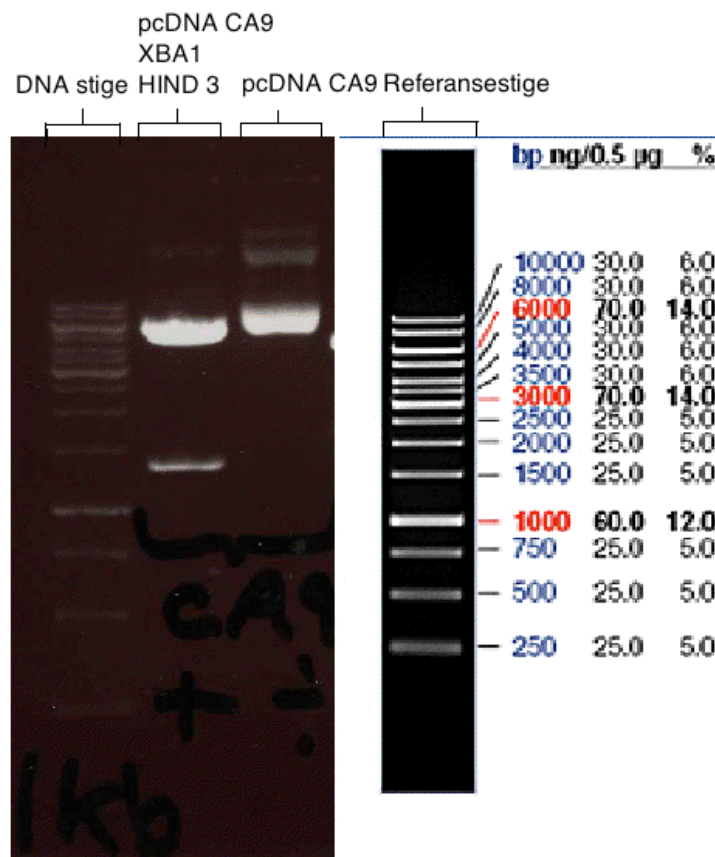
| Brønnplate 4: | |
|---------------|-------------------------|
| Brønn 1 | CA9 pluss H2O2 |
| Brønn 2 | CA9 pluss H2O2 |
| Brønn 3 | CA9 pluss Lysis |
| Brønn 4 | Empty vector pluss H2O2 |
| Brønn 5 | Empty vector pluss H2O2 |
| Brønn 6 | Empty vector pluss H2O2 |

4 Resultater

4.1 Samlede resultater oppsumert

pcDNA 3,1 CA9 2,1 ble vellykket fremstilt på egen labb. Dette DNA-et lot seg lipofectamintransfektore til HL-1 celler. Transfeksjonsgraden ble beregnet til å være 22% ved hoechst kjernefarging og EGFP transfeksjon. Etter transfeksjon ble det i neste omgang undersøkt om HL-1 cellene produserte CA9 protein. Western blot viste rikelig proteinproduksjon sammenliknet med empty vector. Om CA9 fører til redusert H₂O₂ induisert celledød sammenlignet med empty vector er fortsatt uvist. Dataene er inkonklusive. Forsøkene må gjentas og tilpasses.

4.2 PcDNA 3,1 CA9 2,1 fremstilt og identifisert



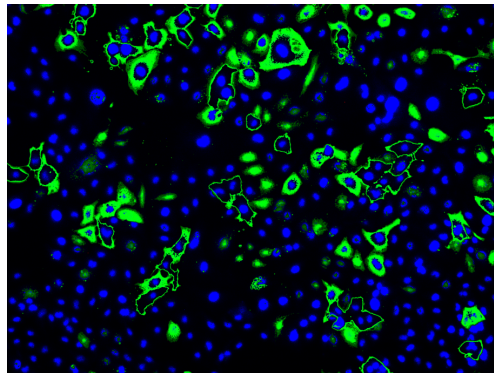
Figur 2: Southern blot, pcDNA 3,1 CA9 2,1.

pcDNA 3,1 CA9 2,1 er et 6677 bp langt konstrukt. Restriksjonsenzymet Hind3 kuttet DNA-et ved en AAGCTT sekvens etter 922bp. Restriksjonsenzymet Xba1 kuttet DNA-et etter en

TCTAGA sekvens etter 2169bp. Sekvensen mellom disse to kuttstedene er altså 1247bp langt og vi kunne forvente å finne et bånd i denne størrelsesorden ved southern blot. Dette ble også funnet svarende til det nederste båndet i andre rad fra venstre i bilde 2.

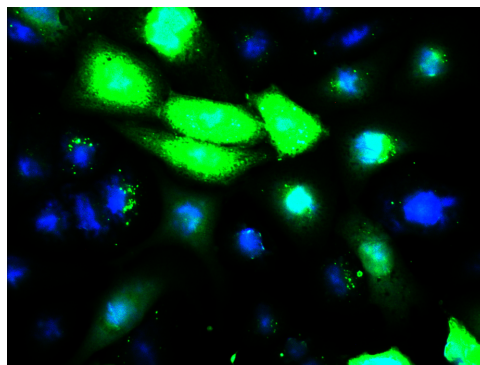
DNA konsentrasjonen ble målt til 1310ng/ul ved hjelp av Nanodrop.

4.3 EGFP lar seg lipofectamintransfektore til HL-1 celler, med en transfeksjonsgrad på 22%



Bilde 1: GFP og Hoechst evaluert ved mikroskopi (4x forstørrelse). Bildet er bearbeidet i photoshop for å tydeliggjøre den blå (hoechst) kjernen bak det grønne (GFP) cytoplasmaet.

965 cellekjerner ble manuelt telt i tre fotograferte synsfelt på 10x forstørrelse i tre forskjellige GFP transfekterte og Hoechst kjernefargede brønner. Av disse hadde 212 celler fluoriserende grønt cytoplasma. Dette gir en ratio på $212\text{celler} / 965\text{celler} = 22\%$. Tellingen er gjort på et mikroskopbilde tatt med Hoechstfilter og et annet mikroskopbilde av samme område tatt med GFP filter. Bildene er senere lagt oppe på hverandre i photoshop, men er ikke endret på annen måte.

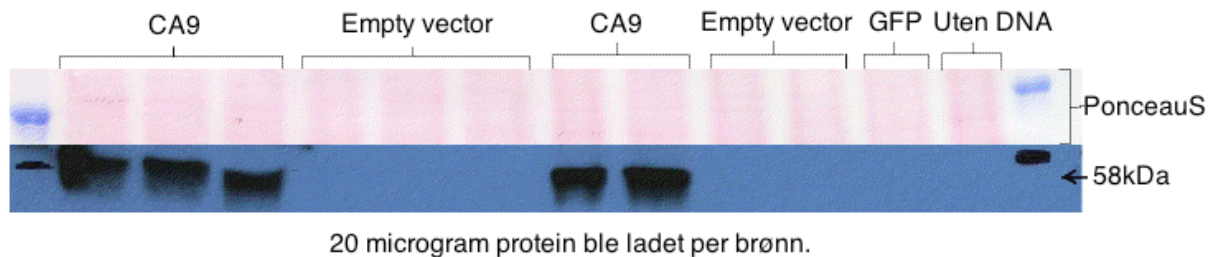


Bilde 2: GFP og Hoechst, 10x forstørrelse uten bearbeidelse i photoshop.

Ikke transfekterte brønner viste ingen tegn til GFP bakgrunnsstråling. Bilde av dette er utelatt av plassbesparende årsaker.

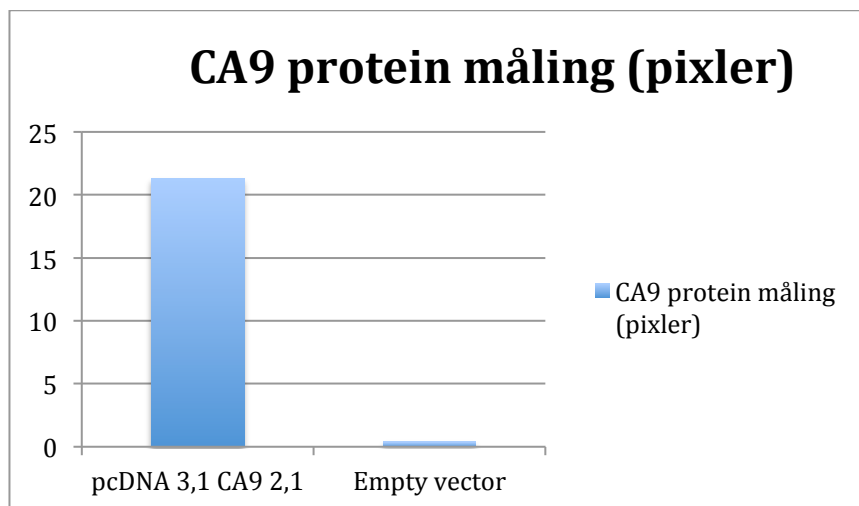
4.4 PcDNA 3,1 CA9 2,1 transfekterte HL-1 celler produserer karbonisk anhydrase 9 analysert med western blot

CA9 er et transmembrant protein på 58kDa. Et bånd i denne størrelsen ble detektert tilsvarende de brønner som var transfektert med pcDNA 3,1 CA9 2,1.



Figur 3: Western blot.

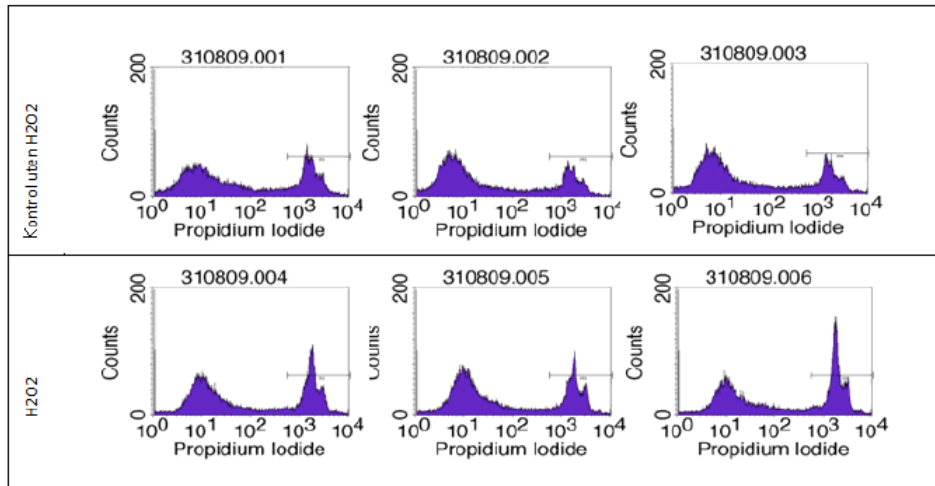
Proteinkonsentrasjonen i 58kDa- området, ble i etterkant målt i alle remser med ImageQuant. Gjennomsnittlig gav disse målingene en verdi på 21,3 pixler for de pcDNA 3,1 CA9 2,1 transfekterte brønnene, og gjennomsnittlig 0,4 pixler for de empty vector transfekterte brønnene. Dette gir 53 (21,3/0,4) ganger så høyt nivå av CA9 protein i de pcDNA 3,1 CA9 2,1 transfekterte brønnene.



Figur 4: ImageQuant proteinuttrykk.

4.5 300µM H₂O₂ induserer celledød i HL-1 celler evaluert med flowcytometri

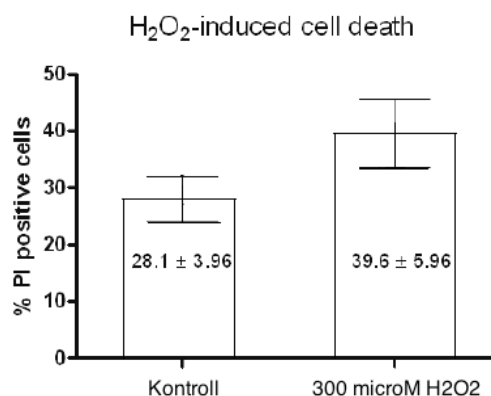
Propidium iodid (PI) tas opp i samtlige HL-1 celler, men lettere i celler med ødelagt cellemembran. PI vil dermed i høy grad tas opp i nekrotiske celler og kan benyttes som et indirekte mål på celledød. Samtidig er PI egnet til registrering ved hjelp av flowcytometri.



Figur 5: HL-1 celledød evaluert med flowcytometri. Over midtstreken ses tre ustimulerte brønner. Under midtstreken ses tre H₂O₂ stimulerede brønner.

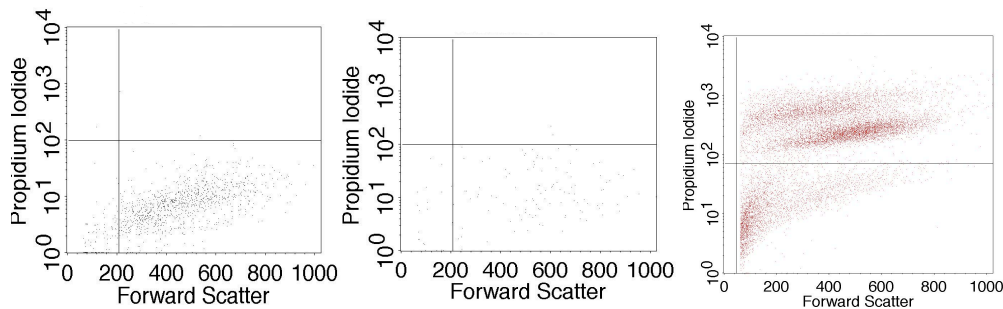
Y-aksen viser antall telte celler og X-aksen hvor mye PI disse cellene har tatt opp. I alle brønnene, både de ustimulerte og de H₂O₂ stimulerede, ble det et bifasisk mønster. Toppen til venstre, med celler hvor PI opptaket har vært lavt, kan betraktes som levende celler. Toppen til høyre kan derimot betraktes som nekrotiske celler, eller celler som er i ferd med å gå inn i en nekrotisk prosess.

Andelen nekrotiske celler, i % av totalt antall celler, viste seg å være statistisk signifikant høyere ($p < 0,05$) i brønnene som hadde blitt stimulerede med H₂O₂ i forhold til de ustimulerte brønnene. Det ble satt en lik grense i alle brønnene for hvilket PI nivå som skulle utgjøre grensehverdien for å betrakte en celle som død eller levende. Merk at x-aksen er en logaritmisk skala.



I alle de pcDNA 3,1 CA9 2,1 transfekterte brønnene, var det vesentlig mye større produksjon av CA9 protein, enn i empty vector brønnene.

4.6 Lavt antall telte transfekterte og H₂O₂ stimulerte HL-1 celler, evaluert med flowcytometri

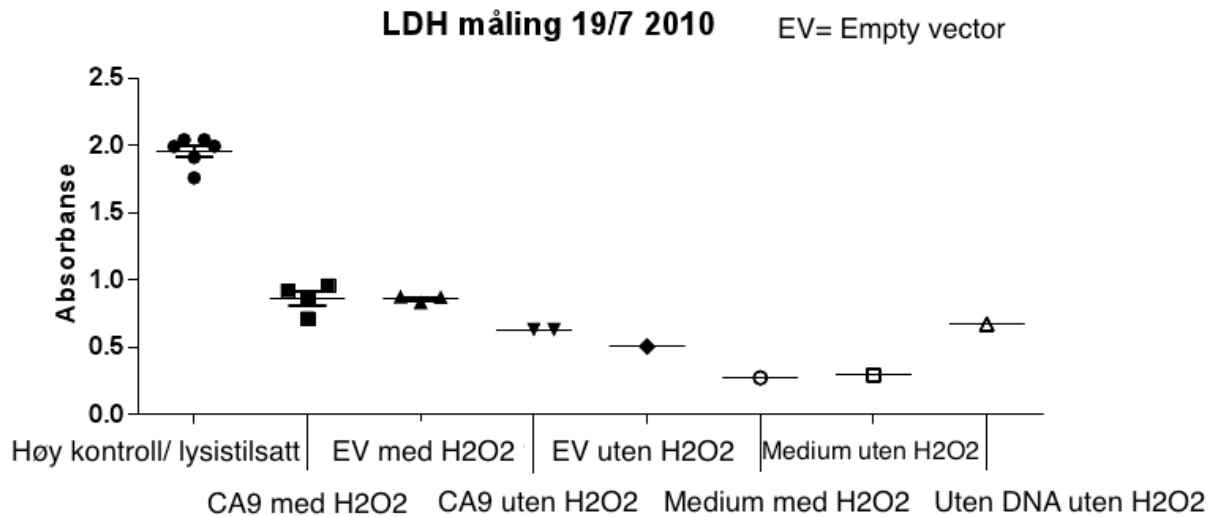


Den første figuren viser brønnen som gjennomgikk transfeksjonsprotokollen uten å få tilført noe form for DNA. Svært få av de 3×10^5 utsådde HL-1 cellene ble registrert ved flowcytometri. Enda færre tellinger ble registrert hos cellene som hadde fått tilført pcDNA 3,1 CA9 2,1 og empty vector. Den midtre figuren viser hvordan tellingen i disse gruppene så ut og bare sporadiske tellinger er synlige. Den siste figuren er til sammenlikning tatt fra et tidligere doseresponsforsøk (ikke H₂O₂ men LPS). Her er det vesentlig mye høyere antall registrerte celler, samt et markant skille mellom cellene med høyt og lavt PI opptak. Dette ble derfor totalt mislykkede forsøk.

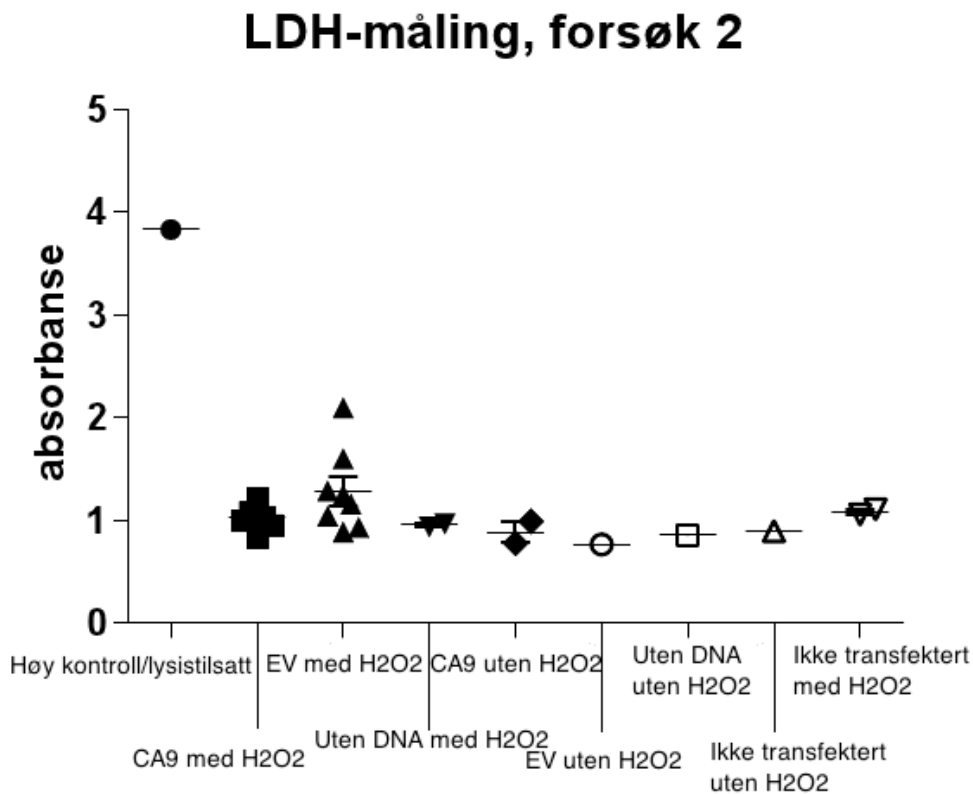
4.7 Ingen registrert forskjell i H₂O₂ induisert celledød, mellom pcDNA 3,1 CA9 2,1 transfekterte HL-1 celler og empty vector transfekterte HL-1 celler

4.7.1 Resultat LDH forsøk 1

For få datapunkter ble samlet for å kunne påvise statistisk signifikante forskjeller mellom de ulike gruppene. Den høye kontrollen er målinger fra brønnen som har fått tilført lysis. Lysis dreper samtlige celler og denne gruppen representerer det høyeste mulige LDH- nivået i mediumet. De to medium brønnene uten celler, representerer det lavest mulige LDH-nivået. Uten å trekke konklusjoner på grunn av manglende mengde data, kan vi allikevel se antydninger som gjør at forsøkene bør gjøres flere ganger.



4.7.2 Resultat LDH forsøk 2:



Igjen er det for få datapunkter for å kunne påvise statistisk signifikante forskjeller mellom de ulike gruppene. Samtidig er også den lave kontrollen utelatt hvilket er en stor svakhet.

5 Diskusjon

Selv om hovedmålet ikke er nådd innen tidsrammen for prosjektoppgaven, genererer prosjektet nye interessante problemstillinger som bør undersøkes videre.

Ved DNA fremstilling og identifisering ble det benyttet etablerte metoder, og resultatene svarte til på forhånd oppgitte verdier. Dette ble igjen støttet av en western blot hvor pcDNA 3,1 CA9 2,1 transfekterte HL-1 celler produserte CA9 protein av forventet størrelse (58kDa) og ca 50 ganger forhøyet. Empty vector transfekterte HL-1 celler ble benyttet som kontroll på at ikke alle HL-1 celler produserer CA9 i like store kvanta. Vi kan dermed konkludere med at fremstilling og transfeksjon med DNA kodende for CA9 førte til en oppregulering av CA9 protein i cellene.

Selv om vi på bakgrunn av disse resultater vet at det produseres CA9, vet vi ikke om produksjonen foregår jevnt over i alle celler, eller om det bare er noen få transfekterte celler som står for produksjonen. Derfor transfekterte vi HL-1 cellene med EGFP, samt visualiserte de HL1 cellene vi ikke lyktes med å transfektere med Hoechst kjernefarging og kom fram til ca 22% av cellene. Transfeksjonsgraden gir oss ytterligere informasjon om hvor stor andel av cellene som produserer protein. Fordi CA9 er et transmembrant protein og utøver sin effekt i cellemembranen til hver enkelt celle, er dette sentral informasjon for senere H₂O₂ stimuleringsforsøk. Med en lav transfeksjonsgrad vil eventuelle forskjeller mellom pcDNA 3,1 CA9 2,1 transfekterte HL-1 celler og empty vector transfekterte HL-1 celler, etter H₂O₂ induisert celledød komme dårligere frem. Å benytte EGFP som metode for visualisering av transfeksjonsgrad er en etablert og akseptert metode.

Transfeksjonsgraden er i vårt tilfelle lavere enn ønsket. Ved å tilpasse protokollen er det mulig å øke transfeksjonsgraden. Lonza har nylig kommet med en optimalisert transfeksjonsprotokoll for kardiomyocytter, hvor de hevder å ha oppnådd en transfeksjonsgrad på ca 40% ved hjelp av Amaxa Nucleofector.

Ved selve stimuleringsforsøkene er det mange svakheter å peke på. Hvorfor det registrerte celledødet ved flowcytometrisk PI registrering er så lavt i H₂O₂ stimuleringsforsøkene av transfekterte celler er usikkert. Med tanke på at samme registreringsprotokoll har blitt fulgt som ved det vellykkede H₂O₂ dose respons forsøket kan forskjellen ligge i at det her er snakk om transfekterte celler. En kontroll med ikke transfekterte celler bør benyttes ved gjentakelse.

Andre feil kan heller ikke utelukkes da flow cytometri er krevende å lære seg. På grunn av tekniske utfordringer med flow cytometri gikk vi over til LDH måling.

LDH forsøkene må også gjentas. En gjennomgang av hvilke kontroller som bør være med er relevant. Tallene er ikke regnet om fra absorbanse nivå til celledød i prosent av maksimal celledød. Dette gjør det mindre oversiktlig. Samtidig kunne det vært gjort i LDH forsøk 1, men er umulig i forsøk 2 på grunn av manglende lav kontroll.

Selv om vi ikke har fått svar på om en oppregulering av CA9 vil virke kardioprotektivt på HL-1 cellene, har vi avdekket en del viktige elementer på veien mot dette mål.

6 Kildehenvisninger

1. Yellon D.M, Hausenloy D.J. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. September 13, 2007; 357:1121-1135.
2. Czibik G. Mending the broken heart; the emerging concept of remote genetic cardioprotection by hypoxia-inducible factor 1 alpha. Avhandling. Dept of Physiology, IMB, University of Oslo. ISBN 978-82-8072-283-6. 2008.
3. Boron W.F, Boulpaep E.L. *Medical Physiology – A Cellular and Molecular Approach*. Updated edition. ISBN 1-4160-2328-3. 2005. Page 637
4. Holotnakova T, Ziegelhoffer A, Ohradanova A, Hulikova A, Novakova M, Kopacek J, Pastorek J, Pastorekova S. Induction of carbonic anhydrase 9 by hypoxia and chemical disruption of oxygen sensing in rat fibroblasts and cardiomyocytes. *Pflugers Arch*. May 2008;456(2):323-37. Epub 2007 Dec 11.
5. White S.M, Constantin P.E, Claycomb W.C. Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function. *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology*. 2004 Mar;286(3):H823-9.