



UIT

NORGES
ARKTISKE
UNIVERSITET

INSTITUTT FOR FARMASI

Etablering av et system for å studere funksjonelle konsekvenser av kreftspesifikke DDR2 mutasjoner

Mahmoud Basel Aburayya

Masteroppgave i farmasi

Mai 2014



FORORD

Denne masteroppgaven markerer slutten av toårige Master i Farmasi ved universitet i Tromsø (UiT). Arbeidet med denne oppgaven ble utført ved farmakologi avdeling ved instituttet for farmasi ved UiT.

Jeg vil med dette benytte anledning til å takke min veileder professor Ole Morten Seternes for god veiledning, motivasjon og inspirasjon underveis i arbeidet. Det har vært lærerikt å ha deg som veileder.

Jeg vil også takke Bjarne Herold Johansen for all opplæring på cellelaben, og for at du tok tid til å høre på mine resultater. Takk til Espen Åberg for dine mange gode innspill og ideer.

Takk til Thomas Clemens Jensen for din innføring i Gateway systemet. En takk går også til Hanne Kidalsen for din hjelp og omtenksomhet. Jeg vil også takke min medstudent Gurjit Kaur for det sosiale og for alle de nyttige tipsene jeg har fått av deg.

Jeg vil også benytte dette til å takke min far, du har vært en viktig støttende rådgiver i mine vanskelige situasjoner. Til min kjære mor; jeg er uendelig takknemlig for dine bønner som jeg hører i dine daglige telefonsamtaler.

Takk til min kjære kone Mariam for din tålmodighet og forståelse for mitt fravær. Til min datter Ranim, du er min glede! Å se deg smile til meg er ubeskrivelig.

Tromsø, mai 2014

Mahmoud Aburayya

SAMMENDRAG

Discoidin domene reseptor 2 (DDR2) er en unik reseptor tyrosinkinase (RTK) som aktiveres av ulike typer kollagen. DDR2 er involvert i regulering av celledifferensiering, remodelering av ekstracellulær matriks, cellemigrasjon, og celleproliferasjon. Nye studier viser at DDR2 er mutert i flere kreftformer, og spesielt lungekreft. Konsekvensen av disse kreftspesifikke mutasjoner er i midlertidig ikke kjent. Hensikten med denne oppgaven er å etablere et system som gjør det mulig å studere de funksjonelle konsekvensene av DDR2 mutasjonene i enkle cellemodeller. Setedirigert mutagenese ble benyttet for å generere mutanter av DDR2 som sammen med cDNA for villtype DDR2 ble klonet i ekspresjonsvektorer med N-terminal EGFP og Myc tagg. Vellykket transfeksjon og uttrykk av DDR2 i HEK 293T ble kun observert med N-terminal EGFP DDR2 tag. Stimulering med kollagen type I ble brukt for aktivering av overuttrykt DDR2 i HEK293 celler. Vi var ikke i stand til å detektere kollagen industert autofosforylering av DDR2 i løpet av denne oppgaven. Flere ulike faktorer som kan ha medført mangel på DDR2 autofosforylering i våre eksperimenter ble undersøkt. Disse inkluderer serumsulting av celler dagen før stimulering med kollagen I, immunopresipitering før westernblotanalyse, ulike epitoptagger av DDR2 (C-terminal Myc, C-terminal EGFP, C-terminal FLAG, og C-terminal Cherry), ulike transfeksjonsmetoder og testing av antistoff effektivitet.

FORKORTELSER

AIP	Alkalin fosfatase
ATCC	American tissue and celle culture collection
bHLH	Basic helix-loop-helix
cDNA	Komplementær DNA
DC	Dendritiske celler
ddNMP	Dideoxynukelotidmonofosfat
DDR2	Discoidin domain receptor 2
DFG	Aspartat-fenylalanin-glysin motivet
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DS	Discoidin
ECM	Ekstracellulær matriks
EGF	Epidermal vekstfaktor
EGFP	Enhanced green Fluorescent protein
EGFR	Epidermal vekstfaktorreseptor
EMT	Epitel mesenkymal transisjon
ERK	Ekstracellulær reseptor kinase
FBS	Føtalt Bovint Serum
GAG	Glycosaminoglykan
GSK3β	Glycogen synthase kinase 3 beta
HEK293T	Human Embryonic Kidney 293 celler
HNSCC	Hode og hals squamous cell carcinoma
HSC	Hepatiske stellatceller
IL-6	Interleukin-6
IP	Immunopresipitering
JM	Juxtamembran
kDa	Kilo dalton
LH1	Lysylhydroksylase
LOX	Lysyloksidase
MAP	Mitogen aktivert protein
MiRNA	Mikro ribonukleinsyre
MMP	Matriks metallproteinase
MQ	Destillert MilliQ vann

MSC	Mesenkymale stamceller
MT-MMP	Membran bundet matriks metallproteinase
NPC	Nasopharyngeal carcinoma
NSCLC	Non-Small Cell Lung Carcinoma
OCN	Osteocalcin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGFR	Platederivert vekstfaktorreseptor
Rpm	Omdreining per minutt
RTK	Reseptor tyrosin kinase
SDS	Natrium dodekyl sulfat
SiRNA	Små interfererende ribonukleinsyre
SPARC	Sekrert Protein Acidic og Rikt i Cystein
SV40	Simian Virus 40
TBS-T	Tris bufferet salt med Tween 20
TGFβ	Transforming growth factor β
TM	Transmembran
Wt	Villtype

INNHold

FORORD	ii
SAMMENDRAG	iii
FORKORTELSER	iv
INNHold	vi
1.Introduksjon	1
DDR2 STRUKTUR	2
DDR2 KOLLAGEN BINDING OG AKTIVERINGSMEKANISME	3
DDR2 SIGNALERING	4
DDR2 UTTRYKK	6
DDR2 FUNKSJON I NORMALE CELLER	6
Skjelett	7
Fibrose, inflammasjon og immunsystemet.....	7
Proliferasjon	8
Migrasjon	9
Differensiering.....	10
ECM remodelering	10
DDR2 OG KREFT	11
Proliferasjon og tumor vekst.....	11
Tumor migrasjon og invasjon.....	12
EMT OG METASTASERING	13
DDR2 uttrykk og mutasjoner i kreft.....	15
MÅLET MED OPPGAVEN	17
2.MATERIALER OG METODE	18
MATERIALER	18
Kjemikalier	18
KITS.....	21
Bakterie	21
Cellelinjer.....	21
Vektorer og plasmider.....	21
Antistoffer.....	22
Instrumenter og maskiner.....	22
METODER	23
Konstruksjon av ekspresjonsvektorer.....	23
Opprensning av plasmider (Miniprep)	24
Restriksjonsanalyse.....	24
Opprensning av plasmider (Midiprep).....	25
Mutagenese	25
Sekvensering	27
Dyrkning og splitting av celler	28
Telling og så ut celler	29
Transfeksjon med kalsiumfosfat.....	29
Transfeksjon med kationiske lipid reagenser	30
Stimulering med kollagen I	31
Høsting av celler.....	32
Westernblot.....	32

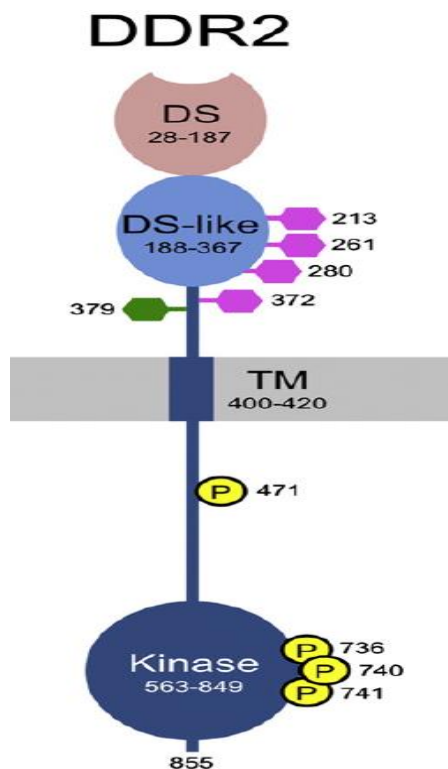
Immunopresipitering.....	33
3.RESULTATER.....	36
Konstruksjon av ekspresjonsvektorer.....	36
Setespesifikk mutagenese av DDR2 villtype	37
HEK293T celler uttrykte EGFP tagget DDR2 villtype og ulike mutanter, men ikke myc tagget DDR2.....	38
Stimulering av DDR2 med kollagen type I	40
Undersøker om serum sulting av celler har effekt på stimulering	42
Forsøk med immunopresipitering	43
Forsøk med c-terminalt tagget DDR2	44
Forsøker å uttrykke DDR2 WT-Flag med ulike transfeksjonsmetoder	46
DDR2 T226A-EGFP uttrykkes i HEK293 celler	48
Stimulering av DDR2 WT-EGFP og DDR2 T226A-EGFP transfektert i HEK 293T celler	49
Transfeksjon med c-terminal myc-tagget DDR2 villtype.....	50
Testing av 4G10 antistoff	51
4.DISKUSJON.....	53
Konstruksjon av DDR2 mutanter.....	53
Konstruksjon av ekspresjonsvektorer.....	53
Ekspresjon av EGFP-DDR2 wt og Myc-DDR2 wt.....	54
Stimulering av DDR2 med kollagen type I.....	55
DDR2 som behandlingsmål i persontilpasset kreftmedisin.....	59
5.KONKLUSJON	60
6.Referanseliste	61
7.Vedlegg	67
Vedlegg 1	67
Vedlegg 2	68
Vedlegg 3	69
Vedlegg 4.....	70
Vedlegg 5.....	71

1. Introduksjon

Celler har reseptorer på overflaten som mottar forskjellige typer signaler fra omgivelsene. Biologisk informasjon overføres fra utsiden til innsiden av cellen ved hjelp av disse reseptorene og via intracellulær signaloverføring. Kreft kan ses på som en sykdom som skyldes feil i kommunikasjon mellom celler og signaloverføring inne i cellene (Klein, McCormick et al. 2005). Kreftceller har ofte mutasjoner i gener som koder for proteiner som er involvert i prosesser som differensiering, vekst og utvikling (Blume-Jensen and Hunter 2001). Noen typer proteiner involvert i signaltransduksjon er mer utsatte for mutasjoner enn andre. Proteinkinaser er en type enzymer som ofte er muterte i kreftcelle. Disse enzymene er involvert i mange cellulære prosesser som kan bidra til utvikling av kreft. Dette er grunnen til at proteinkinaser er populære målproteiner for utvikling av nye legemidler mot kreft (Futreal, Wooster et al. 2005). De fleste av disse legemidlene er rettet mot en undergruppe av proteinkinaser kalt reseptortyrosinkinaser (RTK). Reseptortyrosinkinaser katalyserer overføring av fosfat fra ATP til hydroksylgrupper på tyrosiner i målproteinene (Lemmon and Schlessinger 2010). I de fleste RTK er det vekstfaktorer som er ligander for aktivering. Det finnes 58 typer reseptortyrosinkinaser fordelt på 20 underfamilier, blant disse er de best studerte epidermal vekstfaktorreseptor (EGFR) og platederivert vekstfaktorreseptor (PDGFR) (Gschwind, Fischer et al. 2004). En annen type RTK er discoidin domain reseptor kinase (DDR). Discoidin domene reseptor (DDR) er en familie reseptor tyrosinkinase som består av to typer reseptorer, DDR1 og DDR2 og ble først identifisert tidlig på 1990 tallet i brystkreft celler (Johnson, Edman et al. 1993). I det følgende fokuseres det på DDR2.

DDR2 STRUKTUR

I likhet med andre RTK består DDR2 av et ekstracellulært domene, en transmembran region og et intracellulært domene som inneholder en tyrosinkinase. Hovedkjennetegnet av DDR reseptor familien er en discodin (DS) domene som ligger i den ekstracellulære regionen og en lang cytosolisk juxtamembran (JM) region som binder transmembran (TM) region med tyrosinkinase domenet (Figur 1). Det ekstracellulære domenet består av et N-terminalt DS domene (ca.160 aminosyrer) som inneholder bindingssetet for kollagen, etterfulgt av DS-liknende domene (ca.180 aminosyrer) og en ekstracellulært JM region (ca.32 aminosyrer) som begge inneholder flere N-glykosylerte seter. Etter en kort transmembran region (ca. 20 aminosyrer) kommer det et stort cytosolisk JM domene (ca.142 aminosyrer) og et tyrosinkinase domenet med en kort C-terminal hale (Carafoli and Hohenester 2013). DDR2 inneholder 14 tyrosin aminosyrer, 4 i JM region og 10 i kinasedomenet. I tillegg er det vist at DDR2 utsettes for posttranslasjonelle modifikasjoner i form av N-glykosylering (figur 1) (Phan, Wong et al. 2013).



Figur 1: Skjematisk presentasjon av human DDR2 membranreseptor. Følgende domener er vist i figuren, discodin (DS) domene, DS-liknende domene, transmembran region (TM), og tyrosin kinase domene. Cellemembranen er presentert som et grått felt. Teoretiske N- og O-glykosylering seter er presentert som henholdsvis blå og grønn heksagoner. Fosforyleringssteder er vist. Figuren er modifisert fra (Carafoli and Hohenester 2013)

DDR2 KOLLAGEN BINDING OG AKTIVERINGSMEKANISME

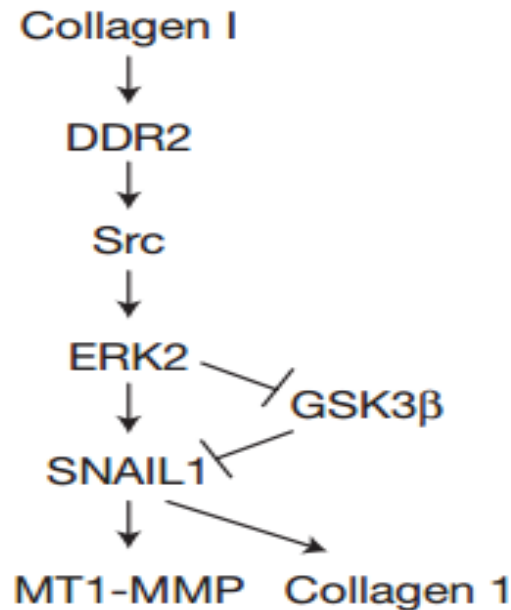
I motsetning til typiske RTK som aktiveres av løselige peptidlignende vekstfaktorer (For eksempel EGF og EGF reseptor), blir DDR2 aktivert av et ekstracellulært matriks protein, kollagen. Medlemmer av DDR familien har forskjellige spesifisitet til ulike typer kollagen. Både DDR1 og DDR2 aktiveres av kollagen type I, II og III. Kollagen type X og IV bindes i henholdsvis til kun DDR2 og DDR1. Kollagen må være i en tett trippelhelix struktur for å kunne aktivere reseptorer av DDR familien. Varme-denaturert kollagen (gelatin) er ikke i stand til å aktivere DDR familien (Carafoli and Hohenester 2013). DDR2 gjenkjenner en spesifikk aminosyre sekvens i kollagen GVMGFO (O er hydroksyprolin), et motiv som finnes fibrillære kollagener I-III (Konitsiotis, Raynal et al. 2008, Xu, Raynal et al. 2011).

I likhet med andre RTK undergår DDR2 en reseptor autofosforylering som følge av ligandbinding, men i DDR2 er aktivering langsommere og varer lengere enn typiske RTK som EGFR og PDGFR (Shrivastava, Radziejewski et al. 1997, Vogel, Gish et al. 1997). Den molekylære mekanismen bak den langsomme aktiveringskinetikken er fortsatt ukjent (Valiathan, Marco et al. 2012) (Leitinger 2014). Mihai og medarbeidere har foreslått en modell for reseptoraktivering som kan forklare den langsomme aktiveringen av DDR reseptorene. Når DDR1 stimuleres med kollagen, fører dette til en rask aggregering av reseptoren, etterfulgt av reseptor internalisering ved endocytose. Internalisert reseptor resirkuleres til cellemembranen med en tidsramme som tilsvarer tiden for reseptor aktivering. Selv om modellen forklarer den langsomme aktiveringskinetikken til DDR1, er det ikke mekanismen som induserer og regulerer endocytose og reseptor redistribusjon bevist (Mihai, Chotani et al. 2009). Det er heller ikke kjent om samme mekanisme gjelder for DDR2. En annen aktuell problemstilling relatert til aktivering av DDR2, er hvordan ligand binding fører til autofosforylering av DDR2 kinasedomenet. Dimerisering anses som hovedmekanisme for reseptor aktivering av tyrosinkinaser. Når liganden bindes til reseptoren, fører dette til at to reseptormolekyler danner ett par, en dimer, dette kalles ligandindusert dimerisering. Det fins også eksempler på reseptorer som dimeriserer uavhengig av ligand binding, dette kalles reseptorindusert dimerisering. Uavhengig av om den inaktive tilstanden av reseptoren foreligger i monomer form eller i dimer form, krever aktivering av reseptor fortsatt ligand binding for å kunne stabilisere spesifikke interaksjoner mellom reseptor molekyler, som igjen vil føre til konformasjonelle endring i dimeren som favoriserer fosforylering av tyrosiner i kinase- og JM- domenene (Lemmon and Schlessinger 2010).

Flere observasjoner tyder på at DDR2 foreligger i dimerform før stimulering med kollagen (Leitinger 2003, Noordeen, Carafoli et al. 2006, Mihai, Chotani et al. 2009). DDR2 dimer dannes mest sannsynlig under biosyntese, og eksisterer i dimerform i cellemembranen (Leitinger 2014). Leitinger fant at discoidin domene 1 er nødvendig for dimerisering av DDR1, samt at dimerisering av denne domene er en forutsetning for kollagen binding til både DDR1 og DDR2 (Leitinger 2003). I tillegg viser studiene at TM regionen har mest betydning for dimerisering av DDR1 (Noordeen, Carafoli et al. 2006). Det er vist at TM region i DDR1 har sterk potensial for selv-assosiering pga. tilstedeværelse av en leucinzipper domene (Noordeen, Carafoli et al. 2006). Aktivisering av DDR1 krever spesifikke interaksjoner mellom leucinzipper domene (Noordeen, Carafoli et al. 2006, Carafoli and Hohenester 2013). Sekvenslikheten av TM mellom DDR1 og DDR2 er 87 %. DDR2 har en leucinezipper-lignende motiv i likhet med DDR1, noe som tyder på at TM region også kan være involvert i dimerisering av DDR2. Kim og medarbeidere har vist at intracellulær JM domene er viktig for kollagen induert DDR2 aktivisering. I tillegg vises at JM2 region av intracellulær JM domene (aminosyrer 459-517) er involvert sammen med TM region i reseptor dimerisering (Kim, Ko et al. 2014).

DDR2 SIGNALERING

Den nedstrømsignalveien aktivert av DDR2 er ikke helt kartlagt ennå (Valiathan, Marco et al. 2012, Fu, Valiathan et al. 2013). En ny studie foreslår at signalveien fra kollagen aktivert DDR2 induserer stabilisering av transkripsjonsfaktoren SNAIL-1, samt MT1-MMP frigjøring og kollagen I produksjon (Zhang, Corsa et al. 2013). I denne settingen blir først DDR2 aktivert ved kollagen I binding. DDR2 aktivisering fører til aktivisering av den intracellulære kinasen Src, som igjen medierer aktivering av ERK2. Fosforylert ERK2 binder direkte med og fosforylerer SNAIL1 på serinene 82 og 104 som øker stabiliteten av SNAIL1. I tillegg hemmer aktivert ERK2 også GSK3 β aktivitet, som normalt induserer destabiliserende fosforylering av SNAIL1 og sammen fører dette til økt nivå av SNAIL1 i DDR2 aktiverte celler. Et høyt nivå av aktivt SNAIL1 opprettholder produksjon av MT1-MMP og kollagen syntese. Denne DDR2 signalering er mest relevant i kreftvev både fordi den er oppdaget i kreftceller og SNAIL1 induksjon oppstår kun under EMT (Zhang, Corsa et al. 2013). Å kartlegge signalveiene koblet til DDR har vist å være en utfordrende oppgave av flere grunner. 1) DDR aktiveres av flere typer kollagen, og dermed kan forskjellige typer kollagener initiere forskjellige typer signaler. 2) kollagener bindes til andre reseptorer enn



Figur 2: Foreslått signalvei fra kollagen aktivert DDR2 til SNAIL1 stabilisering. Kollagenstimulert DDR2 fører til ERK2 aktivering via Src. ERK2 stimulering fører til SNAIL1 stabilisering via direkte fosforylering og hemming av GSK3 β . SNAIL1 opprettholder produksjon av MT1-MMP og kollagen I syntese.

DDR2 (for eksempel til integriner). Det er vist at kollagen industert DDR1 aktivering gir enten synergiske eller antagonistiske signaler i forhold til disse mediert av integriner.

3) DDR signalering er avhengig av celle/vev type og miljøet rundt dem. 4) DDR signalering skjer i lag med andre signaleringsreseptorer, f.eks. Wnt5a/Frizzled og Notch1 reseptorer i DDR1 tilfelle, og insulin reseptor i DDR2 sitt tilfelle. 5) mutasjoner i DDR1 og DDR2 kan påvirke signalveier initiert av disse reseptorene.

I motsetning til DDR2, er flere signaleringsproteiner blitt identifisert som nedstrømsignaler for DDR1, inkludert Src/Shc, Nck1/2, Stat5a/b, og shp-2. Stimulering av DDR1 med kollagen er knyttet til aktivering av både PI3K/Akt og Ras/ERK MAPK kaskadene (Fu, Valiathan et al. 2013). I DDR2 sitt tilfelle, er det vist at Src kan være viktig for initialt signalering etter aktivering av reseptoren. Src er også nødvendig for optimalt autofosforylering av DDR2 (Ikeda, Wang et al. 2002) (Yang, Kim et al. 2005). COS7 celler transfektert med dominant negativ Src viser mangel på DDR2 fosforylering etter reseptoraktivering. I overenstemmelse med dette viser celler transfektert med konstant aktiv Src økt DDR2 fosforylering (Ikeda, Wang et al. 2002). Mer detaljerte studier av DDR2 fosforylering viser at Src fosforylerer tyrosinene Y-736, Y-740 og Y741. Denne Src- avhengige fosforyleringen etterfølges av DDR2 autofosforylering av resterende tyrosiner (Yang, Kim et al. 2005). Fosforylering av

tyrosiner i JM region tiltrekker til seg adapter proteiner som Shc1 og Nck2, fosfataser som SHP-2, og transkripsjons faktorer i STAT familien (Carafoli and Hohenester 2013).

Fosfoproteomikk analyser har identifisert over 45 proteiner som kan være nedstrøms proteiner for DDR2 uavhengig av integrin, og disse inkluderer SHP-2, SHIP2, PIK3C2A, ERK1, og PLCL2 (Iwai, Luczynski et al. 2014).

DDR2 regulerer transaktivitet av Runx2, en transkripsjonsfaktor involvert i skjelettutvikling, gjennom aktivering av ERK1/2 modulerer fosforyleringsnivået til Runx2 (Zhang, Su et al. 2011). En ny studie har vist at DDR2 aktivering av kollagen fører til oppregulering av lysyloksidase nivå i både primære ikke-differensierte og i differensierte mus og rotte celler. Lysyloksidase er et enzym som stabiliserer kollagen fibriller ved å katalysere oksidativ deaminering av lysin eller hydroksylsin aminosyrer i kollagen telopeptid regioner, noe som fører til dannelse av peptidyl aldehyder, som igjen danner intra- og intermolekulære kryssbindinger mellom kollagen molekylar (Khosravi, Sodek et al. 2014).

DDR2 ser også til å være involvert i induksjon av interleukinene, IL-12, og IL-6. Induksjon av IL-6 som følge av kollagen II binding til DDR2 involverer følgende signaleringsproteiner MAP kinasene p38, JNK, ERK1/2 og transkripsjonsfaktoren NFκB (Klatt, Zech et al. 2009, Poudel, Ki et al. 2013). Det er også vist at DDR2 øker uttrykket av DDR1 via en Jak2-Erk1/2 mediert mekanisme i primære human lungfibroblaster (Ruiz and Jarai 2011).

DDR2 UTTRYKK

DDR2 uttrykkes i ulike typer vev og organer. DDR2 mRNA er høyt uttrykt i skjelett, muskel, nyrer, lunger og nervesystemet. DDR2 uttrykkes også i celler involvert i immunforsvaret. Det er ulikt uttrykk av de to DDR proteinene i ulike typer celler/vev. Mens DDR1 uttrykk er høyest i epitelceller, uttrykkes DDR2 i hovedsakelig i bindevevet. Det fins i midlertidig ingen detaljerte eller systematiske analyser av cellulær distribusjon av DDR proteinene i forskjellige vevstyper (Leitinger 2014).

DDR2 FUNKSJON I NORMALE CELLER

DDR2 er involvert i regulering av celledifferensiering, remodelering av ekstracellulær matriks, celle migrasjon, adhesjon- og celleproliferasjon (Valiathan, Marco et al. 2012). Det finnes mange studier om hvordan deregulering av DDR2 fører til sykdom, men få studier om normal funksjon av DDR2 (Leitinger 2014). I det følgende presenteres DDR2 rolle i forskjellige biologiske prosesser og patologiske tilstander.

Skjelett

Hos mennesker består skjelettet i hovedsakelig av to typer vev (brusk og bein), tre celletyper (osteoblaster, kondrocytter og osteoklaster) og mer enn 200 forskjellige skjelettelementer spredt i kroppen (Karsenty 2003). Kollagen er hovedbestanddelen i beinvevet og utgjør en tredjedel av alle proteiner i kroppen (Shoulders and Raines 2009).

Knockoutstudier rettet mot DDR2 gener har avklart viktige funksjoner av DDR2 *in vivo*. Det er vist at DDR2 er viktig for normal benutvikling. Mus som mangler DDR2 er kortvokste og har redusert benvekst. Svikt i skjelettvekst i DDR2^{-/-} mus skyldes en reduksjon i kondrocyt proliferasjon (Labrador, Azcoitia et al. 2001). DDR2^{-/-} mus viser også en signifikant deformasjon av hodeskallen (Dullin, Missbach-Guentner et al. 2007). I tillegg er mutasjoner i DDR2 assosiert med flere skjelettdefekter, inkludert korte lemmer og anormal forkalkning. Hos mennesker, ble DDR2 mutasjoner identifisert hos pasienter med SMED-SL sykdom (Spondylo-Meta-Epiphyseal Dysplasia-Short Limbs), en sjelden autosomal recessiv sykdom som rammer skjelettvekst hos mennesker. Funksjonelle studier av disse mutasjoner viser mangel på kollagen induisert aktivering av DDR2 enten via defekt i transportmekanisme til cellemembranen eller defekt i kollagenbinding til reseptoren (Ali, Xu et al. 2010, Al-Kindi, Kizhakkedath et al. 2014). DDR2 medierer induksjon av lysesylidase, noe som danner en potensiell forklaringsmekanisme for skjelettforandringer observert i både mus som mangler DDR2 eller mutasjoner i DDR2 hos mennesker (Khosravi, Sodek et al. 2014). Disse studiene indikerer at DDR2 spiller en viktig rolle i regulering av en rekke cellulære og ekstracellulære hendelser involvert i benvekst og utvikling.

Fibrose, inflammasjon og immunsystemet

Hepatisk fibrose, eller arr ansamling oppstår som respons på kronisk skade. Under fibrose blir kollagen I erstattet med kollagen type IV. Aktiverte hepatiske stellatceller (HSC) er hovedkilden for kollagenproduksjon under fibrose (Olaso, Ikeda et al. 2001).

Det er vist at DDR2 uttrykk og signalering er induert i stellate celler og er involvert i aktivering av disse cellene under akutt lever skade (Olaso, Ikeda et al. 2001). I motsetning til denne profibrotiske rollen av DDR2 under akutt leverskade, viser DDR2^{-/-} mus lever en økning i både kollagen akkumulering, gelatinolytisk aktivitet, og HSC tetthet ved kronisk leverskade. Dette indikerer at DDR2 har en inhiberende/beskyttende effekt mot fibrose ved kronisk lever skade (Olaso, Arteta et al. 2011). Disse motsigende resultatene tyder på at DDR2 har ulike roller i utvikling av leverfibrose avhengig av om det er akutt eller kronisk leverfibrose.

Nye funn tyder på at DDR2 kan spille en rolle i artroseutvikling, i og med at den involvert i frigjøring av proinflammatoriske cytokiner inkludert interleukin-6 (IL-6) fra humane kondrocytter. Kondrocytter frigjør også MMP-13 når de selv blir stimulert av cytokiner, noe som fører til bruskmatriks degradering (inkludert kollagen II) og dermed artroseutvikling. Kollagen II fragmenter kan igjen indusere proinflammatoriske cytokiner og MMP, noe som fører til mer degradering av ekstracellulær brusk (Klatt, Zech et al. 2009). Studier viser også at DDR2 er oppregulert i kondrocytter, noe som fører til økt frigjøring av MMP-13 (Leitinger 2014).

DDR rolle i immunsystemet er best dokumentert for DDR1. Nye studier viser midlertidig at også DDR2 kan være involvert i immunrespons. Det er vist at DDR2 uttrykkes i sirkulerende humane nøytrofiler (Afonso, McCann et al. 2013). Dette uttrykket av DDR2 i nøyrofile granulocytter er nødvendig for migrasjon i tre dimensjonal (3D) kollagenmatriks og fremmer kjemotakse ved å frigjøre MMP-8 og kjemotaktiske kollagen peptider. Dette indikerer at DDR2 spiller en viktig rolle i immunrespons, som er avhengig av effektiv cellemigrasjon av aktiverte hvite blodceller til infeksjonsstedet (Afonso, McCann et al. 2013, Leitinger 2014). I tillegg spiller DDR2 en kritisk rolle i aktivering av dendrittiske celler (DC). Dendrittiske celler er antigenpresenterende celler som spiller en sentral rolle i immunrespons. DDR2 uttrykkes i umodne benmarg deriverte DC fra mus (mDC) og oppreguleres i TNF- α -stimulerte modne mDC. Stimulering med kollagen I av umodne mDC fører til aktivering av DDR2 og økning av IL-12 produksjon, CD86 uttrykk, og antigen opptak aktivitet (Lee, Kang et al. 2007). Det er også vist at DDR2 medierer aktivering av humane monocyttderiverte DC (hDC), og øker dens funksjonell aktivitet. DDR2 induserer oppregulering av IL-12 skjer via NF- κ B og JNK signalering (Poudel, Yoon et al. 2012, Poudel, Ki et al. 2013)

Proliferasjon

DDR2 er involvert i regulering av celleproliferasjon. Den eksakte mekanismen for hvordan DDR2 regulerer celleproliferasjon er ukjent. Ulike studier viser at DDR2 kan ha både proliferative og antiproliferative egenskaper (Valiathan, Marco et al. 2012). Knockoutstudier viser at mus som mangler DDR2 utvikler korte ben som følge av redusert kondrocytt proliferasjon. I en modell for sårtilheling i hud, viser DDR2^{-/-} mus redusert proliferativ respons sammenlignet med villtype mus. Fibroblaster isolert fra DDR2^{-/-} mus har redusert *in vitro* celleproliferasjon sammenlignet med villtype (Labrador, Azcoitia et al. 2001). Dette indikerer at DDR2 fremmer celleproliferasjon.

Kawai et al. har undersøkt DDR2 funksjon med hensyn på proliferasjon i prekondrocytt cellelinjen, ATDC5 (Kawai, Hisaki et al. 2012). Celler transfektert med miRNA -mot DDR2 viser høyere antall celler sammenlignet med celler transfektert med kontroll miRNA. I tillegg har forfatterne overuttrykt DDR2 som mangler kinase domene (KD-DDR2) spesielt i bruskceller fra mus og fant at laget av proliferative kondrocytter er tykkere i mus som overuttrykker KD-DDR2. Dette indikerer at DDR2 har inhiberende effekt på kondrocytt celleproliferasjon og motsier resultatene publisert av Labrador et al (Labrador, Azcoitia et al. 2001) som indikerer at DDR2 har vekststimulerende effekter på kondrocytter (Kawai, Hisaki et al. 2012). Disse motsigende resultater kan forklares med at DDR2 kan ha forskjellige roller under ulike eksperiment forhold.

Migrasjon

Cellemigrasjon spiller en sentral rolle i flere biologiske prosesser som embryoutvikling, immunreaksjoner, cellevekst, differensiering og sårtilheling. Migrasjon av celler kan ses på som en syklisk prosess. Celler initierer migrasjonsyklus ved å polarisere og ved å danne forlengete utvekster av cellemembranen. Disse utvekstene inkluderer lamellipodia, spikelignende filopodia eller begge deler og drives av polymeriserte aktinfilamenter. Disse membranutvidelsene stabiliseres ved at aktincytoskjelettet festes til underliggende ECM proteiner. Deretter oppstår sammentrekninger av aktomyosin (kompleks av myosin og actin filamenter) som danner drivkraft for migrering. Disse sammentrekninger fører til at adhesjoner i cellens bakre del løsnes, noe som fremmer cellebevegelse (Parsons, Horwitz et al. 2010).

DDR2 spiller en viktig rolle i normal cellemigrasjon. Fibroblastceller transfektert med siRNA rettet mot DDR2 viser hemmet spredning og migrasjon i 2D cellemigrasjonassays. Det er vist at DDR2 rolle i normal fibroblast spredning og migrasjon er uavhengig av kollagen induert aktivering av DDR2 tyrosinekinase, men heller avhengig av aktivering av fokal adhesjonskinase (Herrera-Herrera and Quezada-Calvillo 2012). Kjemotaksisk migrasjon av hudfibroblaster er sterkt redusert i DDR2^{-/-} sammenlignet med DDR2^{+/-} celler. I tillegg er det vist at denne reduksjon i migrasjon skyldes en reduksjon i frigjøring av MMP (Olaso, Labrador et al. 2002). DDR2 spiller en rolle i migrasjon av VSMC (vaskulære glatte muskel celler). Det er vist at VSMC behandlet med hyperbar oksygen (HBO) øker cellemigrasjon pga. økt uttrykk av DDR2, i motsetning til VSMC celler med DDR2 siRNA som viser en hemmet migrasjon aktivitet (Shyu, Wang et al. 2009). DDR2 er også involvert i hypoxia induert

migrasjon av VSMC (Chen, Wang et al. 2008). Nøytrofil kjemotakse i 3D kollagenmatriks ser også ut til å være avhengig av DDR2 (Afonso, McCann et al. 2013).

Differensiering

DDR2 spiller en viktig rolle i osteoblastdifferensiering. Under prosessen med bendannelse (ossifikasjon) differensierer mesenkymale stamceller (MSC) til osteoblaster. Denne differensieringen kjennetegnes ved uttrykk av transkripsjonsfaktoren Runx2 og osteoblast markører som inkluderer type I kollagen, alkalisk fosfatase (ALP), osteocalcin (OCN), og osteopontin (OPN) (Zhang, Su et al. 2011).

Uttrykksprofilen til DDR2 forandres signifikant under osteoblast differensieringsprosessen. Nivået av DDR2 øker når differensieringsprosessen starter og reduseres når den avsluttes. Osteoblastdifferensiering og modning er hemmet i celler transfektert med DDR2 shRNA. Hemmet differensiering vises som reduksjon i osteoblastmarkører som ALP og OCN. Dette indikerer at DDR2 fremmer osteoblastdifferensiering ved å aktivere Runx2 via aktivering av ERK1/2 som igjen fosforylerer Runx2 (Zhang, Su et al. 2011). Kawai og medarbeidere har undersøkt DDR2 sin rolle med hensyn på kondrocytt-differensiering ved å bruke kondrotiske cellelinje ATDC5. Disse cellelinjene differensieres til kondrocytter når de stimuleres med insulin. Når DDR2 uttrykk reduseres vha. inhibitorisk DDR2 mikroRNA i ATDC5 cellelinjer og stimuleres med insulin, differensieres ATDC5 tidligere til kondrocytter sammenlignet med kontroll celler. Dette tyder på DDR2 har negativ effekt på differensiering. Redusert DDR2 uttrykk i ATDC5 cellelinjer fører også til nedregulering av Runx2. Dette tyder på at Runx2 kan være en nedstrøms mål for DDR2 i dette systemet (Kawai, Hisaki et al. 2012).

ECM remodelering

Ekstracellulærmatriks (ECM) er en viktig regulator av cellulær og vevsfunksjon i kroppen. En kontrollert ECM homeostase er viktig for normal utvikling, sårtilheling, og normal organ homeostase. Ubalanse i ECM kan føre til livstruende patologiske tilstander. ECM er definert som samling av ulike proteiner og polysakkarider som befinner seg utenfor cellene. ECM har ulike funksjoner som å gi strukturell/mekanisk støtte og fungere som kompresjonsbuffer. Ekstracellulærmatriks består hovedsakelig av fiberdannende -og nettverk dannende kollagener, elastisk fiber, og glycosaminoglykan (GAG)-glykoprotein som består av hyaluronan og proteoglykaner. I ECM finnes også SPARC (Sekrert Protein Acidic og Rikt i Cystein), et glykoprotein som modulerer kollagen modning og sammensetning av kollagenmatriks, og

lysyloksidase(LOX), et enzym som katalyserer kollagen krysskoblinger sammen
lysyhydroksylase (LH1) (Cox and Erler 2011, Olaso, Lin et al. 2011).

Et viktig resultat etter kollagenbinding til DDR2 er oppregulering av matrix metalloproteinaser. Denne DDR2 medierte uttrykk og aktivering av MMP påvirker ECM remodelering gjennom MMP-mediert nedbrytning av ECM komponenter. Tidlige studier av DDR2 viser at den medierer kollagen-indusert frigjøring av MMP-1 og MMP-2 (Vogel, Gish et al. 1997, Olaso, Ikeda et al. 2001). I tillegg regulerer DDR2 kollagenasene MMP-8 og MMP-13 (Leitinger 2014). Effekten DDR2 har på ECM remodelering er ikke kun via frigjøring av MMP. Olaso og medarbeidere viste reduserte nivåer av ECM proteiner som kollagen type I, SPARC, LOX, og LH1 i vev fra DDR2^{-/-} mus (Olaso, Lin et al. 2011). Det også vist at DDR2 medierer kollagen I induert oppregulering av LOX (Khosravi, Sodek et al. 2014).

DDR2 OG KREFT

Proliferasjon og tumor vekst

Ukontrollert celleproliferasjon er et av hovedkarakteristika til kreftceller. Vekstfremmende signaler er godt regulert i normalt vev gjennom strengt regulerte cellevekst-og-divisjon sykluser. Balansen mellom cellevekst og celledød bidrar til å opprettholde homeostasen med riktig antall celler nødvendig for optimalt vev/organ funksjon. I kreftceller er det deregulering av både proliferative og suppressive signaler. Kreftceller tilegner seg kroniske proliferative signaler på flere måter. For eksempel, ved autokrin proliferative signalering uttrykker celler reseptorer som aktiveres av vekstfaktorer som cellen selv skiller ut. Alternativt, kan kreftceller sende signaler som stimulere naboceller (tumorassosiert stroma) til å frigjøre vekstfaktorer som øker proliferering av kreftceller. Økt proliferasjon oppstår også når kreftceller overtrykker reseptorer som fremmer vekstsignaler eller når en endring i reseptor struktur som følge av en mutasjon fører til liganduavhengig aktivering (Hanahan and Weinberg 2011).

DDR2 kan ha både prolifererende og antiprolifererende funksjoner i kreftceller avhengig av celletype og kollagenstruktur. Når type I kollagen er i monomeriske fibriller eller i denaturert form (gelatin) fungerer den som vekststimulerende protein. I motsetning til dette, når kollagen type I er i organisert fibrill form viser forskjellige studier at den har inhiberende effekt på celleproliferasjon i både normale og kreftceller. Nøyaktig mekanismen av den inhiberende

effekten av kollagen type I på celler er ikke godt kjent (Wall, Werner et al. 2005). Wall og medarbeidere har vist at fibrill kollagen inducerer G0/G1 vekstarrest i humane melanomaceller uavhengig av cytoskjelett organisering. Denne kollageneffekten på cellesyklusarrest medieres av DDR2 (Wall, Werner et al. 2005). Iwai og medarbeidere viser også at HEK293T celler som uttrykker DDR2 har redusert kolonitall sammenlignet med kontroll. De viser også at kinasemutanten I638F øker kolonisering og viser ingen DDR2-fosforylering. Dette får forfatterne til å konkludere med at DDR2 i utgangspunktet har suppressive effekter på celleproliferasjon, og DDR2 mutasjoner medfører redusert aktivering av reseptoren og dermed tap av DDR2 inhiberende effekt på celleproliferasjon (Iwai, Luczynski et al. 2014). I motsetning til dette viser studien av Hammerman og medarbeidere at både DDR2 villtype og mutanter er onkogene og fører til kolonidannelse i NIH-3T3 celler (Hammerman, Sos et al. 2011). En ny studie har også vist at inhibering av DDR2 i humane ikke-småcellet lungekarcinoma cellelinjer, H1299 fører til suppresjon av kreftassosierte fenotyper som økt celleproliferasjon, kolonidannelse og invasjon. Dette indikerer at DDR2 bidrar til kreftprogresjon ved å øke celleproliferasjon (Kim, Ko et al. 2014)

Tumor migrasjon og invasjon

Cellemigrasjon er en forutsetning for både invasjon og metastasering. Innenfor eksperimentell cellebiologi defineres migrasjon som bevegelse av celler på et substrat som basalmembran, ECM fiber, eller plastplater. Hovedfaktorer som regulerer migrasjon er ligander som bindes til serpentin reseptorer (G-protein koblet reseptor) som kjemokiner og neurotransmittere (Entschladen, Drell et al. 2004).

Invasjon defineres som cellebevegelse gjennom en 3D matriks, kombinert med remodelering av 3D miljøet. Invasjon krever derfor adhesjon, proteolyse av ECM komponenter og migrasjon. Innenfor patologi defineres celleinvasjon som penetrering av vevsbarrierer, som å passere basalmembranen og infiltrasjon til underliggende interstitialvev av tumorceller.

Invasjon av kreftceller er avhengig av utskillelse av MMP og MT-MMP. Det har blitt utviklet legemidler som hemmer MMP for hindre invasjon av kreftceller og dermed metastasering.

Kliniske studier med legemidler som hemmer MMP har dessverre så langt vært mislykkede.

Dette kan skyldes for lite spesifisitet, toksisitet eller at kreftceller unnslipper MMP inhibering ved å bruke protease-uavhengige mekanismer for å invadere ECM (Kramer, Walzl et al. 2013).

Få studier har undersøkt hvordan DDR2 påvirker migrasjon og invasjon av kreftceller. Det finnes midlertidig studier som indikerer at nedregulering av DDR2 i humane kreft cellelinjer (SK-HEP, HT29 og A375) ved bruk av siRNA fører til reduksjon i deres *in vitro* migrasjon (Badiola, Villace et al. 2011). I tillegg er det vist at overuttrykk av DDR2 bidrar til celleinvasjon og migrasjon av hode og hals squamouscellkarcinoma (HNSCC) (Xu, Zhang et al. 2014)

EMT OG METASTASERING

Epitelial-mesenkymal transisjon (EMT) er en prosess som forekommer både i normale fysiologiske tilstander (embryogenese og organutvikling), og i patologiske tilstander (kreft metastasering). EMT defineres som endringer som oppstår når epitelceller blir mesenkymallignende celler. Under EMT mister epitelcellene sine karakteriske egenskaper inkludert deres evne til celle-celle interaksjoner og apikale basale polaritet, cytoskjelettet deres reorganiseres, de undergår en endring i signaleringsprogrammer som definerer celleform, og reprogrammerer genuttrykk. Dette øker motilitet av individuelle celler og gjør dem i stand til å utvikle en invasiv fenotype. Hovedkjennetegnet for epitelceller er uttrykk av cell-til-celle adhesjonsmolekylet, E-cadherin. Uttrykk av E-cadherin er sterkt redusert under EMT. Andre epitelcellemarkører som nedreguleres under EMT er α -catenin, desmoplakin, claudiner og occludiner. Mesenkymalemarkører som økes under EMT er blant annet N-cadherin, vimentin og fibronectin. Transkripsjonsfaktorer som er involvert i EMT initiering inkluderer, SNAIL familie, ZEB, bHLH (basic helix-loop-helix) og TWIST. Det er tre sentrale signalveier som bidrar til EMT initiering og disse inkluderer TGF- β , Wnt/ β -catenin, og Notch signalveiene (Lamouille, Xu et al. 2014).

Kreftmetastasering er en flertrinns prosess hvor noen kreftceller løsriver fra primærtumor, og danner en sekundærtumor andre steder i kroppen. Første trinn krever at epitelkreftcellene er mobile og er i stand til å bryte underliggende basalmembran og ECM. Nedbrytning av disse barrierene setter i gang invasjon til nærliggende vev (Trinn 1: invasjon). Neste trinn kalles for intravasasjon, kreftceller invaderer endotellamina, og går inn i systemisk sirkulasjon via lymfe eller blodsystemet (Trinn 2: intravasasjon). Få av de løsrevne kreftceller overlever det harde miljøet i sirkulasjonen (Trinn 3: transport). Eventuelt overlevende kreftceller fanges i vaskulærlumen og går gjennom endotelkapillærer til fjerntliggende organer som kreften spred seg til (Trinn 4: extravasasjon). I et nytt stromalt miljø vil få kreftceller overleve og etablere en mikrometastase, som danner grunnlaget for etablering av sekundær tumor (Trinn 5: kolonisering) (Tsai and Yang 2013). EMT-prosessen er involvert i flere av disse

metastaseringsstrinnene. For eksempel vil aktivering av EMT fører til at karcinomaceller mister celle-celle interaksjoner og løsrives fra hverandre, noe som har betydning for migrasjon og invasjon. EMT er involvert i invasjon via oppregulering av matriksproteaser (MT1-MMP, MT2-MPP, MMP-9) via SNAIL1 aktivering. I tillegg er det studier som indikerer at EMT-markører og transkripsjonsfaktorer er nødvendige for intravasasjon og transport av kreftceller. I siste metastaseringsstrinn, kolonisering av mikrometastaser, er det vist at tumorcellene er epitellignende og uttrykker ikke mesenkymalemarkører. Dette førte til hypotesen om at EMT rolle i metastasering er dynamisk, i den betydning at EMT reversers ved induksjon av en prosess kalt MET (mesenkymal-epitell-transisjon) under koloniseringstrinnet (Tsai and Yang 2013). Rollen av både EMT og MET i karcinoma-metastasering er fortsatt under debatt siden ingen av disse prosessene er vist i kreftceller fra human tumor (Chui 2013).

DDR2 er involvert i EMT og dermed metastasering ved å stabilisere SNAIL1. Denne DDR2-medierte stabiliseringen av SNAIL1 fører til brystkreftcelleinvasjon *in vitro*, og metastasering *in vivo*. DDR2 fører ikke til induksjon av SNAIL1 mRNA uttrykk, men er nødvendig for å opprettholde høye nivåer av SNAIL1 proteinet via induksjon av post-transkripsjonell modifisering. Med andre ord, DDR2 uttrykkes under EMT, men er ikke nødvendig for EMT induksjon. Dette kan tyde på at DDR2 hjelper med å opprettholde høyt SNAIL1 nivå og aktivitet i kreftceller som har allerede undergått EMT, og bidrar til at kreft cellene fortsetter å invadere gjennom kollagen I rikt ECM ved å hjelpe dem med å beholde sine mesenkymale egenskaper (Zhang, Corsa et al. 2013).

Ektopisk uttrykk av SLUG i MDCK celler fører til oppregulering av DDR2 (Maeyama, Koga et al. 2008). Både DDR2 og kollagen I oppreguleres i celler stimulert med TGF- β 1, en potent stimulator av EMT *in vitro*. Dette tyder på at DDR2 spiller en signifikant rolle i TGF- β 1 induert EMT (Walsh, Nawshad et al. 2011).

Flere studier viser at DDR2 er involvert i metastasering. I en *in vivo* levermetastase modell, viser nakne mus at nedregulering av DDR2 i A375 humane melanomceller reduserer risiko for levermetastase (Badiola, Villace et al. 2011). En ny publisert studie viser at DDR2 er involvert i metastasering av prostatakreftcellerlinjer til beinvevet. Typisk for prostatakreft celler som metastaserer til bein er frigjøring av faktorer som stimulerer beinvedbrytning inkludert parathyroid hormon-relatert protein (PTHrP). Forfatterne viste at DDR2 er involvert i ekspresjon av PTHrP via Rux2 aktivering (Yan, Jin et al. 2014).

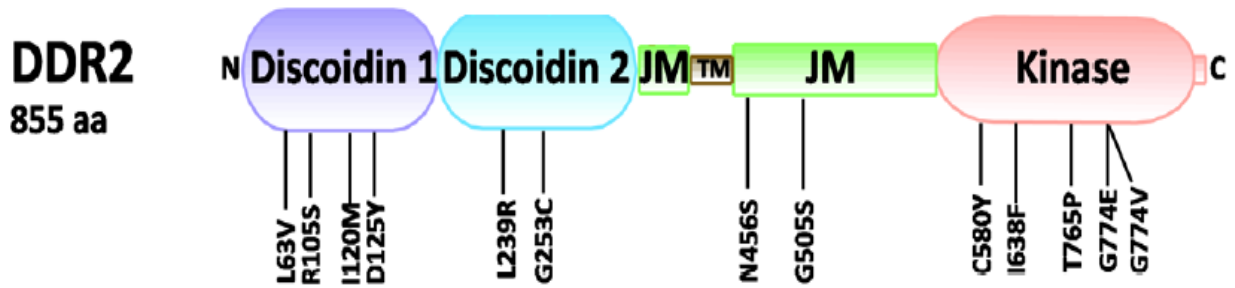
Metastasering av tarmkreftcellerlinjer, MCA38 til leveren i DDR2 -/- mus er undersøkt av (Badiola, Olaso et al. 2012). Levermetastasering av MCA38 øker betydelig i DDR2 -/-

sammenlignet med DDR+/- mus. Forfatterne forklarer resultatene med økt aktivisering og differensiering av HSC i DDR-/- mus, noe som fører til dannelse av mikromiljø som fremmer metastasering via utskillelse av HSC faktorer, som igjen fører til tumorvekst og angiogenese. Dette kan tyde på at DDR2 under normale forhold har beskyttende effekt mot tarmkreftmetastasering til lever, og at pasienter med tarmkreft og som viser redusert hepatisk DDR2 uttrykk har høyere risiko for lever metastasering (Badiola, Olaso et al. 2012).

DDR2 uttrykk og mutasjoner i kreft

Mutasjoner i tyrosinkinaser forekommer i de fleste krefttyper, og spiller en viktig rolle i kreftutvikling og progresjon. Det er alle mutasjoner i tyrosinkinaser som har en funksjonell konsekvens. Noen mutasjoner kan føre til funksjonelle konsekvenser når de forekommer i kritiske aminosyre som befinner seg i for eksempel kinasedomenets aktiveringsloop, autoinhibitorisk juxtamembran region, og/eller ligandsbindende domene. I kreftsammenheng klassifiseres mutasjoner i to kategorier, enten som “drivende” mutasjoner eller “passasjer” mutasjoner. “Drivende” mutasjoner er kausalt involvert i onkogene aktiviteter av tyrosine kinaser, mens “passasjer” mutasjoner ikke bidrar til kreftutvikling, og fins i kreft fordi de oppstår via feil i DNA syntese under normal celledeling (Valiathan, Marco et al. 2012).

Flere studier har påvist DDR2 mutasjoner i plateepitelkarcinoma fra lungekreft (Lung Squamous cell cancer, SCC). Sekvensering av alle tyrosinkinaser til 277 lunge SCC pasienter og 13 cellelinjer viser 11 forskjellige mutasjoner i DDR2. Tre av de elleve mutasjonene fins i kollagenbindende- discoidin I domene: L63V, I120M, og D125Y; to i discoidin II domene: L239R og G253C; en mutasjon i cytosolisk JM domene: G505S og fem mutasjoner i kinase domene: C580Y, I638F, T765P, G774E, og G774V (Figur 3) (Hammerman, Sos et al. 2011). Fosfoproteomikk studier viser at DDR2 er blant topp 20 av de mest fosforylerte RTK i 150 NSCLC (ikke-småcellet lungekarcinoma) tumorer (Iwai, Luczynski et al. 2014). Dette tyder på at DDR2 aktivisering er assosiert med utvikling og/eller progresjon av NSCLC. DDR2 somatiske mutasjoner er identifisert i primære NSCLC biopsier. I en screening av 26 primære NSCLC pasientprøver for somatiske mutasjoner i proteinkinaser, fant forskere 1 somatisk mutasjon i discoidin I domene i DDR2, R105S, hos en pasient med storcelletkarcinoma (Figur 3) (Valiathan, Marco et al. 2012). Det er også funnet en DDR2 mutasjon i lungeadenokarcinoma. Av 188 primære lungeadenokarcinoma prøver ble det funnet en DDR2 mutasjon hos en pasient. Denne mutasjonen, N456S, er



Figur 3: Skjematisk presentasjon av DDR2 domene struktur. Viser lokalisasjon av DDR2 mutasjoner funnet i ulike screeningsstudier. aa, Aminosyrer; JM, juxtamembran domene; TM, transmembran domene. Figuren er modifisert fra (Valiathan, Marco et al. 2012)

lokalisert i cytosolisk JM domene (Figur 3) (Valiathan, Marco et al. 2012). I det nasjonale kreftgenomikk prosjektet (Norsk kreftgenomikkonsortium) ble alle kinase genene til 100 norske lungekreftpasienter sekvensert. To unike mutasjoner i DDR2 som ikke har vært rapportert før ble oppdaget. Det ene mutasjonen T226A er lokalisert i discoidin domene 2, og den andre mutasjonen, 786 Stop, er i kinase domene (Professor Ola Myklebost, Radiumhospitalet og UiO, upublisert). En annen studie viser at DDR2 uttrykk er forhøyet i nasopharyngeal karsinoma (NPC) (Chua, Yeh et al. 2008). De fleste humane invasive ductal kreftceller overuttrykker DDR2. Dette overuttrykket er i kollerasjon med SNAIL1 aktivitet, mangel på E-cadherin og økt kollagen nivå. Denne observasjonen kan indikere at DDR2 overuttrykk er et resultat av EMT og kreftmigrasjon (Zhang, Corsa et al. 2013).

Konsekvensen av DDR2 mutasjoner i kreft

Funksjonelle konsekvenser av observerte kreftspesifikke DDR2 mutasjoner er ikke kjent. Det fins midlertidig en studie som har undersøkt tyrosin fosforyleringsstatus til noen av de observerte DDR2 mutanter. Deres funn viser at L63V og G5050S mutanter er funksjonelle og er i stand til å mediere både reseptor autofosforylering og SHP-2 tyrosinfosforylering. Mens I638F kinase domene mutanten viser redusert evne til å mediere DDR2 autofosforylering og SHP-2 aktivering (Iwai, Payne et al. 2013). Konsekvensen av disse mutasjonene på cellulære prosesser som f. eksempel cellevekst ser ut til å være komplisert (Iwai, Payne et al. 2013) (Hammerman, Sos et al. 2011).

MÅLET MED OPPGAVEN

Forskningsgruppen i Farmakologi ved UiT avdeling farmasi, ønsket å studere konsekvensen av ny oppdaget mutasjoner i DDR2 i den norske kreftstudien (T226A og 786 stopp) og Hammerman et.al. studien (L63V og I638F). Man er interessert i å vite hvordan påvirker disse mutasjonene normal funksjon av DDR2, og hvordan DDR2 mutasjoner påvirker nedstrøms proteiner for DDR2. For å kunne utføre slike studier må det utvikles et system som gjør det mulig å studere DDR2 funksjon *in vitro*. Målet med denne oppgaven var følgende:

- 1) Generer ekspresjonsvektorer for villtype og mutanter av DDR2
- 2) Etablere system for uttrykk og deteksjon av DDR2 i humane celler
- 3) Undersøke aktiviteten til DDR2 villtype og mutanter
- 4) Undersøke om mutasjoner i DDR2 påvirker nedstrømsignalling

Delmålet nummer 4) ble ikke utført, siden systemet ikke ble fullstendig utviklet i løpet av master prosjektets tidsramme.

2. MATERIALER OG METODE

MATERIALER

Kjemikalier

Rekombinasjon

TE-buffer, endotoksinfri		Qiagen GmbH, Hilden, Tyskland
Gateway [®] LR Clonase [™] II enzym blanding		Invitrogen, Carlsbad, USA
Protein Kinase K		Invitrogen, Carlsbad, USA

Restriksjonsanalyse

NEBuffer 2.1		New England Biolabs, Ipswich, USA
BsrG1		New England Biolabs, Ipswich, USA

Gel elektroforese

Seakem [®] LE Agarose		Lonza, Rockland, USA
1xTAE-buffer	40mM Tris-acetat 1mM EDTA	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Ethidium bromide		Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
6x Gel loading dye blue	0,25 % Bromfenol blå 1,5mM Na ₂ EDTA pH=8 0,6 % SDS 40 % Sukrose i ddH ₂ O	Universitetet i Tromsø
1 kb+ ladder		Invitrogen, Carlsbad, USA
6x Loading buffer	0,03 % Bromfenolblått 0,03 % Xylen cyanol FF 10 nM Tris HCl pH=8 60 % Glycerol	

Mutagenese

Primer DDR2 T226A-as	GGCCTAGCCCTTCTGCCATGCTGTATCCAAC	Simga-Aldrich, St.Louis, USA
Primer DDR2 T226A-s	GTTGGATACAGCATGGCAGAAGGGCTAGGCC	Simga-Aldrich, St.Louis, USA
10x PfuUltra II reaksjonsbuffer		Agilent Technologies, Inc.
dNTP mix 10mM		Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

Turboenzym DpnI 20 000U/ml		New England Biolabs
<i>Sekvensering</i>		
DDR2L63V primer	CTGCCAAATATGGAAGGGTGGACTCAAGAAGGG	Sigma- Aldrich, St.Louis, USA
BigDye® Terminator v1.1,v3.1 5x sekvenseringsbuffer		Applied Biosystems, Foster City, USA
<i>Transformasjon</i>		
S.O. C medium	20 g/L Bacto tryptone(DIFCO) 5g/L Bacto yeast ekstrakt (DIFCO) 8,6 mM NaCl 2,5 mM KCL 10 mM MgCl 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glukose pH justert til 7,4	Universitetssykehus i Nord- Norge(UNN), Tromsø
LB-agar plate	10 g/L Bacto tryptone(DIFCO) 5g/L Bacto yeast ekstrakt (DIFCO) 171 mM NaCl pH justert til 7,4 10 g/L agar	Universitetssykehus i Nord- Norge(UNN), Tromsø
Lysgeny broth(LB) medium	10 g/L Bacto tryptone(DIFECO) 5g/L Bacto yeast ekstrakt 171mM NaCl pH justert til 7,4	Universitetssykehus i Nord Norge(UNN), Tromsø
Ampicillin Natrium Salt		Sigma-aldrich, St.Louis, USA
<i>Cellekultur, transfeksjon og stimuli reagenser</i>		
CaCl₂ i vann	2M, steril filtrert	
2x HEPES-bufferet saline(HBS)	280 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ 12 mM Dextrose 50 mM HEPES pH justert til 7.05	Universitetet i Tromsø
1x Dulbecco´s phosphate buffered saline(PBS)		Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
0,25 % Trypsin-EDTA		Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

løsning		
Dulbecco's modifisert eagler's medium (DMEM)	Tilsatt: 1 % 200 nM Glutamine 1 % 10 000 U/ml penicillin 10 mg/ml streptomycin 10 % Fetal boine serum	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Biochrom, Berlin, Tyskland
Lipofectamine™ 2000		Invitrogen, Carlsbad, USA
Lipofectamine™ LTX Plus		Invitrogen, Carlsbad, USA
Opti-MEM®		Invitrogen, Carlsbad, USA
Kollagen I Roche		Roche GmbH, Mannheim, Tyskland
Kollagen I sigma		Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Høsting		
MKK lyseringsbuffer	20 mM Tris pH=7 1% Triton X-100 5 mM NaPPi 50 mM NaF 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 mM Na ₃ VO ₄ 0,27 M Sukrose 10 mM β-Glyserofosfat 1 tablett protease inhibitor 1 tablett fosfatase inhibitor Ad 100 ml	Universitet i Tromsø
IP		
Pierce Control Agarose Resin		Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, USA
MPKK uten proteashemmer og mercaptanol	20 mM Tris pH=7 1% Triton X-100 5 mM NaPPi 50 mM NaF 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 mM Na ₃ VO ₄ 0,27 M Sukrose 10 mM β-Glyserofosfat	Universitet i Tromsø
EGFP antistoff		Gave fra professor T.Johansen
Protein G agarose Fast Flow 50 % slurry		Millipore, KGaA, Darmstadt, Tyskland
Westernblot		
10x NuPAGE sample reducing agent		Invitrogen, Carlsbad, USA
4x NuPAGE LDS sample buffer		Invitrogen, Carlsbad, USA

1x Seablue plus 2		Invitrogen, Carlsbad, USA
Magic Marker XP		Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE 4-12 % Bris-Tris Gel		Invitrogen, Carlsbad, USA
Blottingsbuffer	29 g Trisbase 144 g Glysin 1 L Metanol Ad. 5 L H ₂ O	Universitet i Tromsø
Runningsbuffer	MES runningsbuffer	Invitrogen
Odyssey blockingsbuffer		Li-COR Biosciences, St, Lincoln, USA
1x TBS-T	0,1 % Tween 20 1xTBS: 10 g KCl 400 g NaCl 200 ml 1 M TrisCl pH=c7,5 Ad 5 L H ₂ O	Universitet i Tromsø
ODYSSERY Nitrocellulose Membran, 30 cmx 3 m		Li-Cor Biosciences, St. Licolon, USA
KITS		
QIAquick Spin Miniprep Kit		Qiagen GmbH, Hilden, Tyskland
QIAquick Spin Midiprep Kit		Qiagen GmbH, Hilden, Tyskland
Bakterie		
E.coli DH5 α komponente	Oppskrift etter (Inoue, Nojima et al. 1990)	Universitet i Tromsø
Cellelinjer		
HEK292T Celler		American tissue and celle culture collection (ATCC-CR 12268)
Vektorer og plasmider		
Destinasjonsvektor N term EGFP		E. Åberg og O.M. Seternes upublisert, UiT
Destinasjonsvektor C term. EGFP		E. Åberg og O.M. Seternes upublisert, UiT
Destinasjonsvektor C-term. Myc		ATCC, Manassas, USA
Destinasjonsvektor N-term. Myc		ATCC, Manassas, USA
Destinasjonsvektor C-term mCherry		ATCC, Manassas, USA
Destinasjonsvektor C-term Flag		ATCC, Manassas, USA
Entrykloner DDR2		Addgene og Kildalsen og Seternes upublisert

Antistoffer

Primær Anti-EGFP kanin	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Sekundær anti-kanin IRDye 800 CW	LiCor, Lincoln, USA
Primær 4G10 mus	En gave fra professor Kjetil Tasken, UiO
Sekundær anti-mus IRDye 800 CW	Rockland Immnuochemicals Inc, USA
Sekundær anti-mus IRDye 680 CW	LiCor, Lincoln, USA
Primær anti-FLAG	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Primær Anti-myc	Supernatnet fra 9E10 hybridomaceller
Fosfo-p44/42 MAPK(ERK1/2)(Thre202/Tyr204	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

Instrumenter og maskiner

Varmeskap 37 °C bakterier	Termaks, Bergen, Norge
Ristemaskin, bakterier	Unitron HT InforsAG, Bottmingen, Sveits
Vannbad, 42 °C	Grant Y6 Instruments, Cambridge, UK
Sentrifuge	Thermo scientific PICO 21 Heraeus, USA
Inkubator humane celler	Thermo Scientific Heracell 150i, USA
NanoDrop	NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, USA
Inkubator eppendorfrør	Eppendorf Thermomixer
Vorteks maskin	Labnet VX100 Vortex, MO BIO, USA
Maskin for visualisering av gel	Gel Doc 2000 BIO-RAD, USA
Westernblot	XCell SureLock Mini-cell Electrophoresis system, Invitrogen, USA
PCR maskin	MJ Research PTC-2000 Peltier Thermal Cycler DNA Engine, USA

METODER

Konstruksjon av ekspresjonsvektorer

Gateway[®] LR reaksjon ble brukt for å lage ekspresjonsvektorer. Grunnlaget for Gateway[®] teknologi er basert på de setespesifikke rekombinasjonsegenskapene brukt av bakteriofagen lambda til å integrere sitt DNA i E.coli kromosomet (Hartley, Temple et al. 2000). Teknologien gir mulighet til å flytte DNA sekvenser (for eksempel gener) på en enkel, rask og effektiv måte til ønsket vektor som kan videre brukes til blant annet protein uttrykk. Gateway[®] LR reaksjonen forutsetter at entryklonen og destinasjonsvektoren inneholder henholdsvis attL, og attR-seter (Invitrogen 2003).

LR reaksjon

Protokoll:

Til 1.5 ml eppendorfrør ble følgende tilsatt:

1. 75 ng Entryklon, 150 ng destinasjonsvektor og 2 µl TE buffer.
2. LR klonase II tinet på is, vorteks blandet 2x2sekunder
3. 1 µl av LR klonase tilsatt og blandet kort
4. Mikrosentrifugert ved 5000 rpm i 4 sekunder
5. Inkubert i 2 timer ved 25 °C
6. 1 µl proteinase K tilsatt og inkubert ved 37 °C i 10 minutter (Invitrogen).

Transformasjon

Til Falcon rør ble følgende tilsatt:

1. 50 µl komponente DH5 celle tinet på is
2. 1 µl av rekombinasjonsblanding fra LR reaksjonen
3. Inkuber på is i 30 minutter
4. Varmesjokk ved å inkubere i et vannbad ved 42 °C i 90 sekunder
5. 250 µl S.O.C medium
6. Inkuber i ristemaskin ved 225 rpm og 37 °C i 1 time
7. 100µl av medium plates ut på agarplater tilsatt 100 µg/ml ampicillin
8. Inkuber ved 37 °C over natten (Invitrogen).

Dagen etter ble ekspresjonsvektorene rensset opp vha. Mini-prepp.

Opprensing av plasmider (Miniprep)

Det ble brukt QIAprep Miniprep Kit for å rense opp plasmidene. Hensikten med metoden er å isolere ekspresjonsvektorene fra bakterie cellene. Prosedyren er basert på alkalisk lysing av bakterie celler, etterfulgt av DNA adsorpsjon over en silika membran i høyt salt miljø (Qiagen 2012)

Protokoll:

Til et Falcon rør tilsettes:

1. 3 ml LB medium med 100 µg/ml ampicillin
2. En koloni fra overnatt kulturen
3. Inkuber i ristemaskinen ved 37 °C og 225 rpm over natten

Kulturen ble overført i to omgang til 1,5 ml eppendorfrør og sentrifugert ved 14800 rpm i 1 minutt. Resterende trinn i opprensning ble gjennomført i henhold til protokollen fra Qiagen (Qiagen 2012). Konsentrasjon av opprenset ekspresjonskonstrukt ble bestemt vha.

NanoDrop® ND-1000 spektrofotometer.

Restriksjonsanalyse

Restriksjonsanalyse ble utført for å kontrollere om Gateway kloning var vellykket.

Restriksjonsanalyse består av to deler, først kutting av DNA vha. restriksjonszymer og deretter separering ved bruk av gel elektroforese. Restriksjonszymer ble oppdaget av Werner Arber og Stuart Linn som mottak nobelpris i fysiologi/medisin i 1978 for deres oppdagelse. Restriksjonszymer gjenkjenner og kutter DNA ved spesifikke restriksjonssteder. De fleste restriksjonssteder er 4 til 6 baser lange. Restriksjonszymer klassifiseres i tre grupper. Type I som gjenkjenner spesifikk DNA sekvens, men kutter ved tilfeldig sete som kan ligge 1000 basepar fra bindingssete. Type II som gjenkjenner og kutter innenfor samme sekvens. Type III som gjenkjenner spesifikk sekvens, men kutter ved en bestemt sekvens som vanligvis ligger innenfor 25 base par fra bindingssete (Pray 2008).

Etter kutting med restriksjonszymeret separeres fragmentene vha. gel elektroforese. Dette er en teknikk som ble utviklet i 1960 tallet og ble brukt for å separere DNA fragmenter etter størrelse (Pray 2008)

Kutting

Protokoll

En masterblanding ble laget. Innhold pr prøve:

1. 500-1000 ng plasmid DNA
2. 1 µl 10x reaksjonsbuffer
3. 0-5 µl MQ-H₂O (totalvolum 10 µl)
4. 1 µl BsrG1
5. Vorteksmiks kort, sentrifuger ved 14800 rpm i 3 sekunder
6. Inkuber ved 37 °C i 1-2 timer

Gelelektroforese

Protokoll

1. 2 g agarose veies og oppløses i opptil 200 ml TAE buffer
2. Oppvarmes i mikroovnen til alt pulver er oppløst
3. Avkjøles til 60 °C
4. Gelen støpes i 45 minutter. Bruker 25-30 µl av Ethidium bromide (1mg/ml)
5. Tilsette gel loading dye (1 µl pr 5 µl prøve)
6. Påfør 1 kb ladder pluss, og resten av prøvene i brønnene
7. Kjør på 90 Volt i 45 minutter

Båndene ble gjort synlige ved bruk av UV lys. Dette ble gjort i Bio-Rad Gel Doc 2000 system og bildet tatt opp i programmet Quantity One 4.30.

Opprensning av plasmider (Midiprep)

Det ble brukt Qiagen Midiprep Kit for å rense opp plasmider. Forskjellen fra miniprep er at det lages større mengder enn i miniprep. I tillegg inneholder midiprep protokollen ekstra vasketrinn som gir renere plasmid enn miniprep. Prosedyren ble gjennomført i henhold til produsents protokoll (Qiagen 2012).

Mutagenese

In vitro setedirigert mutagenese brukes til å lage en modifisert DNA sekvens hvor en eller flere nukleotider er forandret. Denne teknikken blir ofte brukt til å forandre den kodene sekvensen i ett cDNA slik at en kan undersøke den funksjonelle betydningen av

ulike aminosyrene i et protein. I dette prosjektet ble QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit benyttet for å generere ønsket punkt mutasjoner i DDR2. I denne metoden brukes to primere som er komplementære til begge DNA-trådene i templatet og som inneholder ønsket mutasjon. Ved å denaturere utgangsplasmid vha. varme bindes primerne til begge DNA-trådene og forlenges av enzymet kalt PfuTurbo DNA polymerase. Den nye syntetiserte og muterte DNA vil til forskjell fra utgangsplasmidet ikke være metylert. Dette gjør at vi kan fjerne templatplasmid med bruk av restriksjonsenzymet DpnI. Etter behandling med DpnI transformeres mutert DNA-tråd i komponente bakterie celler (Stratagene 2010).

Prosedyren ble gjennomført i henhold til produsents protokoll (Stratagene 2010).

Protokoll

To konsentrasjoner av DDR2 villtype ble benyttet, 10 og 40 ng. Til et PCR-rør ble følgende tilsatt:

1. 5 µl 10x reaksjonsbuffer
2. 42 µl MQ H₂O for konsentrasjon 10 ng, og 39 µl for konsentrasjon 40ng
3. 1 µl primer mix
4. 1 µl dNTP mix
5. 1 µl pfu Turboenzyme
6. 1 µl DDR2 wt templat 10ng/µl for konsentrasjon 10 ng og 4 µl for konsentrasjon 40ng

PCR-rørene ble deretter inkubert i PCR maskin med innstillinger vist i tabell 1.

Tabell 1. Innstillinger på PCR-maskin brukt i mutagenese

Segment	Syklus	Temperatur, °C	Tid (minutter)
1	1	95	1/2
2	13	95	1/2
		55	1
		68	6

Etter PCR ble prøvene tilsatt 1 µl DpnI, blandet forsiktig, mikrosentrifugert 1 minutt og inkubert ved 37 °C i 1 1/2 time.

Transformasjon

Protokoll

Til et Falcon rør ble følgende tilsatt:

1. 2 µl av DpnI behandlet prøver
2. 100 µl DH5 komponente celler
3. Inkuber på is i 20 minutter
4. Varmesjokk i 42 °C vannbad i 90 sekunder
5. 450 µl S.O.C medium
6. Inkuber i ristemaskin ved 225 rpm i 37 °C i 1 time
7. 100 µl av kulturen spredt på agarplate som inneholder spektinomycin og inkubert ved 37 °C overnatt. Plasmidet ble så rensset opp ved å gjennomføre en miniprep.

Sekvensering

Etter å ha rensset opp mutert plasmid, ville vi forsikre oss om sekvensering var vellykket, og det ble derfor gjennomført en sekvenseringsreaksjon. Den mest brukte metoden innenfor sekvensering er Sanger sekvensering, oppkalt etter Fredrikk Sanger som utviklet metoden sammen med Alan Coulson i 1975. Metoden baseres på bruk av en DNA-avhengig DNA polymerase for å lage en komplementær kopi av enkelt trådet DNA templat. Syntesen begynner i 3' enden av en tilsatt DNA primer komplementært til et enkelt trådet DNA templat. I tillegg til de 4 vanlige deoksyribonukleosidfosfatene tilsettes analoger til disse som mangler hydroksygruppen i 3'enden (dideoxynukleotidmonofosfat, ddNMP) og som fører til terminering av den voksende DNA tråden. Det utføres fire reaksjoner, hver med ett av de fire ddNMP nukleotidene. De fire ddNMP er enten radioaktiv eller fluorescens merket for deteksjon av DNA fragmenter. Resultatet av dette en samling av mange forskjellige tråder med forskjellige lengder i hver de fire reaksjonene. De fire reaksjonene analyseres i en gel elektroforese for separasjon, deretter avleses baserekkefølgen i DNA-tråden direkte (Shendure, Porreca et al. 2011).

Protokoll

Til et PCR-rør ble følgende tilsatt:

1. 14.5 µl MQ-H₂O (totalt 20 µl)
2. 1 µl primer 3,2 pmol/µl
3. 3 µl 5x sekvenseringsbuffer
4. 250 ng plasmid DNA

5. 1 µl BigDye v3.1

6. Blandet og inkubert i PCR maskin med innstillingen vist i tabell 2.

Prøvene ble sendt til sekvenseringslaboratorium som hører til Universitetssykehus Nord-Norge (UNN)

Tabell 2. Innstillinger på PCR-maskin brukt i sekvensering

Trinn	Antall sykluser	
Initieringstrinn	1	96 °C, 5 min
Denaturering	25	96 °C, 10 sek.
Hybridisering		50 °C, 5 sek
Polymerisering		60 °C, 4 min
Avkjøling		4 °C

Dyrkning og splitting av celler

I dette prosjektet ble det brukt human embryonic kidney (HEK) celler transformert med Simian Virus 40 (SV40) som uttrykker T antigen, og dermed kalt HEK293T. HEK cellelinjer er mye brukt som verktøy for rekombinant protein uttrykk. De nåværende kommersielle HEK celle linjer har sitt opphav fra den originale transformasjonen med adenovirus 5 utført av Graham et al (Van der Eb, Mulder et al. 1977).

HEK293T celler ble dyrket i Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). Det ble tilsatt 10 % Føtalt Bovint Serum (FBS), 1 % penicillin- streptomycin, og 1 % L-glutamin til DMEM dyrkingsmedium. En steril dyrkningsflaske med overflate areal på 175 cm² ble brukt til å dyrke HEK293T cellelinjer. Cellene inkubert i dyrkingsmedium ved 37 °C i 5 % CO₂ i en Galaxy® CO₂ inkubator.

Da cellene ble ca. 70-80 % konfulente ble de splittet. Dette ble gjort i sterilt miljø under en LAF-benk. Vekstmedium ble tømt, og flasken væsket med 5 ml Phosphate Buffered Saline (PBS). Så ble PBS tømt og tilsatt 2ml 37 °C varm trypsin. Trypsin ble fordelt i flasken, og flasken slått mot hard overflate forsiktig for å løsne celler som er festet til flaskeoverflaten. Cellene ble undersøkt under mikroskopet for å forsikre at de er splittet i en og en celle. Det ble så tilsatt 8 ml vekstmedium og blandet godt. Av denne celle suspensjon ble 9 ml kastet og 1 ml etterlatt i dyrkningsflasken. Det ble deretter tilsatt 24 ml nytt vekstmedium og inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ varmeskap.

Telling og så ut celler

Celletelling ble gjort når det var behov for å så ut celler til transfeksjon. En prøve på ca. ½ ml ble tatt av dyrkningsflaske etter trypsinering og suspendering i totalt 10 ml vekstmedium. Ca. 20 µl av denne prøven ble overført til telleplate (Bürkerkammer) dekket med dekkglass. Telleplate ble plassert under mikroskopet og cellene ble telt pr A-rute.

Antall celler/ml ble regnet ut ved hjelp av denne formelen:

$$\frac{\text{Totalt antall celler telt} \times 10\,000}{\text{Antall ruter telt}} = \text{Celler/ml}$$

Det ble brukt både 6 cm skåler og 6 brønners brett til å så ut celler. Mengde celler som ble sådd ut varierte og var avhengig av overflatearealet av brukte skåler. Det ble sådd ut ca. 200 000 celler til 6 brønners brett og ca. 400 000-800 000 celler i 6 cm skåler. Det ble først overført 1 ml av celler som inneholdte ønsket antall, og så fortynnet med 1 ml nytt DMEM vekstmedium. Cellene ble så oppbevart i inkubatoren med 5 % CO₂ og ved 37 °C. Cellene ble inkuberte til de nådde 50-80 % konfluens før transfeksjon.

Transfeksjon med kalsiumfosfat

For å kunne studere protein funksjon og konsekvenser av genmutasjoner i et cellulært miljø er det nødvendig å introdusere mutert og normalt gen inn i cellen. Prosessen kalles transfeksjon. Jeg har i denne studien brukt både en kalsiumfosfat metode og en lipidbasert metode for å introdusere DNA inn i cellen. Kalsiumfosfat metoden gir et kjemisk miljø som fører til binding av DNA til celleoverflaten. DNA blir deretter tatt opp av cellene ved en ukjent mekanisme. Danning av et presipitat som inneholder kalsiumfosfat og DNA er viktig for opptaket. Presipitatet vil være synlig under mikroskopet. Presipitatet dannes ved å blande forsiktig en HEPES-bufferet salt løsning med en løsning som inneholder kalsiumklorid og DNA. Avhengig av celletype vil opptil 10 % av celler tar opp DNA presipitatet. (Robert E. Kingston 2003)

Protokoll

Transfeksjonsblanding lages ved å tilsett følgende til 1,5 ml eppendorfrør

1. H₂O (totalt 200 µl)
2. 0-2000 ng DNA plasmid (Ekspresjonsvektor)

3. 100 µl 2 M HEPES bufferet salt løsning med pH 7,05
4. 12,5 µl 2 M CaCl₂
5. Vorteks miks i 5 sekunder
6. Tilsettes dråpevis til cellekulturen
7. Inkuber ved 37 °C og 5 % CO₂ over natten

Cellene ble enten høstet eller stimulert med kollagen dagen etter transfeksjon.

Transfeksjon med kationiske lipid reagenser

I denne oppgaven ble det brukt to transfeksjonsmetoder som er basert på kationiske lipider, Lipofectamine 2000 og Lipofectamine® LTX med Plus™ reagens. Kationiske lipider interagerer med DNA eller RNA vha. elektrostatiske interaksjoner. Kationiske lipider er positivt ladet, mens DNA eller RNA er negativt ladet. Som følge av interaksjonen og de lipofiliske egenskapene til kationiske lipider, blir aggregatene transportert gjennom det negativ ladete, hydrofobe cellemembran og inn i cellen (Hawley-Nelson, Ciccarone et al. 2001)

Lipofectamine® LTX med Plus™ reagens

Protokoll

Transfeksjonsblanding lages ved å tilsette følgende til 1,5 ml eppendorfrør:

1. 500 µl Opti-MEM
2. 0-2000 ng plasmid DNA
3. 1,5 µl Plus™ reagens
4. Bland forsiktig og inkuber i 5 min i romtemperatur
5. 3 µl Lipofectamin® LTX reagens
6. Inkuber i 30 min. i romtemperatur.
7. Innholdet ble tilsatt dråpevis til cellene i 60 mm skåler, og inkubert overnatt ved 37 °C og 5 % CO₂.

Lipofectamine® 2000 reagens

Protokoll

1. 250 µl Opti-MEM blandet med DNA plasmidet (500-2000 ng) i et eppendorfrør (A).
2. 250 µl Opti-MEM og 3 µl lipofectamine® 2000 tilsatt i eppendorfrør (B).
3. Innholdet i (B) overført til eppendorfrør (A).

4. Inkuber i romtemperatur i 20-60 minutter.
5. Cellevekst medium fjernes og 500 µl Opti-MEM tilsettes pr 60 mm skål.
6. Transfeksjonsblanding (A+B) tilsettes dråpevis til skålen
7. Inkuber ved 37 °C og 5% CO₂ i 3-5 timer
8. 4 ml vekstmedium tilsettes
9. Inkubert videre ved 37 °C og 5% CO₂ over natten.

Stimulering med kollagen I

DDR2 transfekterte HEK 293T celler ble stimulert med kollagen I. To typer kollagen I ble brukt i denne oppgave, den ene fra Roche, og den andre fra Sigma. Det ble prøvd med to metoder for å stimulere med kollagen I, “coating” og direkte tilsetning.

Protokoll

Direkte tilsetning av kollagen I

1. Så ut HEK293T celler i 6 cm skåler
2. Ved ca.70-80 % konfluens transfektere med ønsket ekspresjonsvektor
3. Inkubere over natten
4. Tilsette kollagen I (20 µg/ml) direkte til skålene
5. Inkuber i 0-24 timer
6. Høste cellene

“Coating” med kollagen I fra Roche

Med “coating” i denne sammenheng menes å dekke dyrknings brønn/skål med et kollagen belegg. “Coating” ble utført i henhold til produsentens bruksanvisning (Roche 2006).

Protokoll

1. Så ut HEK293T celler i 6 cm skåler
2. Ved ca. 70-80% konfluens tansfektere med ønsket ekspresjonsvektor
3. Inkuber over natten
4. “Coate” med 5 µg/cm² kollagen I.
5. 25 µl av 2 mg/ml kollagen I(Roche) spres over 6 brønners brett
6. Inkuber ved romtemperatur til alt vann fordampes.
7. Celler i 6 cm skåler overføres til “coatet” brønner ved å utføre en splitting.
8. 1ml av splittete celler overføres til “coatete” brønner, og 1ml til ikke “coatete” brønner
9. 1m av nytt medium tilsettes til brønnene slik at totalt volumet er 2ml pr brønn.
10. Stimulere i 0-24 timer.
11. Cellene høstes

“Coating” med kollagen I fra Sigma

“Coating” ble utført i henhold til produsentens bruksanvisning (Sigma-Aldrich 2001).

Protokoll

1. Så ut HEK293T celler i 6 cm skåler
2. Ved ca. 70-80% konfluens tansfektore med ønsket ekspresjonsvektor
3. Inkuber over natten
4. “Coate” med $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ kollagen I
5. 25 μl av 4 mg/ml kollagen I løses i 100-300 ml vann,
6. Overfør kollagen oppløst i vann til 6 brønners brett
7. Inkuber ved 37°C til alt vann fordampes.
8. Celler i 6 cm skåler overføres til "coatet" brønner ved å utføre en splitting.
9. 1ml av de splittete celler overføres til "coatete" brønner, og 1ml til ikke "coatete" brønner
10. 1ml av nytt medium tilsettes til brønnene slik at totalt volumet er 2ml pr brønn.
11. Stimulere i 0-24 timer.
12. Cellene høstes

Høsting av celler

Cellene ble lysert for å ekstrahere ønsket protein fra cellen. Først ble gammelt medium fjernet og brønnene vasket to ganger med 2 ml PBS. Deretter ble 300 μl MKK lysesbuffer tilsatt pr brønn/skål og inkubert i 1 minutt. Skålene ble så skrapet og innholdet overført til 1,5 eppendorfrør. Rørene ble inkubert på is i 20 minutter og vorteksblandet i 10 sekunder, og så ble de sentrifugert ved 13000 rpm ved 4°C i 30 minutter. Etter sentrifugering ble pellets kastet og supertanten brukt i westernblot analyse.

Westernblot

Westernblot er en sentral teknikk innenfor molekylærbiologi. Den er en metode som hjelper med å identifiserer spesifikke proteiner fra en kompleks proteinblanding ekstrahert fra celler. Dette gjøres i tre trinns prosess, først blir proteinene separert etter størrelse, så blir proteinene overført til fast membran og til slutt blir målproteinet identifisert vha. primært og sekundært antistoff. (Hirano 2012)

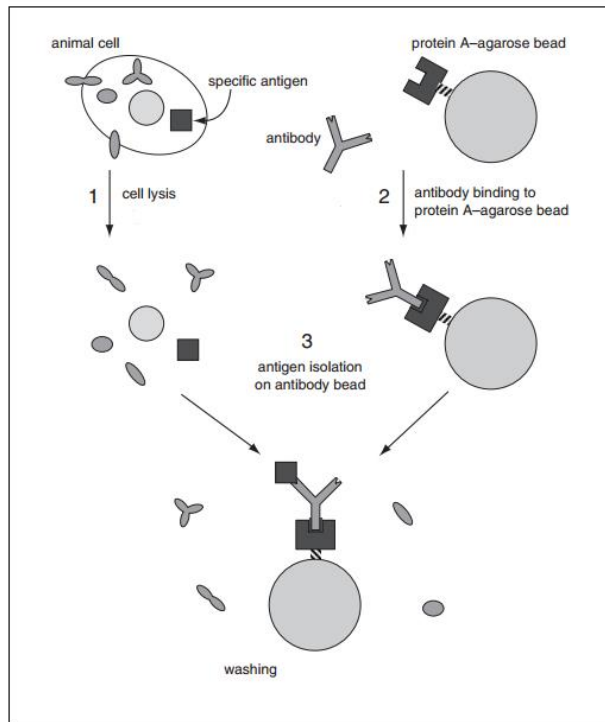
Protokoll

1. 39 µl av lysate overføres til et eppendorfrør
2. Tilsette 15 µl 4xLDS og 6 µl sample reducing agent.
3. Bruke 10 brønners 4-12% Bis-Tris gel.
4. Brønnene vaskes med runningsbuffer (fortynnet 40:800)
5. Tilsette runningsbuffer i det ytre og indre rommet av analyse apparatet
6. 15-20 µl av prøvene påsettes i brønnene.
7. 5 µl SeaBlue pluss ladder og 1µl Magic Marker(MM) brukes som markører
8. Kjør i 45 minutter ved standard innstillinger
9. Svamper, filterpapir, og nitrocellulosemembran fuktes i blottebuffer
10. Blottingssystemet settes opp i følgende rekkefølge: svamp, filterpapir, gel, filterpapir, svamp
11. Sandwichen overføres til blottekar.
12. Kald vann fylles i det ytterste rommet og blottebuffer i det innerste
13. Velg programmet Gel blotting og kjør i 2 timer
14. Nitrocellulosemembranen inkuberes i 1 time med vipping
15. Overfør membranen til 45 ml sentrifugerør
16. Tilsett 5 ml blokkingsbuffer, 5 µl Tween 20 og primært antistoff
17. Inkuber på rullator over natten
18. Vaske med TBS 3x5 minutter
19. Tilsette sekundær antistoff og inkuber i TBS buffer i 1time på vipping
20. Vaske med TBs 3x5 minutter

Membranen ble undersøkt under Odyssey Sa Infrared Imagin system og resultatet analysert vha. Odyssey Sa Software.

Immunopresipitering

Immunopresipitering (IP), er en teknikk som brukes til å isolere ønsket protein vha. et antistoff som er bundet til en sedimenterbar matriks. Både polyklonale og monoklonale antistoffer kan brukes i IP protokoll. Antistoffer kan være bundet ikke-kovalent til immunoabsorbant som protein A eller G, eller kan kobles ved kovalente bindinger til et fast matriks. IP protokoll består av flere trinn, slik som vist i figur 4. Første trinnet i protokollen går ut på å lysere cellene, slik at protein er oppløst i lysesbuffer. I andre trinnet, bindes.



Figur 4: Viser trinn i immunopresipiterings protokoll. Trinn 1, lysering av celler. Trinn 2, binding av antistoffet til et fast matris (protein A eller protein G). I siste trinn skjer det immunopresipitering ved at ønsket protein bindes til et spesifikt antistoff, mens andre ubundet proteiner skylles bort ved gjentatt vasking. Figuren er modifisert fra (Bonifacino and Dell'Angelica 2001)

antistoffet til sedimenterbart matris (f. eks: protein A, protein G, eller Sepharose). I trinn 3, bindes ønsket protein til det spesifikke antistoffet mot proteinet og andre ubundet proteiner vaskes bort

Protokoll

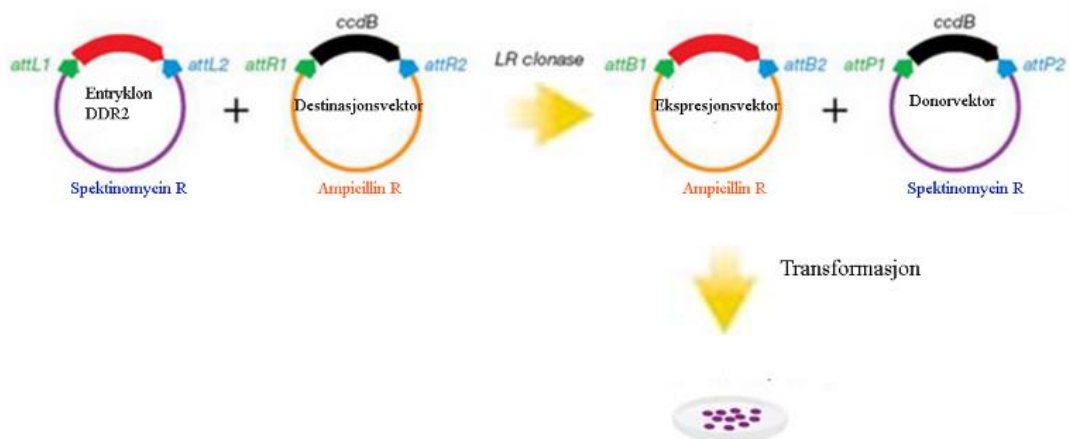
1. 150 µl Pierce Control Agarose Resin (20 µl/prøve) overføres til et eppendorfrør
2. Vaske 3x med iskald 600 µl lyseringsbuffer, MPKK, uten proteasehemmer og mercaptoetanol.
3. Sentrifuger ved 4000 rpm i 10 sekunder mellom hver vask.
4. Agarosen løses i 150 µl iskald lyseringsbuffer
5. 20 µl av suspensjonen overføres til rør med lysatet (IP rør)
6. Blanding inkuberes på rullehjul ved 4 °C i 30 minutter
7. Sentrifuger ved 13000 rpm i 1 minutt
8. Supernatanten overføres til nytt eppendorfrør.
9. Tilsette 1 µl antistoff, og inkuber på rullehjul ved 4 °C over natten.

10. Vask og equiliber protein G agarose 3x med 600 µl MPKK uten proteasehemmer og mercapeteanol.
11. 20 µl av protein G agarose tilsettes rør med antistoff og lysatet
12. Inkuber i 1 time på rullehjul ved 4 °C.
13. Innholdet overføres til spinnkolonne.
14. Eppendorfrør skyldes godt med iskald lyseringsbuffer og overføres til spinnkolonne
15. Innholdet i spinnkolonnen vaskes 3x med 500 µl lyseringsbuffer
16. Sentrifuger ved 4000 rpm i 10 sekunder mellom hver vask
17. Vask 2x med iskald 50mM Tris buffer (pH:7,5)
18. Sentrifuger mellom hver vask og til slutt sentrifugert med tom kolonne v 4000 rpm i 1 minutt.
19. Kolonnen plasseres i et eppendorfrør og tilsettes 40 µl sampleredusering buffer med LDS (master blanding: 120 µl LDS, 48 µl samplereducing, 72 µl ddH₂O).
20. Plasser i varmeblokk ved 70 °C i 10 minutter.
21. Sentrifuger i 1 min ved 4000 rpm

3. RESULTATER

Konstruksjon av ekspresjonsvektorer

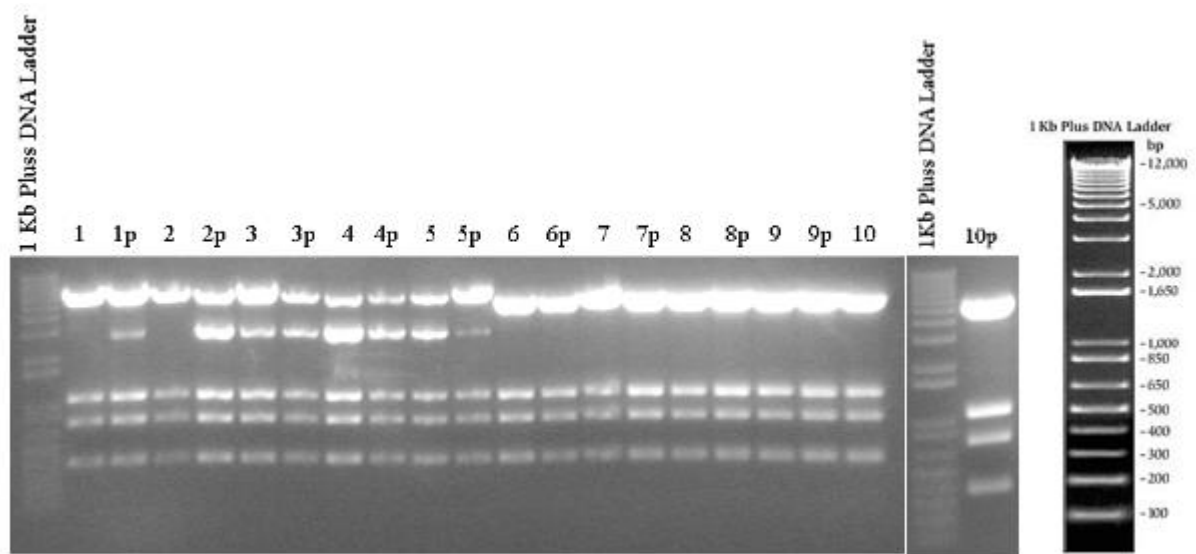
Vi ønsket å lage konstrukter som er epitoptagget med N-terminalt myc og ”Enhanced green Fluorescent protein” (EGFP) fordi vi har antistoffer med god affinitet til disse taggene. En annen hensikt med epitoptagging er at den gir mulighet til å isolere tagget protein ved immunopresipitering. Bruk av EGFP- tag gjør at proteinet fluoriserer under UV-lys og gir oss mulighet til å undersøke under et fluorescensmikroskop om transfeksjon er vellykket og lokalisasjon av proteinet i cellen. Gateway LR kloningsreaksjon ble brukt for å lage EGFP og myc tagget ekspresjonsvektorer. Figur 5 viser prinsippet for kloningsreaksjon.



Figur 5: Kloningsstrategi. DDR2 entryklon med attL1 og attL2 seter flyttes til en sekundær plasmid, destinasjonsvektor. Reaksjonen medieres av enzymet LR klonase som kutter DDR2 fra entryklonen og limer den inn i destinasjonsvektor, som blir en ekspresjonsvektor. Deretter transformeres ekspresjonsvektoren i E.coli celler. Figur modifisert fra (Gibthai 2008)

Vellykket kloning ble bekreftet ved å gjennomføre en restriksjonsanalyse av rekombinante plasmider renset med Miniprep Kit. Plasmidene ble kuttet med restriksjonsenzymet BsrGI. Teoretisk vil kutting av EGFP-DDR2 med BsrG1 gi 4 synlige fragmenter på størrelse 400, 750, 1100 og 5400 basepar. Etter agarose gelelektroforese ble det observert som forventet 4 DNA fragmenter ved ca. 400, 750, 1100 og 5400 basepar for EGFP-DDR2 (Figur 6 brønn 6-10p) (vedlegg 1).

Vi forventer også å se 4 synlige DNA fragmenter av myc tagget DDR2 etter kutting med BsrG1 ved ca. 400, 750, 1100 og 5400 basepar (Vedlegg 2). Disse fragmentene er observert i

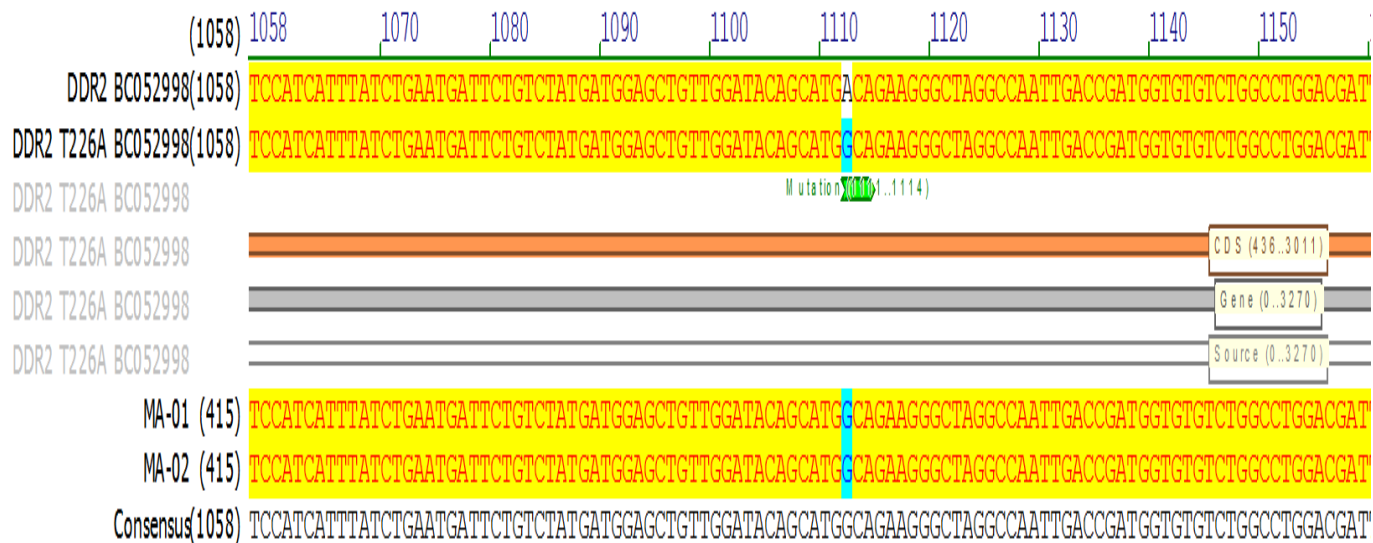


Figur 6: Restriksjon analyse av EGFP og Myc tagget DDR2 villtype og mutanter. Det ble brukt restriksjonsenzymet BsrGI for å kutte plasmidene. Plasmidene ble renset med Mini-prep og det ble plukket to kolonier fra samme agar plate, og derfra kommer merking 1, og 1p osv., for å indikere at det er samme plasmid, men fra to forskjellige kolonier. Brønnene inneholder følgende, Myc-DDR2 786 stop (Brønn 1 og 1p), Myc-DDR D710A (2 og 2p), Myc-DDR2 L63V (3 og 3p), Myc-DDR2 I638F (4 og 4p), Myc-DDR2 villtype (5 og 5p), EGFP-DDR2 786stopp (6 og 6p), EGFP-DDR2 D710A (7 og 7p), EGFP-DDR2 L63V (8 og 8p), EGFP-DDR2 I638F (9 og 9p), og EGFP-DDR2 villtype (10 og 10p). Prøvene ble analysert på 1 % agarosegel i 45 minutter. 1 Kb pluss DNA ladder ble brukt som markør.

brønn 1 og 2 (Figur 6). Det vises en ekstra uforventet brønn mellom 2000 og 5000 basepar i brønnene 1p, og 2p-5p (Figur 6). Det ekstra båndet kan skyldes en ufullstendig kutting.

Setespesifikk mutagenese av DDR2 villtype

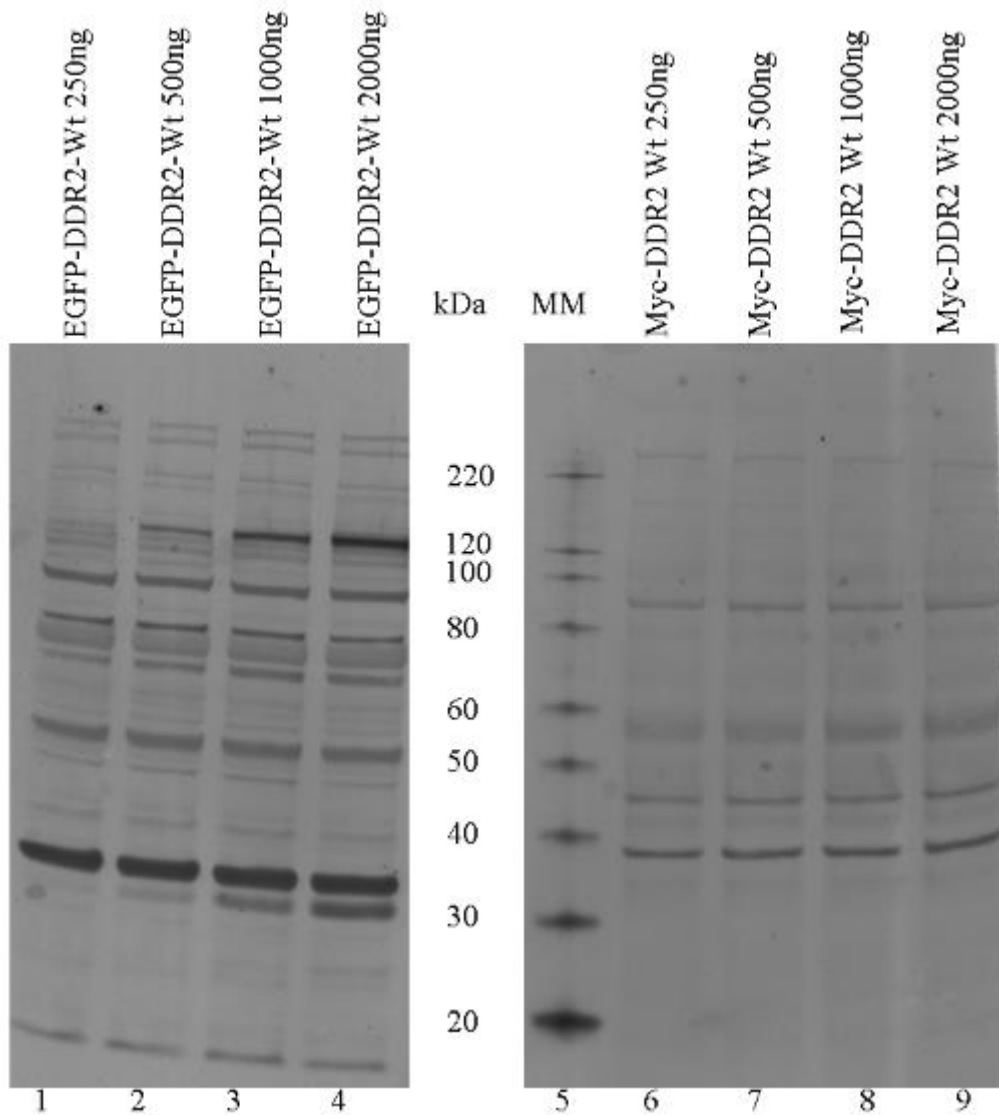
Vi ønsket å reprodusere DDR2 mutasjoner observert hos kreft pasienter. I dette forsøket ønsket vi å lage DDR2 T226A mutanten. Det ble brukt QuickChange setespesifikk mutagenese for å lage denne mutanten. Mutagenesen ble utført som beskrevet i metodekapitlet. Figur 7 viser resultatet fra sekvensering av mutert DDR2 DNA og bekrefter at nukleotidet adenin i DDR2 villtype har blitt til guanin i mutert prøve. Dette fører til endring av aminosyren treonin til alanin.



Figur 7: Sekvenseringsresultatet som viser vellykket mutasjon av DDR2 villtype. Sekvensen av DDR2 villtype er identisk med sekvensen av mutert prøve, unntatt ved basen adenin som har blitt til guanin. Dette fører til endring av kodon ACA til GCA, og dermed syntese av aminosyren treonin istedenfor alanin i de muterte prøvene (MA-01 og MA-02) (Figur laget i Vector NTI Advance® av E. Åberg).

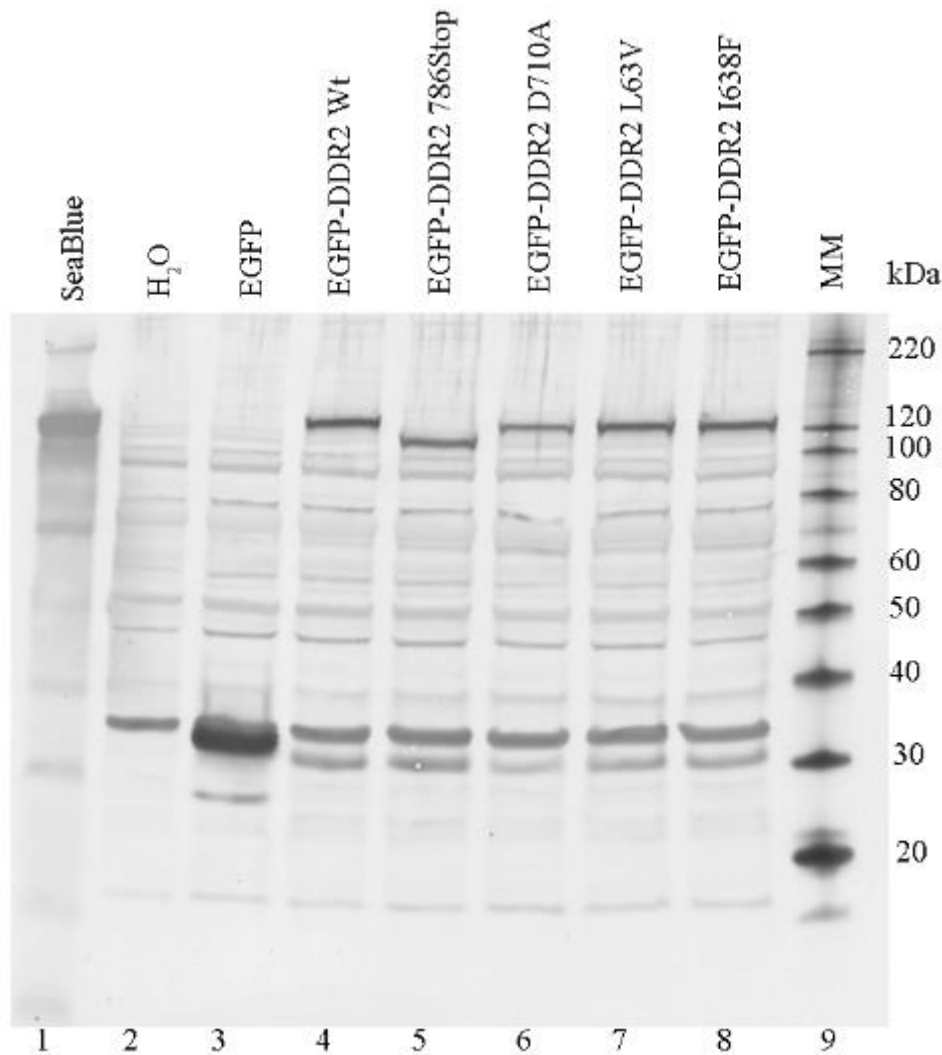
HEK293T celler uttrykte EGFP tagget DDR2 villtype og ulike mutanter, men ikke myc tagget DDR2

For å vise at de ekspresjonsplasmidene vi har konstruert uttrykker EGFP eller myc-tagget DDR2 ble ekstrakter fra transfekterte celler analysert med bruk av westernblotting. Ulike mengder av ekspresjonsvektorer som koder for EGFP-DDR2 villtype (250 ng, 500 ng, 1000 ng, og 2000 ng) ble transfektert i HEK-293T celler. Det samme ble gjort med myc-DDR2 villtype. Ett døgn etter transfeksjon ble ekstraktet høstet og analysert med westernblotting med bruk av anti-EGFP antistoff for ekstrakter fra celler transfektert med EGFP-DDR2 og anti-myc antistoffer for ekstrakter fra celler transfektert med myc-DDR2. Figur 8 viser resultatet av westernblottingen. Vi forventer å se EGFP-DDR2 ved ca. 129 kDa (96.5kDa DDR2+ 32.7 kDa EGFP). I figur 8, (brønn 1-4) blottet med anti-EGFP antistoff ser vi ett bånd som vandrer med forventet størrelsen til EGF-DDR2 villtype. Vi ser også at båndet uttrykkes med økende intensitet, pga. økt konsentrasjon av transfektert plasmid. Vi kunne ikke observere bånd av forventet størrelse i ekstraktene fra cellene transfektert med myc-DDR2 (figur 8, brønn 6-9).



Figur 8: Westernblot av EGFP-DDR2 villtype og Myc-DDR2 villtype. HEK293T celler (400 000/skål) ble sådd ut i 60 mm skål og to dager etter transfektert ved bruk av kalsiumfosfatmetode med 250 ng, 500 ng, 1000 ng, og 2000 ng EGFP-DDR2 villtype og myc-DDR2 villtype. Dagen etter transfeksjon ble cellene høstet og ekstraktene analysert med westernblot. For deteksjon ble det brukt anti EGFP (1:200) som primært antistoff, og antikanin 800 (1:10 000) som sekundært antistoff på membran blottet med ekstrakter fra celler transfektert med EGFP-DDR2 villtype. Det ble brukt anti-myc (1:200) som primært antistoff, og anti mus 800 (1:10 000) som sekundært antistoff på membran blottet med ekstrakter fra celler transfektert med myc-DDR2 villtype. MM; Magic Marker molekylvektstandard stige.

På bakgrunn av resultatene vist i figur 8 valgte vi å bruke ekspresjonsvektorer med EGFP-tag for å studere villtype og muterte varianter av DDR2. Figur 9 viser westernblott av ekstrakter fra utransfektete HEK293 celler og ekstrakter av celler transfektert med ekspresjonsvektorer for EGFP (kontroll) eller ulike mutanter av N-terminal EGFP tagget DDR2 detektert med et anti-EGFP antistoff. Vi ser bånd av forventet størrelse i alle ekstrakter fra de transfektete cellene (figur 9 Brønn 3-8).



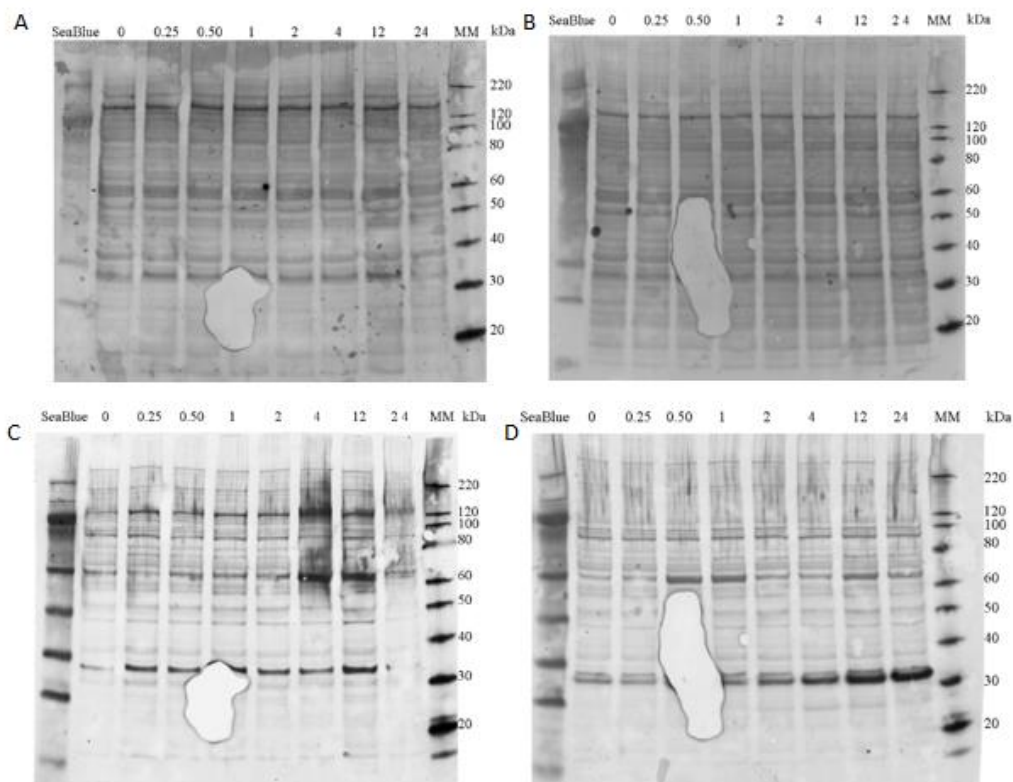
Figur 9: Westernblott som viser uttrykkelsen av EGFP-DDR2 villtype og DDR2 mutanter. HEK293 T celler (400 000 celler/skål) ble sådd ut i 60 mm skål og to dager etter transfektert med 1000 ng EGFP-DDR2 villtype eller ulike EGFP-DDR2 mutanter som indikert på figuren. Dagen etter transfeksjon ble cellene høstet og ekstraktene analysert med bruk av westernblott. For deteksjon ble det brukt anti EGFP (1:200) som primært antistoff og antikanin IR-800 (1:10 000) som sekundært antistoff. MM; Magic Marker

Celler transfektert med EGFP-DDR2 786 stopp viste et bånd som vandrer lengere enn de andre DDR2 mutantene, dette skyldes nonsens mutasjon som lager stoppkodon ved aminosyre nummer 786, noe som fører til kortere protein (figur 9 brønn 5).

Stimulering av DDR2 med kollagen type I

Flere studier har vist at DDR2 blir autofosforylert ved tyrosin aminosyrer i det cytosoliske domene når den aktiveres av forskjellige typer kollagener. Disse studiene viser også at kollagen type I er blant de som gir best aktivering av DDR2. (Konitsiotis, Raynal et al. 2008, Xu, Raynal et al. 2011). I dette forsøket ønsket vi å undersøke kollagen I industert tyrosin autofosforylering av DDR2 uttrykt fra våre ekspresjonsplasmider. Vi ønsket også å undersøke aktiveringskinetikken til DDR2. Først ble HEK293T celler transfektert med EGFP (negativ

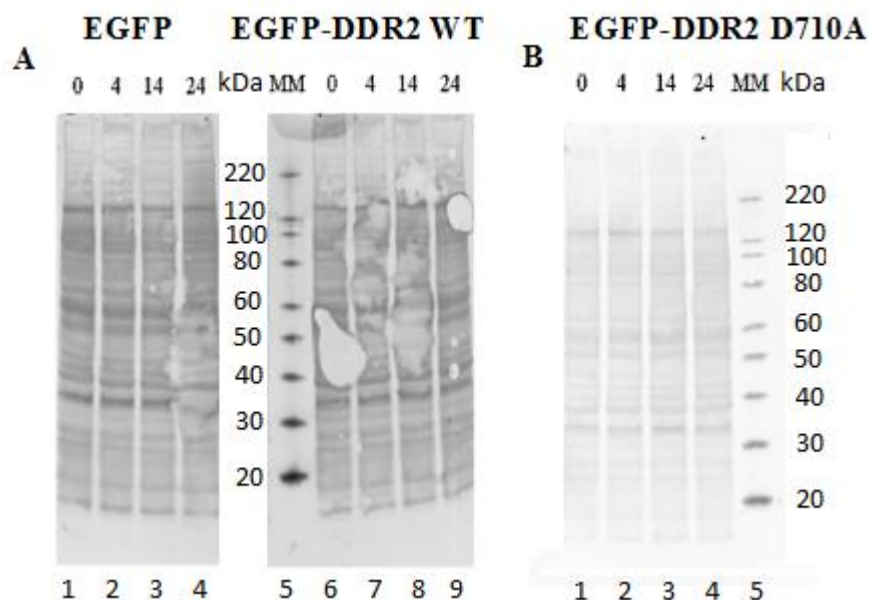
kontroll) og EGFP-DDR2 villtype. Dagen etter transfeksjon ble cellene stimulert ved å tilsette kollagen I (20µg/ml). Cellene ble stimulert i ulike tidspunkter. Deretter ble cellene høstet etter følgende tidspunkter, 0, 15 min, 30 min, 1time, 2 timer, 4 timer, 10 timer, 12 timer og 24 timer. Figur 10 viser resultatet av westernblotting. Figur 10 A) viser westernblot av ekstrakter fra EGFP-DDR2 villtype transfekterte celler, mens 10 B) viser ekstrakter fra EGFP transfekterte celler. Både A og B ble blottet med fosfotyrosin antistoff (4G10), et ikke sekvensspesifikt antistoff som gjenkjenner fosforylert tyrosin. I figur 10 C og D vises reproping av henholdsvis A og B med et anti-EGFP antistoff. Vi forventer å se tyrosin fosforylert DDR2 ved ca. 130 kDa i ekstrakter fra celler transfektert med EGFP-DDR2 og stimulert med kollagen I (figur 10 A). Vi ser ingen unike bånd med økt fosforylerings intensitet i forventet størrelse som ikke vises i ekstraktene fra EGFP transfekterte celler. Dette tyder på mislykket tyrosin autofosforylering av DDR2. Reproping av membranen i figur 10 A viser svakt uttrykk av EGFP-DDR2 proteinene (figur 10 C), mens ingen lignende bånd vises i figur 10 D som inneholder ekstrakter fra EGFP transfekterte celler som er repropet med anti-EGFP.



Figur 10: Westernblot analyse av HEK293T celler transfektert med EGFP-DDR2 og stimulert med Kollagen I. HEK293 T celler (400 000 celler/skål) ble sådd ut i 60 mm skål og to dager etter transfektert vha. kalsiumfosfatmetoden med 1000 ng EGFP-DDR2 villtype (A) og EGFP (B). Dagen etter transfeksjon ble cellene tilsatt 20 µg/ml kollagen I. Deretter ble cellene høstet til angitte tidspunkter (timer) og ekstraktene analysert med bruk av westernblot. I A og B ble det brukt 4G10 (1:1000) som primær antistoff, inkubert overnatt i blokkingsbuffer, og dagen etter brukt anti-mus 800 (1:10 000) som sekundær antistoff. C og D viser reproping av membran i henholdsvis i A og B, med anti-EGFP som primært antistoff, og anti-kanin IR-700 (1:10 000) som sekundært antistoff. MM; Magic Marker med molekylvektstandard stige

Undersøker om serum sulting av celler har effekt på stimulering

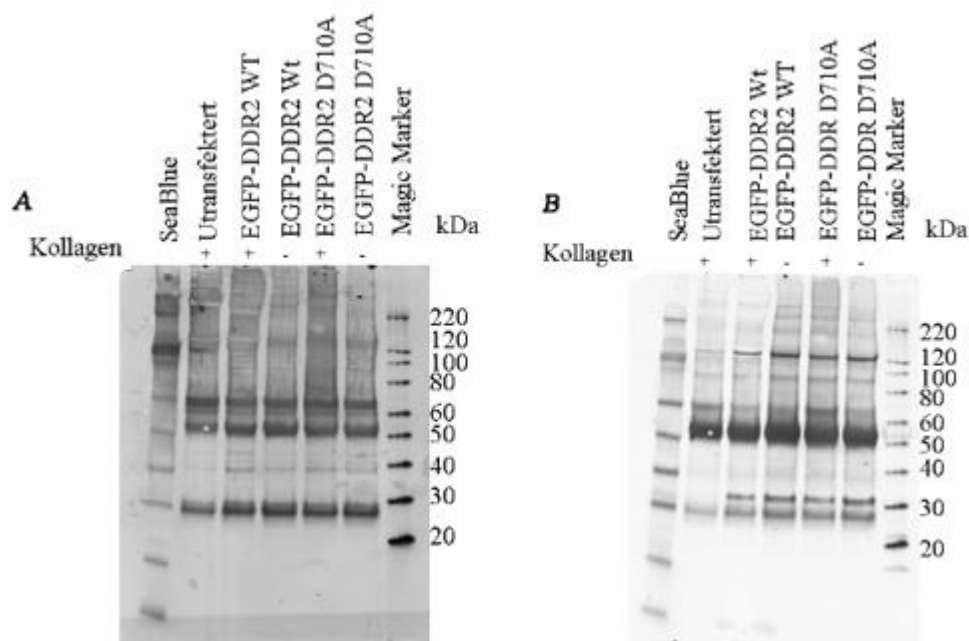
Siden vi ikke observerte økt tyrosinfosorylering i forsøket beskrevet i figur 10, ville vi prøve å serumulte cellene i 24 timer før stimulering med kollagen I. I dette forsøket ble det brukt to forskjellige negative kontroller, den ene EGFP, og den andre en kinase-død mutant, EGFP-DDR2 D710A. I denne mutanten er aspartaten (D) i DFG motivet, som er kritisk for kinasens katalytiske aktivitet, mutert til en alanin(A) og kinasen burde være katalytisk inaktiv. Cellene ble transfektert med 1000 ng av EGFP, EGFP-DDR2 villtype og EGFP-DDR2-D710A. Dagen etter transfeksjonen ble vekstmedium skiftet til serumfattig medium (0,5 % FBS). Cellene ble inkubert i 24 timer med serumfattig medium før de ble stimulert med kollagen I. HEK293T ble tilsatt 20µg/ml kollagen I, og høstet etter 0, 2, 4, og 24 timer. Figur 11 viser resultatet av forsøket. Vi ser ingen bånd som skiller seg fra ikke-transfektete celler og som tyder på DDR2 fosorylering. Vi ser et bånd som vandrer ved ca.120 kDa, og har derfor samme molekylvekt som EGFP-DDR2. Dette båndet kan ikke være det ektopiske uttrykte EGFP-DDR2 plasmidet, siden båndet vises i HEK293T celler som ikke er transfektert med EGFP-DDR2 (figur 11 A, brønn 1-4). Resultatet av dette forsøket indikerer mislykket kollagen I induisert DDR2 tyrosin autofosorylering.



Figur 11: Westernblot analyse av stimuleringsforsøket med Kollagen I. HEK293 T celler (400 000 celler/skål) ble sådd ut i 60 mm skål og to dager etter transfektert ved bruk av kalsiumfosfat med 1000 ng av EGFP, EGFP-DDR2 villtype og EGFP-DDR2 D710A. Dagen etter transfeksjon ble medium erstattet med serum fattig medium (0,5% FBS) og inkubert i 24 timer. Deretter ble 20 µg/ml kollagen I tilsatt til skålene, cellene ble så høstet etter angitte tidspunktet (i timer). For deteksjon ble det brukt 4G10 (1:1000) som primært antistoff, inkubert overnatt i blokkingsbuffer, og dagen etter brukt anti-mus 800 (1:10 000) som sekundært antistoff. MM; Magic Marker

Forsøk med immunopresipitering

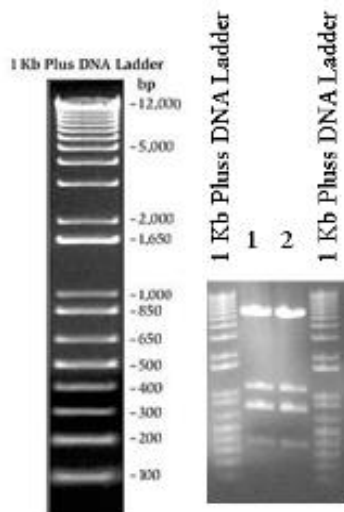
Det neste vi prøvde var å immunopresipitere (IP) EGFP-DDR2 etter høsting av celler. Dette gjorde vi for å eliminere uønskede proteiner i blottet som kan blokkere visualisering av fosforylert DDR2 (for eksempel båndet ved ca.120 kDa i figur 11). I tillegg vil vi med immunopresipitering også oppkonsentrere DDR2 i prøven før westernblott analysen. HEK 293T celler ble sådd ut i 60 mm petriskåler, og etter at de ble 60-70% konfulente, transfektert med EGFP-DDR2 villtype eller EGFP-DDR2 D710A eller en negativ kontroll (H₂O). Dagen etter transfeksjonen ble medium fjernet og erstattet med serumfattig medium (0,5% FBS) og inkubert i 24 timer. Etter inkubasjon ble noen av HEK 293T celler stimulert med kollagen I. Etter 24 timer med stimulering ble HEK293T celler høstet, og deretter ble IP gjennomført som beskrevet i metodekapittelet. Figur 12 viser resultatet av westernblottingen. I figur 12 A blottet med 4G10 antistoffet ser vi ingen bånd som tyder på DDR2 tyrosin autofosforylering. Reprising i figur 12 B viser at EGFP-DDR2 proteinene ble uttrykt og immunopresipitert fra de transfekterte cellene, men ikke i utransfekteerte celler.



Figur 12: Westernblot analyse av immunopresipiterte proteiner fra kollagen I stimulerede celler. HEK293 T celler (400 000 celler/skål) ble sådd ut i 60 mm skål og to dager etter transfektert ved bruk av kalsiumfosfat med 2000 ng av EGFP-DDR2 villtype, EGFP-DDR2 D710A, og negativ kontroll (utransfekttert, H₂O). Dagen etter transfeksjon ble medium erstattet med serum fattig medium (0,5% FBS) og inkubert i 24 timer. Deretter ble stimulerede celler tilsatt 40 µg kollagen I til 2 ml medium, merket (+), mens ikke stimulerede celler ble ikke tilsatt kollagen I, merket (-). Etter 24 timers stimulering ble både stimulerede og ikke stimulerede celler høstet og IP ble utført som beskrevet i metode kapitelet fra ekstraktene. Immunopresipitatet ble så analysert med westernblotting. I A) ble det brukt 4G10 (1:1000) som primært antistoff, inkubert overnatt i blokkingsbuffer, og dagen etter brukt anti-mus 800 (1:10 000) som sekundært antistoff. B) viser repreciping av membranen med anti-EGFP som primært antistoff, og anti-kanin 700 (1:10 000) som sekundært antistoff. Molekylvektstandard stige

Forsøk med c-terminalt tagget DDR2

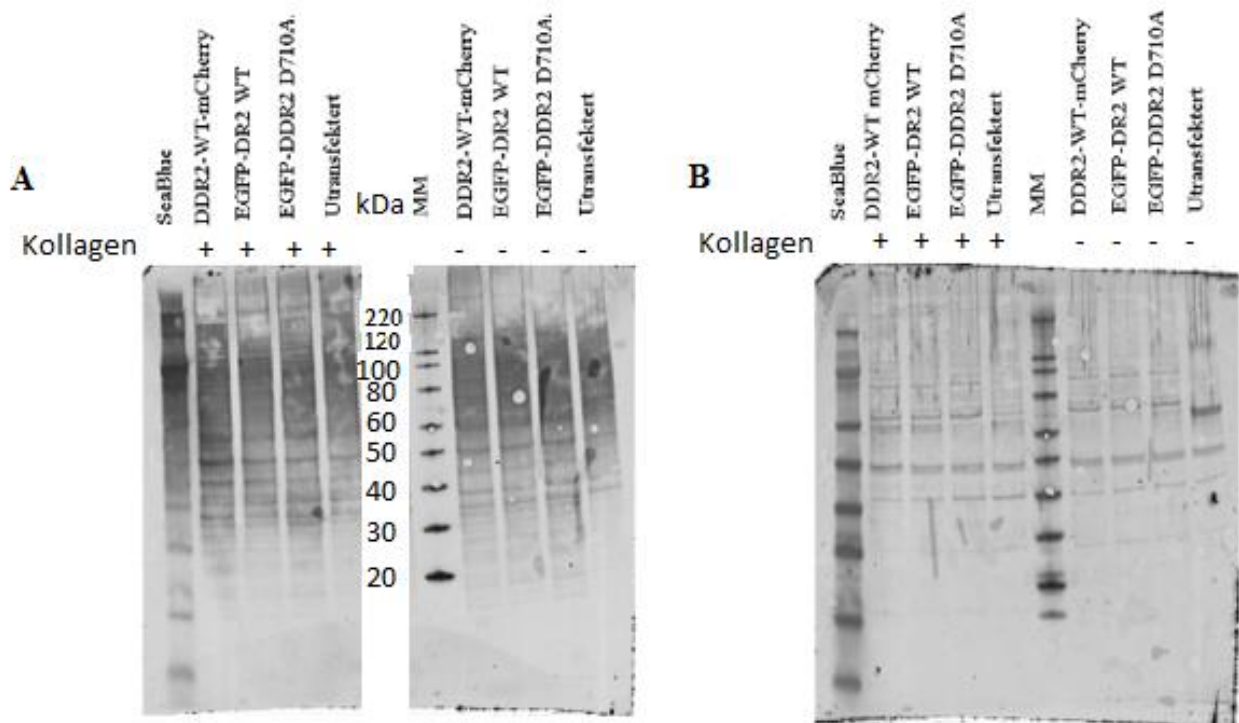
Siden vi ikke observerte tyrosine fosforylering av DDR2 etter immunopresipitering, ville vi undersøke om mangel på DDR2 aktivering kan skyldes at vi har en N-terminal EGFP tag. Derfor ble c-terminal tag av DDR2 laget. LR reaksjon ble gjennomført som beskrevet i metode kapitlet samt mini og midi-prep. Ekspresjonsvektor som ble laget hadde c-terminal mCherry tag på DDR2 villtype. Restriksjonsanalyse med BsrG1 viser fire DNA fragmenter (figur 13). Fragmentene som vises ved ca. 400, 750 og 1100 basepar stemmer med de teoretiske fragmentene (Vedlegg 3). I tillegg til disse tre DNA fragmentene forventes en fragment ved ca.4000 basepar. I figur 13 vises en fragment ved ca. 5000 basepar i brønn 1 og 2, men det er vanskelig å bestemme størrelse på dette fragmentet pga. uspesifikk størrelsesmarkør.



Figur 13: Restriksjonsanalyse av C-terminal mCherry tagget DDR2 villtype. Det ble brukt restriksjonsenzymet BsrGI for å kutte plasmidene. Plasmidene ble renset med Mini-prep og det ble plukket to kolonier fra samme agarplate, brønn 1 og 2. Brønn 1 og 2 inneholder fragmenter fra DDR2 WT-mCherry. Prøvene ble analysert på 1% agarosegel i 45 minutter. 1 Kb plus DNA ladder ble brukt som markør. Størrelsen på ulike fragmenter er vist til venstre.

Konstruert c-terminal mCherry tagget DDR2 villtype ble transfektert i HEK293T celler med kalsiumfosfatmetoden. I tillegg til DDR2-wt mCherry ble også EGFP-DDR2 wt og EGFP-DDR2 D710A plasmidene transfektert inn i HEK293T celler. N-terminal EGFP tagget DDR2 ble inkludert denne gangen også fordi vi ville prøve å stimulere cellene med “coatet” kollagen. Dagen etter transfeksjon ble medium skiftet til serumfattig og inkubert i 24 timer. Deretter ble cellene stimulert med kollagen. I dette forsøket ble skålene coatet med kollagen I (Roche) som beskrevet i metodekapitlet. Transfektete celler ble overført til skåler med

“coatet” kollagen ved splitting med trypsin og suspensjon i totalt 2 ml vekstmedium. 1 ml av celsuspensjon ble overført til brønner “coatet” med kollagen, og resten til brønner uten kollagen “coating”. Cellene ble stimulert i 24 timer før høsting og westblott analyse. Resultatet av westernblottingen er vist i figur 14. Stimuleringsforsøket med DDR2-mCherry mislyktes, reproping av membranen med EGFP antistoff viste ingen uttrykk av EGFP-DDR2 villtype eller EGFP-DDR2 D710A (figur 14). Ingen mCherry antistoff ble brukt for å undersøke uttrykk av DDR2 wt-mCherry plasmidet.

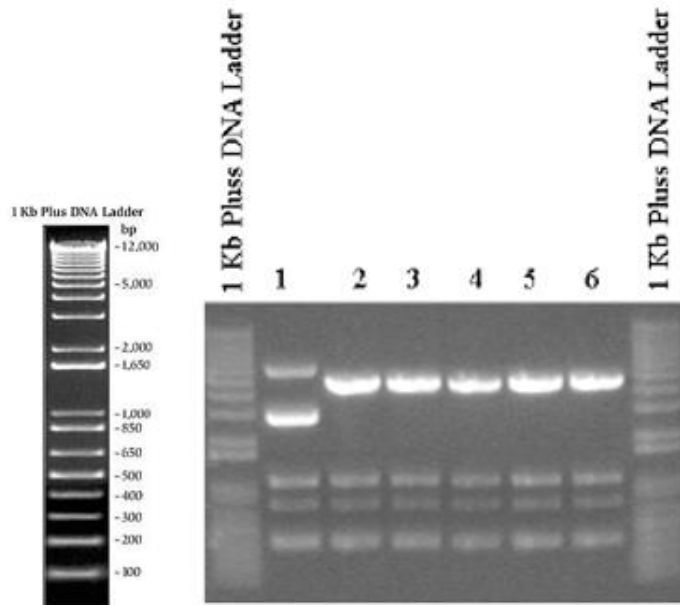


Figur 14: Westernblot av stimuleringsforsøket med kollagen I av HEK 293T celler transfektet med DDR2-villtype-mCherry, EGFP-DDR2 wt og EGFP-DDR2 D710A. HEK293 T celler (400 000 celler/skål) ble sådd ut i 60 mm skål og to dager etter transfektet ved bruk av kalsiumfosfat med 2000 ng av EGFP-DDR2 villtype, EGFP-DDR2 D710A, og negativ kontroll (uttransfektet, H₂O). Dagen etter transfeksjon ble medium erstattet med serumfattig medium (0,5% FBS) og inkubert i 24 timer. Deretter ble cellene stimulert med kollagen I (Roche) i 24 timer. Stimulering ble gjennomført ved å "coate" brønner i 6 brønners Brett med kollagen I. Deretter ble HEK 293 celler flyttet fra 60 mm skåler til 6 brønners Brett ved å splitting. 1 ml av celsuspensjon ble overført til brønner med kollagen I (+) og 1 ml til brønner uten kollagen I (-). Etter 24 timer med stimulering ble cellene høstet, sentrifugert og ekstraktet analysert med westernblot. I A) ble det brukt 4G10 (1:1000) som primært antistoff, inkubert overnatt i blokkingsbuffer, og dagen etter brukt anti-mus 800 (1:10 000) som sekundært antistoff. B) viser reproping av membranen med anti-EGFP som primært antistoff, og anti-kanin 700 (1:10 000) som sekundært antistoff. MM; Magic Marker molekylvektstandard stige

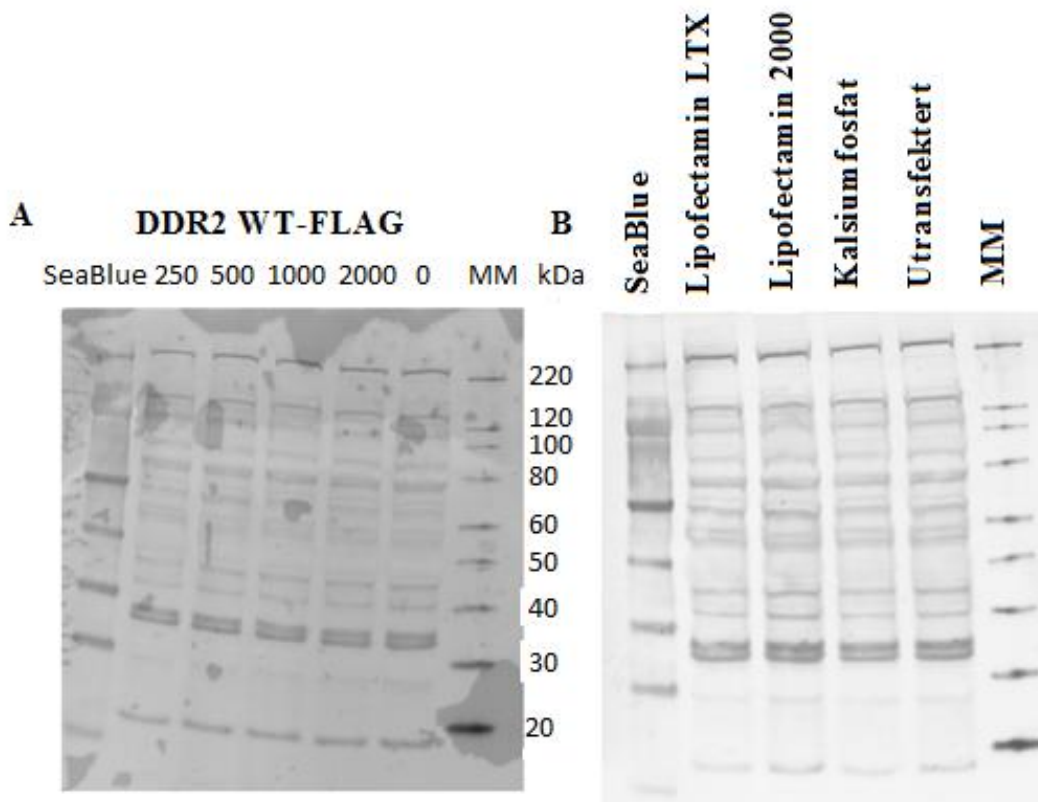
Forsøker å uttrykke DDR2 WT-Flag med ulike transfeksjonsmetoder

Ekspementene vist i figur 14 viste at vi ikke fikk effektiv uttrykk av EGFP-DDR2 og vi ønsket å prøve ulike transfeksjonsmetoder for å undersøke om det er forskjell i transfeksjonseffektiviteten mellom de forskjellige metodene og om vi kunne øke uttrykket av DDR2 proteinene våre. I og med at vi i eksperimentene beskrevet i figurene 10,11, 12, og 14 ikke fikk induisert autofosforylering av DDR2 med uttrykk av N-terminalt tagget DDR2 ønsket vi å bruke C-terminalt tagget DDR2. For å kunne gjøre dette måtte vi først konstruere ekspresjonsvektorer for uttrykk av c-terminal FLAG tagget DDR2. Dette ble gjort med bruk av Gateway rekombinasjonsreaksjon. Etter rekombinasjon ble restriksjonsenzym analyse utført for å bekrefte at plasmidene var korrekte. Resultatet av restriksjonsanalyse med BsrG1 er vist i figur 15. Vi forventer å se fire synlige fragmenter med størrelser på ca. 400, 750, 1100 og 4300 basepar (Vedlegg 4). Observerte fragmenter i brønnene 2-6 i figur 15 stemmer med forventede fragmenter. Brønn 1 (DDR2-wt FLAG) i samme figuren viser en ekstra bånd ved litt over 2000 basepar, samt at forventet fragment ved ca. 4300 basepar observeres ved litt over 5000 basepar. Dette kan indikere en feil i plasmidet eller ufullstendig kutting.

I det neste del ønsket vi å transfektere de konstruerte ekspresjonsvektorene i HEK293T celler for å undersøke deres uttrykk. Det ble gjennomført to eksperimenter, i det ene forsøket ble ulike mengder av DDR2-Flag transfektert i HEK293T ved å bruke lipofektamin LTX metoden (figur 16A). I det andre forsøket ble ulike transfeksjonsmetoder brukt for å transfektere DDR2 wt-Flag, og disse inkluderer Lipofektamin LTX, Lipofektamin 2000 og kalsiumfosfat metoden (figur 16B). FLAG-tag er ca. 1 kDa, og derfor vil DDR2 wt-FLAG vandre omtrent ved ca. 98 kDa. I westernblottet med anti-FLAG antistoff (figur 16) ser vi ingen unike bånd med økt intensitet i forventet størrelse som ikke vises i ekstraktene fra utransfektete celler. Dette indikerer at uttrykk av DDR2 wt-FLAG ikke var vellykket. Det samme gjelder DDR2 wt-FLAG transfektert med ulike transfeksjonsmetoder vist i figur 16B. Ingen bånd som indikerer uttrykk av proteinet vises ved ca. 98 kDa.



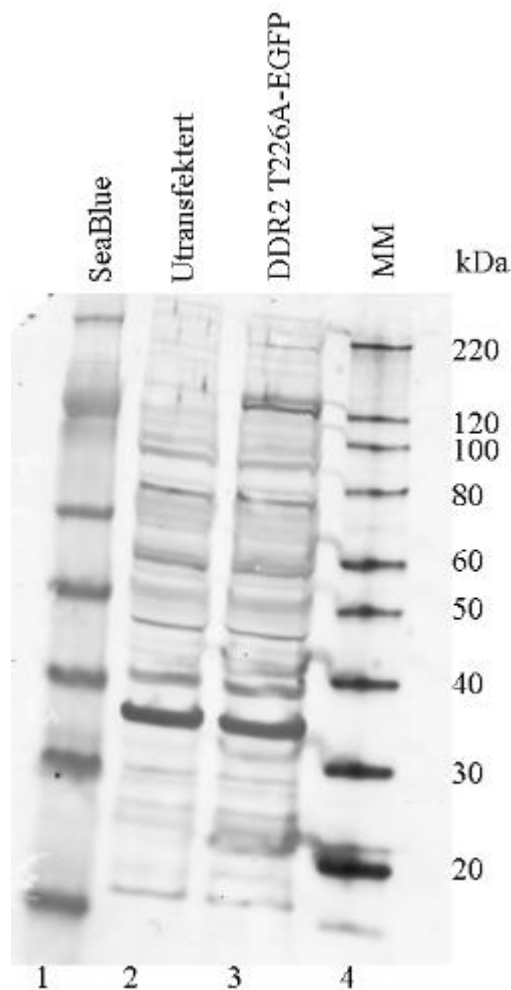
Figur 15: Restriksjons analyse av FLAG tagget DDR2 villtype og ulike mutanter. Det ble brukt restriksjonsenzymet BsrGI for å kutte plasmidene. Plasmidene ble renset med Mini-prep. Brønnene inneholder fragmenter fra, 1: DDR2 wt-FLAG, 2: DDR2 D710A-FLAG, 3: DDR2 T226A-FLAG, 4: DDR2 I638F-FLAG, 5:DDR2 786 Stop-FLAG, 6: DDR2 L63V-FLAG. Prøvene ble analysert på 1% agarosegel i 45 minutter. 1 Kb pluss DNA ladder ble brukt som markør. Størrelsen på ulike fragmenter er vist til venstre



Figur 16: Uttrykksforsøk av DDR2 wt- FLAG samt forsøk med ulike transfeksjonsmetoder. HEK 293T (1000 000) celler ble sådd ut på 60 mm skåler og dagen etter transfektet med DDR2-wt FLAG. A) Ulike mengder (ng) av DDR2 wt-FLAG transfektet i HEK293T med Lipofectamin LTX. Dagen etter ble cellene høstet og ekstraktene analysert med bruk av westernblott. B) ulike transfeksjonsmetoder ble brukt til å transfektere DDR2 wt-FLAG i HEK293T celler som beskrevet i metode kapitlet. 1000 ng FLAG ble brukt i alle metodene. Dagen etter transfeksjon ble cellene høstet og ekstraktene analysert med bruk av westernblott. For både A og B ble det brukt anti-FLAG mus (1:500) som primært antistoff. Som sekundært antistoff ble det brukt 800 CW Donkey anti-mus IgG. MM; Magic Marker. molekylvektstandard stige

DDR2 T226A-EGFP uttrykkes i HEK293 celler

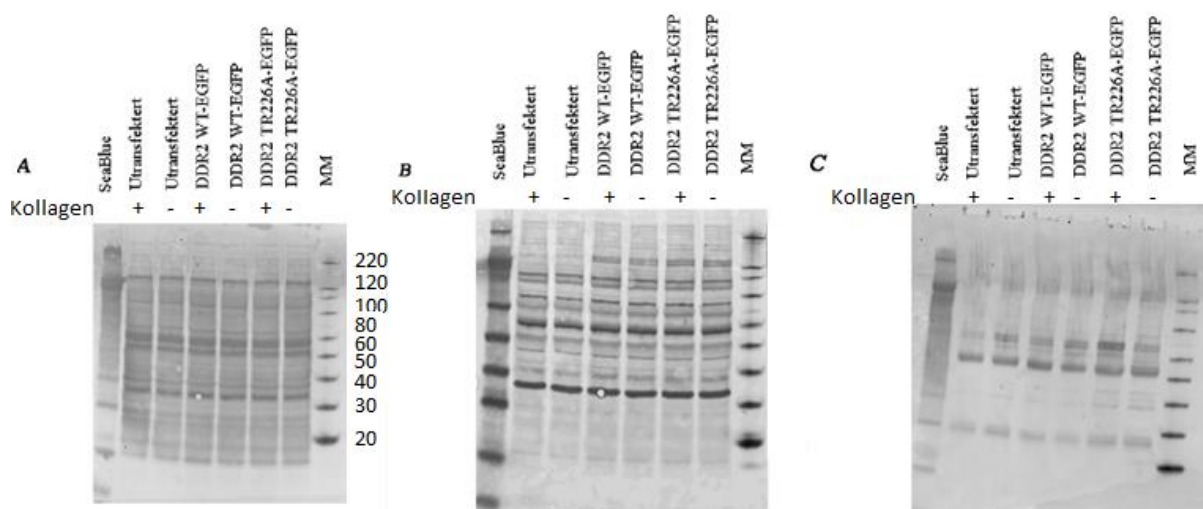
Siden DDR2 wt Flag ikke ble uttrykt, ville vi undersøke om c-term EGFP tag kunne uttrykkes. Først ble ekspresjonsvektoren med c-term EGFP tag laget med Gateway rekombinasjonsreaksjon. Restriksjonsanalyse viste vellykket kloning (data ikke vist). Lipofectamin LTX ble brukt som transfeksjonsmetode. DDR2 T226A-EGFP plasmidet ble transfektert inn i HEK293T celler. Westernblottingen med anti-EGFP antistoff viser resultatet av forsøket (figur 17). I figuren ser vi et bånd som vandrer ved ca. 130 kDa i ekstraktet fra transfekterte celler (Brønn 3), ingen lignende bånd vises i ekstraktet fra utransfektete celler (Brønn 2). Dette tyder på vellykket uttrykk av DDR2 T226A-EGFP proteinet fra vårt plasmid.



Figur 17: Westernblot analyse som viser uttrykk av DDR2 T226A-EGFP. HEK293 T celler (400 000 celler/skål) ble sådd ut i 60 mm skål og to dager etter transfektert ved bruk av Lipofectamin LTX med 2000 ng av DDR2 T226A-EGFP, og negativ kontroll (utransfektert, H₂O). Dagen etter transfeksjon ble cellene høstet og ekstraktene analysert med bruk av westernblot. For deteksjon ble det brukt anti EGFP(1:200) som primært antistoff. Det ble brukt 800CW Donkey anti-kanin IgG som sekundært antistoff (1:10 000). MM; Magic Marker med molekylvektstandard stige

Stimulering av DDR2 WT-EGFP og DDR2 T226A-EGFP transfektert i HEK 293T celler

I dette forsøket ville vi undersøke om c-terminal EGFP tagget DDR2 wt og DDR2 T226A mutant blir autofosforylert av kollagen type I (Sigma). Transfektete HEK293T celler ble stimulert med “coatet” kollagen I (Sigma) som beskrevet i metodekapittelet. Resultatet er vist i figur 18. Resultatene vist i figuren indikerer at stimuleringsforsøket ikke var vellykket med hensyn på autofosforylering av DDR2 (figur 18A). Reproping av membranen med EGFP antistoff viser at DDR2 uttrykkes, men svakt (figur 18B). Det neste vi prøvde var å immunopresipitere DDR2-EGFP for å fjerne proteiner som kan forstyrre visualisering av fosfo-DDR2-EGFP (figur 18C). Vi kan se i dataene vist i figur 13 C at vi ikke kan påvise fosforylering av DDR2 etter IP.

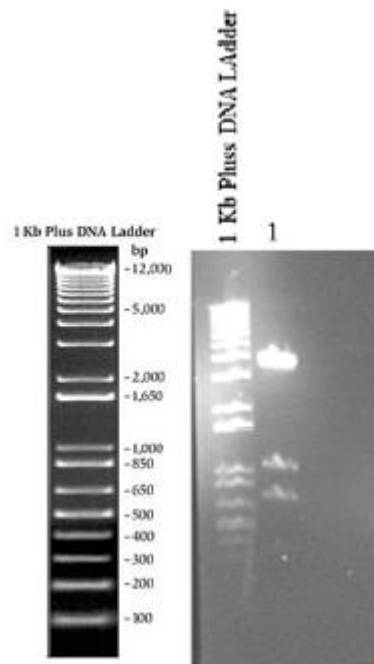


Figur 18: Westernblot analyse av stimuleringsforsøket med kollagen I. HEK 293T (400 000 000 celler/skåler) ble sådd ut på 60 mm skåler og 2 dager etter transfektert med 2000 ng av DDR2 wt-EGFP og DDR2 T226A-EGFP. En uttransfektet skål ble inkludert. Det ble brukt Lipofectamin LTX som transfeksjonsmetode. Dagen etter transfeksjon ble medium erstattet med serumfattig medium (0,5% FBS) og inkubert i 24 timer. Deretter ble HEK 293T celler stimulert med kollagen I (Sigma). Stimulering ble utført ved å først “coat” 6 brønners Brett med kollagen I (Sigma) som beskrevet i metode kapitelet. Deretter ble cellene splittet fra 60 mm skåler og overført til 6 brønners Brett “coated” med kollagen I. Cellene ble stimulert i 20 timer. Deretter ble cellene høstet og ekstraktene analysert med bruk av westernblot. . I A) ble det brukt 4G10 (1:1000) som primært antistoff, inkubert overnatt i blokkingsbuffer, og dagen etter brukt anti-mus 800 (1:10 000) som sekundært antistoff. B) viser reproping av membranen med anti-EGFP som primært antistoff, og anti-kanin 700 (1:10 000) som sekundært antistoff. I C) ble det utført IP som beskrevet i metodekapitelet, så western blot. Her ble det også brukt 4G10 (1:1000) som primært antistoff, inkubert overnatt i blokkingsbuffer, og dagen etter brukt anti-mus 800 (1:10 000) som sekundært antistoff. MM; Magic Marker.

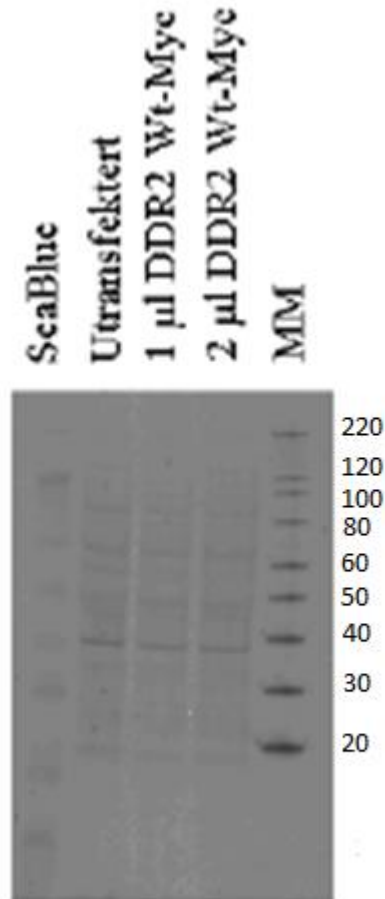
Transfeksjon med c-terminal myc-tagget DDR2 villtype.

Det siste epitoptaggen vi har prøvd er et c-terminalt myc-tagget DDR2 villtype. Gateway rekombinasjons reaksjon ble brukt til å lage myc-tagget DDR2 villtype. Restriksjonsanalyse er vist i figur 19. Vi forventer å se 4 synlige DNA fragmenter (400, 750, 1100 og 3700 basepar) etter kutting av plasmidet med restriksjonsenzymet BsrG1 (vedlegg 5). Det ble observert godt synlige fragmenter ved ca.750, 1100 og 3700, DNA fragmentet ved ca. 400 basepar er godt ikke synlige.

Vi ønsket å undersøke om konstruert plasmid uttrykkes i HEK293T. Figur 20 viser resultatet etter transfeksjon av DDR2 wt-myc plasmidet med Lipofectamin LTX metoden. Vi forventer å se DDR2 wt-myc ved ca. 98 kDa, men ingen bånd av forventet størrelse vises i westernblottet av ekstraktet i de transfekterte celler. Dette indikerer at uttrykk av DDR2 wt-myc ikke var vellykket.



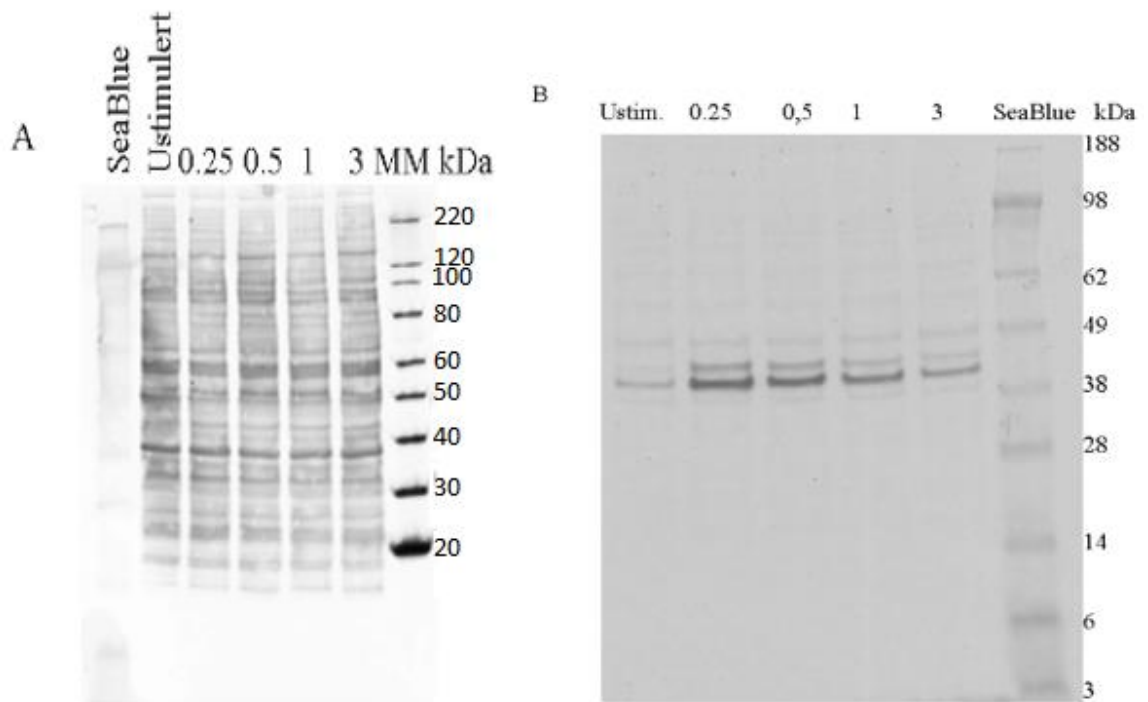
Figur 19: Restriksjonsanalyse av c-terminal myc-tagget DDR2 villtype. Det ble brukt restriksjonsenzymet BsrGI for å kutte plasmidene. Plasmidene ble rensset med Mini-prep. Brønn 1 inneholder fragmenter fra DDR2 WT-Myc. Prøven ble analysert med 1% agarosegel i 45 minutter. 1 Kb pluss DNA ladder ble brukt som markør.



Figur 20: Westernblot analyse av c-terminal myc-tagget DDR2. HEK293 T celler (400 000 celler/skål) ble sådd ut i 60 mm skål og to dager etter transfektet ved bruk av Lipofectamin LTX med 1 µl og 2 µl av DDR2 wt-myc (716 ng/ µl). Dagen etter transfeksjon ble cellene høstet og ekstraktene analysert med bruk av westernblott. Det ble brukt anti-myc (1:200) som primært antistoff, og anti-mus 800 (1:10 000) som sekundært antistoff. MM; Magic Marker.

Testing av 4G10 antistoff

I dette forsøket ville vi teste om antistoffet vi bruker, 4G10, er fortsatt aktiv og om den virker optimalt. H1299 celler ble stimulert med 50 ng/ ml av epidermal vekst faktor, EGF i 0,25, 0,5, 1 og 3 timer. Vi forventer at reseptoren til EGF blir tyrosin fosforylert. Vi forventer å se et bånd som vandrer ved ca. 170 kDa og som indikerer fosforylering av tyrosin aminosyrer i EGF reseptoren. Figur 16 viser resultatet av forsøket. Ingen bånd av forventet størrelse vises i ekstraktene stimulert med EGF med bruk av 4G10 antistoffet (figur 16A). I westernblottet vist i figur 16B ble det brukt fosfo ERK1/2 spesifikk antistoff på samme ekstraktet. Westernblottet viser et bånd av ERK1/2 ved ca. 40 kDa. Fosforylering av ERK1/2 er avhengig av oppstrøm tyrosinkinase. Resultatet indikerer at tyrosinkinasene er aktive, men 4G10 antistoffet er ikke effektiv til å identifisere dem.



Figur 21: Westernblot analyse av EGF stimulerter H1299 celler. 500 000 celler/skål ble sådd ut i 60 mm skål, dagen etter stimulert med 50 ng/ml epidermal vekst faktor, EGF i angitte tidspunkter (timer). Etter stimulering ble cellene høstet og ekstraktene analysert med bruk av westernblot. I A) Ble det brukt 4G10(1:1000) som primært antistoff, inkubert overnatt i TBS-T, og dagen etter brukt anti-mus 800 (1:10 000) som sekundært antistoff. I B) ble det brukt fosfo-p44/42 MAPK(ERK1/2)(Thre202/Tyr204)(1:10 000) som primært antistoff, og anti-mus 800 (1:10 000) som sekundært antistoff. MM; Magic Marker, Ustim; Ustimulert.

4. DISKUSJON

Flere studier har vist at mutasjoner i DDR2 genet forekommer i flere typer kreft og spesielt er dette godt dokumentert hos lungekreftpasienter (Hammerman, Sos et al. 2011). Til tross for den rike dokumentasjon av mutasjoner er det få studier som har studert de funksjonelle konsekvensene av DDR2 mutasjonene. I denne studien har vi forsøkt å etablere et system som gjør det mulig å studere funksjonelle konsekvenser av DDR2 mutasjoner *in vitro*.

Konstruksjon av DDR2 mutanter

DDR2 mutasjoner ble laget ved å bruke QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit. Fordelene med å bruke denne type PCR basert mutagenese metode er at den teknisk enkel å gjennomføre. Denne metoden ble valgt fordi den er best egnet for introduksjon av punkt mutasjoner, siden den krever bruk av oligonukleotider under PCR amplifikasjon (Stratagene 2010).

De fleste DDR2 mutasjonene var allerede laget i entrykloner før prosjekt start, med unntak av DDR2 T226A som ble laget i starten av prosjektet. Vellykket mutasjon i ønsket aminosyre ble påvist i sekvenseringsanalyse. Sekvenseringsanalyser viste også at ingen andre uønskete mutasjoner ble innført i DDR2.

Konstruksjon av ekspresjonsvektorer

For å kunne detektere DDR2 *in vitro* ble det laget ekspresjonsvektorer av DDR2 tagget med N-terminal myc og EGFP. En av fordelene med å bruke epitoptagging er at det gjør det mulig å bruke effektive og vel karakteriserte antistoffer for å detektere protein uttrykk. En ulempe er at epitoptaggen kan i noen tilfeller interferere med protein struktur og funksjon (Jarvik and Telmer 1998).

Restriksjonsanalyse av DDR2 viser at EGFP tagget DDR2 kuttet som forventet (Figur 6). Når det gjelder myc-tagget DDR2, viser to brønner riktig kuttingsmønster (Brønn 1 og 2), mens i resten (brønnene 1p, 2p, 3, 3p, 4, 4p, 5, 5p) vises et ekstra DNA fragment i området mellom 2000 og 5000 basepar. Det ekstra fragmentet kan skyldes ufullstendig kutting pga. for lite restriksjonsenzym, siden intensiteten ved båndet ved ca. 5000 er svakere sammenlignet med brønner med fullstendig kutting

Ekspresjon av EGFP-DDR2 wt og Myc-DDR2 wt

Etter å ha bekreftet at kloningsreaksjon var vellykket var neste trinn å uttrykke begge DDR2 taggene i HEK293T celler. Ulike mengder av EGFP-tagget DDR2 wt og myc-tagget DDR2 wt plasmider ble transfektert inn i HEK293T celler for å studere deres ekspresjonsprofil. Vi klarte å påvise EGFP-DDR2 wt, men ikke Myc-DDR2 wt uttrykk i transfekterte HEK celler. Det ble ikke gjort forsøk på å finne ut hvorfor HEK293T celler ikke uttrykte myc-DDR2 wt. Det er midlertidig flere teoretiske feilkilder som kan medføre mangel på protein uttrykk. Det er lite sannsynlig at mangel på uttrykk av myc-DDR2 wt skyldes at plasmidet ikke ble transfektert inn i HEK293 celler, siden myc-tagget DDR2 ble transfektert parallelt med EGFP tagget DDR2 og akkurat samme transfeksjonskjemikalier brukt i begge eksperimentene. I kloningsreaksjoner derimot har restriksjonsanalyse vist at kuttingsmønsteret på DDR2 ikke i samsvar med forventete fragmenter. Mangel på uttrykk av myc-tagget DDR2 wt i HEK293T celler indikerer at det uforventede ekstrabåndet observert i restriksjonsanalyse skyldes sannsynligvis ikke ufullstendig kutting som tidligere foreslått. Mangel på uttrykk kan forklares med at den brukte N-terminal myc destinasjonsvektoren i kloningsreaksjonen ikke fungerer optimalt på grunn av for eksempel deleksjon av viktige sekvenser i plasmidet som promoter sekvens og enhancer region. Restriksjonsanalyse er ikke sensitiv nok til å detektere tap av små sekvenser. Fragmentet vi observer ved ca. 5000 basepar kommer mest sannsynlig fra destinasjonsvektor, siden BsrG1 kutter ved attL og attR setene og ingen andre steder i destinasjonsvektor (figur 6) (Vedlegg 2). Den nøyaktige teoretiske størrelse på 5000 basepar fragmentet vi observer i figur 6 i brønnene 1-5 er 5426 basepar. Det er i midlertidig umulig å bestemme denne eksakte teoretiske størrelsen ut fra brukt størrelsesmarkør i restriksjonsanalyse. Sekvenseringsanalyse er mer sensitiv enn restriksjonsanalyse, og vil derimot avsløre om vi har fullstendig og optimal ekspresjonsvektor. Transfeksjon og uttrykk av EGFP-DDR2 mutantene inn i HEK293T celler var også vellykket. Ekspresjon av EGFP-DDR2 villtype og mutanter ble observert ved ca. 130 kDa. Ikke-transfekteerte celler viste ingen uttrykk av EGFP-DDR2. Det er kjent at DDR2 utsettes for posttranslasjonelle endringer i form av N-glykosylering (Phan, Wong et al. 2013). N-glykosylering av proteiner bidrar til folding og stabilisering av nylig syntetiserte polypeptidkjeder samt transport fra endoplasmatisk retikulum (ER) til celle overflate via Golgi apparatet. Phan og medarbeidere viste at Ha-tagget DDR2 transfektert i HEK293T celler uttrykker flere ulike isoformer av DDR2. Forfatterne viste i westernblot analyse at ekstrakter fra DDR2 transfekteerte celler uttrykker DDR2 ved følgende størrelser: 100-kDa,

110kDa, 120kDa, og 130 kDa. Disse forskjellige molekylmassene av DDR2 representerer ulike grad av glykosylering. I tillegg har Phan og medarbeidere påvist at DDR2 med molekylmassen 130 kDa er den mest funksjonellaktive formen og som derimot autofosforyleres ved kollagen I stimulering (Phan, Wong et al. 2013). I motsetning til dette viser våre westernblot analyser at vårt rekombinant DDR2 ikke utsettes for N-glykosylering i transfekterte celler, siden vi ikke observerte uttrykk av EGFP-DDR2 ved molekylmasse som tyder på at proteinet utsettes for N-glykosylering. Dermed tyder dette på det uttrykte EGFP-DDR2 vi observerer i våre westerblot analyser er ikke den funksjonellaktive isoformen. Vi viste ikke rollen av glykosylering i forhold til DDR2 funksjon i det tidspunktet forsøket ble gjennomført, og har derfor ikke gjort noe for å undersøke hvorfor vi ikke observerer N-glykosylert form av DDR2 i våre westernblot. Men en forklaring kan være at det båndet vi ser stammer fra EGFP-DDR2 som ligger i cytoplasma, og som ikke har blitt utsatt for glykosylering og transport til cellemembranen. Det kan også skyldes bruk av et svakt lyseringsbuffer som ikke oppløser glykosylert DDR2 fra cellemembranen.

Stimulering av DDR2 med kollagen type I

Protein fosforylering er den vanligste posttranslasjonelle modifikasjon i cellene, og brukes til å modulere protein funksjon. De fleste RTK blir autofosforylert som følge av ligandbinding (Hubbard and Miller 2007). Flere studier har vist at kollagen inducerer DDR2 autofosforylering (Shrivastava, Radziejewski et al. 1997, Vogel, Gish et al. 1997). I denne delen av oppgaven ønsket vi derfor å påvise kollagen industert autofosforylering av DDR2. Vogel og medarbeidere har vist at DDR2 aktivering er langsom og øker med tiden. De fant også at kollagen I og III gir best fosforylering og at konsentrasjon på 10-20 µg/ml gir maksimum fosforylering av DDR2 (Vogel, Gish et al. 1997). Basert på dette ble første forsøket med DDR2 satt opp for å vise den langsomme aktiveringskinetikken til DDR2. HEK293T celler ble transfektert med EGFP-DDR2 villtype og en negativ kontroll (EGFP). For å detektere tyrosin fosforylering brukte vi antistoffet, 4G10. Dette antistoffet ble brukt i de fleste studier om DDR2, mest pga. at det er et generelt tyrosin antistoff som gjenkjenner et bredt spekter av tyrosin fosforylerte proteiner (Sawasdikosol 2010).

Westernblot av det første forsøket med kollagen stimulering av HEK293T celler viste ingen tyrosin fosforylering, selv om reproping av membranen viste at DDR2 uttryktes i EGFP-DDR2 wt transfekterte celler. I motsetning til artikler som har vist tyrosinfosforylering av DDR2, har vi ikke serumultet cellene før stimulering med kollagen I. Serumulting av celler utføres av flere grunner blant annet som en rutine prosedyre for å forberede cellene for et

forsøk i et serumfritt miljø og for å redusere basal cellulær aktivitet. Serumsulting av celler fjerner både kjente og ukjente forstyrrende faktorer som kan interferere med eksperimentets resultater (Pirkmajer and Chibalin 2011). På bakgrunn av dette har vi endret oppsettet av forsøket til å inkludere serumsulting av celler i 24 timer før stimulering med kollagen I. Denne intervensjonen førte ikke til økt autofosforylering av DDR2. For å kunne observere autofosforylert DDR2 er det nødvendig med høyt ekspresjon av proteinet (Sawasdikosol 2010). Innledende forsøk med DDR2 uttrykk viste svakt ekspresjon av DDR2. På bakgrunn av dette har vi prøvd å immunopresipitere EGFP-DDR2 for å oppkonsentrere DDR2 i prøven før westernblot analysen. Selv om EGFP-DDR2 proteinene ble immunopresipitert og uttrykt, ble ingen tyrosinfosforylering observert. I dette forsøket har vi ikke oppnådd forventet oppkonsentrering av EGFP-DDR2 proteinene. Ikke vellykket oppkonsentrering kan skyldes blant annet ufullstendig lysering av proteinet/cellelysatsen, for lite antistoff, eller at proteinet vaskes bort pga. for svakt binding til antistoffet. Det ble ikke gjennomført optimalisering av immunopresipiteringsprotokollen for å oppkonsentrere EGFP-DDR2 proteinene. Vi undersøkte heller om mangel på DDR2 aktivering skyldtes den N-terminale EGFP taggen. De fleste proteiner kan tagges enten på N-terminal enden eller c-terminal enden uten å påvirke proteinets funksjon. Men i noen tilfeller kan tagging ved det N-terminale enden eller ved det C-terminale enden påvirke proteinets tre dimensjonale struktur og dermed funksjon (Jarvik and Telmer 1998). Teoretisk kan det tenkes at N-terminal tag påvirker/forstyrrer kollagenbinding til DDR2 eller fører til destabilisering av DDR2 struktur, og dermed hindre kollagen industert fosforylering av DDR2. På bakgrunn av dette tagget vi DDR2 med et c-terminalt mCherry tag. Stimulering med kollagen I av celler transfektert med DDR2-mCherry var heller ikke vellykket, siden vi ikke observerte tyrosin fosforylering i western fra celler transfektert med DDR2-mCherry. Reprising av membranen viste at brukt kontroll, EGFP-DDR2 villtype ikke var uttrykt i dette forsøket (Figur 14). Dermed kan mulig årsak til mangel på DDR2 autofosforyleringen i dette eksperimentet skyldes dårlig uttrykk av DDR2-Cherry proteinet. Denne mangel på uttrykk av EGFP-DDR2 kan skyldes reduksjon i transfeksjonseffektivitet. Kalsiumfosfatmetoden ble brukt som transfeksjonsmetode i dette forsøket. Denne metoden er enkel å gjennomføre, men involverer flere kritiske parametere. Den mest vanlige kritiske parameteren som fører til mislykket transfeksjon er en HEPES bufret salt løsning som ikke lenger holder riktig pH. For optimal transfeksjon bør HEPES ha en pH mellom 7,05 og 7,12, noe som er veldig smalt. En annen ulempe med kalsiumfosfatmetoden er dannelsen av et tungt presipitat som kan føre til celledød. Det tunge presipitatet dannes pga. endring i pH i medium til surt miljø under transfeksjonsprosessen (Kingston, Chen et al.

2003). På bakgrunn av at vi ofte observerte mye celledød dagen etter transfeksjon med kalsiumfosfatmetoden, og enda mer celledød etter ett døgn med serumsulting, ville vi prøve andre transfeksjonsmetoder. Vi sammenlignet kalsiumfosfatmetoden med lipofectamine 2000 og lipofectamine LTX. Vi brukte disse transfeksjonsmetodene til å transfektere EGFP-DDR2 i HEK293T celler. Visuell undersøkelse under fluorescens mikroskop viste best transfeksjonseffektivitet av EGFP-DDR2 ble oppnådd med bruk av lipofectamin LTX metoden (data ikke vist). Vi ønsket å bekrefte disse resultatene i westernblotanalyse. I tillegg ønsket vi å prøve et nytt DDR2 tagg. Derfor brukte vi et c-terminalt FLAG tagget DDR2 villtype for å illustrere observert forskjell i transfeksjonseffektivitet mellom de tre transfeksjonsmetodene.

Westernblottingen med anti-FLAG viste ingen uttrykk av DDR2 villtype. Vi kunne dermed ikke bekrefte observert forskjell i transfeksjonseffektivitet med bruk av western blott. Mangel på uttrykk av FLAG tagget DDR2 villtype kan skyldes en feil i kloningsreaksjon. Dette er vist i restriksjonsanalyse av FLAG tagget DDR2 villtype (Figur 15, brønn 1).

Vi valgte å gå videre med å bruke lipofectamin LTX som transfeksjonsmetode i påfølgende forsøk. I neste forsøk ønsket vi å fortsette med undersøke hypotesen om at mangel på DDR2 autofosforylering vi observerte i første forsøket skyldtes en N-terminal EGFP tag. Et c-terminalt EGFP tagget DDR2 mutant (T226A) ble transfektert i HEK293T celler. Westernblot analyse viste et bånd ved ca. 130 kDa i transfekterte celler. Ingen liknende bånd ble observert i ikke-transfektete celler (Figur 17). I neste forsøk undersøkte vi om denne mutanten og DDR2-EGFP villtype blir autofosforylert i transfektete celler etter stimulering med kollagen I. Ingen fosforylering av DDR2 proteinene ble observert. Dette tyder på at det er lite sannsynlig at plassering av EGFP-taggen (enten på c-terminal eller N-terminal enden) er avgjørende for kollagen induert autofosforylering av DDR2. Mangel på uttrykk av c-terminalt myc, c-terminalt FLAG, og N terminalt myc taggete DDR2 proteiner gjør at vi ikke kan konkludere noe om effekt av lokalisering av disse taggene i forhold til reseptor fosforylering.

I denne oppgaven har vi i noen forsøk valgt å stimulere cellene ved å først "coate" brønnene med kollagen, inkubere i noen timer til alt væske fordampet, og så splitte DDR2 transfektete celler til brønner med "coatet" kollagenlag. Bakgrunnen for dette er studier som brukte "coatet" kollagen til å indusere DDR2 autofosforylering (Zhang, Corsa et al. 2013) (Vogel, Gish et al. 1997). I tillegg ligner "coatet" kollagen mer på *in vivo* kollagen, siden det meste av *in vivo* kollagen forekommer i immobilisert form som en del av ECM (Vogel, Gish et al. 1997). Vi tenkte også at "coating" med kollagen vil gi bedre adhesjon og kontakt med cellene,

noe som kan muligens hjelpe med å bedre deteksjon av DDR2 tyrosin autofosforylering. Til tross for dette har vi ikke observert DDR2 autofosforylering i eksperimentene der kollagen “coating” ble brukt.

På bakgrunn av dette forsøkte vi å finne ut andre årsaker som kan ha ført til at vi ikke observerer DDR2 aktivering. Vi undersøkte om antistoffet vi bruker, 4G10 er god nok til å gjenkjenne fosforylerte tyrosiner. Min medstudent Gurjit Kaur stimulerte H1299 celler med EGF og viste ERK1/2 fosforylering med et ERK1/2 fosfospesifikt antistoff (Figur 21 B).

Fosforylering av ERK1/2 er avhengig av oppstrøm tyrosin signalering, f. eksempel aktivering av EGF reseptor som er en tyrosinkinase. Samme ekstraktet ble blottet med 4G10.

Westernblottet viste ingen tyrosinfosforylerte proteiner i EGF stimulerte celler. Dette er en indirekte indikasjon på at antistoffet 4G10 ikke fungerer optimalt og forklarer hvorfor vi ikke observerer tyrosinfosforylering av DDR2. En annen indikasjon som tyder på at 4G10 antistoffet ikke lenger effektivt til å gjenkjenne tyrosinfosforylering er at vi har oppbevart antistoffet ved -18 °C, mens produsenten av 4G10 anbefaler at antistoffet må oppbevares ved 2-8 °C (Millipore 2014). Dette tyder på at feil oppbevaring av antistoffet har ført til redusert gjenkjenning av fosforylert tyrosin. Det fins i tillegg andre aktuelle svakheter i forsøkene som kan ha bidratt til mislykket induksjon av DDR2 tyrosin fosforylering. En av disse er at fosfotyrosin antistoffet ikke effektivt til å detektere svake fosfotyrosin signaler som skyldes for lite uttrykt protein. Dette problemet anses som mest vanlig feilkilde når fosfotyrosin ikke detekteres i westernblot (Sawadikosol 2010). I samsvar med dette viser våre westernblot fra ekstrakter transfektert med EGFP tagget DDR2 proteiner at DDR2 uttrykkes svakt i HEK293T celler. Det svake uttrykket kommer mest sannsynlig fra proteiner som ligger i cytoplasma og som ikke har blitt transportert til cellemembranen. Bruk av et svakt lysesbuffer som ikke løser opp cellemembranen fullstendig medfører at aktive EGFP taggete DDR2 proteiner sedimenteres sammen med cellemembranen i pelleten under sentrifugering. Dermed inneholder supernatanten som ble brukt til western kun ubundet og inaktiv protein fra cytoplasma.

For bedre lysing av cellemembranen må man bruke en lysesbuffer som inneholder en sterk detergent. Vårt MAPKK lysesbuffer inneholdte en svak ikke-ionisk detergent, 1% Triton X-100. Et eksempel på en bedre detergent som ofte blir brukt er natrium dodecyl sulfat (SDS). Dette er en sterk an-ionisk detergent med liten hydrofil hodegruppe som gir effektiv lysing av membranen pga. dens evne til å solubilisere lipider og proteiner. En ulempe med bruk av SDS er den denaturerende effekten den på proteinstruktur (Arnold and Linke 2008).

Man kan også bruke en lyseringsbuffer som inneholder en kombinasjon av flere detergenter for å bedre lysering av cellene. Dette ble brukt av for eksempel (Iwai, Payne et al. 2013) for å lysere HEK293 celler som uttrykker DDR2. Forfatterne brukte RIPA lyseringsbuffer som inneholder følgende detergenter 1% Nonidet P40, 1% natrium deoxycholate og 0,1 % SDS.

DDR2 som behandlingsmål i persontilpasset kreftmedisin

Persontilpasset kreftbehandling baseres på identifisering av kreft spesifikke mutasjoner som er avgjørende for kreft progresjon vha. sekvenseringsmetoder. Når onkogene mutasjoner er identifisert hos den enkelte pasienten, kan man undersøke om fins tilgjengelig behandling mot de spesifikke mutasjonene. For eksempel er det vist at lungekreftpasienter med mutasjoner i EGFR responderer på gefitinb (Gonzalez de Castro, Clarke et al. 2013).

Funn gjort av Hammerman og medarbeidere indikerer at DDR2 mutasjoner kan være onkogene og er involvert i kreft utvikling. Squamous karcinoma cellelinjer som har DDR2 mutasjoner ble selektivt drept av DDR2 knockdown eller av behandling med en tyrosin kinase inhibitor, dasatinib. Dette tyder på DDR2 kan være en potensiell behandlingsmål for NSCLC pasienter som har disse mutasjonene (Hammerman, Sos et al. 2011). I tråd med dette har Zhang et al. funnet en forhøyet ekspresjon av DDR2 som følge av gen amplifisering hos 5 % av pasienter undersøkt med av invasiv bryst tumor. I tillegg identifiserte forfatterne en mekanisme for hvordan DDR2 bidrar til metastasering av brystkreft. Dette skjer via stabilisering av SNAIL1, en sterk induser av EMT *in vitro* og *in vivo* (Zhang, Corsa et al. 2013). Dette gjør DDR2 et attraktivt mål for behandling av bryst kreft metastaser. Hvordan eventuelt mutanter av DDR2 viker i dette systemet er fortsatt ukjent. I tillegg ser det ut som at de onkogene egenskapene til DDR2 mutantene funnet av (Hammerman, Sos et al. 2011) å være kompliserte, siden de identifiserte DDR2 mutasjonene er ikke begrenset til få lokaliserte aminosyrer, men involverer mange forskjellig aminosyrer spredt i forskjellige DDR2 regioner. Den inhiberende effekt av DDR2 på proliferasjon av melanoma kreftceller motsier en potensiell onkogen rolle av DDR2 mutantene (Wall, Werner et al. 2005). I tillegg viser ektopisk uttrykk av både DDR2 villtype og mutasjoner inn i HEK293 celler en reduksjon i kolonidannelse sammenlignet med kontroll (Iwai, Luczynski et al. 2014). En vellykket målrettet legemiddelbehandling mot DDR2 forutsetter at vi kjenner de grunnleggende DDR2 funksjoner i både kreft og normale celler. Flere studier er nødvendige for validering av DDR2 som legemiddelmål i kreftbehandling.

5. KONKLUSJON

I denne oppgaven har forsøkt å etablere et system for å kunne studere funksjonelle konsekvenser av DDR2 mutasjoner *in vitro*. Det vi oppnådde med denne oppgaven er vellykket *in vitro* syntese av DDR2 mutasjoner observert hos lungekreftpasienter, kloning av DDR2 entrykloner i EGFP destinasjonsvektor og vellykket uttrykk av disse vektorene i HEK293T celler. Stimulering av DDR2 transfekterte HEK293T celler med den naturlige liganden for DDR2, kollagen I, har ikke gitt forventet autofosforylering av DDR2. Flere eksperimenter ble utført for å avklare mulige årsaker for manglende deteksjon av tyrosin autofosforylert DDR2 i westernblot analyse. Disse forsøkene tyder på at både lavt uttrykk av proteinet, tap av bindingskapasitet til antistoffet og/eller redusert glykosylering av DDR2 kan ha bidratt til mangel på deteksjon av fosfotyrosin signaler fra DDR2.

Å vite hvordan DDR2 mutasjoner påvirker kjente nedstrømssignaler for DDR2 vil bidra med å bedre vår forståelse for DDR2 rolle i kreft utvikling. I tillegg vil funksjonelle studier av DDR2 mutasjoner avklare om DDR2 kan være et mål for legemiddelbehandling.

Sammenlignet med andre RTK er det mange ubesvarte grunnleggende spørsmål om DDR2 funksjon både i normale celler og i kreftceller.

6. Referansliste

- Afonso, P. V., et al. (2013). "Discoidin domain receptor 2 regulates neutrophil chemotaxis in 3D collagen matrices." Blood **121**(9): 1644-1650.
- Al-Kindi, A., et al. (2014). "A novel mutation in DDR2 causing spondylo-meta-epiphyseal dysplasia with short limbs and abnormal calcifications (SMED-SL) results in defective intra-cellular trafficking." BMC Med Genet **15**(1): 42.
- Ali, B. R., et al. (2010). "Trafficking defects and loss of ligand binding are the underlying causes of all reported DDR2 missense mutations found in SMED-SL patients." Hum Mol Genet **19**(11): 2239-2250.
- Arnold, T. and D. Linke (2008). "The use of detergents to purify membrane proteins." Curr Protoc Protein Sci **Chapter 4**: Unit 4.8.1-4.8.30.
- Badiola, I., et al. (2012). "Discoidin domain receptor 2 deficiency predisposes hepatic tissue to colon carcinoma metastasis." Gut **61**(10): 1465-1472.
- Badiola, I., et al. (2011). "Downregulation of discoidin domain receptor 2 in A375 human melanoma cells reduces its experimental liver metastasis ability." Oncol Rep **26**(4): 971-978.
- Blume-Jensen, P. and T. Hunter (2001). "Oncogenic kinase signalling." Nature **411**(6835): 355-365.
- Bonifacino, J. S. and E. C. Dell'Angelica (2001). "Immunoprecipitation." Curr Protoc Cell Biol **Chapter 7**: Unit 7.2.
- Carafoli, F. and E. Hohenester (2013). "Collagen recognition and transmembrane signalling by discoidin domain receptors." Biochim Biophys Acta **1834**(10): 2187-2194.
- Chen, S. C., et al. (2008). "Hypoxia induces discoidin domain receptor-2 expression via the p38 pathway in vascular smooth muscle cells to increase their migration." Biochem Biophys Res Commun **374**(4): 662-667.
- Chua, H. H., et al. (2008). "Upregulation of discoidin domain receptor 2 in nasopharyngeal carcinoma." Head Neck **30**(4): 427-436.
- Chui, M. H. (2013). "Insights into cancer metastasis from a clinicopathologic perspective: Epithelial-Mesenchymal Transition is not a necessary step." Int J Cancer **132**(7): 1487-1495.
- Cox, T. R. and J. T. Erler (2011). "Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer." Dis Model Mech **4**(2): 165-178.
- Dullin, C., et al. (2007). "Semi-automatic classification of skeletal morphology in genetically altered mice using flat-panel volume computed tomography." PLoS Genet **3**(7): e118.

- Entschladen, F., et al. (2004). "Tumour-cell migration, invasion, and metastasis: navigation by neurotransmitters." Lancet Oncol **5**(4): 254-258.
- Fu, H. L., et al. (2013). "Discoidin domain receptors: unique receptor tyrosine kinases in collagen-mediated signaling." J Biol Chem **288**(11): 7430-7437.
- Futreal, P. A., et al. (2005). "Somatic mutations in human cancer: insights from resequencing the protein kinase gene family." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **70**: 43-49.
- Gibthai (2008). "Gateway® technology." Tilgjengelig fra http://www.gibthai.com/services/technical_detail.php?ID=15. Lastet ned 02.05.14
- Gonzalez de Castro, D., et al. (2013). "Personalized cancer medicine: molecular diagnostics, predictive biomarkers, and drug resistance." Clin Pharmacol Ther **93**(3): 252-259.
- Gschwind, A., et al. (2004). "The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy." Nat Rev Cancer **4**(5): 361-370.
- Hammerman, P. S., et al. (2011). "Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer." Cancer Discov **1**(1): 78-89.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Hartley, J. L., et al. (2000). "DNA cloning using in vitro site-specific recombination." Genome Res **10**(11): 1788-1795.
- Hawley-Nelson, P., et al. (2001). Transfection of Cultured Eukaryotic Cells Using Cationic Lipid Reagents. Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc.
- Herrera-Herrera, M. L. and R. Quezada-Calvillo (2012). "DDR2 plays a role in fibroblast migration independent of adhesion ligand and collagen activated DDR2 tyrosine kinase." Biochem Biophys Res Commun **429**(1-2): 39-44.
- Hirano, S. (2012). "Western blot analysis." Methods Mol Biol **926**: 87-97.
- Hubbard, S. R. and W. T. Miller (2007). "Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling." Curr Opin Cell Biol **19**(2): 117-123.
- Inoue, H., et al. (1990). "High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids." Gene **96**(1): 23-28.
- Invitrogen. "Gateway® Cloning Protocols." Tilgjengelig fra <http://www.lifetechnologies.com/no/en/home/life-science/cloning/gateway-cloning/protocols.html>. Lastet ned 09.09.2013

Invitrogen (2003). "Gateway® Technology
A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in
multiple systems". Tilgjengelig fra
<http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/gatewayman.pdf>. Lastet
ned 09.09.2013

Iwai, L. K., et al. (2014). "Discoidin domain receptors: a proteomic portrait." Cell Mol Life Sci.

Iwai, L. K., et al. (2013). "Phosphoproteomics of collagen receptor networks reveals SHP-2 phosphorylation downstream of wild-type DDR2 and its lung cancer mutants." Biochem J **454**(3): 501-513.

Jarvik, J. W. and C. A. Telmer (1998). "Epitope tagging." Annu Rev Genet **32**: 601-618.

Johnson, J. D., et al. (1993). "A receptor tyrosine kinase found in breast carcinoma cells has an extracellular discoidin I-like domain." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(12): 5677-5681.

Karsenty, G. (2003). "The complexities of skeletal biology." Nature **423**(6937): 316-318.

Kawai, I., et al. (2012). "Discoidin domain receptor 2 (DDR2) regulates proliferation of endochondral cells in mice." Biochem Biophys Res Commun **427**(3): 611-617.

Khosravi, R., et al. (2014). "Collagen advanced glycation inhibits its Discoidin Domain Receptor 2 (DDR2)-mediated induction of lysyl oxidase in osteoblasts." Bone **58**: 33-41.

Kim, D., et al. (2014). "The intracellular juxtamembrane domain of discoidin domain receptor 2 (DDR2) is essential for receptor activation and DDR2-mediated cancer progression." Int J Cancer.

Kingston, R. E., et al. (2003). "Calcium phosphate transfection." Curr Protoc Mol Biol **Chapter 9**: Unit 9.1.

Klatt, A. R., et al. (2009). "Discoidin domain receptor 2 mediates the collagen II-dependent release of interleukin-6 in primary human chondrocytes." J Pathol **218**(2): 241-247.

Klein, S., et al. (2005). "Killing time for cancer cells." Nat Rev Cancer **5**(7): 573-580.

Konitsiotis, A. D., et al. (2008). "Characterization of high affinity binding motifs for the discoidin domain receptor DDR2 in collagen." J Biol Chem **283**(11): 6861-6868.

Kramer, N., et al. (2013). "In vitro cell migration and invasion assays." Mutation Research/Reviews in Mutation Research **752**(1): 10-24.

Labrador, J. P., et al. (2001). "The collagen receptor DDR2 regulates proliferation and its elimination leads to dwarfism." EMBO Rep **2**(5): 446-452.

- Lamouille, S., et al. (2014). "Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(3): 178-196.
- Lee, J. E., et al. (2007). "Discoidin domain receptor 2 is involved in the activation of bone marrow-derived dendritic cells caused by type I collagen." Biochem Biophys Res Commun **352**(1): 244-250.
- Leitinger, B. (2003). "Molecular analysis of collagen binding by the human discoidin domain receptors, DDR1 and DDR2. Identification of collagen binding sites in DDR2." J Biol Chem **278**(19): 16761-16769.
- Leitinger, B. (2014). "Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions." Int Rev Cell Mol Biol **310**: 39-87.
- Lemmon, M. A. and J. Schlessinger (2010). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." Cell **141**(7): 1117-1134.
- Maeyama, M., et al. (2008). "Switching in discoid domain receptor expressions in SLUG-induced epithelial-mesenchymal transition." Cancer **113**(10): 2823-2831.
- Mihai, C., et al. (2009). "Mapping of DDR1 distribution and oligomerization on the cell surface by FRET microscopy." J Mol Biol **385**(2): 432-445.
- Millipore (2014). "Anit-Phosphotyrosine Anitbody, clone 4G10®." Tilgjengelig fra <http://www.millipore.com/catalogue/item/05-321>. Lastet ned 10.05.2014
- Noordeen, N. A., et al. (2006). "A transmembrane leucine zipper is required for activation of the dimeric receptor tyrosine kinase DDR1." J Biol Chem **281**(32): 22744-22751.
- Olaso, E., et al. (2011). "Loss of discoidin domain receptor 2 promotes hepatic fibrosis after chronic carbon tetrachloride through altered paracrine interactions between hepatic stellate cells and liver-associated macrophages." Am J Pathol **179**(6): 2894-2904.
- Olaso, E., et al. (2001). "DDR2 receptor promotes MMP-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells." J Clin Invest **108**(9): 1369-1378.
- Olaso, E., et al. (2002). "Discoidin domain receptor 2 regulates fibroblast proliferation and migration through the extracellular matrix in association with transcriptional activation of matrix metalloproteinase-2." J Biol Chem **277**(5): 3606-3613.
- Olaso, E., et al. (2011). "Impaired dermal wound healing in discoidin domain receptor 2-deficient mice associated with defective extracellular matrix remodeling." Fibrogenesis Tissue Repair **4**(1): 5.
- Parsons, J. T., et al. (2010). "Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(9): 633-643.

- Phan, T. N., et al. (2013). "Low stability and a conserved N-glycosylation site are associated with regulation of the discoidin domain receptor family by glucose via post-translational N-glycosylation." Biosci Biotechnol Biochem **77**(9): 1907-1916.
- Pirkmajer, S. and A. V. Chibalin (2011). "Serum starvation: caveat emptor." Am J Physiol Cell Physiol **301**(2): C272-279.
- Poudel, B., et al. (2013). "Induction of IL-12 production by the activation of discoidin domain receptor 2 via NF-kappaB and JNK pathway." Biochem Biophys Res Commun **434**(3): 584-588.
- Poudel, B., et al. (2012). "Collagen I enhances functional activities of human monocyte-derived dendritic cells via discoidin domain receptor 2." Cell Immunol **278**(1-2): 95-102.
- Pray, L. A. (2008). "Restriction Enzymes." Nature Education **1**(1): 38.
- Qiagen (2012). QIAGEN® Plasmid Purification Handbook.
- Qiagen (2012). "QIAprep® Miniprep Handbook." Tilgjengelig fra fra <http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/plasmid-dna/qiagen-plasmid-midi-kit#resources>. Lastet ned 13.12.2013
- Robert E. Kingston, C. A. C., Hiroto Okayama and John K. Rose (2003). "Current Protocols in Molecular Biology: Calcium Phosphate Transfection." Tilgjengelig fra <http://www.currentprotocols.com/WileyCDA/CPUnit/refId-mb0901.html>. Lastet ned 10.05.2014
- Roche (2006). Collagen(rat), From rat tail tendon.
- Ruiz, P. A. and G. Jarai (2011). "Collagen I Induces Discoidin Domain Receptor (DDR) 1 Expression through DDR2 and a JAK2-ERK1/2-mediated Mechanism in Primary Human Lung Fibroblasts." Journal of Biological Chemistry **286**(15): 12912-12923.
- Sawasdikosol, S. (2010). "Detecting tyrosine-phosphorylated proteins by Western blot analysis." Curr Protoc Immunol **Chapter 11**: Unit 11.13.11-11.
- Shendure, J. A., et al. (2011). "Overview of DNA sequencing strategies." Curr Protoc Mol Biol **Chapter 7**: Unit7.1.
- Shoulders, M. D. and R. T. Raines (2009). "Collagen structure and stability." Annu Rev Biochem **78**: 929-958.
- Shrivastava, A., et al. (1997). "An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors." Mol Cell **1**(1): 25-34.
- Shyu, K. G., et al. (2009). "Hyperbaric oxygen activates discoidin domain receptor 2 via tumour necrosis factor-alpha and the p38 MAPK pathway to increase vascular smooth

muscle cell migration through matrix metalloproteinase 2." Clin Sci (Lond) **116**(7): 575-583.

Sigma-Aldrich (2001). Collagen Solution, Type I. From rat tail Sigma-Aldrich, Sigma-Aldrich, Inc.

Stratagene (2010). "QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit." Tilgjengelig fra <http://www.chem-agilent.com/pdf/strata/200518.pdf>. Lastet ned 06.09.2013

Tsai, J. H. and J. Yang (2013). "Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis." Genes Dev **27**(20): 2192-2206.

Valiathan, R. R., et al. (2012). "Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression." Cancer Metastasis Rev **31**(1-2): 295-321.

Van der Eb, A. J., et al. (1977). "Transformation with specific fragments of adenovirus DNAs. I. Isolation of specific fragments with transforming activity of adenovirus 2 and 5 DNA." Gene **2**(3-4): 115-132.

Vogel, W., et al. (1997). "The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen." Mol Cell **1**(1): 13-23.

Wall, S. J., et al. (2005). "Discoidin domain receptor 2 mediates tumor cell cycle arrest induced by fibrillar collagen." J Biol Chem **280**(48): 40187-40194.

Walsh, L. A., et al. (2011). "Discoidin domain receptor 2 is a critical regulator of epithelial-mesenchymal transition." Matrix Biol **30**(4): 243-247.

Xu, H., et al. (2011). "Collagen binding specificity of the discoidin domain receptors: binding sites on collagens II and III and molecular determinants for collagen IV recognition by DDR1." Matrix Biol **30**(1): 16-26.

Xu, J., et al. (2014). "Overexpression of DDR2 contributes to cell invasion and migration in head and neck squamous cell carcinoma." Cancer Biol Ther **15**(5).

Yan, Z., et al. (2014). "Discoidin domain receptor 2 facilitates prostate cancer bone metastasis via regulating parathyroid hormone-related protein." Biochim Biophys Acta.

Yang, K., et al. (2005). "Tyrosine 740 phosphorylation of discoidin domain receptor 2 by Src stimulates intramolecular autophosphorylation and Shc signaling complex formation." J Biol Chem **280**(47): 39058-39066.

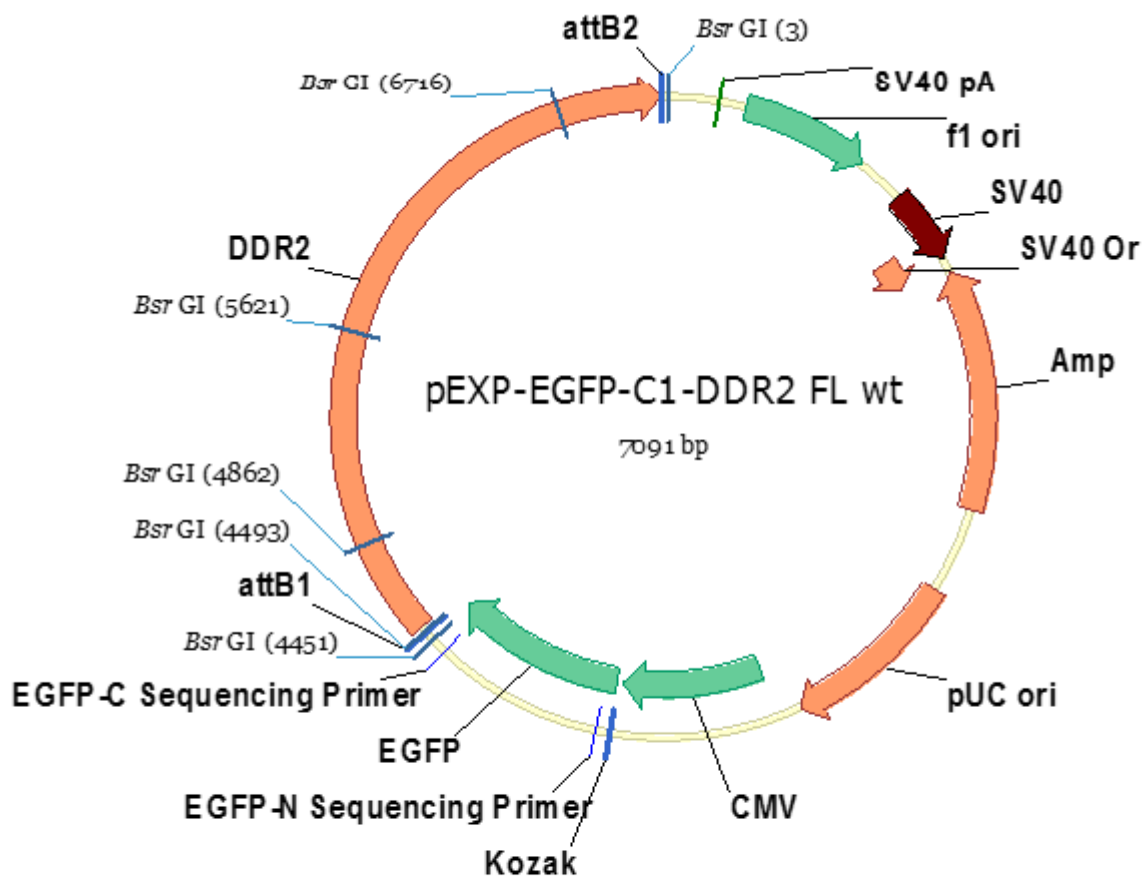
Zhang, K., et al. (2013). "The collagen receptor discoidin domain receptor 2 stabilizes SNAIL1 to facilitate breast cancer metastasis." Nat Cell Biol **15**(6): 677-687.

Zhang, Y., et al. (2011). "An essential role of discoidin domain receptor 2 (DDR2) in osteoblast differentiation and chondrocyte maturation via modulation of Runx2 activation." J Bone Miner Res **26**(3): 604-617.

7. Vedlegg

Vedlegg 1:

Vektorkart av N-terminal EGFP tagget DDR2 som viser restriksjonssteder til restriksjonsenzymet BsrGI samt størrelse på genererte fragmenter. Laget i Vector NTI av E. Åberg

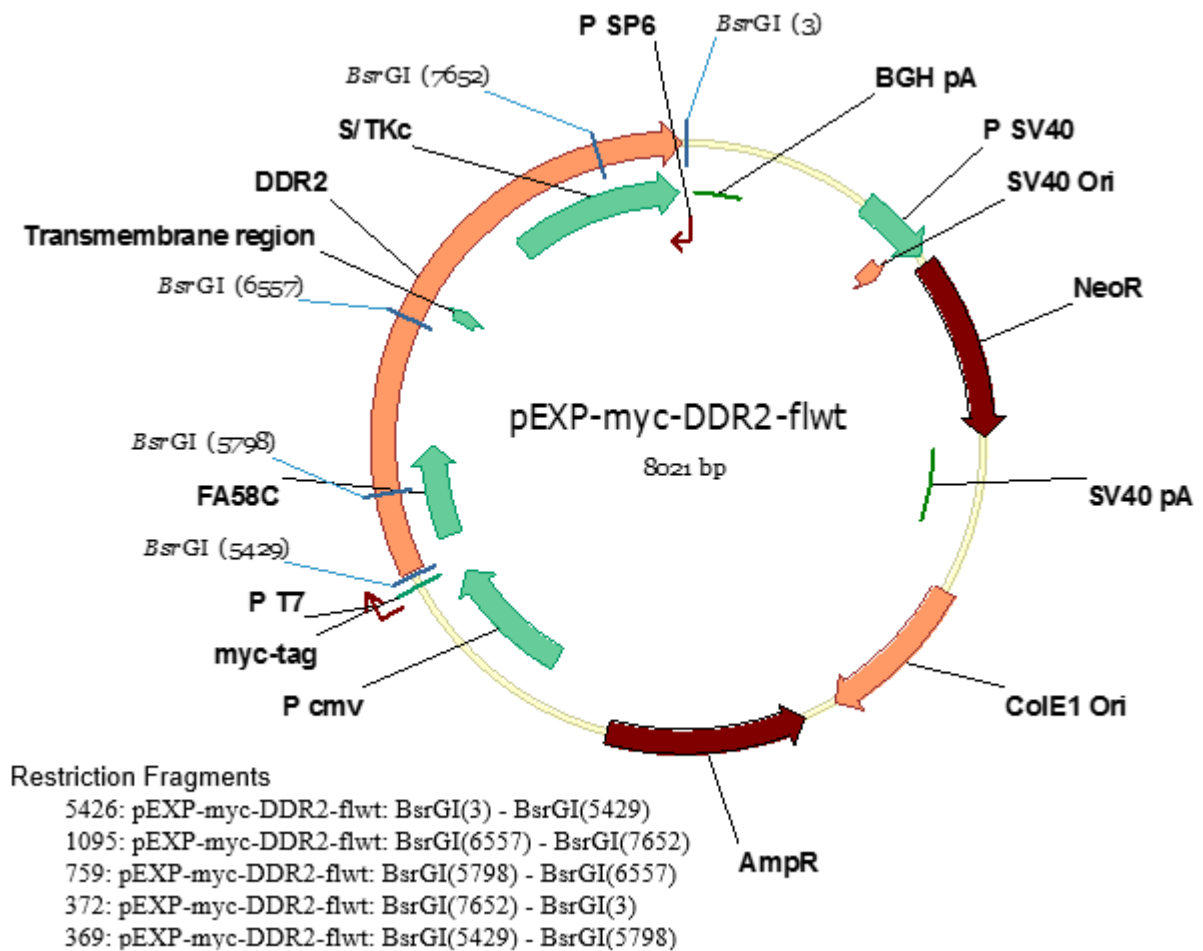


Restriction Fragments

- 4448: pEXP-EGFP-C1-DDR2 FL wt: BsrGI (3) - BsrGI(4451)
- 1095: pEXP-EGFP-C1-DDR2 FL wt: BsrGI(5621) - BsrGI(6716)
- 759: pEXP-EGFP-C1-DDR2 FL wt: BsrGI(4862) - BsrGI(5621)
- 378: pEXP-EGFP-C1-DDR2 FL wt: BsrGI(6716) - BsrGI(3)
- 369: pEXP-EGFP-C1-DDR2 FL wt: BsrGI(4493) - BsrGI(4862)
- 42: pEXP-EGFP-C1-DDR2 FL wt: BsrGI(4451) - BsrGI(4493)

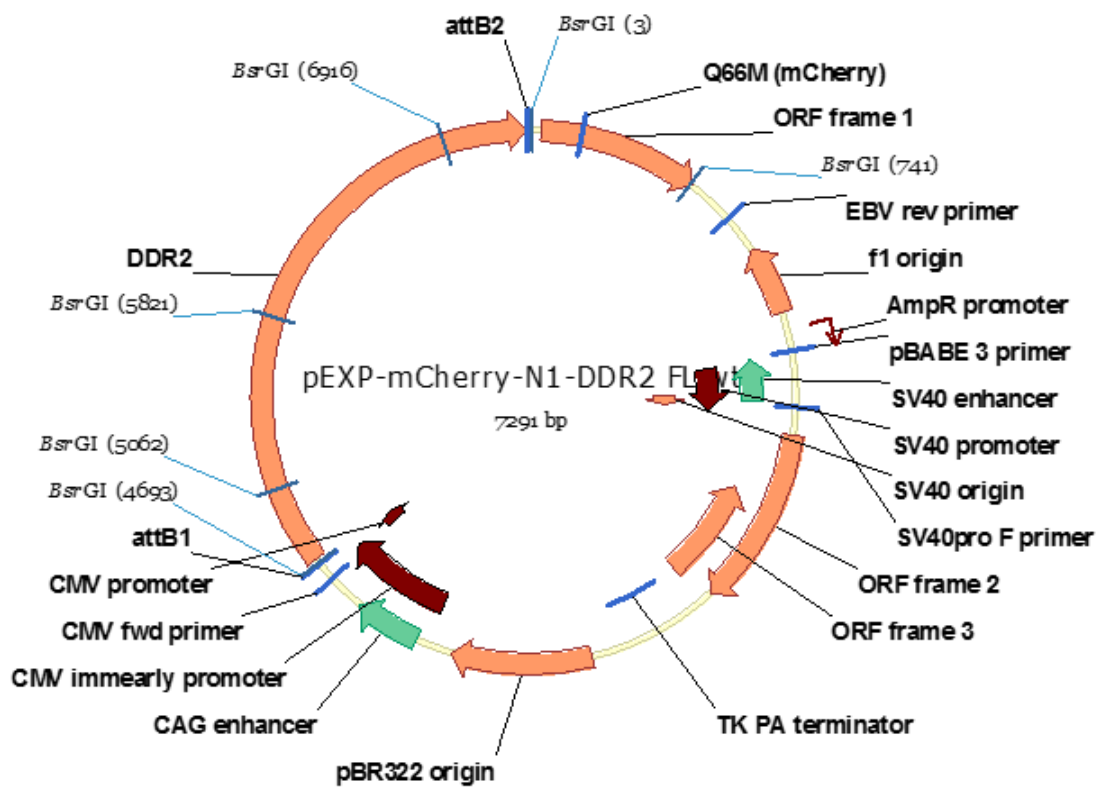
Vedlegg 2

Vektorkart av N-terminal myc tagget DDR2 som viser restriksjonssteder til restriksjonsenzymet BsrGI samt størrelse på genererte fragmenter. Laget i Vector NTI av E. Åberg



Vedlegg 3:

Vektorkart av C-terminal mCherry tagget DDR2 som viser restriksjonssteder til restriksjonsenzymet BsrGI samt størrelse på genererte fragmenter. Laget i Vector NTI av E. Åberg

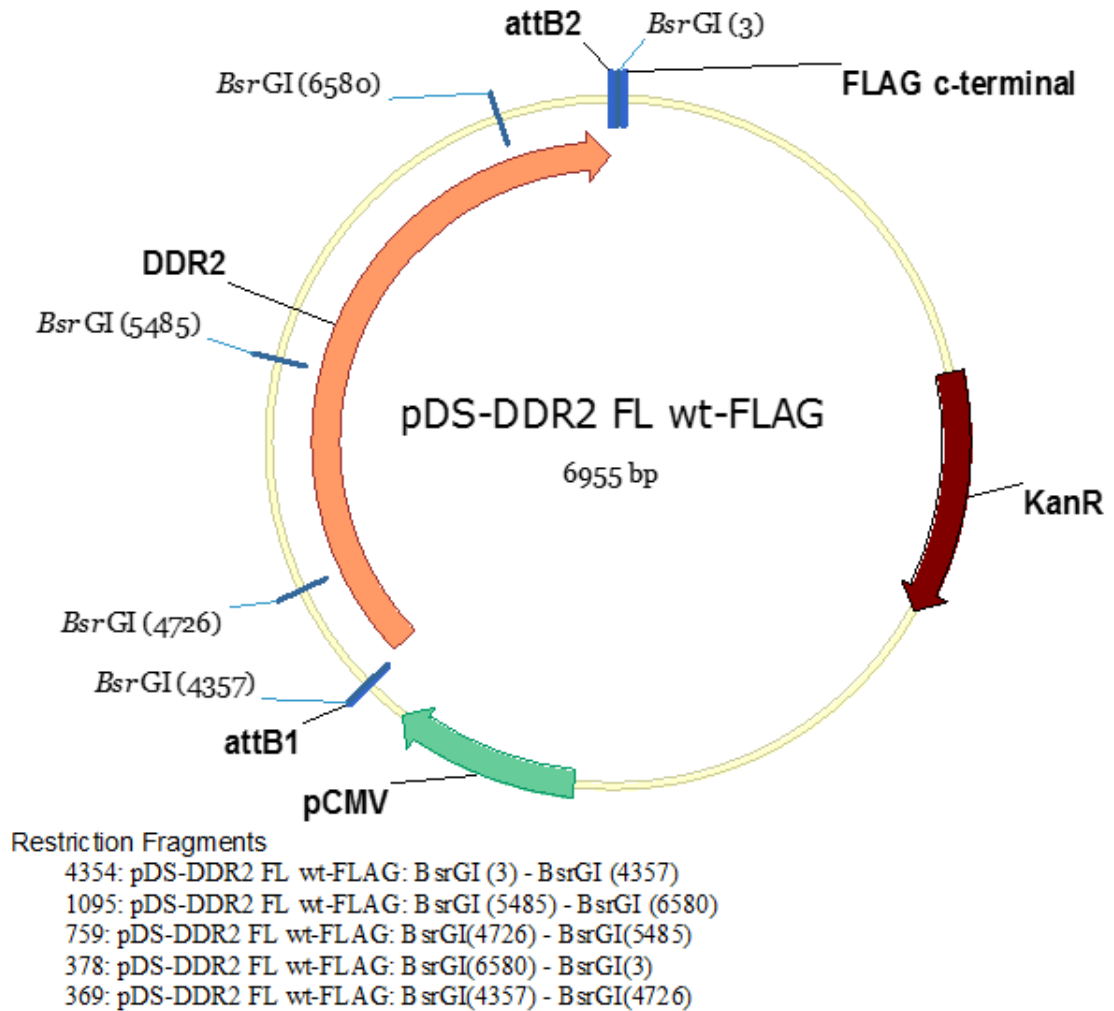


Restriction Fragments

- 3952: pEXP-mCherry-N1-DDR2 FL wt: BsrGI(741) - BsrGI(4693)
- 1095: pEXP-mCherry-N1-DDR2 FL wt: BsrGI(5821) - BsrGI(6916)
- 759: pEXP-mCherry-N1-DDR2 FL wt: BsrGI(5062) - BsrGI(5821)
- 738: pEXP-mCherry-N1-DDR2 FL wt: BsrGI(3) - BsrGI(741)
- 378: pEXP-mCherry-N1-DDR2 FL wt: BsrGI(6916) - BsrGI(3)
- 369: pEXP-mCherry-N1-DDR2 FL wt: BsrGI(4693) - BsrGI(5062)

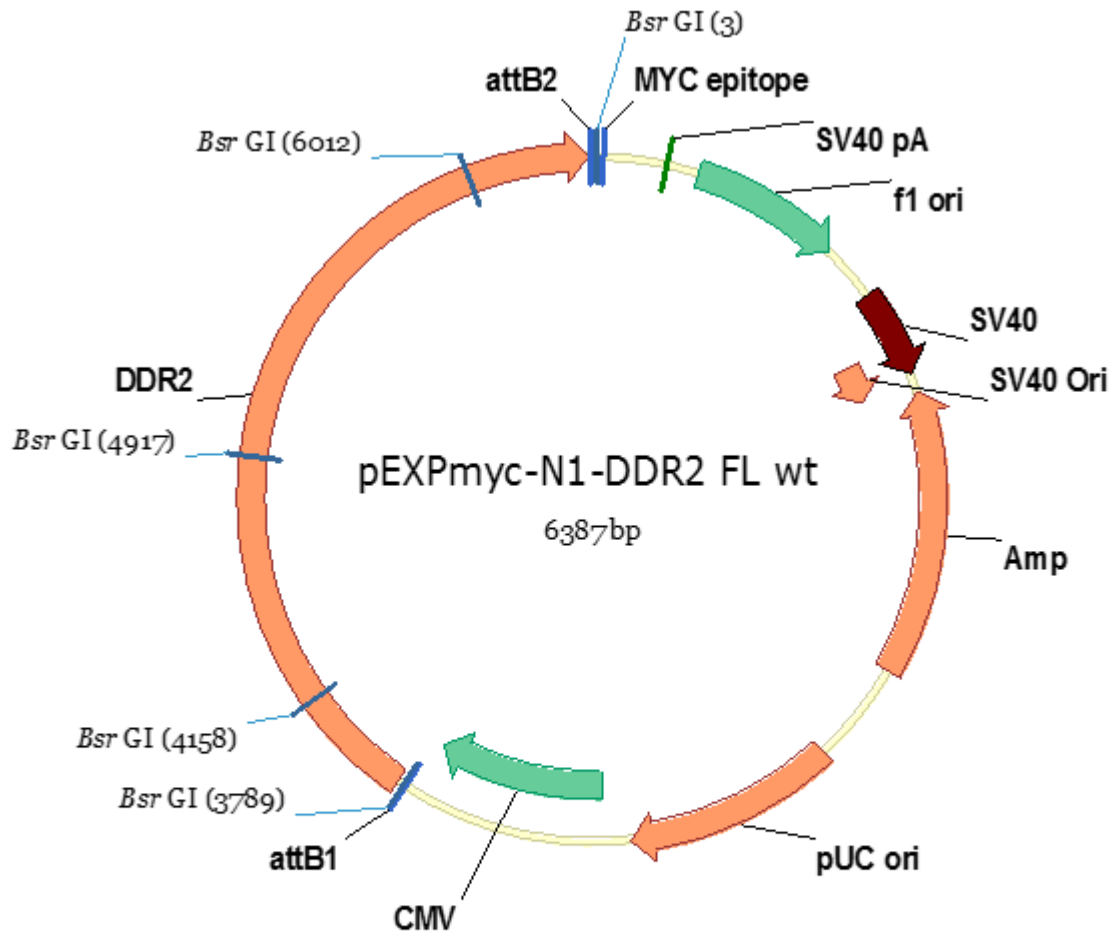
Vedlegg 4:

Vektorkart av C-terminal FLAG tagget DDR2 som viser restriksjonssteder til restriksjonsenzymet BsrGI samt størrelse på genererte fragmenter. Laget i Vector NTI av E. Åberg



Vedlegg 5:

Vektorkart av C-terminal myc tagget DDR2 som viser restriksjonssteder til restriksjonsenzymet BsrGI samt størrelse på genererte fragmenter. Laget i Vector NTI av E. Åberg



Restriction Fragments

- 3786: pEXPmyc-N1-DDR2 FL wt: BsrGI (3) - BsrGI (3789)
- 1095: pEXPmyc-N1-DDR2 FL wt: BsrGI (4917) - BsrGI (6012)
- 759: pEXPmyc-N1-DDR2 FL wt: BsrGI (4158) - BsrGI (4917)
- 378: pEXPmyc-N1-DDR2 FL wt: BsrGI(6012) - BsrGI(3)
- 369: pEXPmyc-N1-DDR2 FL wt: BsrGI(3789) - BsrGI(4158)

