

Masteroppgave i farmasi

Identifisering av en gruppe glykosyltransferaser som mulige målgener for transkripsjonsfaktoren Pax6

Lan Huong Thi Nguyen



2009

Molekylær Farmakologisk forskningsgruppe

Institutt for farmasi

Det Helsevitenskapelige fakultet

Universitetet i Tromsø

Veileder

Førstemanuensis Ingvild Mikkola, Institutt for farmasi, UiT

Innholdsfortegnelse

Forord	5
Forkortelser	6
Sammendrag	8
1. Innledning.....	9
1.1 Paired box (PAX) gen	9
1.1.1 Paired box gen 6 (Pax6)	10
1.1.2 Pax6 i glukose homeostase	11
1.1.3 Pax6 i pancreaskreft	11
1.1.4 Pax6 i øyesykdommer	11
1.1.5 Pax6 i retinoblastoma	12
1.1.6 Pax6 i glioblastoma	12
1.2 Glykosylering	13
1.2.1 Biosyntesen av N-linket glykosylering.....	13
1.2.2 Biosyntesen av O-linket glykosylering.....	14
1.2.3 Rollen til glykosylering	14
1.2.4 Glykosylering og nevrodegenerative sykdommer	15
1.2.5 Glykosylering og revmatoid artritt (RA)	15
1.2.6 Glykosylering og alkoholholdige lever sykdom (ALD).....	15
1.2.7 Glykosylering og kreft.....	16
1.3 Glykosyltransferaser.....	16
1.3.1 Fucosyltransferase 8 (Fut8)	19
1.3.2 N-acetylglycosaminytransferase III og V (Mgat3 og Mgat5)	19
1.3.3 UDP glukoronosyltransferase 1 familie, polypeptid A7c (Ugt1a7c).....	21
1.3.4 N-acetylglucosaminytransferase 1 (Gcnt1)	21

1.3.5 N-acetylglucosaminyltransferase 2 (Gcnt2)	21
1.3.6 St6 β -galactosamide α - 2,6-sialyltransferase 1 (St6gal1)	22
1.3.7 St3 β -galactoside α -2,3-sialyltransferase 6 (St3gal6)	22
1.3.8 Hensikt.....	23
2. Materialer og Metoder	24
2.1 Materialer	24
2.1.1 Primersekvens.....	24
2.1.2 Buffere.....	25
2.1.3 Løsninger.....	27
2.1.4 Antistoffer	28
2.1.5 Vekstmedia.....	28
2.1.6 Andre materialer.....	29
2.1.7 Protein og DNA markører	30
2.2 Metoder	30
2.2.1 RNA preparasjon ved hjelp av TRIzol (Invitrogen).....	30
2.2.2 DNase behandling av RNA	31
2.2.3 Preparasjon av cDNA vha Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche)	31
2.2.4 Revers Transkriptase Polymerase Chain Reaction (RT- PCR)	32
2.2.5 DNA gel elektroforese.....	33
2.2.5.1 1 % agarose gel blanding.....	33
2.2.5.2 Støping av gelen	33
2.2.5.3 Pipettering av ulike prøver i den avstøpte gelen.....	33
2.2.6 Kvantitativ Polymerase chain reaction (qPCR).....	34
2.2.7 Høsting av celler til glykoprotein isolering	35
2.2.8 BioRad protein assay	35
2.2.9 Glykoprotein isolering ved hjelp av ConA Sepharose 4B (Amersham Biosciences, GE Healthcare) før SDS-PAGE.....	36

2.2.10	Coomassie blue staining	37
2.2.11	Glykoprotein isolering vha WGA (Thermo scientific nummer 89805)	37
2.2.12	Glykoproteinfarging vha GelCode glykoproteinfargingskit.....	39
2.2.13	Testing av GelCode glykoprotein fargingskit	39
2.2.14	Testing av glykoprotein isoleringskit, WGA (Thermo scientific nummer 89805).....	40
2.2.15	Western Blot.....	41
2.2.16	Immunopresipitering	43
2.2.17	Immunohistokjemi (IHC)	43
3.	Resultat.....	44
3.1	Revers Transkriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).....	46
3.2	Real time PCR (qPCR).....	51
3.3	Glykoprotein isolering ved hjelp av Conavalin A (ConA).....	54
3.4	Glykoprotein isolering ved hjelp av Wheat Germ Agglutinin (WGA).....	57
3.5	Testing av GelCode Glykoprotein fargingskitet	58
3.6	Testing av Glykoprotein isoleringskitet	59
3.7	Western Blot.....	61
3.8	Immunopresipitering	63
3.9	Immunohistokjemi (IHC).....	67
4.	Diskusjon.....	69
4.1	RT-PCR.....	69
4.2	QPCR	70
4.3	Glykoprotein isolering ved hjelp av ConA og WGA.....	70
4.4	Western Blot.....	72
4.5	Glycoprotein isolering ved hjelp av immunopresipitering (IP)	73
4.6	Immunohistokjemi (IHC).....	73
4.7	Betydning av vårt funn.....	74

5. Fremtidige perspektiver.....	75
6. Konklusjon	76
7. Referanser.....	78

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved institutt for farmakologi, Det medisinske fakultet, Universitetet i Tromsø, i perioden februar 2009 til oktober 2009.

Først og fremst vil jeg takke min super veileder, Ingvild Mikkola for god veiledning og lærerike tilbakemeldinger gjennom hele oppgaven.

Jeg vil også takke Yury Kiselev for hjelp med real time PCR.

En spesiell takk til Rune Hogseth for teknisk hjelp og god veiledning. Til andre på avdelingen tusen takk for hyggelige atmosfære og veiledning under oppholdet i biokjemilabben.

Tilslutt vil jeg takke familie, venner og spesielt min mann Lam Ngoc Nguyen for støtte, oppmuntring og motivasjon gjennom hele studietiden i Tromsø.

Tromsø, oktober 2009

Lan Huong Thi Nguyen

Forkortelser

mHPRT	mus Hypoxanthine phosphoribosyltransferase
hRPLP	human acidic ribosomal phosphoprotein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles of MEM
NaHCO ₃	Natrium bikarbonat
MnCl ₂	Mangan klorid
NaOH	Natrium hydroksid
NaCl	Natrium klorid
CaCl ₂	Kalsium klorid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
Tris	tris (hydroksy metyl) aminometan
TEMED	N ¹ -tetrametyletylendiamin
APS	Ammonium persulfat
SDS PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel elektroforese
PBS	Phosphate-buffered saline
PBST buffer	Phosphate buffered saline med 0,1 % Tween 20
MQ-vann	Milli Q vann
1M DTT	1 molar dithiothreitol
dNTP [10mM]	Deoxyribonucleotide triphosphate [10 millimolar]
GP-buffer + PI	glycoprotein buffer med protease inhibitor
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
RNAsin	Ribonuclease inhibitor
CRI	Cystolisk RNase inhibitor
FW primere	Forward primere

REW primere	Revers primere
DNase	Deoxyribonuclease
RNase fritt vann	Ribonuclease fritt vann
BSA	Bovine serum albumin
PFA	Paraformaldehyd
Fcs	Fetal calf serum
TAE	Tris-acetat-EDTA
bp	basepar
cDNA	Komplementære DNA
Ct	cycle threshold
dH2O	doionisert vann
kDa	kilodalton
Q-PCR	Quantitative polymerase chain reaction
rpm	rounds per minute
HPR	Horseradish Peroxidase
STI	Soybean Trypsin Inhibitor

Sammendrag

Det har vært stadig mer forskning på rollen av glykosylering i utvikling av sykdommer i de siste tiårene. Glykosylering av proteiner er en prosess hvor karbohydrat grupper overføres til et protein ved hjelp av glykosyltransferaser. Denne prosessen er nødvendig for riktig folding av proteiner som gir riktig funksjon til ulike proteiner. Endringer i glykosylering av proteiner har vist å ha sammenheng med utvikling av en rekke sykdommer og kreft. Disse endringer i glykosylering kan oppstå som følge av endringer i uttrykksnivåer av glykosyltransferasene.

Denne masteroppgaven har til hensikt å verifisere om en gruppe glykosyltransferaser (Fut8, Mgat3, Ugt1a7c, St3gal6, St6gal1, Gcnt1 og Gcnt2) er mulige målgener for transkripsjonsfaktoren Pax6.

Metodene RT-PCR og qPCR ble brukt for å se på uttrykket og eventuelle nedreguleringer av de sju testede glykosyltransferaser i FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) på RNA-nivå. Det ble også brukt metoder som isolering av glykoproteiner ved hjelp av concavalin A (Con A) og Wheat Germ Agglutinin (WGA), immunopresipitering (IP), Western blot (WB) og immunohistokjemi (IHC) for å prøve og detektere endringer i glykosylering på protein-nivå.

Resultat av denne masteroppgaven viste at de sju testede glykosyltransferasene blir nedregulert i nærvær av Pax6 og isoformen Pax6(5a) på RNA-nivå. Når det gjelder metodene glykoprotein isolering vha ConA og WGA og IP ble det ingen klare resultater, mens Western blot resultatet viste at nucleolin blir nedregulert både i Pax6 og Pax6(5a) på protein nivå.

Konklusjonen for denne masteroppgaven er at vi har identifisert glykosyltransferasene Fut8, Mgat3, Ugt1a7c, St3gal6, St6gal1, Gcnt1 og Gcnt2 som nye målgener for Pax6. Disse glykosyltransferasene blir nedregulert i nærvær av Pax6 og Pax6(5a) og basert på tidligere funn har det vist at nedregulering av disse glykosyltransferasene fører til en rekke sykdommer. Resultatet vi ser i denne masteroppgaven har gitt en ytterligere innsikt i mulige rollen av Pax6 i regulering av de sju testede glykosyltransferasene i utvikling av sykdommer og kreft.

1. Innledning

1.1 Paired box (PAX) gen

Paired box (PAX) gen er en familie av vevsspesifikke transkripsjonsfaktorer som har viktige roller i utviklingen av mange organismer [1]. Ni PAX gener er identifisert og de kjennetegnes ved at alle inneholder et paired domene som gjenkjenner spesifikk DNA sekvenser. Disse ni PAX gener inndeles igjen i fire undergrupper basert på strukturelle likheter og likheter i uttrykksmønster [2].

PAX family Group	Protein structure/domains Paired octapeptide homeodomain	Protein family member	Embryonic Expression Domain	Expression/Mutation in human disease
I		PAX1	Skeleton, thymus, 3rd/4th pharyngeal pouch	Klippel-Feil Syndrome, Jarcho-Levin Syndrome
		PAX9	Skeleton, Teeth, Thymus	Jarcho-Levin Syndrome, Oligodontia
II		PAX2	Kidney, CNS	Hyperproliferative dysplastic kidney, Renal hyperplasia, Bladder and renal cancer, Coloboma Syndrome
		PAX5	B-Cells, CNS	Lymphomas
		PAX8	Kidney, Thyroid, CNS	Congenital hypothyroidism, Thyroid carcinomas/adenomas
III		PAX3	Neural Crest, CNS somites/muscle	Waardenburg Syndrome Types I/III, Melanoma, Rhabdomyosarcoma
		PAX7	Neural Crest, CNS somites/muscle	Rhabdomyosarcoma
IV		PAX4	Pancreas, gut	Diabetes
		PAX6	Pancreas, gut, CNS and eye	Aniridia, GI tumors, Cataracts/Peter's Anomaly

Figur 1: En oversikt over PAX gen familiegruppe. Figuren er basert på figur 1 i referansen [2] og det viser til hvor de ulike Pax gener blir uttrykt og eventuelle sykdommer som er assosiert med disse genene.

PAX gruppe I består av Pax1 og Pax9. Til forskjell fra andre Pax proteiner, mangler Pax1 og Pax9 et homeodomene. Pax1 og Pax9 uttrykkes under utvikling av skjelettet, thymus og skjoldbruskkjertel. Mutasjon av Pax1 kan forårsake Klippel-Feil Syndrom og Jarcho-Levin syndrom, mens mutasjon av Pax9 fører til oligodontia (en tilstand som er relatert til manglende av et eller flere tenner) hos voksne [2].

PAX gruppe II består av Pax2, Pax5 og Pax8. Pax2 uttrykkes i nyrene og sentral nervesystemet (CNS), Pax5 i B-celler og CNS, og Pax8 i nyrene, CNS og skjoldbruskkjertel. Pax2 uttrykket er nødvendig for nyrevikling. Overuttrykk av Pax 2 kan føre til nyre- og blærekreft. Pax5 er viktig for utvikling av B-celler. Overuttrykk av Pax5 er assosiert med lymfoma (en type kreft av lymfocytter). Pax8 har en stor rolle i utvikling av skjoldbruskkjertel. Mutasjon av Pax8 kan resultere hypotyreose og kreft i skjoldbruskkjertel [2].

PAX gruppe III består av Pax3 og Pax7. Disse Pax gener er uttrykt i CNS, skjelett muskler, ledd og bindevev. Pax3 er nødvendig for utvikling av melanocytter og har en viktig rolle i hemming av apoptose. Mutasjon av både Pax3 og Pax7 fører til muskel/ledd defekter og Waardenburg Syndrom (WS) type I og III. Waardenburg syndrom er en sjelden genetisk lidelse som oftest preget av varierende grad av døvhet og unormal hårvekst og hypopigmentering. En translokasjon som fører til fusjon mellom Pax3 eller Pax7 og FKHR (Forkhead transcription factor gen) resulterer rhabdomyosarcoma (en type kreft i bindevev) [2].

PAX gruppe IV består av Pax4 og Pax6. Pax4 uttrykkes i tarm og bukspyttkjertel. Pax6, i tillegg til tarm og bukspyttkjertel, uttrykkes også i øyet og CNS. Pax4 vedlikeholder insulin produserende beta celler og somatostatin produserende celler. Mangel av Pax4 vil derfor resultere diabetes [2]. Siden Pax6 er det PAX genet som er studert i denne oppgaven vil en mer detaljert beskrivelse av dette genet følge under.

1.1.1 Paired box gen 6 (Pax6)

Pax6 tilhører gruppe IV av paired box (PAX) gen familien. Dette genet fungerer som en transkripsjonsfaktor og har to DNA bindende domener, et paired box domene (PD) og en homeodomene (HD) som er koplet sammen av en linker. I tillegg består genet av en PST domene som er rikt på prolin, serin og threonin ved C-terminalen. I ulikhet med andre PAX undergrupper mangler Pax6 et oktapeptid sekvens [3].

Det finnes forskjellige isoformer av Pax6 genet, blant annet Pax6, Pax6(5a), og Pax6(Δ PD) eller "pairedless" isoform. Pax6 består av et N-terminal paired domene koplet til en homeodomene og en PST C-terminal domene. Pax6(5a) produktet forekommer ved alternativ spleiset ekson 5a som resulterer innsetting av 14 aminosyrer i paired domene som endrer spesifisiteten av DNA bindingsaktivitet. Pax6(Δ PD) isoformen lages ved bruk av tre alternative startkodoner som kan resultere tre ulike genprodukter avhengig av hvilket startkodon som benyttes. Felles kjennetegn for disse tre genproduktene er at de mangler paired domenet. Pax6(Δ PD) isoformen har dermed et molekylvekt enten ved 43, 33 eller 32 kDa alt avhengig av hvilket startkodon som benyttes [4] [5]. For Pax6 og Pax6(5a) forventes det en molekylvekt på ~46 kDa og ~ 48 kDa henholdsvis [6].

Pax6 uttrykkes hovedsakelig i CNS, øyne og i alfa, beta, delta og gamma (α , β , δ , γ) cellene i de Langerhansker øyer i bukspyttkjertelen [2]. Uttrykk av Pax6 påvirker en rekke biologisk prosesser slik som celle proliferasjon, migrasjon, adhesjon og signalering både i normal og oncogenese utvikling [7].

1.1.2 Pax6 i glukose homeostase

De Langerhanske øyene inneholder forskjellige endokrine celler som syntetiserer og skiller ut insulin, glukagon, somatostatin og hormoner som regulerer metabolske prosesser og til slutt glucose homeostase. Pax6 er nødvendig for utvikling av disse endokrine celler. Mangel på Pax6 uttrykket fører til ufullstendig utvikling av disse endokrine celler. Utilstrekkelig utvikling, dysfunksjon eller ødeleggelse av β -cellene i de Langerhanske øyer som produserer insulin kan føre til diabetes mellitus [8], mens utilstrekkelig utvikling av alfa cellene vil føre til tap av glukagon produksjon [1, 2].

1.1.3 Pax6 i pancreaskreft

Kreft i bukspyttkjertel (pancreaskreft) er en av de mest dødelige formene for kreft. Det er den femte vanligste dødsårsaken av kreft, og har den laveste 5-års overlevelse. Rundt halvparten av bukspyttkjertel tumorer er forårsaket av en mutasjon i p53 tumor suppressor genet. P53 proteinet spiller en viktig rolle i celle spredning, apoptose, celle senescence og differensiering. Rollen av p53 i differensiering er avhengig av celle type. I noen differensierte celler slik som leukocytter og makrofager er p53 protein nivåer økt, mens i keratinocytter og osteoblaster er p53 uttrykk redusert.

Deborah Lang og medarbeidere (2007) har gjennom sin studie vist positive roller av p53 og negative roller av Pax6 i celle differensiering. Nivået av p53 kan påvirke om cellene skal begå programmert selvmord (apoptose) eller differensiering. Økt uttrykk av p53 proteinet kan hemme tumor dannelsen ved å indusere vekst hemming, apoptose og DNA reparasjon. Transkripsjonsfaktor Pax6 er uttrykt gjennom tidlig utvikling av bukspyttkjertel, men etter hvert som bukspyttkjertelen vokser og differensieres til eksokrine og endokrine kompartment blir uttrykket av Pax6 begrenset. I modne bukspyttkjertel uttrykker cellene vanligvis ikke Pax6. Overuttrykk av Pax6 har gjennom Deborah Lang og medarbeidere (2007) sin studie vist å være relatert til kreft i bukspyttkjertelen. Hemming av kreftceller i bukspyttkjertelen kan altså skje ved økt uttrykk av p53 eller hemming av Pax6 uttrykket i bukspyttkjertelen [9].

1.1.4 Pax6 i øyesykdommer

Pax6 er også kjent som master kontroll gen i utvikling av øyne. Normal utvikling av øyne er høy sensitive for nivået av Pax6 uttrykket [10]. Både for lavt og for høyt uttrykksnivå av Pax6 kan føre til defekter i øyeutvikling [11].

Pax6 er uttrykt i øyelinsen, indre lag av iris, korneal epitelium og i retina [12]. Under øyeutvikling regulerer Pax6 uttrykket av andre regulatorer slik som Pax2, SOX2, samt strukturelle proteiner slik som krystalliner. Hos mennesker er Pax6 mutasjoner assosiert

med en rekke øyesykdommer [13]. Heterozygote mutasjon av Pax6 hos mennesker fører til en rekke øyesykdommer slik som aniridia, katarakt og ufullstendig utskillelse av linsen fra hornhinnen (Peters anomali) [1, 2, 7, 11, 12, 14] Homozygot mutasjon av Pax6 hos mennesker og mus fører til fullstendig mangel av øyet [15].

1.1.5 Pax6 i retinoblastoma

I øynene er retina regulert av ulike gener som for eksempel Pax6, nestin, CD133, chx10 og Rx [16]. Pax6 spiller en viktig rolle i utvikling av retina (netthinnen). Pax6 genet blir uttrykt i retinoblastoma (Rb) celler og er regulert av en sink finger (ZF) fosfoprotein kalt CTCF. Tie Li og medarbeidere (2006) har gjennom sin tidligere studie utforsket mekanismen av CTCF i kontrollering av Pax6 genuttrykket i humane Rb celler. Gjennom studien har de funnet at nedregulering av CTCF fører til økt uttrykket av Pax6 i Rb celler, mens overuttrykk av CTCF i Rb celler resulterer nedregulering av Pax6 genuttrykket [14, 17].

1.1.6 Pax6 i glioblastoma

Glioblastoma multiforme (GBM) er den mest vanlige formen for primær hjernesvulst. Pax6 er involvert i flere utviklingsprosesser av øyne og CNS) og ble kjent som en tumor suppressor i gliomas [18]. For å forstå hvordan Pax6 fungerer som en tumor suppressor har Yi-Hong Zhou og medarbeidere (2005) gjort undersøkelser hvor Pax6 genet ble overuttrykket i en svært tumorigenisk U251HF GBM cellelinje som uttrykker lav nivå av Pax6. Western blotting av cellelysater fra transfektanter mot Pax6 og FLAG antistoffer viste økt eksogene Pax6 protein i Pax6-positive transfektanter sammenlignet med original (parenteral -P), Pax6-negative og vektortransfektant kontrollceller. Overuttrykk av Pax6 i U251HF påvirker ikke celle fordoblingen. Evnen av U251HF Pax6-transfektanter til å danne kolonier under ”anker-uavhengige” tilstander i agar ble sammenlignet med hverandre. Resultatet viste at tre individuelle U251HF Pax6-positive transfektanter dannet betydelig med mindre kolonier enn kontroll cellelinjer (to vektor-transfektants og ett Pax6-negative transfectant), noe som antyder at Pax6 undertrykker ”anker-uavhengig” vekst i denne GBM cellelinjen. Yi-Hong Zhou og medarbeidere (2005) har dermed gjennom sin studie rapportert at lav uttrykk av Pax6 er et kjennetegn for dårlig prognose for pasienter med malignt astrocytisk glioma, mens høy uttrykk av Pax6 er korrelert med god prognose [19].

1.2 Glykosylering

Glykosylering av proteiner er en prosess hvor karbohydrat grupper overføres til et protein ved hjelp av glykosyltransferaser. Denne prosessen er det første trinnet i syntesen av membran- og sekretoriske proteiner. Glykosylering er inndelt i 2 hovedtyper; N-linket- og O-linket glykosylering. I N-linket glykosylering blir karbohydratgruppen koplet til et nitrogen atom av en amino gruppe av asparagin via amid binding. I O-linket glykosylering blir karbohydratgruppen koplet til et oksygen atom fra en hydroksyl gruppe i enten serin eller threonin via ester binding. Karbohydrat kjeden som kopler til glycoproteiner kan enten være rett eller forgreinet med en lengde som varierer mellom 2-60 sukkerenheter. Disse sukkerenhetene er ofte galaktose, mannose, N-acetylglucosamin (GlcNAc) og sialinsyre som har negative ladning [20]

1.2.1 Biosyntesen av N-linket glykosylering

N-linket glykosylering inndeles i 2 trinn; den initielle kjerneglykosyleringen og modifikasjonen av karbohydrat side kjeden.

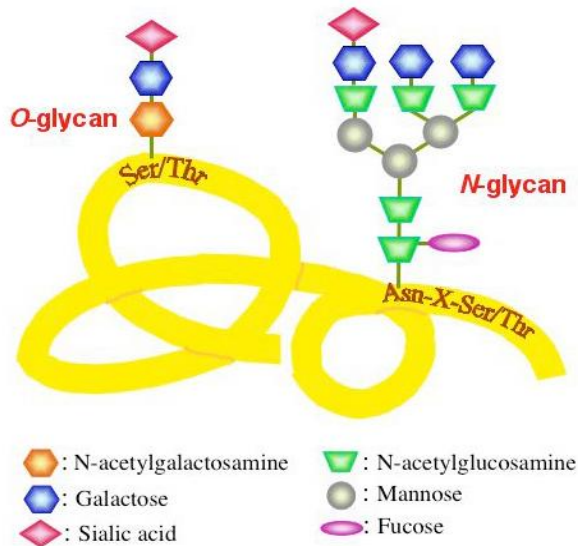
I initiell glykosylering skjer det først syntese av en kjerneoligosakkarid i cytosolisk endoplasmatisk retikulum (ER) ved at det trinn for trinn overføres flere sukkerenheter (2 N-acetylglucosamin (GlcNAc), 9 mannose og 3 glukose) til Dolicholphosphate (bærere av oligosakkarid enheter). Dette kjerneoligosakkaridet overføres deretter fra cytosolisk ER til ER lumen ved hjelp av flippase (fosfolipid translokator). I ER lumen blir oligosakkaridet fra Dolichol phosphate overført til asparagin residue av et protein ved hjelp av oligosaccharyl transferase.

Under andre trinn av N-glykosylering blir kjerneoligosakkaridet trimmet og modifisert. En mannose og tre glukose enheter blir fjernet av mannosidase og glucosidase. Under denne prosessen reagerer flere ER proteiner med det nye syntetiserte glycoproteinet for å sikre riktig folding. Calnexin (CNX) og calreticulin (CRT) er ER proteiner som kan binde til monoglukosylerte glykoproteinet og fremmer dannelsen av disulfid binding. Dette skjer ved kompleks dannelse av glykoproteinet med en tiol oksidoreduktase (kjent som ERp57). Etter dannelsen av disulfid binding dissosierer protein kompleksen og de siste glukoseenhetene blir fjernet av glucosidase II. Ved dette punktet fungerer UDP-glukose:glycoprotein glucotransferase (UGGT) som en sensor for riktig folding av det nye syntetiserte glykoproteinet. UGGT binder til feil foldet proteiner og bryter det til enklere glukose enheter som kan være substrat for andre runder for gjendannelse av DNX/CRT binding og disulfid binding. Når proteinet blir riktig foldet slipper UGGT løs det nye syntetiserte glykoproteinet slik at glykoproteinet beveger ut av ER til Golgi apparatet hvor det gjennomgår terminal glykosylering. Terminal glykosylering omfatter

fjerning av noen karbohydrat enheter fra kjerne oligosakkaridet og gir opphav til ulike proteiner med ulike lengde, struktur og funksjoner [20].

1.2.2 Biosyntesen av O-linket glykosylering

O-linket glykosylering skjer golgiapparatet. Først blir N-acetylgalactosamin (GalNac) overført fra UDP-GalNac til hydroksyl gruppen av enten serin eller threonin ved hjelp av enzymet UDP-N-acetylgalctosaminyltransferase. Deretter koples andre karbohydrater slik som galactose og sialinsyre til den forlengende karbohydrat kjeden. Denne prosessen er nødvendig for enkelte proteintyper slik som proteoglykaner. O-linket proteiner involverer dannelsen av ekstracellulære matris (ECM), celledhesjon ved interaksjon mellom sukker komplekser av proteoglykaner og de fungerer som en komponent for slim sekresjon [21]. O-glykaner er funnet mest i slim som er rikelig på mucosal overflate og spytt [22].



Figur 2: Eksempel på tilkøpling av glykaner på et protein via O-linket og N-linket glykosylering. Figuren er basert på figur 1 i referansen [23]

1.2.3 Rollen til glykosylering

Glykosylering er nødvendig for riktig folding av proteiner. Det påvirker flere fysiokjemisk og funksjonelle egenskaper av proteiner slik som protein stabilitet, protein ladning og løselighet, protein inter-/ intracellulære transport, protein halveringstid i blodet. Enzymatisk tilkøpling og fjerning av sukkerenheter til proteiner gir variasjoner i protein lengde, struktur, konformasjon og funksjoner [22]. Glykosylering påvirker også biologisk prosesser slik som reseptor aktivering, signal transduksjon, endocytose, celle

adhesjon og fører til regulering av mange fysiologisk og patologisk resultater som celle vekst, migrasjon, differensiering, tumor metastase og host-patogen reaksjoner [24], celle trafikkering og transmembran signalering [25]. I tillegg har glykosylering også betydning i utvikling av sykdommer slik som kreft, neuropatologi, astma, RA og Crohn's syndrom [26].

1.2.4 Glykosylering og nevrodegenerative sykdommer

Endring i protein glykosylering har vært relatert til human nevrodegenerative sykdomstilstander slik som alzheimer's demens (AD), parkinsonisme (PD) og Creutzfeldt-Jakob sykdom (CJD). Viktig enzymer som er involvert i patogenesen av alzheimer's demens er acetylkolinesterase (AChE) og butyrylcholinesterase (BuChE). AChE enzymet hydrolyserer acetylkolin neurotransmittere ved kolinergisk synapser og er godt distribuert i hjernen. Det har vist at glykosylering av dette enzymet var blitt endret i post-mortem hjernen og cerebrospinal væsken (CSF) hos AD pasienter. Også har det vist endringer på glykosylering av butyrylcholinesterase (BuChE) hos AD CSF (cerebrospinal væske). Patogenese for PD er fremdeles lite kjent men nylig har Farrer og sine medarbeidere (2001) oppdaget at dysfunksjonen av PD kan involvere en E3 ubiquitin ligase. Dette enzymet er involvert i ubiquitinerings av protein substrater og merker dem for nedbrytning av proteasomal komplekset, og dannelsen av α -synuclein inklusjoner. Det viste seg at mekanismen som ligger bak denne prosessen kan være parkin-mediert ubiquitinerings av en O-linket glycosylert form av α -synuclein. Mutasjon av parkin og α -synuclein resulterer utvikling av PD [27].

1.2.5 Glykosylering og revmatoid artritt (RA)

Ved revmatoid artritt er det observert endringer i glykosylering av glykokonjugater av brusk og synoviocytter, celle overflate reseptorer på chondrocytter, synovial flytende glykoproteiner, enkelte plasma proteiner, IgG, endringer i nivåer av anti-MBL auto-Abs og endringer i differensielle uttrykkelsen av noen galectiner og mannose-bindende lektiner (MBL) [26].

1.2.6 Glykosylering og alkoholholdige lever sykdom (ALD)

Karbohydrat-mangel transferrin (CDT) er en markør av kronisk alkoholmisbruk og oppstår på grunn av endringer i glykosylering. Human serum transferrin er et glycoprotein syntetisert i leveren og er involvert i transport av jern mellom steder av absorpsjon og leveranse. Kronisk etanol forbruk medfører endringer av normal mikroheterogenitetsmønster av transferrin på grunn av endringer i innhold av sialinsyre. Ved kronisk alkoholforbruk ble det observert unormal terminal sialylering hos rotter og

dette kan forklares ved reduksjon av β -galaktosid α -2,6 sialyltransferase (St6gal1) mRNA og protein uttrykk og/eller økt hepatocyt membran assosierte sialidase [22].

1.2.7 Glykosylering og kreft

Unormal protein glykosylering er assosiert med malignt transformasjon av celler. En familie av viktige molekyler som er relatert til unormal glykosylering er sialinsyre (SA) og deres derivater. Sialylering påvirker halveringstiden av mange sirkulerende glykoproteiner og har betydning i en rekke biologiske prosesser slik som celle-celle kommunikasjon, celle-matriks interaksjon og adhesjon. Overføringen av sialinsyre fra CMP-sialinsyre til karbohydrater er katalysert av sialyltransferaser (ST). Hos mennesker er ST uttrykk i mange vev til ulike nivåer og uttrykksnivået av ST er dramatisk endret under kreft dannelsen. Det er påvist at endret uttrykk av ST har en signifikant sammenheng med oncogenese, tumor utvikling og lymfeknute metastase [23]

Reseptor tyrosin kinaser (RTK) er transmembran glycoproteiner som starter en signal kaskade og resulterer både proliferative og antiapoptotisk cellulære programmer. Epidermal vekst faktor reseptorer (EGFR) og ErbB2 er to medlemmer av RTK glykoprotein som stimulerer signaleringsreaksjoner i flere krefttilfeller slik som prostata, bukspyttkjertel og malignt gliomas. Overuttrykk av disse reseptorer er assosiert med cellevekst av tumorer. N-linket glykosylering er viktig for modning av RTK glykoproteiner og representerer dermed et målsted til å forstyrre RTK signaleringsaktivitet i kreftceller. Joseph N. Contessa og medarbeidere (2008) har gjort undersøkelser hvor de brukte tunicamycin (en inhibitor av N-linket glykosylering) i sine eksperimenter til å bevise at hemming av N-linket glykosylering nedregulerer RTK signaleringsaktivitet. Forstyrrelse av RTK signaleringsaktivitet blir dermed en terapeutisk strategi for blokkering av cellevekst, samt sensibiliserer svulster til strålebehandling [28].

1.3 Glykosyltransferaser

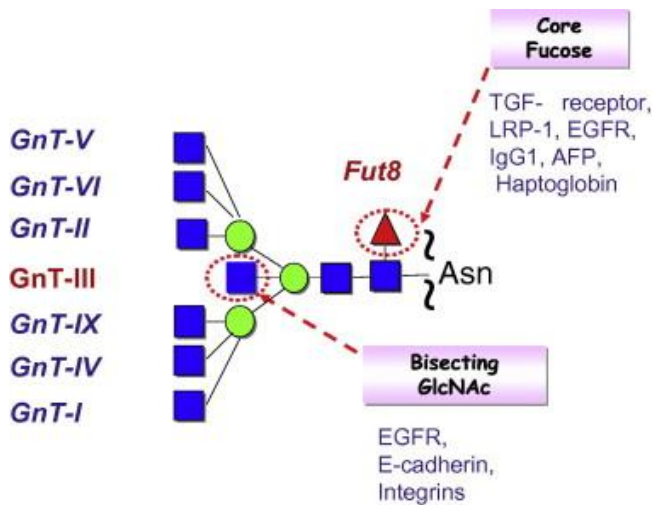
Glykosyltransferaser er enzymer som deltar i glykosyleringsprosessene i endoplasmatisk retikulum (ER) og Golgi apparatet hvor deres funksjon er å overføre karbohydratgrupper til proteiner [20]. Hittil er det identifisert over 180 glykosyltransferase gener der hver av dem har ulike funksjoner [24]. Denne masteroppgaven går ut på å verifisere om en gruppe glykosyltransferaser er mulige målgener for transkripsjonsfaktoren Pax6. Disse glykosyltransferasene er Fut8, Mgat3, Ugt1a7c, St3gal6, St6gal1, Gcnt1 og Gcnt2. Disse er derfor nærmere omtalt i tabell 1.

Tabell 1: En oversikt over de sju testede glykosyltransferasene med deres fullstendig navn, funksjon, og sykdommer/kreft der disse glykosyltransferasene er involvert.

Fullstendig navn på glykosyltransferase	Funksjon	Type glykosylering	Eksempler på sykdommer/kreft som er assosiert med denne glykosyltransferasen
Fucosyltransferase 8 (Fut8) Også kalt α 1,6 fucosyltransferase	Overfører en fucose enhet fra GDP-fucose til posisjon 6 på den innerste GlcNAc enhet av N-linket oligosakkarider på glykoproteiner for å danne kjerne fucosylering * [29].	N-linket glykosylering	Oppregulering av Fut8 er assosiert med tyroid papillary carcinomas, hepatocellulære carcinoma (HCC) og lever cirrhose [25]
N-acetylglucosaminyltransferase III (Mgat3)	Overfører GlcNAc til β -mannose av N-glykaner for å danne en "bisecting" GlcNAc * [22, 29]	N-linket glykosylering	Uttrykk/oppregulering av Mgat3 deltar i hemming av metastase [22, 25].
St6 β -galactosamide α -2,6-sialyltransferase 1 (St6gal1)	Katalyserer overføring av α -2,6-linket sialinsyre til glykoproteiner [30].	N-linket glykosylering	Oppregulering av St6gal1 er assosiert med colon adenocarcinomas, økt invasjon av fibroblaster og brystkreft celler [30].
St3 β -galactoside α -2,3-sialyltransferase 6 (St3gal6)	Overfører en sialinsyre fra cytidine 5-prime-monophospho-N-acetylneuraminic syre (CMP-NeuAc) til terminal posisjonen av	N-linket glykosylering	Nedregulering eller avvikende metylering av St3gal6 er assosiert med GI kreft [32].

	glykoprotein/glykolipid [31].		
UDP glucuronosyltransferase 1 familie, polypeptid A7c (Ugt1a7c)	Viktig i konjugering og eliminering av toksisk xenobiotisk og endogenøse stoffer. [33, 34]	N-linket glykosylering	Nedregulering av medlemmer av Ugt1a familien medfører Gilberts syndrom og Crigler-Najjars sykdom [33-35]
Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2 β -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase (Gcnt1)	Gcnt1 er nødvendig for dannelsen av Gal β 1-3 (GlcNAc β 1-6) galNAc struktur og kjerne 2 O-glykaner. [36] [37].	O-linket glykosylering	Oppregulering eller uttrykt av Gcnt1 er assosiert med prostatakreft, colorectal, lungekreft, T-lymfocytisk og myelogenøs leukemi [36] [37].
Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 2, I-branching enzym (blod gruppe I) (Gcnt2)	Gcnt2 omdanner lineære i antigen til forgreinet I antigen ved å kople en GlcNAc enhet til en galactosyl enhet [38].	O-linket glykosylering	Mutasjon/manglende uttrykk av Gcnt2 er assosiert med katarakt [38].

* Med ***kjerne fucosylering*** menes med prosessen der fucose enhet påsettes til posisjon 6 ved initial GlcNAc enhet av N-glykaner (se figur 3). Med ***"bisecting" GlcNAc*** menes med prosessen hvor en GlcNAc påsettes i en β -(1-4) kjeden til mannose enhet av N-glykaner (se figur 3).



Figur 3: Figuren viser hvor de ulike glykosyltransferasene slik som Fut8 og Mgat3 katalyserer. Det viser også kjerne fucosylering og "bisecting" GlcNAc som var tidligere forklart. Figuren er basert på figur 1 i referansen [24].

1.3.1 Fucosyltransferase 8 (Fut8)

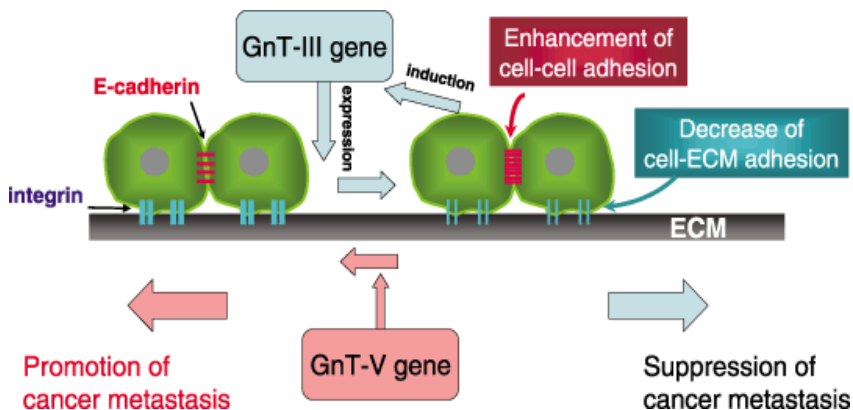
Fut8 er den eneste kjerne fucosyltransferase funnet hos pattedyr. Kjerne fucosylerte glykoproteiner er bredt fordelt i vev hos pattedyr og kan endres under patologisk tilstander slik som hepatocellulære carcinoma (HCC) og lever cirrhose. Høy uttrykk av Fut8 er observert i papillary carcinomas og har sammenheng med lymfeknute metastase. Uttrykk av Fut8 kan dermed være en sentral faktor i utviklingen av tyroid papillary carcinomas [29]

1.3.2 N-acetylglycosaminyltransferase III og V (Mgat3 og Mgat5)

Mgat 3 katalyserer overføring av GlcNAc til β -linket mannose av N-linket sukker kjeder for å danne en "bisecting" GlcNAc. Påsetting av denne "bisecting" GlcNAc i N-linket sukker kjeder resulterer hemming av videre prosessering og elongering av N-glykaner. Uttrykk av Mgat3 er involvert i hemming av metastase. Dette ble bekreftet av studier som viste at når Mgat3 transfektert i melanoma B16 celler blir injisert i mus var lunge metastase redusert sammenlignet med melanoma celler uten Mgat3 [25]. Det har også rapportert at uttrykk av antistoff med endret glykoformer som for eksempel tillegg av "bisecting" GlcNAc fører til økt antistoff-avhengig cellulære cytotoxicitet (ADCC) via økt affinitet for Fc γ reseptor III [39]. Påsetting av "bisecting" GlcNAc i N-linket sukker kjeder har dermed ikke bare antimetastatisk funksjon, men påvirker også aktiviteten av antistoff-avhengig cellulære cytotoxicitet (ADCC) [25]. Siden det er en sammenheng mellom Mgat3 og Mgat5 blir også Mgat5 omtalt under.

Mgat5 katalyserer dannelsen av β 1,6 GlcNAc forgreiningssstrukturer som har en viktig rolle i tumor metastase. Det ble undersøkt sammenhengen mellom Mgat5 og tumor metastase og resultatet viste hemming av polyomavirus middel T antigen (PyMT)-indusert tumor vekst og metastase hos mus som mangler Mgat5. I tillegg viste det at Mgat5 fremmer fokal adhesjon turnover, noe som fører til økt aktivering av PyMT som i sin tur aktiverer fosfatidylinositol 3 (PI3) kinase–PKB og fremmer tumor vekst og metastase. Mgat5 er også involvert i regulering av apoptose. Oppregulering av Mgat5 resulterer at cellene blir mer motstandsdyktig for apoptose, mens nedregulering av Mgat5 fører til at cellene blir mindre motstandsdyktige for apoptose. Det har også vist at uttrykk av Mgat5 i epitheliaceller resulterer i tappt kontakt hemming, økt cellebevegelse og morfologisk transformasjon i cellekulturer [25].

Mgat3 og Mgat5 har motsatt effekt på metastatisk spredning. Uttrykk av Mgat5 fremkynder metastase av kreftceller, mens Mgat3 undertrykker metastase av kreftceller. [25]. Mgat3 konkurrerer med Mgat5 om substrat ved at Mgat3 katalyserer overføring av GlcNAc til β -linket mannose av N-linket sukker kjeder for å danne en ”bisecting” GlcNAc. Denne ”bisecting” GlcNAc i N-linket sukker kjeder fører til undertrykkelse av videre prosessering og elongering av N-glykaner, dermed kan ikke andre glykosyltransferase slik som Mgat5 bruke ”bisecting” oligosakkaridet som substrat [25, 40] Overuttrykk av Mgat3 vil dermed resultere i underuttrykkelsen av Mgat5 aktivitet og dermed hindring av metastatisk spredning [25].



Figur 4: Figuren viser uttrykk av Mgat3 og Mgat5 og sammenheng mellom disse glykosyltransferasene. Økt uttrykk av Mgat5 i epitheliaceller fører til morfologiske transformasjon, tappt kontakt inhibisjon, økt celle motilitet og fremkynder metastatisk spredning. Økt uttrykk av Mgat3 fører til hemming av Mgat5 aktivitet og dermed forhindrer metastatisk spredning. Figuren er basert på figur 2 i referansen [25].

1.3.3 UDP glukoronosyltransferase 1 familie, polypeptid A7c (Ugt1a7c)

Humane UDP-glukoronosyltransferase (UGT) katalyserer glukoronideringsreaksjoner av en rekke stoffer. Glukoronideringsreaksjoner er en mekanisme for eliminering og detoksifisering av tusenvis av stoffer slik som legemiddelstoffer, stoffer fra dietten, miljømessige kjemikaler, endogene stoffer (steroider og bilirubin) og kjemisk karsinogener eller mutagener. Disse UGT enzymer har dermed en viktig rolle i cellulære forsvarsmekanismer og eliminering av toksiske stoffer [33-35].

Det har vært identifisert at mutasjoner av UGT1A familien kan føre til nedsatt enzym aktivitet og dermed redusert konjugering av bilirubin (glucuronidering). Konjugering er nødvendig for at bilirubinet kan skilles ut med gallen. Ukonjugert bilirubin vil dermed hoppe seg opp i blodet og resulterer hyperbilirubinemia, Gilbert syndrom og Crigler-Najjar syndrom type I og II [35].

1.3.4 N-acetylglucosaminyltransferase 1 (Gcnt1)

Gcnt1 er nødvendig for dannelsen av kjerne 2-branched O-glykaner ved at enzymet katalyserer overføring av N-acetylglucosamine (GlcNAc) til kjerne 1 O-glykan [36]. Uttrykk av Gcnt1 ble funnet i flere type tumorer slik som colorectal, lungekreft, T-lymfocytisk og myelogenøs leukemi [37]. Tidligere har det blitt gjort studier som viste at Gcnt1 har sammenheng med utvikling av prostatakreft. For å bestemme rollen av Gcnt1 i utvikling av prostatakreft ble det etablert en LNCaP kontroll cellelinje og en LNCaP cellelinje som uttrykker Gcnt1. Når disse cellelinjene ble inokulert i prostata hos mus ble det observert at LNCaP som uttrykker Gcnt1 produserer tre ganger mer prostata tumorer enn kontrollceller. Videre ble det funnet at LNCaP-Gcnt1 celler adherer sterkere til prostata stromal celler, type IV kollagen og laminin enn LNCaP kontroll celler. Disse resultatene kan tyde på at Gcnt1 er nødvendig for prostata kreftceller som fremmer adhesjon til type IV kollagen og laminin. Denne forsterkede adhesjonen kan være en årsak til aggressive tumor dannelsen av prostata kreftceller som uttrykker Gcnt1 [36].

1.3.5 N-acetylglucosaminyltransferase 2 (Gcnt2)

I/i antigener er karbohydrat strukturer på glykoproteiner og glycolipider på celle overflater av flere kropps vev og væsker. i antigen er en lineær poly-N-acetylactosamin kjede som har Gal β -1 til 4GlcNAc β 1-3 gjentatte enheter, mens I antigenet er forgreinet ved tilføyning av en N-acetylglucosaminyl (GlcNAc) enheter gjennom β -1,6 kjede til en galactosyl enhet. Omdannelsen av i antigen til en I struktur skjer først i humane røde blodceller under de første 18 måneder etter fødsel som et resultat for uttrykk av "I-

branching Gcnt2” transferase. Manglende uttrykk eller mutasjon av dette enzymet er assosiert med katarakt i befolkningen på Taiwan og Japan [38].

1.3.6 St6 β -galactosamide α -2,6-sialyltransferase 1 (St6gal1)

St6gal1 er glykosyltransferase som katalyserer overføring av α -2,6-linket sialinsyre til glycoproteiner [30]. St6gal1 er kjent for å være oppregulert i mange tumortyper slik som colon adenocarcinomas.

In vitro studier ble det foreslått at sialylering av membran glycoproteiner av St6gal1 deltar i metastase ved økt celle bevegelse og invasjon gjennom ekstracellulære matriser (ECM). For eksempel overuttrykk av St6gal1 øker invasjon av fibroblaster og brystkreft celler. Studier av metastase i dyremodell bekrefter disse funnene. Harvey og medarbeidere (1992) har vist at forbehandling av colorektal tumorceller med inkorporering av en sialinsyre inhibitor før injeksjon i bukspyttkjertel hos mus medfører reduksjon av antall mus med hepatisk metastase [41]. Likeledes har Bresalier og medarbeidere (1990) rapportert at injeksjon av sialinsyre inhibitor i to cellepopulasjoner der den ene gruppen er høy α -2,6- sialylerte og den andre er lav sialylerte, har resultatet vist nedsatt dannelsen av hepatisk tumorer i den høy α -2,6- sialylerte gruppen [42] [30].

I en annen studie var det blitt identifisert at β -1 intergrin er et substrat av St6gal1 og det ble brukt en celle-fritt reseptor/ligand binding assay for å bevise at rensket kollagen-bindende intergriner binder bedre til kollagen I når de blir α -2,6- sialylerte. Resultatet viste at celler med α -2,6- sialylert integriner (ved økt St6gal1 uttrykk) har større adhesjon og migrasjon på kollagen I ved sammenligning med usialyerte integriner [30].

1.3.7 St3 β -galactoside α -2,3-sialyltransferase 6 (St3gal6)

St3gal6 katalyserer overføring av en sialinsyre fra cytidine 5-prime-monophospho-N-acetylneuraminic syre (CMP-NeuAc) til terminal posisjon av glycoprotein og glycolipid karbohydrat grupper [31]. Kawamura og medarbeidere (2008) har gjennom sin studie funnet at endringer i en gruppe glykosyltransferaser slik som B4GALNT2 og ST3GAL6 representerer en ondartet fenotype av gastrisk kreft. De har undersøkt uttrykksnivåer av 43 glykogener og har funnet ut at en tredje del av glykosyltransferase gener var nedregulert i mange GI kreft cellelinjer. Blant de kreft-assosierte nedregulerende glykogener som de fant i sin studie var ST3GAL6 hypermetylert i samsvar med metylering av B4GALNT2 i mange av GI kreft cellelinjer. Avvikende metylering i St3gal6 er detektert i 24 av 32 primær gastriske tumorer med statistisk signifikant sammenheng med metylering av B4GALNT2 og Epstein-Barr virus (EBV) status. Disse

resultatene tyder på at endringer kan forekomme i en gruppe glykogener slik som B4GALNT2 og ST3GAL6 i gastrisk kreftvev, som etter hvert kan indusere avvikende glykosylering og uttrykk av kreft-assosierte karbohydrat-antigener ved inaktivering av enzymaktiviteten som er ansvarlig for antigen uttrykk [32].

1.3.8 Hensikt

Hensikten med denne masteroppgaven er å verifisere om en gruppe glykosyltransferaser (Fut8, Mgat3, Ugt1a7c, St3gal6, St6gal1, Gcnt1 og Gcnt2) er mulige målgener for transkripsjonsfaktoren Pax6.

Dette vil bli gjort ved hjelp av RT-PCR og qPCR på RNA-nivå. Isolering av glykoproteiner ved hjelp av concavalin A (Con A) og Wheat Germ Agglutinin (WGA), immunopresipitering (IP), Western blot (WB) og immunohistokjemi (IHC), ble også brukt for å prøve og detektere endringer i glykosylering på protein-nivå.

2. Materialer og Metoder

2.1 Materialer

2.1.1 Primersekvens

Tabell 2. Primere brukt i denne oppgaven

Navn	Sekvens 5' til 3'	Basepar
mPax6 RT 5 mPax6 RT3	CAGCTTGGTGGTGTCTTTGTC CTCGGATAATAATCTGTCTCG	299 + 341 bp
mHPRT RT 5 mHPRT RT 3	GGGGGCTATAAGTTCTTTGC TCCAACACTTCGAGAGGTCC	313 bp
mMgat3 RT 5 mMgat3 RT 3	GGACGATGGGATGAAGATGA GAGTGACAGGGGCATTGTTC	182 bp
mUgt1a,7c RT5 mUgt1a,7c RT 3	GGTGACCCTGAATGTCCTTG TGCCTCATCACGTATTCCAC	174 bp
mFut8 RT 5 mFut8 RT3	AAAATTCACTTCGGGGTGTG CTGATTGTGGGCATTTGG	191 bp
mSt3gal6 RT 5 mSt3gal6 RT 3	AAATGCTTCGTTTTCCAGA TAAAGGACTGTTGGGGCTGT	152 bp
mSt6gal1 RT 5 mSt6gal1 RT 3	CAGCCAGCCTTTTTACATCC ACACATCTGTCTTGCGCTTG	191 bp
mGcnt1 RT 5 mGcnt1 RT 3	ACCAGGAGTCAGAGCCTCAA GGTGTGGTGGGACAACTTC	153 bp
mGcnt2 RT 5 mGcnt2 RT 3	AAGTGGATGGACATGGAAGC ATGGCGATCTCACTCTGGTT	209 bp

2.1.2 Buffere

Tabell 3. Buffere brukt i denne oppgaven

Metode	Buffere	Innhold
Gel elektroforese	50 x TAE buffer	242 g Tris base 57,1 ml 11,4 % eddiksyre 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) dH ₂ O til 1000 ml 50 x TAE buffer fortynnes til 1 x TAE før bruk!
	6 x T gel loading buffer	0,25 % Xylen Cyanol FF 60 mM Na ₂ EDTA (pH 8,0) 0,6 % SDS 40 % (w/v) sukrose i vann
Høsting av celler	GP buffer+ PI	50 mM Tris (pH 7,4) 150 mM NaCl 0,1 mM MnCl ₂ 0,5 % Triton X-100 82,5 ml dH ₂ O Tilsett 1 tablett av protease inhibitor (PI) uten EDTA til 10 ml buffer. Lagres ved -20°C
Rensing av glykoproteiner	Bindingsbuffer	20 mM Tris pH 7,4 0,5 M NaCl 1 mM CaCl ₂ 1 mM MnCl ₂
	Gel shift buffer	20 mM Hepes pH 7,9 60 mM KCl 1,5 mM MnCl ₂ 0,2 mM EDTA
	Gel shift buffer m/NaCl	20 mM Hepes pH 7,9 60 mM KCl 1,5 mM MnCl ₂ 0,2 mM EDTA 120 mM NaCl

Western Blot	5 % blokkeringsbuffer	2,5 g tørrmelk 50 ml PBST
	PBST	100 ml 10 x PBS 1 ml Tween 20 899 dH ₂ O
	Blottebuffer	1,88 g Tris base 23,25 g Glycin til 850 ml med dH ₂ O 150 ml Metanol
	2 x SDS gel loading buffer	100 mM Tris HCl 4 % (w/v) SDS 0,2 % (w/v) 20 % (v/v) glyserol 200 mM Ditriothritol (tilsettes før bruk)
	10 x gelkjøringsbuffer	10 g SDS 30 g Tris(base) 144 g glycine til 800 ml med dH ₂ O. Juster pH til 7,4 med 18,5 % HCl dH ₂ O til 1000 ml 10 x gel kjøringsbuffer fortynnes til 1 x SDS gelkjøringsbuffer før bruk!
	1,5M Tris(base) pH 8.8	18,2 g (Tris base) 80-90 ml dH ₂ O 2 ml 20 % SDS Juster pH til 8,8 med 18,5 % HCl Tilsett dH ₂ O til 100 ml
	0,5M Tris(base) pH 6.8	6,05 g Tris(base) 80-90 ml dH ₂ O 2 ml 20 % SDS Juster pH til 6,8 med 18,5 % HCl Tilsett dH ₂ O til 100 ml
	10 % APS	1 g Ammoniumpersulfat (APS) 10 ml MQ-vann

	10 % separerende gel	4,8 ml MQ-vann 2,5 ml 1,5 M Tris(base) 2,6 ml Acrylamid Bis 40 % 29:1 100 µl 10 % APS 10 µl TEMED (BioRad)
	4 % konsentrerende gel	1,6 ml MQ-vann 650 µl 0,5 M Tris(base) 250 µl Acrylamid Bis 40 % 29:1 25 µl 10 % APS 2,5 µl TEMED (BioRad)
	1 M DTT	3,085 g dithiothreitol (DTT) 20 ml 10 mM Natrium acetate (pH 5,2)

2.1.3 Løsninger

Tabell 4. Typer løsninger til brukt i denne oppgaven

Metode	Type løsning	Innhold
Immunostaining	8 % PFA	0,4 g PFA ~ 4,5 ml dH ₂ O ~ 2 dråper NaOH 1 M Varmes i vannbad ved temperatur 70-80°C. Etter alt var oppløst ble 0,5 ml 10 x PBS tilsatt og løsningen plasseres på is inntil bruk.
Coomassie blue	Fikseringsløsning	10 % eddiksyre (acetic acid) 40 % etanol (EtOH) 50 % vann (dH ₂ O)
	Fargeløsning	0,125 % Coomassie blue K250 50 % metanol 10 % eddiksyre
	Avfargingsløsning I	50 % metanol 10 % eddik syre 40 % vann (dH ₂ O)

	Avfargingsløsning II	7 % eddik syre 5 % metanol 88 % vann (dH2O)
--	----------------------	---

2.1.4 Antistoffer

Tabell 5. Antistoff brukt i denne oppgaven

Antistoffsnavn	Fortynning	Produksjon/fabrikk	Produkt nummer
Kanin α -Pax6	1:1000	Chemicon International	Cat.nr. AB5409
Kanin α -nucleolin	1:2000	Abcam	Ab 70493-100
	1:50	Abcam	Ab 70490-100
Kanin α -actin	1:1000	Sigma-Aldrich	A2066
Geit α -Biotin	1:2000	Cell Signaling	Ab # 7727
α -kanin HPR	1:2000	Pharmingen	Cat.nr. 554021
Kanin α -BRCA2	1:100	Abcam	Ab 2957
Alexa Fluor® 488 geit- α -kanin IgG	1:5000	Molecular Probes	A-11034 Lot# 99C 2-3
Geit α -NrCAM	1:800	Santa Cruz	sc189960 Lot# 01703
Geit α -NCAM-L1	1:800	Santa Cruz	sc1508 Lot# 1003

2.1.5 Vekstmedia

Tabell 6. Vekstmedia brukt i denne oppgaven

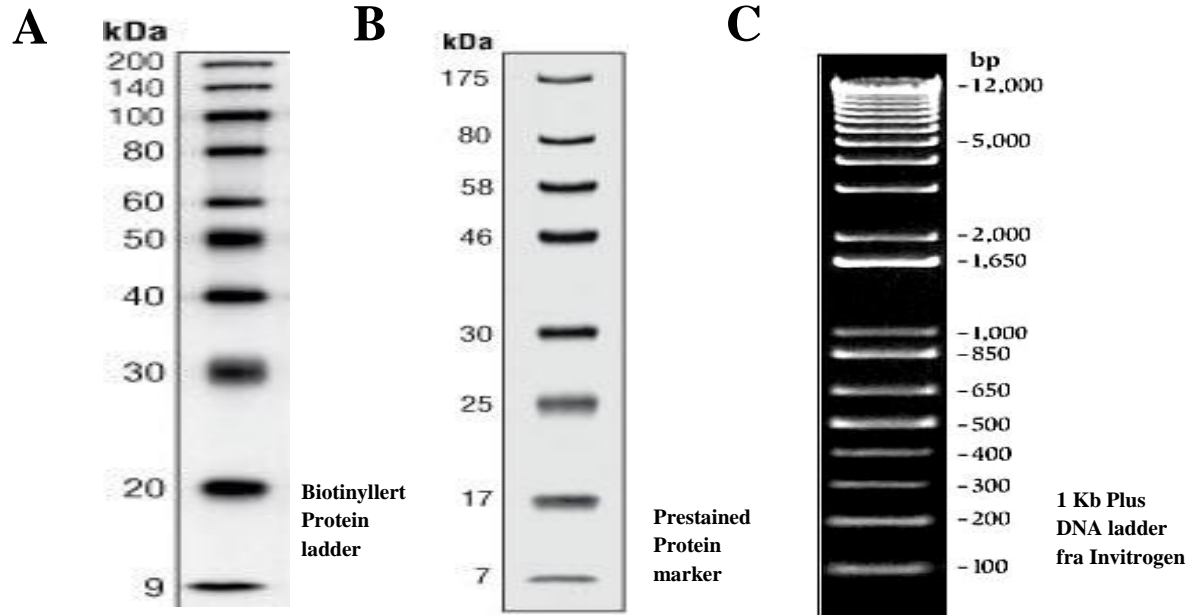
Vekstmedia	Innhold
Vekstmedia for FlpIn 3T3	10 % FCS 90 % DMEM high glucose 100 μ l Zeocin per 100 ml medium
Vekstmedia for Pax6 og Pax6(5a)	10 % Fcs 90 % DMEM 150 μ l Hygromycin per 100 ml medium

2.1.6 Andre materialer

Tabell 7. Andre materialer brukt i denne oppgaven

Materialer	Produksjon/fabrikk
Zeocin	Invitrogen
Hygromycin	Invitrogen
Fcs	Hyclone
CRI	TaKaRa
DMEM	Sigma
RNasin	Promega
Dynazyme	Finnzymes
10 x DynaZyme PCR buffer DNA polymerase	Finnzymes
dNTP mix (10 mM)	Finnzymes
2 x Brilliant II Syber Green Q-PCR master mix	Stratagene
Trypsin – EDTA solution (1x)	Sigma
Biotinylad protein ladder	Cell Signaling
Prestained Protein marker	BioLabs
1 Kb Plus DNA ladder	Invitrogen
Western Blotting Luminol Reagent	Santa Cruz
Con A sepharose 4B	Amersham Biosciences
Glycoprotein isolation Kit, WGA	Thermo scientific
GelCode Glycoprotein Staining Kit	Pierce biotechnology

2.1.7 Protein og DNA markører



Figur 5. Viser biotinylert og prestained ladder brukt til WB og 1 Kb Plus DNA ladder brukt til gel elektroforese.

2.2 Metoder

2.2.1 RNA preparasjon ved hjelp av TRIzol (Invitrogen)

3 ml TRIzol ble tilsatt i hver 75 cm² cellekulturflaske når cellene var cirka 80 % confluent. Celler i kulturflaskene ble inkubert omtrent 5 minutter ved romtemperatur, deretter ble cellene skrapet løs med sterile celleskraper og overført med omtrent 1 ml av celle blanding i hver eppendorfrør. Disse eppendorfrørene ble deretter brukt til å lage RNA eller lagret ved -80°C .

RNA preparasjon ble utført i RNA avtrekkskap. I hvert rør med 1 ml Trizol ble det tilsatt 200 μl kloroform. Hver eppendorfrør ble ristet hardt for hånd i 15-20 sekunder, deretter inkubert ved romtemperatur i 2-3 minutter. Etter inkubering ble eppendorfrørene sentrifugert ved $12000 \times g$ ved 4°C i 15 minutter. Den øverste fasen (den blanke fasen) ble overført til et nytt eppendorfrør. 500 μl isopropanol ble tilsatt i hvert rør og vendt omtrent 6-7 ganger. Rørene ble deretter inkubert ved romtemperatur i 10 minutter, deretter sentrifugert med $12000 \times g$ ved 4°C i 10 minutter. Supernatanten ble fjernet og RNA pelleten vasket i 1 ml 75 % etanol (lagd med DEPC H₂O). Rørene ble blandet godt ved vortex, deretter sentrifugert med $7500 \times g$ ved 4°C i 5 minutter. Supernatanten ble

igjen fjernet og RNA pelleten lufttørket i omtrent 10 minutter slik at all etanol var fordampet. RNA pelleten ble deretter løst opp ved å resuspendere i 50-100 µl RNase fritt vann. Prøvene ble inkubert på varmeblokk ved 55-60°C i 10 minutter, deretter plassert på is. RNA konsentrasjon ble målt ved hjelp av nanodrop spektrofotometri, deretter lagret ved - 80 °C.

2.2.2 DNase behandling av RNA

DNase behandling av RNA ble utført ved hjelp av RNeasy Micro Kits Qiagen for å fjerne genomisk DNA. Til RNA prøven ble det tilsatt 100 µl RNase fritt vann, deretter 350 µl RLT buffer og blandingen ble blandet sammen. 250 µl av 96-100 % etanol ble tilsatt og blandet godt sammen ved å pipettere opp og ned flere ganger. 700 µl av blandingen ble overført til en RNeasey Minelute spinn kolonne med 2 ml samlerør. Kolonnen ble sentrifugert ved 11500 x g i 15 sekunder. 350 µl RW1 buffer ble tilsatt i kolonnen og deretter sentrifugert ved 11500 x g i 15 sekunder. 210 µl RDD buffer ble tilsatt i en ny eppendorfrør, deretter 30 µl DNase. 80 µl av denne DNase blandingen ble overført til kolonnen før den ble inkubert ved romtemperatur i 15 minutter. 350 µl RW1 buffer ble tilsatt og sentrifugert ved 11500 x g i 15 sekunder. Kolonnen ble overført til et nytt 2 ml samlerør, 500 µl 80 % etanol ble tilsatt og sentrifugert ved 11500 x g i 2 minutter. For å vaske bort resterende buffer ble kolonnen overført til et nytt 2 ml samlerør og sentrifugert ved 13000 x g (maks hastighet) i 5 minutter. For eluering av RNA ble kolonnen overført til et nytt 1,5 ml eppendorfrør, 14 µl RNase fritt vann tilsatt og sentrifugert ved 13000 x g i 1 minutt. RNA prøven ble plassert på is og RNA konsentrasjonen ble målt med NanoDrop ND-200 Spectrophotometer. RNA prøven ble deretter lagret ved – 80 °C eller brukt direkte i cDNA preparasjon.

2.2.3 Preparasjon av cDNA vha Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche)

I hver eppendorfrør ble følgende tilsatt:

X µl RNA (5 ug)

4 µl Random hexamer primer (pdN6 [1,6 ug/ul])

Y µl RNase fritt vann til 26 ul

Eppendorfrørene ble inkubert på varmeblokk ved 65 °C i 10 minutter, deretter plassert på is i omtrent 1-2 minutter. Deretter ble rørene spunnet ned og følgende ble tilsatt:

8 µl Transcriptor RT Reactionbuffer (5x) (Roche)

4 µl dNTP mix (10mM)

1 µl RNAsin (eller CRI)

1 µl Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche)

Rørene ble blandet godt ved vortex og spunnet kort ned. De ble så inkubert på varmeblokk først ved 25 °C i 10 minutter, deretter ved 55 °C for 30 minutter og tilslutt ved 85 °C i 5 minutter. cDNA rørene som ble lagt lagret deretter ved – 20°C.

2.2.4 Revers Transkriptase Polymerase Chain Reaction (RT- PCR)

For hvert primersett ble det laget en mastermiks og det ble laget en halv ganger mer enn det som trengtes.

Hver PCR reaksjon inneholder følgende:

39,5 µl dH₂O

5 µl 10 x DynaZyme PCR buffer

1 µl dNTP miks (10 mM)

1 µl 10 µM Forward primer

1 µl 10 µM Revers primer

0,5 µl DyNAzyme

Totalt 50 µl

48 µl mastermiks og 2 µl cDNA ble pipettert over til PCR rør. Prøvene ble blandet sammen ved å flikke på rørene, deretter spunnet ned. PCR prøvene ble kjørt i PCR maskin.

PCR program: "IMHPRT" og "IMPAX6"

Trinn 1: denaturering ved 94 °C i 1 minutt

Trinn 2: annealing ved 57 °C i 20 sekunder

Trinn 3: polymerisering ved 72 °C i 1 minutt

Etter at først syklus var fullført dannes det 2 DNA tråder som ga DNA templatere for de neste syklusene.

Trinn 4: gjentakelse!

Tilbake til trinn 1-4, men denatureringstrinnet etter første syklus reduseres til 20 sekunder.

Trinn 5: Syntese av DNA ved 72 °C i 5 minutter

Trinn 6: Nedkjøling til 4 °C (uendelig)

2.2.5 DNA gel elektroforese

2.2.5.1 1 % agarose gel blanding

1,5 g agarosepulver ble veid og blandet med 150 ml 1xTAE i en erlenmeyerkolbe. Deretter ble blandingen oppvarmet i en mikrobølgeovn i omtrent 2-3 minutter til all agarosepulver blir oppløst. Den varme agarose gel blandingen ble avkjølt til cirka 60-70°C

2.2.5.2 Støping av gelen

En kam med ønsket antall tenner ble plassert i en gelstøpingsbrett som ble skrudd fast i en ramme. 5 ul etidiumbromid (10mg/ml) ble tilsatt og fordelt utover rammen. Cirka 50 ml av 1 % agarosegel blandingen ble helt inn i gelstøpingsbrettet. Det ble ristet lett på slik at etidiumbromid ble homogent blandet med agarosegelen. Alle luftbobler ble fjernet før gelen stivnet (~ 20-30 minutter).

2.2.5.3 Pipettering av ulike prøver i den avstøpte gelen

Agarose gelen ble lagt i et gel elektroforese kar som ble fylt opp med 1 x TAE buffer til det dekket hele gel overflaten. 10 ul av 6 x T ble tilsatt i hvert PCR prøverør. 6 ul av 1 kb pluss ladder ble deretter pipettert over i en egen brønn, deretter ble 15 ul av hver PCR prøvene satt i hver sine brønner. Før prøvene ble overført til hver brønn ble de godt blandet ved å pipettere opp og ned flere ganger. Gelen ble kjørt med 90 volt i omtrent 30 minutter. Etter at gel elektroforese var kjørt ble bilder av gelen tatt ved hjelp av Gel Doc 2000 BIO RAD.

2.2.6 Kvantitativ Polymerase chain reaction (qPCR)

cDNA ble fortynnet 1:5, 1:25, 1:125 og 1:625 med dH₂O. For hver prøve ble det kjørt med duplikater, samt en kontroll uten templat (NTC) og en kontroll med cDNA lagd uten revers transkriptase enzym (NoRT). For hvert primersett ble det lagt en mastermiks.

Mastermiks for hver PCR reaksjon inneholder følgende:

9,5 µl dH₂O

12,5 SYBR (Brilliant II Syber Green–Stratagene)

0,5 µl Forward primer [10µM]

0,5 µl Revers primer [10 µM]

23 µl mastermiks ble pipetert over i qPCR eppendorfrør og 2 µl cDNA ble tilsatt, deretter spunnet ned før qPCR prøvene ble kjørt i qPCR maskinen.

Prøvene ble kjørt på en MX3000P Stratagene maskin med følgende innstillinger i qPCR maskinen:

Temperaturen økes til 95°C i 10 minutter, deretter ble det kjørt 42 sykluser med

- Denatuering av templat ved 95°C i 30 sekunder
- Temperaturen senkes til 60°C i 1 minutt hvor primer kan binde til templat
- Temperaturen økes til 72°C i 30 sekunder hvor DNA syntese foregår

Smeltekurve

- Denatuering ved 95°C i 1 minutt
- Temperaturen senkes til 55°C i 30 sekunder
- Temperaturen økes til 95°C i 30 sekunder

Resultatene ble analysert ved hjelp av MxPro-Mx3000P software program som fulgte med maskinen. For å beregne differanser ble følgende formell benyttet:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{P target}} (\text{controll-sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{P ref}} (\text{controll-sample})}}$$

2.2.7 Høsting av celler til glykoprotein isolering

Cellene i kulturflaske ble vasket 2 ganger med omtrent 15 ml 1 x PBS. Deretter ble 5 ml 1 x PBS tilsatt og cellene i kulturflasken ble inkubert på is i 5 minutter. Cellene ble skrapet løs ved hjelp av celleskrape og deretter overført til en 15 ml sentrifugerør. Sentrifugerøret ble spunnet ned ved 1000 x g i 3 minutter. Supernatant ble fjernet og 500 µl av GP buffer + PI ble tilsatt og resuspendert. Celleblandingen ble overført til eppendorfrøf og sonikert på vannbad i 30 sekunder i 2,5 minutter med Bioruptor ICD-200. Etter sonikering ble det sentrifugert i 5 minutter ved 13000 x g ved 4 °C for å bli kvitt debris. Supernatanten ble overført til et nytt eppendorfrør og protein konsentrasjonen ble målt ved hjelp av BioRad assay, deretter lagret ved - 20 °C eller kjørte proteinekstraktet på 10 % SDS-PAGE for Western Blot.

2.2.8 BioRad protein assay

Konsentrasjon av ulike proteiner ble målt ved hjelp av BioRad protein assay. I denne metoden ble protein konsentrasjonen bestemt ved en fargetest basert på en standard kurve. Først ble det satt opp en standardkurve. Dette ble gjort ved å pipettere vann og BSA i brønnene som vist på tabellen nedenfor.

Tabell 8. Standardkurve. Tallene under "Standardkurve" for står brønn 1 til brønn 10 på en cellekultur multiplate Falcon Microtest™. Tallene under "µg protein", "µl BSA", "µl dH2O" og "BioRad reagens" er mengde protein, BSA, dH2O og BioRad reagens henholdsvis som skal tilsettes i de ulike brønnene fra nummer 1-10.

Standardkurve	µg protein	µl BSA (0,1 mg/ml løsning)	µl dH2O	BioRad reagens
1	0	0	24	40
2	1	2	22	40
3	2	4	20	40
4	3	6	18	40
5	4	8	16	40
6	5	10	14	40
7	6	12	12	40
8	7	16	8	40

9	8	20	4	40
10	9	24	0	40

Bland 880 µl BioRad reagens sammen med 3 ml dH₂O. 176 µl av denne blandingen ble tilsatt i hver brønn etter at vann og BSA var tilsatt.

For å finne ut hvor mye av protein som må tilsettes for å ligge innenfor standardkurven ble det kjørt flere fortyningstester med ulike protein mengder til en total volum på 200 µl, for eksempel:

Test 1: 0,5 µl protein + 159,5 µl vann + 40 µl BioRad reagens

Test 2: 1 µl protein + 159 µl vann + 40 µl BioRad reagens

Test 3: 1,5 µl protein + 158,5 µl vann + 40 µl BioRad reagens

Test 4: 2 µl protein + 158 µl vann + 40 µl BioRad reagens

Det ble brukt den fortyningen som ligger innenfor standardkurven. Til måling ble det lagt 2 paralleller av hver prøve.

Proteinkonsentrasjonen ble avlest ved bruk av software program SOFT max 2.32 og plate reader THERMOmax Microplatereader.

2.2.9 Glykoprotein isolering ved hjelp av ConA Sepharose 4B (Amersham Biosciences, GE Healthcare) før SDS-PAGE

150 µl Con A Sepharose gel (gelslurry) ble vasket 2 ganger med 1,5 ml bindingsbuffer (20 mM Tris pH 7.4, 0,5 M NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂) og sentrifugert ved 2000 x g i 1 minutt mellom hver vask. Deretter ble gelen resuspendert i 100 µl bindingsbuffer. Mengde protein (500 µg) ble justert til 300 µl ved å tilsette "GP buffer + PI", deretter ble det tilsatt 88 µl 2 M NaCl, 0,5 µl 1M CaCl₂, 5 µl 0,1 M MnCl₂ og 107 µl vann til et total volum på 500 µl. 60 µl gelslurry som ble lagt ble tilsatt til hvert protein rør. Protein prøvene ble inkubert på rotator ved 4 °C over natt. Etter inkubering ble prøvene spunnet ned ved 2000 x g i 1 minutt, deretter ble supernatant overført til et annet eppendorfrør. Prøvene med "sepharose kulene" ble vasket 4 ganger i 1 ml bindingsbuffer og sentrifugert ved 2000 x g i 1 minutt mellom hver vask. Prøvene ble deretter kokt på vannbad i 5 minutter i 25 µl 2 x SDS loading buffer. 15 µl 2 x SDS loading buffer ble tilsatt i 15 µl av supernatant til et total volum på 30 µl og kokt på vannbad sammen med prøvene og en prestained markør som består av 7 µl biotinylated ladder, 7 µl prestained

ladder og 14 µl 2xSDS loading buffer. Disse ble kjørt på 10 % SDS-PAGE gel, deretter fiksert og farget med Coomassie blue.

2.2.10 Coomassie blue staining

Etter at proteinene ble kjørt på 10 % SDS-PAGE gel ble den fiksert i fikseringsløsning minst ½ time, deretter farget i fargingsløsning i 1 time eller over natt. Etter farging med fargingsløsning ble gelen vasket med avfargingsløsning I tre ganger innen omtrent en time før det ble vasket med avfargingsløsning II tre ganger innen en time eller lengre. Bildet av gelen ble tatt ved hjelp av Gel Doc 2000 BIO RAD.

2.2.11 Glykoprotein isolering vha WGA (Thermo scientific nummer 89805)

Prøve forberedelse:

Protein prøven ble lagt ved å fortynne 1 mg protein med 5 x bindingsbuffer (vaske buffer) til et forholdstall på 4:1.

Isolering av glykoproteiner:

1 x bindingsbuffer ble lagt ved å fortynne 460 µl 5 x bindingsbuffer med 1840 µl sterilt vann. 200 µl WGA lektin resinet ble overført til en kolonne med et 2 ml samlerør, deretter sentrifugert ved 1000 x g i 1 minutt. WGA lectin resinet ble vasket 3 ganger i 200 µl 1 x bindingsbuffer og kolonnen ble sentrifugert ved 1000 x g i 1 minutt mellom hver vask. En plugg ble satt inn nederst i kolonnen og protein prøven ble tilsatt til resinet. Kolonnen ble inkubert på rotator i 10 minutter ved romtemperatur. Pluggen ble fjernet og kolonnen ble plassert tilbake i samlerøret, deretter sentrifugert ved 1000 x g i 1 minutt. Det ble tatt vare på væsken (flow through) som har rennet gjennom kolonnen. Resinet i kolonnen ble vasket 2 ganger i 400 µl 1 x bindingsbuffer og sentrifugert ved 1000 x g i 1 minutt mellom hver vask. Pluggen ble satt tilbake og 400 µl 1 x bindingsbuffer ble tilsatt til resinet. Kolonnen ble inkubert på rotator i 5 minutter ved romtemperatur. Pluggen ble igjen fjernet og kolonnen ble plassert tilbake i samlerøret og sentrifugert ved 1000 x g i 1 minutt. Igjen ble pluggen satt tilbake og 400 µl 1 x bindingsbuffer ble tilsatt til resinet. Kolonnen ble inkubert på rotator i 5 minutter ved romtemperatur. Pluggen ble igjen fjernet og kolonnen ble plassert tilbake i samlerøret og sentrifugert ved 1000 x g i 1 minutt. Pluggen ble satt tilbake i kolonnen og 200 µl elueringsbuffer ble tilsatt til resinet (Eluerte glykoproteiner her kalt "Eluat 1" lagres for senere analyse). Kolonnen ble

inkubert på rotator i 10 minutter ved romtemperatur, deretter overfør til et nytt samlerør og sentrifugert ved 1000 x g i 1 minutt. Eluatet ble samlet og dette elueringsstrinnet ble gjentatt 2 ganger. (eluerte glykoproteiner her kalt "Eluat 2 + Eluat 3" lagres for senere analyse).

Tillaging av 10 prøver til SDS-PAGE:

FlpIn-3T3 protein til Western blot (100 µg):

- FlpIn-3T3 protein [11,716 µg/ul] 8,5 µl + 6,5 µl dH₂O + 15 µl 2 x SDS buffer

FlpIn-3T3-Pax6 protein til Western blot (100 µg):

- FlpIn-3T3-Pax6 protein [14,082 µg/ul] 7,1 µl + 7,9 µl dH₂O + 15 µl 2 x SDS buffer

FlpIn-3T3 Pax6(5a) protein til Western blot (100 µg):

- FlpIn-3T3-Pax6(5a) protein [12,737 µg/ul] 7,9 µl + 7,1 µl dH₂O + 15 µl 2 x SDS buffer

FlpIn-3T3 "Flow through":

- 15 µl FlpIn-3T3 "Flow through" + 15 µl 2 x SDS buffer

FlpIn-3T3-Pax6 "Flow through":

- 15 µl FlpIn-3T3-Pax6 "Flow through" + 15 µl 2 x SDS buffer

FlpIn-3T3-Pax6(5a) "Flow through":

- 15 µl FlpIn-3T3-Pax6(5a) "Flow through" + 15 µl 2 x SDS buffer

Prestained markør:

- 7 µl + 7 µl 2 x SDS buffer

FlpIn-3T3 "Eluat":

- 15 µl FlpIn-3T3 "Eluat" + 15 µl 2 x SDS buffer

FlpIn-3T3-Pax6 "Eluat":

- 15 µl FlpIn-3T3-Pax6 "Eluat" + 15 µl 2 x SDS buffer

FlpIn-3T3-Pax6(5a) "Eluat":

- 15 µl FlpIn-3T3-Pax6(5a) "Eluat" + 15 µl 2 x SDS buffer

Alle prøverørene ble kokt på vannbad i 5 minutter, deretter kjørt i 10 % SDS-PAGE gel. Gelen ble deretter farget med GelCode glykoprotein fargingskitet.

2.2.12 Glykoproteinfarging vha GelCode glykoproteinfargingskit

Farging av glykoproteiner i SDS-PAGE gel skjer ved hjelp av GelCode Glykoprotein Staining Kit (Pierce Biotechnology qp Perbio nummer 24562).

Etter at glykoproteiner ble kjørt i 10 % SDS-PAGE gel ble gelen fiksert i 100 ml 50 % metanol i 30 minutter. Gelen ble vasket 2 ganger på svak risting i 100 ml 3 % eddiksyre løsning med 10 minutter mellom hver vask, deretter inkubert i 25 ml oksiderende løsning på svak risting i 15 minutter. Etter inkubering i oksiderende løsning ble gelen ble vasket 3 ganger på svak risting i 100 ml 3 % eddiksyre løsning med 5 minutter mellom hver vask. 25 ml GelCode Glycoprotein staining reagent ble tilsatt og gelen inkubert på svak risting i 15 minutter. Etter farging ble det tilsatt 25 ml reduserende løsning og gelen inkubert på svak risting i 5 minutter. Gelen ble vasket med 100 ml 3 % eddiksyre løsning og deretter rikelig med MQ vann. Bilder av gelen ble tatt ved hjelp av Gel Doc 2000 BIO RAD.

2.2.13 Testing av GelCode glykoprotein fargingskit

GelCode glykoprotein fargingskitet (Pierce Biotechnology qp Perbio nummer 24562) testes ved at det ble lagt åtte prøver som består av tre fortyninger hver av en positiv kontroll (HPR) og en negativ kontroll (STI) på 10 µg, 20 µg og 40 µg.

- 1) HPR 5 µl proteinekstrakt (2 µg/ µl) + 5 µl 2 x SDS buffer med 20 % DTT
- 2) HPR 10 µl proteinekstrakt (2 µg/ µl) + 10 µl 2 x SDS buffer med 20 % DTT
- 3) HPR 20 µl proteinekstrakt (2 µg/ µl) + 20 µl 2 x SDS buffer med 20 % DTT
- 4) STI 5 µl proteinekstrakt (2 µg/ µl) + 5 µl 2 x SDS buffer med 20 % DTT
- 5) STI 10 µl proteinekstrakt (2 µg/ µl) + 10 µl 2 x SDS buffer med 20 % DTT
- 6) STI 20 µl proteinekstrakt (2 µg/ µl) + 20 µl 2 x SDS buffer med 20 % DTT
- 7) 7 µl prestained ladder + 7 µl 2 x SDS buffer med 20 % DTT
- 8) BSA [2mg/ml] 10 µl proteinekstrakt (2 µg/ µl) + 10 µl 2xSDS buffer med 20 % DTT

Disse prøvene ble kokt i 5 minutter og kjørt på 10 % SDS-PAGE, deretter ble gelen farget med Gelcode glykoprotein fargingskitet.

2.2.14 Testing av glykoprotein isoleringskit, WGA (Thermo scientific nummer 89805)

Glykoproteiner ble isolert etter prosedyre beskrevet tidligere under glykoprotein isolering ved hjelp av WGA, men proteinekstraktet ble blandet med 10 μl (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) Horseradish peroxidase (HRP) før prøven fortynnes med 5 x bindingsbuffer til et forholdstall på 4:1. Etter eluering ble 200 μl SDS buffer overført til resinnet. Kolonnen ble dekt til med parafilm og kokt opp i 5 minutter. Kolonnen ble sentrifugert ved 1000 x g i 1 minutt og eluatet av resinnet ble samlet til SDS-PAGE.

Tillaging av protein prøver til SDS-PAGE:

Det ble lagt en prøve av eluatet fra kokte resinnet, en prøve av flow through, en prøve av eluat 1 og eluat 2, en prøve av proteinekstrakt, en prøve av positiv kontroll og en molekylvekt markør. Disse ble lagt på følgende måter:

Prøve av eluatet fra kokt resinnet:

- 30 μl eluatet av resinnet (etter at det ble kokt) ble brukt til SDS-PAGE.

Prøven av flow through:

- 15 μl 2 x SDS buffer med DTT
- 15 μl flow through

Prøven av eluat 1:

- 15 μl 2 x SDS buffer med DTT
- 15 μl eluat 1

Prøven av eluat 2:

- 15 μl 2 x SDS buffer med DTT
- 15 μl eluat 2

Protein prøve til et total volum på 30 μl :

- 1 μl FlpIn-3T3 protein (10 μg)
- 15 μl 2 x SDS buffer med DTT
- 14 μl vann

Positiv kontroll prøve:

- 1 µl HRP
- 15 µl 2 x SDS buffer med DTT
- 14 µl sterilt vann

Molekylvekt markør:

- 7 µl biotinylated ladder
- 7 µl prestained ladder
- 14 µl 2 x SDS buffer med 20 % DTT

Alle prøvene unntatt fra eluatet av resinet (som allerede var kokt) ble kokt på vannbad i 5 minutter, deretter kjørt alle prøvene i 10 % SDS-PAGE gel. Gelen ble deretter farget med GelCode glykoprotein fargingskitet.

2.2.15 Western Blot

Støping av acrylamidgelen:

Det ble brukt glassplater med 1,5 mm tykke ”spacere”. Utstyret ble montert etter anvisning fra produsenten (BioRad). 10 % separerende gel ble fylt opp mellom glassplatene til 3/4 på glassplaten, deretter tilsatt MQ-vann oppå separerende gel for å få en jevn overflate på gelen når den stivnet. Etter at gelen var stivnet og vannet som lå over gelen ble helt ut ble det tilsatt 4 % konsentrerende gel, deretter ble det satt ned en kam med 10 tenner mellom glassplatene. Når gelen var stivnet ble den overført til en gelkjøringsramme som ble plassert i en gelkjøringskar og det ble fylt opp med 1 x gelkjøringsbuffer. De prøvene og ladderene som var laget ble satt i brønnene og det ble kjørt på 120 volt i 2 timer.

Etter at prøven ble kjørt på 10 % SDS-PAGE ble gelen blottet i blottebuffer i 1 time ved romtemperatur for å overføre proteiner fra gel til nitrocellulose membran.

Blotting av membranen:

Før gelen blottes ble den inkubert i blottebuffer i omtrent 10 minutter. En Hybondmembran, 2 svamper og 4 filterpapir ble også inkubert i blottebuffer i 15 minutter før blotting. Disse ble pakket inn i en kassett på følgende måte:

- en svamp

- 2 filterpapir
- en Hybondmembran
- SDS-PAGE gel
- 2 filterpapir
- 2 svamp

Kassetten ble satt i blottekaret, slik at membranen kom nærmest den positive polen. 1000 ml blottebuffer ble tilsatt og blottingen ble kjørt på 100 volt i 1 time ved romtemperatur med en liten magnetrør i bunnen.

Inkubering med antistoff:

Etter blotting ble Hybondmembranen vasket med vann før den ble overført til et 50 ml sentrifugerør. Membranen ble deretter blokkert på rotator over natt i 20 ml 5 % blokkeringsbuffer ved 4 °C. Blokkeringsbufferen ble fjernet og membranen ble inkubert på rotator i 4 ml 5 % blokkeringsbuffer med primær antistoff i 1 time ved romtemperatur eller overnatt ved 4 °C. Etter inkubering av primær antistoff ble membranen vasket i 15 ml PBST buffer på svak risting i 5 minutter. Membranen ble vasket 5 ganger før inkubering av sekundær antistoff på rotator i 4 ml 5 % blokkeringsbuffer i 1 time ved romtemperatur. Etter inkubering av sekundær antistoff ble membranen vasket 5 ganger på rotator i 15 ml PBST buffer med 5 minutter intervall mellom hver vask.

Membranen ble tørket og 750 µl av Western Blotting Lunimol reagens A og 750 µl av reagens B fra Santa Cruz ble blandet godt sammen før væsken overførtes til membranen. Væsken ble jevn fordelt utover membranen og lot det virke i 1 minutt før membranen ble lagt inn i en plastlomme til fremkalling av bildet. Bildet ble tatt ved hjelp av Image Reader LAS-3000 Fujifilm intelligent dark box.

Membranen ble gjenbrukt for andre antistoffer. For å kunne gjøre dette ble membranen strippet for å fjerne tidligere primære og sekundære antistoffer før en ny runde med antistoff deteksjon.

Stripping av membranen:

Membranen ble inkubert i 20 ml 0,5 M NaOH og satt på vippeplate i 5 minutter. Deretter skylte av i vann og vasket membranen i omtrent 15 ml PBST buffer i 5 minutter. Dette ble repetert 5 ganger. Etter vask ble membranen blokkert over natt ved 4 °C på rotator i 20 ml 5 % blokkeringsbuffer. Blokkeringsbufferen ble fjernet og membranen ble inkubert på rotator i 4 ml 5 % blokkeringsbuffer med ønsket primær antistoff. Videre prosedyre ble gjort på samme måten som beskrevet tidligere.

2.2.16 Immunopresipitering

240 µl Protein A sepharose CL-4B beads ble pipetter over i et eppendorfrør og vasket 2 ganger i "gel-shift buffer", deretter mettet med 10 µl BSA [20 µg/µl] i gel- shift buffer i ½-1 time på rotator ved 4 °C. Etter inkuberingen ble "sepharosen" vasket 2 ganger i gel shift buffer, deretter resuspendert til 50 % gel – slurry i gel shift buffer. 200 µg protein ekstrakt ble pre-inkubert med 40 µl 50 % gel – slurry i gel shift buffer i 20 minutter ved 4 °C. Etter pre-inkuberingen ble supernatant overført til et nytt eppendorfrør og det ble tilsatt 6 µl antistoff til supernatant. Røret ble inkubert på rotator ved 4 °C i 2 timer, deretter ble det tilsatt 40 µl 50 % gel – slurry i gel shift buffer i supernatanten og inkubert på rotator ved 4 °C i 1 time. Røret ble spunnet ned og supernatant ble overført til et nytt eppendorfrør. Eppendorfrøret med "sepharosen" ble vasket tre ganger i gel shift buffer som inneholder 120 mM NaCl, deretter kokt opp i 25 µl 2 x SDS PAGE loading buffer med 20 % DTT i 5 minutter. Prøven ble kjørt på 10 % SDS-PAGE gel eller lagret ved -20 °C for senere analyse. Etter at prøven ble kjørt på 10 % SDS-PAGE ble gelen blottet i blottebuffer i 1 time ved romtemperatur for å overføre proteiner fra gel til nitrocellulose membran, deretter ble western blot utført.

2.2.17 Immunohistokjemi (IHC)

Cellene som ble dyrket i en Falcon™ 8 Multiwell (20.000 celler i 300µl per brønn) ble fiksert ved å tilsette iskald PFA (8 %) til 4 % i medium, deretter inkubert på is i 10 minutter. Etter inkubering ble cellene vasket 2 ganger i iskald 1 x PBS. Cellene ble gjort permeabel ved å tilsette 200 µl iskald metanol og inkubert på is i 10 minutter. Deretter ble de vasket 2 ganger i 1 x PBS med omtrent 300 µl per brønn. Etter vask ble cellene inkubert på svak risting i 30 minutter ved romtemperatur i PBS/3 % serum blokkeringsløsning. Hvilket serum som ble brukt var avhengig av opprinnelsen til sekundær antistoffet. Hvis sekundær antistoffet var produsert i geit, ble geite serum brukt. Etter inkubering ble blokkeringsløsning fjernet og primær antistoff (Ab) fortynnet i PBS/1 % serum var tilsatt. Cellene ble inkubert i PBS/1 % serum på svak risting i 30 minutter ved romtemperatur. Etter inkubering ble de vasket 6 ganger med 1 x PBS med 5 minutters intervall mellom hver vask. Sekundær antistoff (Ab) fortynnet i PBS/ 1 % serum ble tilsatt og hele platen ble dekket til med aluminiumsfolie. Cellene ble inkubert i sekundær antistoff i 30 minutter ved svak risting. Etter inkuberingen ble cellene vasket 6 ganger med 1 x PBS med 5 minutters intervall mellom hver vask. Bilder av cellene ble tatt ved hjelp av ZEISSLSM 510 META confocal mikroskopi.

3. Resultat

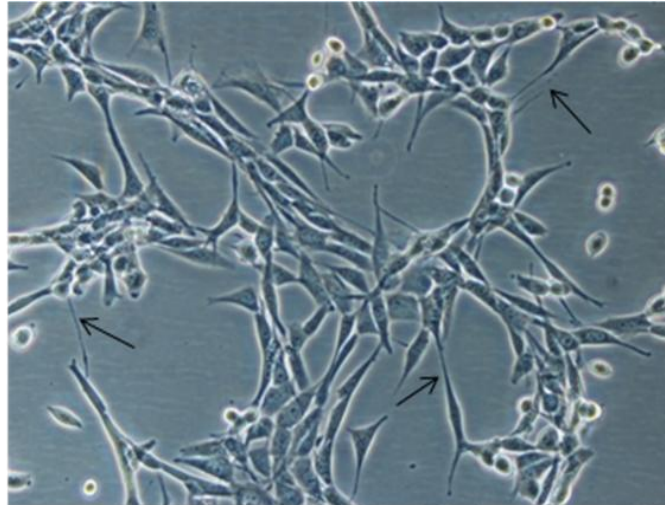
I tidligere studier utført ved Institutt for farmasi, avdeling for farmakologi, har det blitt observert at FlpIn-3T3-Pax6 og isoformen FlpIn-3T3-Pax6(5a) cellelinjer har endret morfologi sammenlignet med den opprinnelige FlpIn-3T3 cellelinjen som ikke uttrykker Pax6 eller Pax6(5a). For å finne årsaken til dette ble RNA fra disse cellelinjene brukt i genekspressjonsmicroarray. I tillegg ble også proteiner høstet fra disse cellelinjene brukt i 2D-gel elektroforese og masse spektrometri (MS).

Resultater fra genekspressjonsmicroarray viste at en gruppe glykosyltransferaser var nedregulert i både Pax6 og Pax6(5a). Samtidig indikerte 2D-gel elektroforese og MS at det var en del post-translasjonelle modifikasjoner. Muligens glykosyleringer eller fosforyleringer.

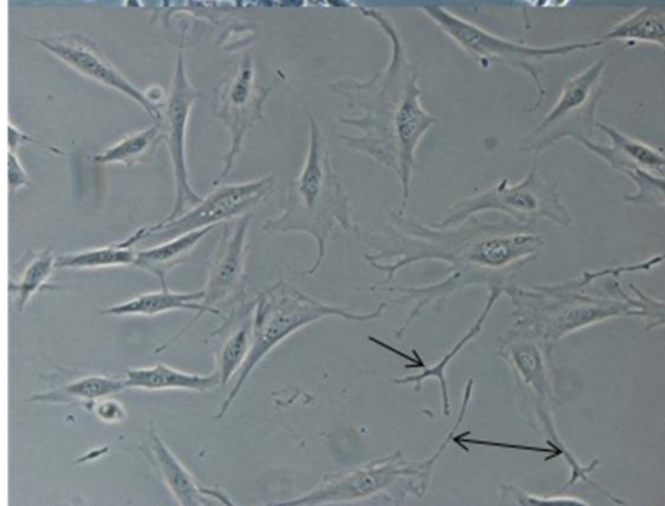
Hypotesen for observasjonene var at Pax6 og Pax6(5a) nedregulerer uttrykket av glykosyltransferaser som fører til mindre eller endrede sukkermodifikasjoner på proteiner. Endring av disse sukkermodifikasjonene kan bidra til at Pax6 og Pax6(5a) cellene har endret morfologi sammenlignet med FlpIn-3T3 kontrollcellene.

I denne masteroppgaven ble det brukt tre cellelinjer. En kontroll FlpIn-3T3 cellelinje som ikke uttrykker Pax6 eller Pax6(5a), og to andre FlpIn-3T3 cellelinjer hvor Pax6 og Pax6(5a) isoformen fra mus hadde blitt flippet inn [43]. Disse cellelinjene stammer fra fibroblaster i mus. I figur 6 viser at selve celleformen ser annerledes i FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) enn i FlpIn-3T3 kontrollcellene. FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) cellene er større og flatere enn sin opprinnelige FlpIn-3T3 formen. I tillegg ser det ut til at det er flere utløpere i FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) enn i FlpIn-3T3 kontrollceller. Utløpere i FlpIn-3T3-Pax6 ser ut til å være lengre og mer forgreinet enn FlpIn-3T3-Pax6(5a) og FlpIn-3T3 kontrollceller.

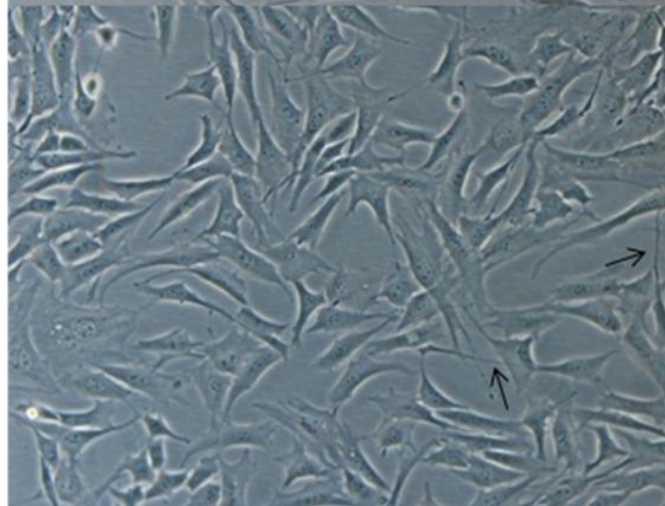
**FlpIn-3T3
kontrollceller**



FlpIn-3T3 - Pax6



FlpIn-3T3- Pax6(5a)

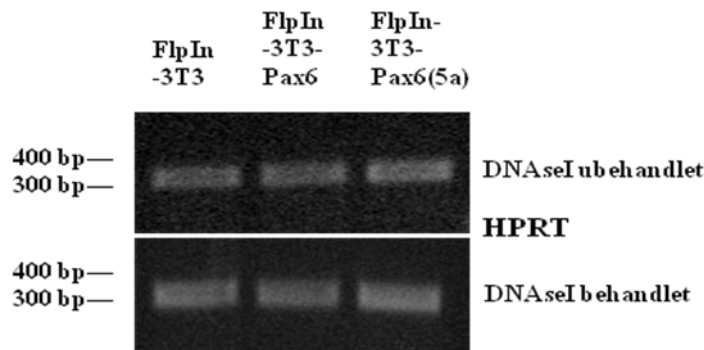


Figur 6: Cellebilder av FlpIn-3T3 passasje 17, FlpIn-3T3-Pax6 passasje 15 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) passasje 11 i 75 cm² cellekulturflasker. Cellebildene ble tatt ved hjelp av mikroskopi (Axovert S100) med en størrelse på 20 x objective. Figur 1 viser endret morfologi av cellelinjene FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) sammenlignet med den opprinnelige FlpIn-3T3 kontroll cellelinjen. Utløpere i alle tre cellelinjene er markert med piler.

3.1 Revers Transkriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

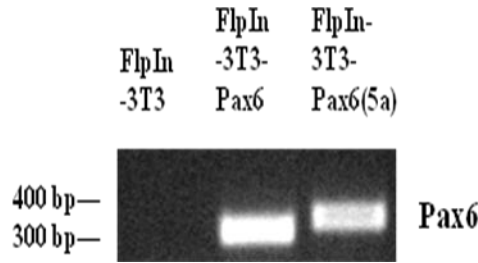
RT-PCR ble brukt for å se på uttrykket av sju av de glykosyltransferasene som var nedregulert i microarrayet. Fut8, Mgat3, Ugt1a7c, St3gal6, St6gal1, Gcnt1 og Gcnt2 genuttrykket ble sammenlignet i FlpIn-3T3, FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) cellelinjene.

Før de sju glykosyltransferase primersettene ble kjørt i RT-PCR reaksjoner bør mengde cDNA som benyttes være kontrollert og være tilnærmet like i alle tre cellelinjene. For å kontrollere dette ble cDNA kjørt i RT-PCR reaksjon med et referanse gen (house keeping gene) hvor vi antar at uttrykk av referanse genet er tilnærmet likt mellom de tre cellelinjene, og at det ikke lar seg påvirkes av nærvær av Pax6. Referanse genet som ble benyttet i denne oppgaven er HPRT (Hypoxanthine phosphoribosyltransferase). Ved ujevn uttrykksnivå av HPRT blant cellelinjene ble mengde cDNA justert inn i RT-PCR reaksjonen. Figur 2 viser uttrykk av HPRT med og uten DNase I behandling. RT-PCR reaksjon hvor RNA preparater ble behandlet med DNase I har til hensikt å fjerne genomisk DNA forurensning.



Figur 7: mRNA uttrykk av HPRT i FlpIn-3T3, FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) detektert ved hjelp av RT-PCR. Figuren viser jevn uttrykk av referanse genet HPRT i alle 3 cellelinjer før de brukes til å teste andre primersett i RT-PCR reaksjoner. I tillegg viser det uttrykk av HPRT med og uten DNaseI behandling.

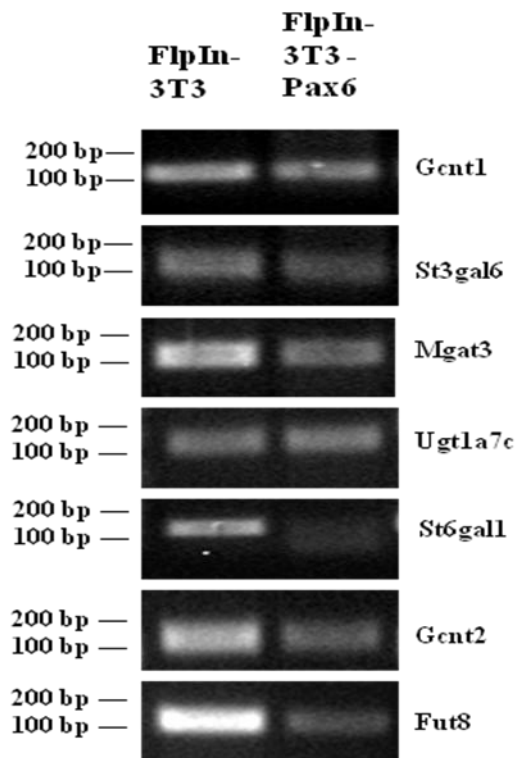
Som kontroll for at de tre cellelinjene som ble brukt har rett identitet ble cDNA brukt i RT-PCR reaksjon med Pax6 primere. FlpIn-3T3 er kontrollceller som ikke uttrykker Pax6 genet. FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) er transfekterte celler med Pax6 og isoformen Pax6(5a) henholdsvis og dermed forventes det uttrykk av Pax6 genet i disse cellelinjene. Figur 8 viser uttrykk av Pax6 genet i FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a), men ikke i FlpIn-3T3 kontrollceller som forventet.



Figur 8: mRNA uttrykk av Pax6 primere i FlpIn-3T3, FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) detektert ved hjelp av RT-PCR. Bildet viser uttrykk av Pax6 i FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) cellelinjene, men ikke i FlpIn-3T3 kontrollceller.

Etter at RT-PCR reaksjoner med HPRT og Pax6 var tilfredsstillende ble cDNA brukt til å kjøre RT-PCR reaksjoner for glykosyltransferasene Fut8, Mgat3, Ugt1a7c, St3gal6, St6gal1, Gcnt1 og Gcnt2.

Det ble kjørt RT-PCR reaksjon to runder for hvert primersett. I første runde ble alle sju glykosyltransferasene testet i RT-PCR for FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3 kontrollceller. For primersettene Ugt1a7c, Gcnt2 og Fut8 ble det kjørt to ganger i første runden.



Figur 9: mRNA uttrykk av glykosyltransferasene Gcnt1, St3gal6, Mgat3, Ugt1a7c, St6gal1, Gcnt2 og Fut8 i FlpIn-3T3 og FlpIn-3T3-Pax6 detektert ved hjelp av RT-PCR. Figuren viser nedregulering av alle testede glykosyltransferasene i FlpIn-3T3-Pax6 cellelinjen.

Figur 9 viser nedreguleringen av alle sju testede glykosyltransferasene i FlpIn-3T3-Pax6. Nedregulering av St6gal1 er sterkest av alle testede glykosyltransferasene, dernest Mgat3 og Gcnt2, mens nedregulering av Gcnt1 og Ugt1a7c er noe mindre tydelig sammenlignet med de andre glykosyltransferasene.

Gcnt1 primersettet vil gi et produkt på 153 basepar (bp), dermed etter RT-PCR reaksjon forventes det uttrykk av Gcnt1 ved et sted mellom 100-200 basepar. Resultatet viser at både i FlpIn-3T3 kontrollceller og FlpIn-3T3-Pax6 uttrykker Gcnt1. Uttrykksnivået av Gcnt1 var litt mindre enn i FlpIn-3T3 kontrollceller, men det er vanskelig å vurdere hvor mye mindre ut ifra gelbildet. Det var dermed vanskelig å si om det har forekommet nedregulering av Gcnt1 i Pax6 cellene i det hele tatt.

RT-PCR resultatet viser produkt for St3gal6 ved omtrent 152 bp. St3gal6 ble uttrykt i begge cellelinjene, men uttrykksnivået er sterkere i FlpIn-3T3 kontrollceller enn FlpIn-3T3-Pax6. Det vises også bånd i begge cellelinjene mellom 1000-1650 bp (ikke vist på figuren) som kan tenkes å være genomisk DNA. Dette vil bli nærmere kommentert i diskusjonsdelen.

Mgat3 (182 bp) ble uttrykt i begge cellelinjene, men uttrykksnivået av Mgat3 var sterkere i FlpIn-3T3 enn i FlpIn-3T3-Pax6 cellelinjen. Her viser det tydelig nedregulering av Mgat3 i FlpIn-3T3-Pax6 cellelinjen.

Uttrykket av Ugt1a7c (174 bp) vises både i FlpIn-3T3 og FlpIn-3T3-Pax6 cellelinjer. Uttrykket av Ugt1a7c var litt sterkere i FlpIn-3T3 enn FlpIn-3T3-Pax6 cellelinjen, men dette kommer ikke tydelig fram på bildet, derfor ble det kjørt nytt RT-PCR for Ugt1a7c. Resultat for den andre gangen viser at uttrykket av Ugt1a7c var nesten like sterk i FlpIn-3T3 og FlpIn-3T3-Pax6 cellelinjene. Begge RT-PCR reaksjonene for Ugt1a7c viser uklare resultater dermed er vanskelig å tolke om det har forekommet nedregulering eller ikke. Basert på den første RT-PCR reaksjonen kan det muligens være svak nedregulering av Ugt1a7c i FlpIn-3T3-Pax6 cellelinjen.

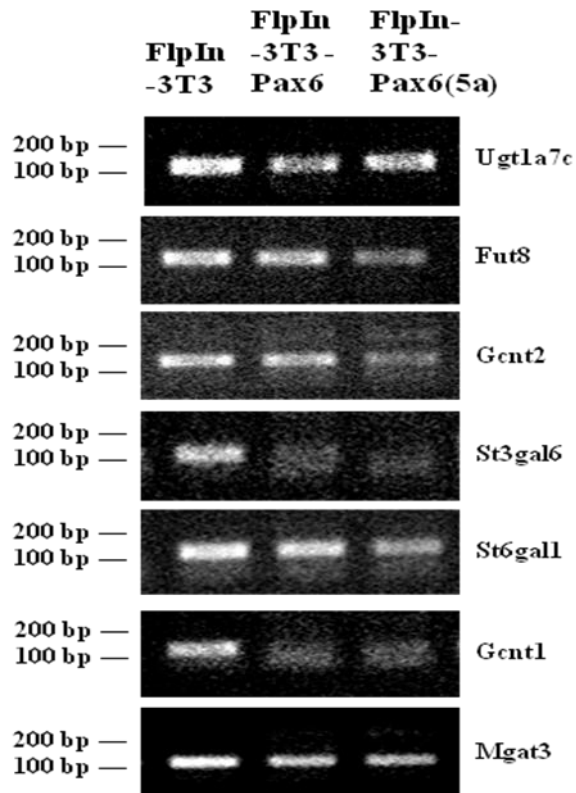
St6gal1 (191 bp) ble uttrykt i begge cellelinjene og uttrykksnivået av St6gal1 var sterkest i FlpIn-3T3 celler. I FlpIn-3T3-Pax6 cellelinjen var uttrykket av St6gal1 nesten borte. Her ser det ut til at St6gal1 er sterk nedregulert i FlpIn-3T3-Pax6 cellelinjen.

Uttrykk av Gcnt2 (209 bp) vises litt over 200 bp i både FlpIn-3T3 og FlpIn-3T3-Pax6 cellelinjer. Uttrykksnivået av Gcnt2 var litt sterkere i FlpIn-3T3 enn i FlpIn-3T3-Pax6 cellelinjen. For å være mer sikre på at nedreguleringen av Gcnt2 finnes i FlpIn-3T3-Pax6 cellelinjen ble det kjørt nytt RT-PCR for dette primersettet. Resultat fra den andre gangen viser klare nedregulering av Gcnt2 i FlpIn-3T3-Pax6 cellelinjen.

Fut8 (191 bp) ble uttrykt i begge cellelinjene. Første PCR reaksjon for Fut8 viser at uttrykket av Fut8 var nesten like sterk i både FlpIn-3T3 og FlpIn-3T3-Pax6. Nytt RT-

PCR reaksjon for Fut8 ble derfor utført for å sjekke at det virkelig ikke har forekommet nedregulering av Fut8 i FlpIn-3T3-Pax6 cellelinjen. Resultatet fra den andre RT-PCR reaksjonen viste tydelig nedregulering av Fut8 i FlpIn-3T3-Pax6 cellelinjen.

I andre runde med RT-PCR ble også cDNA fra FlpIn-3T3-Pax6(5a) cellelinjen inkludert.



Figur 10: mRNA uttrykk av Ugt1a7c, Fut8, Gcnt2, St3gal6, St6gal1, Gcnt1 og Mgat3 i FlpIn-3T3, FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) detektert ved hjelp av RT-PCR. Bildet viser nedregulering av alle testede glykosyltransferasene i FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) cellelinjene.

Figur 10 viser nedreguleringen av alle testede glykosyltransferasene i FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a). Nedregulering av St3gal6 og Gcnt1 er sterkest i FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) cellelinjene, dernest Fut8, Gcnt2 og St6gal1, mens nedregulering av Mgat3 og Ugt1a7c ser ut til å være minst nedregulert av alle primersettene.

Uttrykk av Ugt1a7c vises i alle 3 cellelinjene, men uttrykksnivået av Ugt1a7c er sterkest i FlpIn-3T3 kontrollceller, dernest i FlpIn-3T3-Pax6(5a) og svakest i FlpIn-3T3-Pax6 cellelinjen. Her viser det klar nedregulering av Ugt1a7c i FlpIn-3T3-Pax6 sammenlignet

med FlpIn-3T3 kontrollceller, mens nedregulering i FlpIn-3T3-Pax6(5a) cellelinjen vises ikke så godt på gelbildet.

Fut8 ble uttrykt i alle 3 cellelinjene. Uttrykksnivået av Fut8 er noenlunde jevn i FlpIn-3T3 og FlpIn-3T3-Pax6 cellelinjene, mens uttrykket av Fut8 i FlpIn-3T3-Pax6(5a) er svakere enn i kontrollceller og FlpIn-3T3-Pax6. Gelbildet viser tydelig nedregulering i FlpIn-3T3-Pax6(5a) cellelinjen.

Uttrykk av Gcnt2 finnes i alle 3 cellelinjer. Uttrykksmønsteret og nivået av Gcnt2 er tilnærmet det samme som Fut8. Også her viser det nedregulering av Gcnt2 i FlpIn-3T3-Pax6(5a) cellelinjen.

St3gal6 uttrykkes i alle tre cellelinjene, men uttrykksnivå av St3gal6 er betydelig mindre i både FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a). Siden uttrykket av St3gal6 i FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) blir nesten borte ble det utført nytt RT-PCR reaksjon for dette primersettet for å sjekke om resultatene er valide. RT-PCR reaksjonen fra andre gangen viser det samme som første gangen. Det antas dermed at nedregulering av St3gal6 i både FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) er mye sterkere enn for de andre glykosyltransferasene.

Uttrykk av St6gal1 er sterkest i FlpIn-3T3, dernest i FlpIn-3T3-Pax6, og svakest i FlpIn-3T3-Pax6(5a) cellelinjen. Her viser det nedregulering i både FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a), men nedreguleringen synes bedre i FlpIn-3T3-Pax6(5a) enn i FlpIn-3T3-Pax6. Det ble også observert bånd i FlpIn-3T3-Pax6(5a) ved 1000-1650 bp (ikke vist på figuren) som antas for å være genomisk DNA. Dette vil bli kommentert i diskusjonsdelen.

Gcnt1 har tilnærmet samme uttrykksmønster som St3gal6. Uttrykk av Gcnt1 er sterkest i kontrollceller, mens i FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) er uttrykket av Gcnt1 nesten borte. Her viser det tydelig nedregulering av Gcnt1 i både FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a).

I likhet med alle andre testede glykosyltransferase ble Mgat3 uttrykt i alle tre cellelinjene. Uttrykket av Mgat3 er sterkest i kontrollceller. Uttrykksnivået og nedreguleringen av Mgat3 mellom FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) er tilnærmet lik.

Som konklusjon viser RT-PCR resultatene nedregulering av alle sju glykosyltransferasene i både FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) cellelinjene.

3.2 Real time PCR (qPCR)

Det ble observert nedregulering av alle sju glykosyltransferasene ved hjelp av RT-PCR, men noen er sterkere nedregulert enn andre. Mengden av PCR-produkt (DNA) bør måles mens reaksjonen er fremdeles i eksponensiell fase. Dette kan være vanskelig å fastslå med konvensjonell RT-PCR som vanligvis bruker etidiumbromid for å kvantifisere endepunkt av PCR produktene. Kvantitativ PCR (qPCR) ble derfor benyttet, fordi i qPCR blir mengden DNA målt etter hver syklus ved bruk av fluorescerende markører som er innkorporert i DNA. Økningen i fluorescerende signal er direkte proporsjonal med økende mengde DNA som genereres i den eksponentielle fasen av reaksjonen. Denne egenskapen til å overvåke reaksjonen under dets eksponentielle fasen gir brukere muligheten til å kvantitere mengden DNA mer nøyaktigere enn RT-PCR.

Først ble det kjørt standardkurver for å teste effektiviteten av primersettene. Dette er nødvendig fordi effektiviteten forteller hvor nøyaktig og reproducerbare resultater vi kan få. For å oppnå reproducerbare resultater bør reaksjoner ha en effektivitet på 100 %, men dette kan aldri oppnås, fordi alltid er det en eller annen faktor som påvirker reaksjonseffektiviteten slik at den aldri kan bli nøyaktig 100 %. En effektivitet mellom 90-110 % er dermed akseptabelt for å kunne bruke primerne i qPCR.

Smeltekurver ble også målt for hvert primersett samtidig som standardkurver ble kjørt. En smeltekurve er et diagram som viser endringer i fluorescens når dobbelt trådet DNA med inkorporert farget molekyl smelter til enkle DNA trådet når temperatur av qPCR reaksjonen øker. Smeltekurve gjøres for å sjekke at det er kun ett DNA fragment som amplifiseres. Etter standardkurver ble det også kjørt qPCR for alle prøvene. Samtidig ble det kjørt ingen revers transkriptase kontroll (NoRT kontroll) og ingen templat kontroll (NTC) for å sjekke om genomisk DNA var tilstedet i cDNA prøvene og om templatet inneholder primer-dimer eller kontaminasjon. Resultatene beregnes ved hjelp av "Pfaffl" formelen:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CP_{\text{target}} (\text{controll-sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CP_{\text{ref}} (\text{controll-sample})}}$$

Formel 1: Viser en matematisk modell av ratio i real time PCR. Ratio av et målgjen er uttrykt i en prøve versus en kontroll i sammenligning med en referanse gen. E_{target} er qPCR effektivitet av målgjenets transkriptet. E_{ref} er qPCR effektivitet av et referanse gen transkriptet. QPCR effektivitet ble beregnet slik at $E = 10^{-1/\text{slope}}$ eller $E_{\text{target}} = 1 + \text{Eff}$. $\Delta CP_{\text{target}}$ er CP avvik av kontroll-prøve av målgjenets transkriptet. ΔCP_{ref} = CP avvik av kontroll-prøve av referanse gen transkriptet. CP = crossing points (eller Ct). Ct er det stedet hvor fluorescence krysser threshold, mens threshold er det stedet hvor fluorescence øker eksponensielt [44].

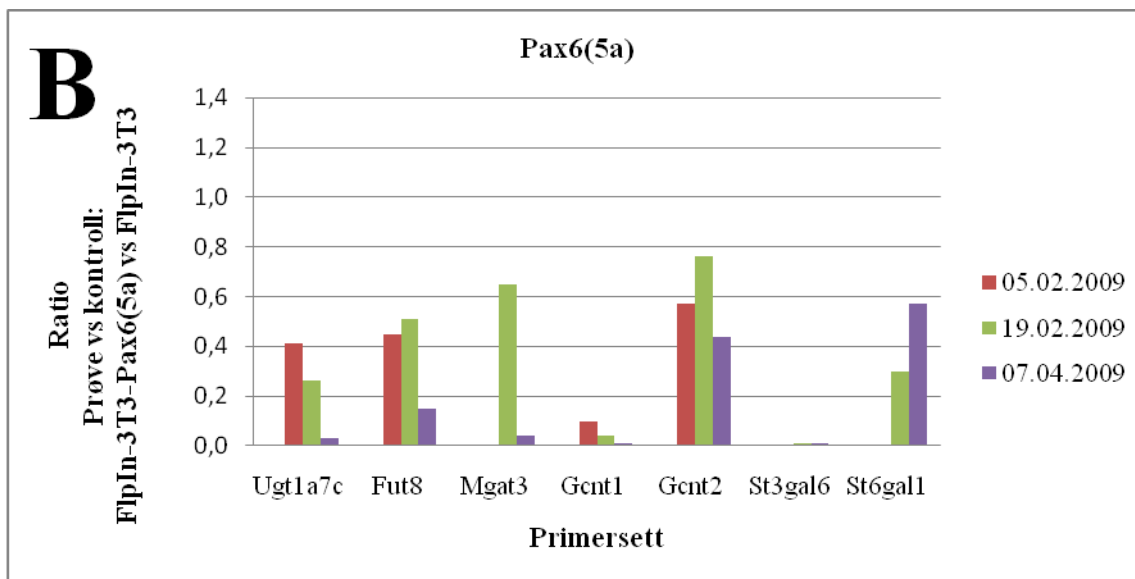
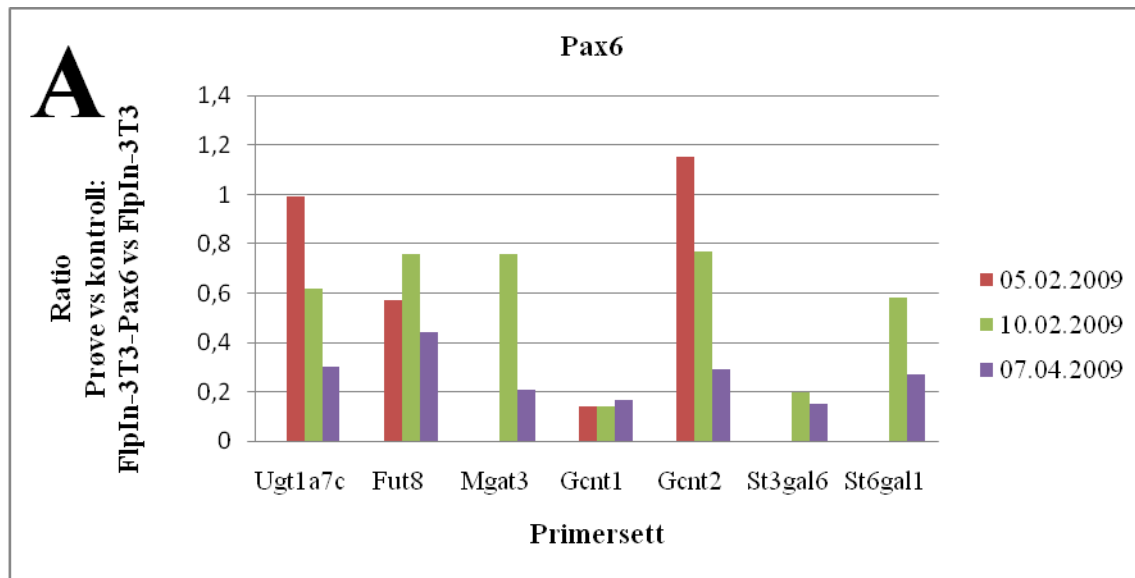
Tabell 9: Resultat av qPCR på prøver versus kontroll. Tabell A viser ratio mellom FlpIn-3T3-Pax6 versus FlpIn-3T3. Det viser også hvor mye (fold) de testede glykosyltransferasene er nedregulert i FlpIn-3T3-Pax6 i forhold til FlpIn-3T3 kontrollceller. Tabell B viser ratio mellom FlpIn-3T3-Pax6(5a) versus FlpIn-3T3 og hvor mye fold nedregulering av de testede glykosyltransferasene i FlpIn-3T3-Pax6(5a) i forhold til FlpIn-3T3 kontrollceller. For hvert primersett ble det kjørt qPCR 2-3 ganger.

A

Primersett	FlpIn-3T3-Pax6 vs FlpIn-3T3 ratio	q-fold
Ugt1a7c	0,99	1
	0,62	-1,61
	0,30	-3,33
Mgat3	0,76	-1,32
	0,21	-4,76
Fut8	0,57	-1,75
	0,76	-1,32
	0,47	-2,27
St3gal6	0,20	-5
	0,15	-6,67
St6gal1	0,58	-1,72
	0,27	-3,7
Gcnt1	0,14	-7,14
	0,14	-7,14
	0,17	-5,88
Gcnt2	1,15	0,87
	0,77	-1,3
	0,29	-3,45

B

Primersett	FlpIn-3T3-Pax6(5a) vs FlpIn-3T3 ratio	q-fold
Ugt1a7c	0,41	-2,44
	0,26	-3,85
	0,03	-33,3
Mgat3	0,65	-1,54
	0,04	-25
Fut8	0,45	-2,22
	0,51	-1,96
	0,15	-6,67
St3gal6	0,01	-100
	0,01	-100
St6gal1	0,3	-3,33
	0,57	-1,75
Gcnt1	0,1	-10
	0,04	-25
	0,01	-100
Gcnt2	0,57	-1,75
	0,30	-3,33
	0,08	-12,5



Figur 11: mRNA uttrykk av Ugt1a7c, Fut8, Mgat3, Gcnt1, Gcnt2, St3gal6 og St6gal1 i FlpIn-3T3, FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) detektert ved hjelp av qPCR. A) Viser ratio av FlpIn-3T3-Pax6 versus FlpIn-3T3 kontrollceller. B) Viser ratio av FlpIn-3T3-Pax6(5a) versus FlpIn-3T3 kontrollceller.

Figur 11 A og B viser resultatet av qPCR der alle primersettene blir nedregulert både i FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) og nedreguleringen er sterkest i FlpIn-3T3-Pax6(5a). Dette stemte med RT-PCR resultatene for primersettene St3gal6, St6gal1, Gcnt2 og Fut8, mens for Ugt1a7c, Mgat3 og Gcnt1 stemte det ikke med RT-PCR resultatene. For disse primersettene viser RT-PCR resultatene en tilnærmet lik nedregulering både i FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a). Årsaken til dette vil bli kommentert i diskusjonen

Det ble også observert at Gcnt1 og St3gal6 slås kraftigst ned av alle de testede glykosyltransferasene. St3gal6 er sterkest nedregulert av alle primersettene både i FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a). Nedreguleringen av St3gal6 er 100 fold i FlpIn-3T3-Pax6(5a) sammenlignet med FlpIn-3T3-Pax6 hvor nedreguleringen er bare cirka 6 fold. For Gcnt1 er nedreguleringen omtrent 60 fold i FlpIn-3T3-Pax6(5a) sammenlignet med FlpIn-3T3-Pax6 hvor nedreguleringen er ~7 fold.

QPCR resultatene viste også store variasjoner mellom alle forsøkene for de fleste av de testede glykosyltransferasene. Eventuelle årsaker til disse variasjoner vil bli nærmere kommentert i diskusjonen.

En kort oppsummering etter qPCR resultatet ser det ut til at alle de sju testede glykosyltransferasene er nedregulert i både FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a). For St3gal6 og Gcnt1 er de mest nedregulert av alle de testede glykosyltransferasene. Nedreguleringen av alle sju testede glykosyltransferasene er sterkere i FlpIn-3T3-Pax6(5a) enn i FlpIn-3T3-Pax6.

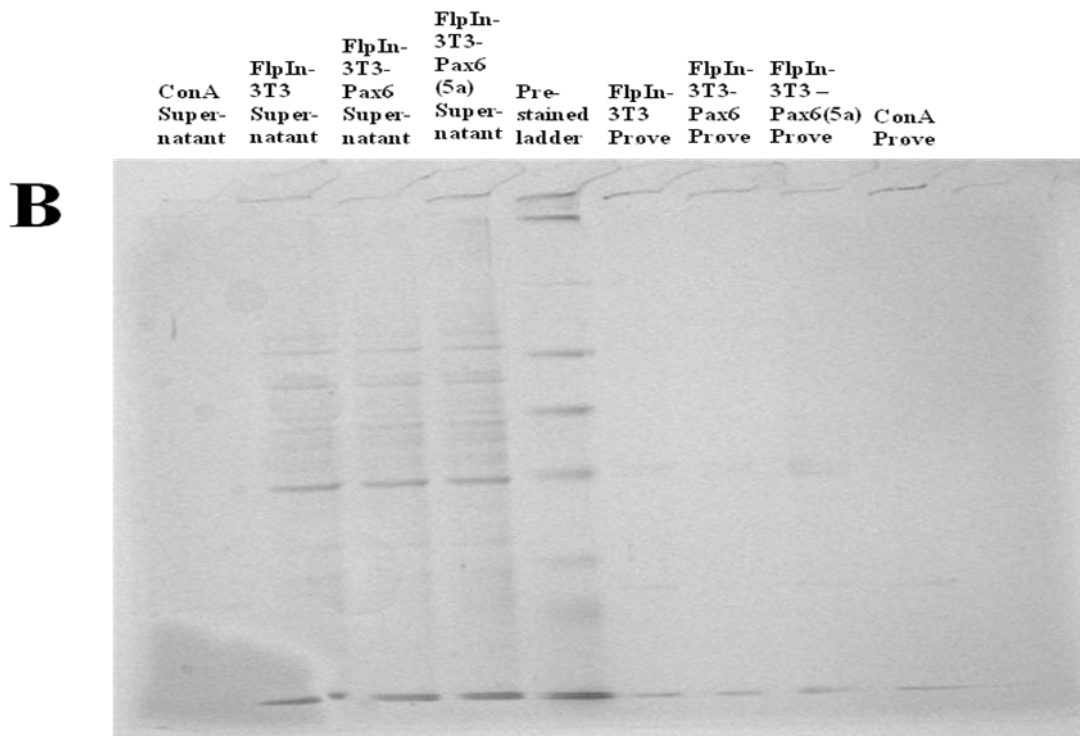
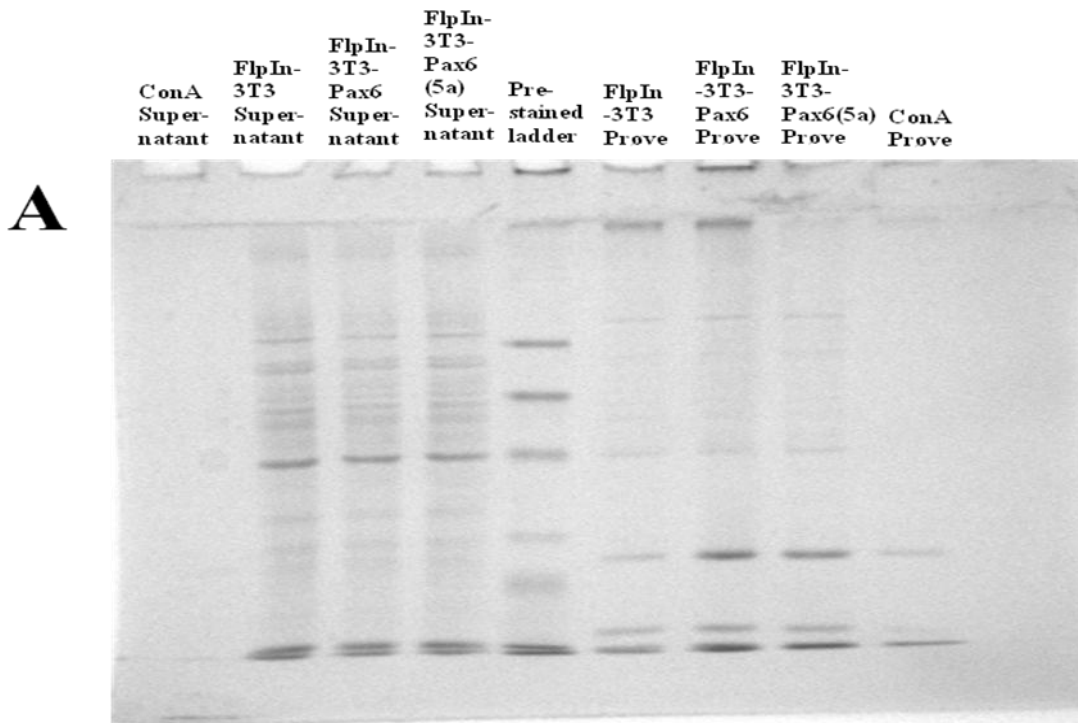
3.3 Glykoprotein isolering ved hjelp av Concanavalin A (ConA)

Det ble observert endringer på RNA nivå i glykosyltransferasegenene ved hjelp av RT-PCR og qPCR, og det ønskes å se om disse endringene også kunne observeres i endringer av glykosyleringsstatusen til proteiner i de tre cellelinjene. Det er anslått at mer enn 50 % av proteiner i alle pattedyr er glykosylerte. Karbohydrater har dermed avgjørende roller i ulike biologiske hendelser slik som celle anerkjennelse, inter-og intracellulær signalering, embryonale utviklingen, celle adhesjon og celle-celle interaksjon. Endringer i glykosylering og oligosakkarid struktur av glycoproteiner har vist å ha sammenheng med sykdom og tumor progresjon. Disse strukturelle forandringer kan oppstå som følge av endringer i nivåene av glykosyltransferasene [45]. Derfor kan det være interessant å se på proteinuttrykk for å se om endringer i glykosylering kan endre protein konformasjonen og funksjonelle egenskapene til et protein.

Concanavalin (ConA) er en lektin protein som binder spesifikt til mannosyl og Glc enheter av polysakkarider og glykoproteiner [46]. Med denne egenskapen ble ConA brukt i dette forsøket til å isolere glycoproteiner fra en kompleks celleblanding.

Glykosylerte proteiner som ble isolert ved hjelp av ConA ble kjørt på 10 % SDS-PAGE, deretter ble gelen fiksert og farget med Coomassie blue. Resultatet for glykoprotein isolering ved hjelp av ConA etter farging av gelen med Coomassie blue er vist i figur 12A. Resultatet ble ikke slik det ble håpet på å kunne se mindre glykosylerte proteiner i FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) enn i FlpIn-3T3 kontrollcellene. Det ser ut til at det er ingen forskjell mellom nivået av glykosylerte proteiner i FlpIn-3T3 kontrollcellene

sammenlignet med FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) cellelinjene. I tillegg viser det svake bånd av eluerte glykoproteiner i prøvene, noe som kan tyde på at mengde isolerte glykoproteiner i eluatet er ganske lav. Det ble derfor prøvd å kjøre en annen runde med glykoprotein isolering ved hjelp av ConA med økt proteinkonsentrasjonen fra 500 µg til 1000 µg. Resultatet etter Coomassie blue farging av gelen er vist i figur 12 B. Her viser det ingen bånd i de eluerte glykoprotein prøvene. Mulige årsaker til dette vil bli nærmere kommentert i diskusjonen.



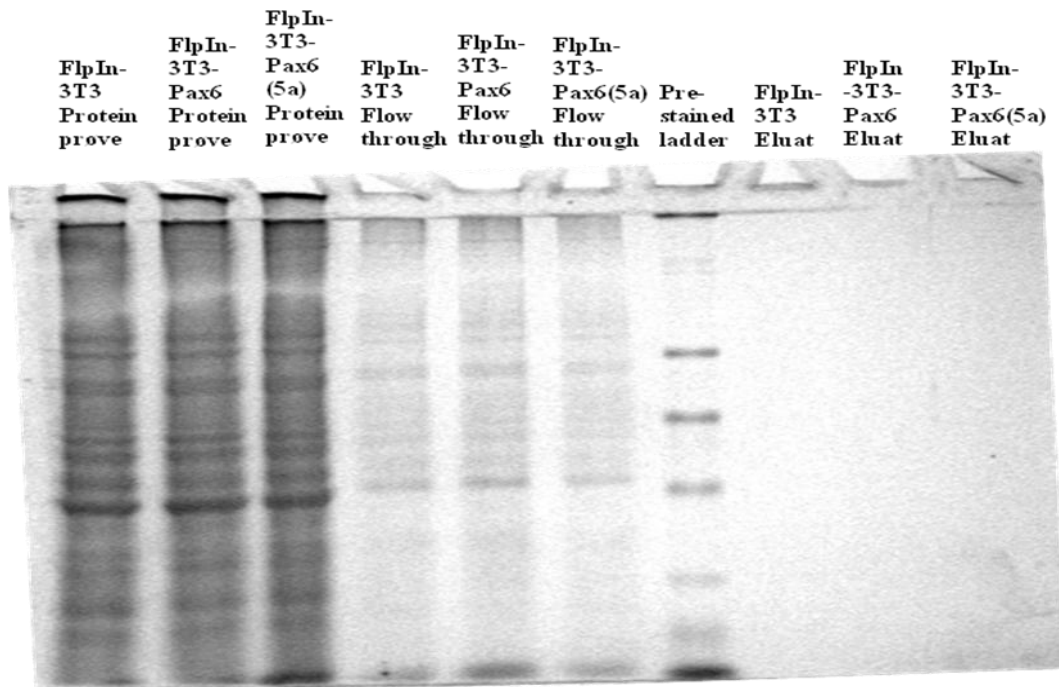
Figur 12: Isolering av glykoprotein ved hjelp av ConA. Bildet A) viser første runden med glykoprotein isolering vha ConA der proteinkonsentrasjonen som ble benyttet er 500 µg. I de brønnene merket med prøve er eluerte glykoproteiner hvor det viser ingen endringer i glykosylering av proteiner i de tre cellelinjene. Bildet B) viser andre runde med glykoprotein isolering vha ConA der proteinkonsentrasjonen som ble benyttet er 1000 µg.

3.4 Glykoprotein isolering ved hjelp av Wheat Germ Agglutinin (WGA)

Wheat Germ Agglutinin (WGA) er også en type lektin protein som ConA. Forskjellen er at ConA binder til α -mannosyl grupper av glykoproteiner, mens WGA binder selektivt til N-acetylglucosamine og N-acetylneuraminin syres (sialin syre) enheter av glykoproteiner [45]. I denne oppgaven ble WGA benyttet til samme formål som ConA i å isolere glykoproteiner fra en kompleks proteinblanding.

Glykoprotein isolering ved hjelp av WGA ble utført ved hjelp av et kit fra Pierce Biotechnology beskrevet i materiale og metode delen. Prøvene ble kjørt på 10 % SDS-PAGE og gelen ble deretter farget med GelCode Glykoprotein fargingskit fra Pierce Biotechnology. Resultat etter farging av gelen med GelCode Glykoprotein fargingskitet er negativ, ingen bånd er synlig på gelen unntatt fra markøren. Resultatet av gelbildet ble derfor ikke vist i oppgaven.

For å sjekke at det ikke er problemer med kjøring av prøvene på 10 % SDS-PAGE, ble gelen derfor farget med Coomassie blue. Resultatet er vist i figur 13. Her viser det bånd i alle tre cellelinjene i de brønnene merket med proteinprøver og "flow through", men ikke i de brønnene merket med eluat som forventet. Mulige årsaker til at bånd ikke synes på gel i de brønnene med eluatene vil bli nærmere kommentert i diskusjonen.



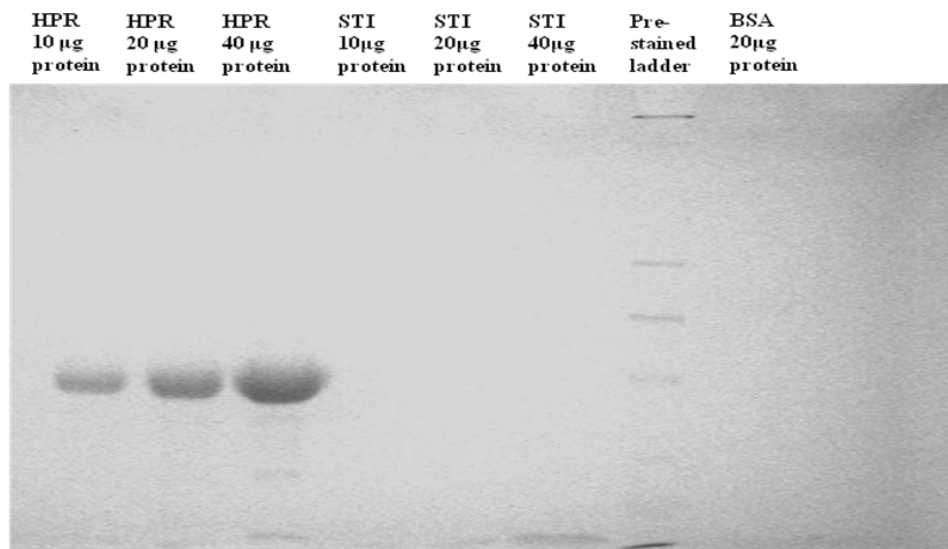
Figur 13: Glykoprotein isolering vha WGA etter farging av gelen med Coomassie blue. Proteinkonsentrasjon som ble tilsatt i hvert brønn er 100 μ g. Glykoproteiner ble detektert i de brønnene merket med "protein prøver" og "flow through", mens dette er fraværende i "eluatene".

Siden resultatet ble negativ ble hele forsøket gjentatt. Resultatet fra andre gangen ble også negativ (resultat ikke vist). GelCode Glycoprotein fargingskitet ble derfor testet for å sjekke om fargingskitet virker som produsenten går god for.

3.5 Testing av GelCode Glykoprotein fargingskitet

Med GelCode Glykoprotein fargingskitet vil glykoproteiner kunne detekteres på polyakrylamid geler og på nitrocellulose membraner. Når glykoler i glykoproteiner blir behandlet med oksiderende middel vil de bli oksidert til aldehyder, og disse glykolene vil tilslutt bli farget slik at bånd kan oppdages på polyakrylamid geler og på nitrocellulose membraner.

GelCode Glycoprotein fargingskitet ble testet ved å lage åtte prøver som består av tre fortyndinger hver av en horseradish peroksidase (HPR), en soyabønne trypsin inhibitor (STI) på 10, 20 og 40 µg. STI og BSA er ikke glykosylerte proteiner og ble brukt som negative kontroller. I disse brønnene med negative kontrollprøver forventes det derfor ikke bånd. Resultatet fra glykoprotein farging er vist i figur 14. Her viser det bånd i de tre HPR positive kontroller med økende proteinkonsentrasjon (10 µg, 20 µg og 40 µg) og ingen bånd i negative kontrollprøver som forventet.

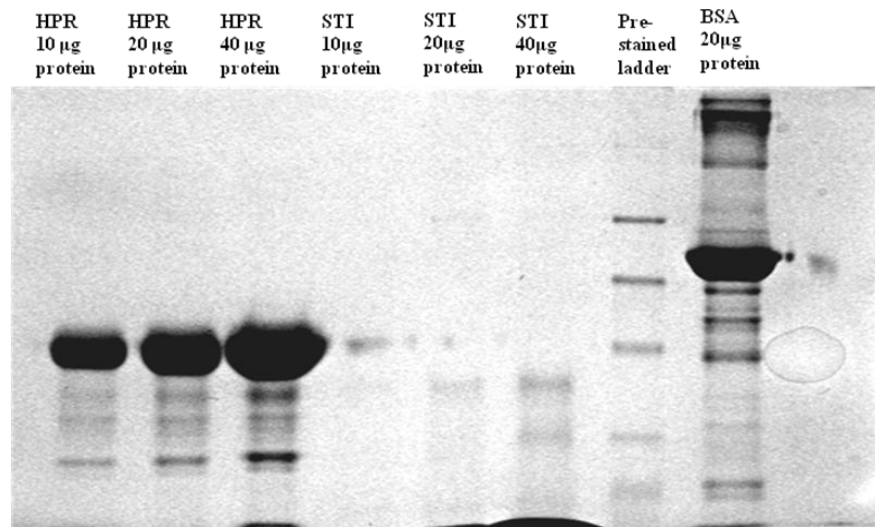


Figur 14: Testing av GelCode Glykoprotein fargingskitet. Bildet viser bånd i de tre HPR positive kontroller med økende proteinkonsentrasjon (10 µg, 20 µg og 40 µg proteinekstrakt) etter farging av gelen med fargingskitet.

Etter farging av gelen med fargingskitet ble gelen videre farget med Coomassie blue. Resultat (figur 15) viser tydelig bånd i BSA og HPR prøvene. STI har en molekylvekt på

8000-24000 dalton [47] og har sannsynligvis vandret lengre ned eller ut av gelen. På den måten kunne ikke de båndene for STI prøvene ses etter farging av gelen med Coomassie blue.

Ut fra det som ble observert tyder det på at GelCode glykoprotein fargingskitet virker.

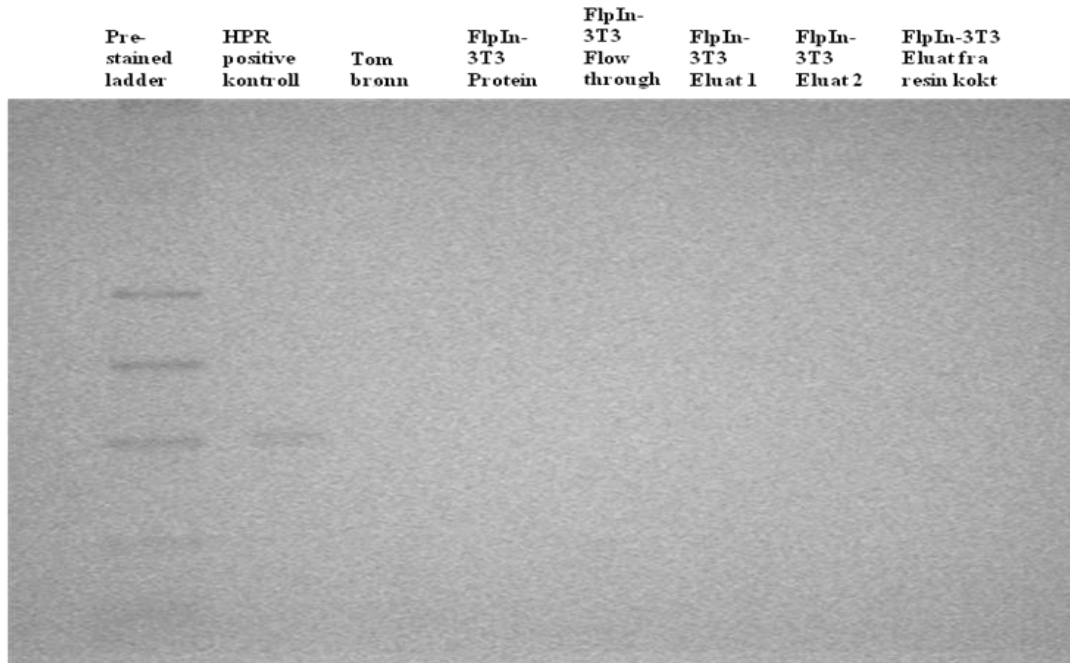


Figur 15: Testing av GelCode Glykoprotein fargingskitet der gelen ble farget med Coomassie blue. Figuren viser tydelig bånd i de brønnene med BSA og HPR prøver, mens dette er fraværende i de brønnene med STI.

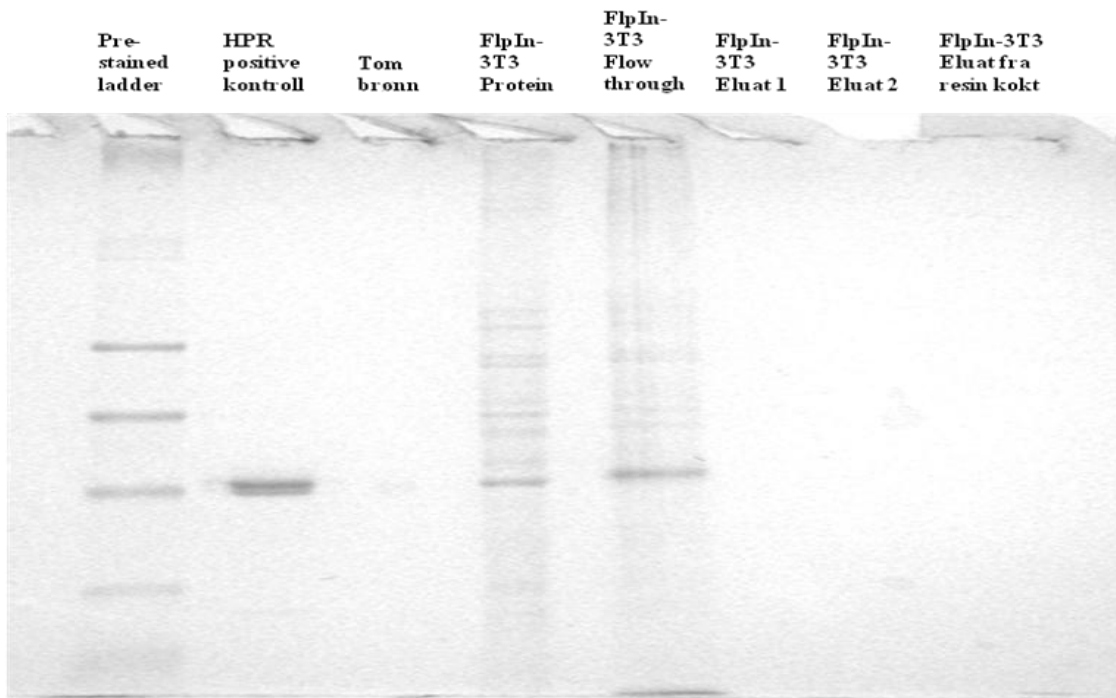
Etter testing av GelCode glykoprotein fargingskitet ble det kjørt en runde til med glycoprotein isolering ved hjelp WGA, men glykoproteiner ble denne gangen overført til en Hybondmembran. Resultatet ble negativ, det er kun markøren som vises på membranen og resultatet ble derfor ikke vist.

3.6 Testing av Glykoprotein isoleringskitet

Etter testing av GelCode Glykoprotein fargingskitet ble også glykoprotein isoleringskitet testet ved å lage åtte prøver som beskrevet i metode del. Hvis glykoprotein fargingskitet virker vil bånd kunne observeres i HPR positive kontrollen og hvis glykoprotein isoleringskitet virker vil bånd kunne observeres i eluatene. Resultat ved testing av glykoprotein isolering er vist i figur 16. Her er det bare markøren og en HPR positiv kontroll som vises etter at gelen ble farget med glykoproteiner fargingskitet. Gelen ble deretter farget med Coomassie blue og resultatet er vist i figur 17. Her viser det bånd i de brønnene med HPR positive kontroll, FlpIn-3T3 protein ekstrakt og "flow through", mens i de brønnene med eluatene viser det ingen bånd som forventet.



Figur 16: Testing av Glycoprotein isoleringskit ved hjelp av WGA. Kun markøren og en prøve ved HPR positive kontroll som synes på gel etter farging med GelCode glykoprotein fargingskitet.

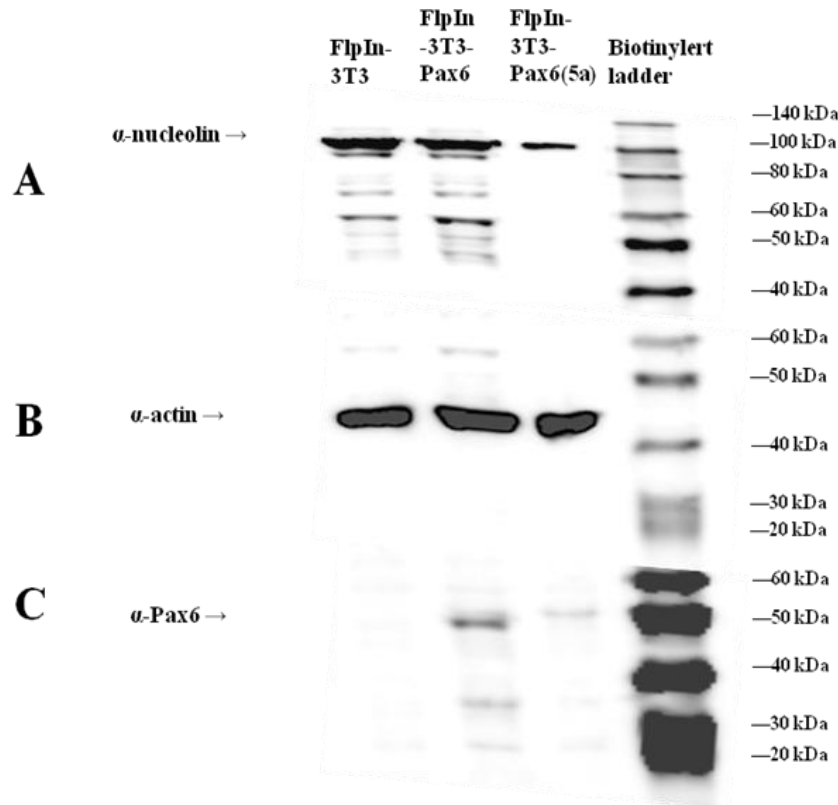


Figur 17: Testing av Glycoprotein isoleringskit ved hjelp av WGA etter farging av gelen med Coomassie blue. Bildet viser bånd i prøvene med HPR positive kontroll, FlpIn-3T3 prøve og i FlpIn-3T3 ”Flow through”. Etter at gelen ble farget med Coomassie Blue.

3.7 Western Blot

Western blot (WB) brukes til deteksjon av enkelt proteiner. Nucleolin anstistoff ble brukt, fordi proteomikk studier indikerer at dette proteinet er nedregulert i Pax6 cellene (ikke publisert resultater). Nucleolin er et non-histone kjerne fosfoprotein som finnes stort sett i kjernen, men også i cytoplasma og cellemembraner hos de fleste eukaryotiske celler. Det har vært rapportert flere funksjoner av nucleolin som blant annet modulering av enzymer og hormon aktiviteter. I tillegg er nucleolin involvert i regulering av intracellulære trafikkering, kontroll av protein folding, ligand gjenkjenning og celle-celle interaksjoner [46].

Det ble utført to runder med WB for nucleolin. Resultat ved første runden (figur 18A) viser at nucleolin ble uttrykt ved ~100 kDa i alle tre cellelinjene. Uttrykksnivået av nucleolin er sterkest i FlpIn-3T3 kontrollceller, dernest i FlpIn-3T3-Pax6, mens uttrykksnivået av nucleolin er minst i FlpIn-3T3-Pax6(5a). I tillegg ser det ut til at nedbrytningsprodukter av nucleolin finnes i både FlpIn-3T3 kontrollceller og i FlpIn-3T3-Pax6 celler, mens dette er fraværende i FlpIn-3T3-Pax6(5a). Lik protein konsentrasjon tilsatt i hver brønn ble kontrollert ved at membranen ble strippet og innkubert med anti-actin antistoff. Resultatet er vist i figur 18B. Her viser det tilnærmet lik uttrykksnivå av actin i alle tre cellelinjer ved ~ 42 kDa, noe som indikerer lik mengde protein tilsatt på gel. Det antas derfor at årsaken til mindre uttrykt av nucleolin i FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a), samt fraværende av nucleolin nedbrytningsprodukter i FlpIn-3T3-Pax6(5a) kan skyldes nedregulering av nucleolin i disse cellelinjene. Membranen ble igjen strippet og inkubert med anti-Pax6 for å kontrollere riktig proteinekstrakt. Resultatet er vist i figur 18 C. Her viser det uttrykk av Pax6 i FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) cellelinjene ved ~48 kDa, og at uttrykk av Pax6 er fraværende i FlpIn-3T3 kontrollceller. I tillegg ser det ut til at uttrykksnivået av Pax6 i FlpIn-3T3-Pax6 er mange ganger sterkere enn i FlpIn-3T3-Pax6(5a) cellelinjene. Disse observasjonene stemte med RT-PCR resultatene hvor uttrykk av Pax6 gen ble testet i FlpIn-3T3, FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) ved hjelp av RT-PCR.

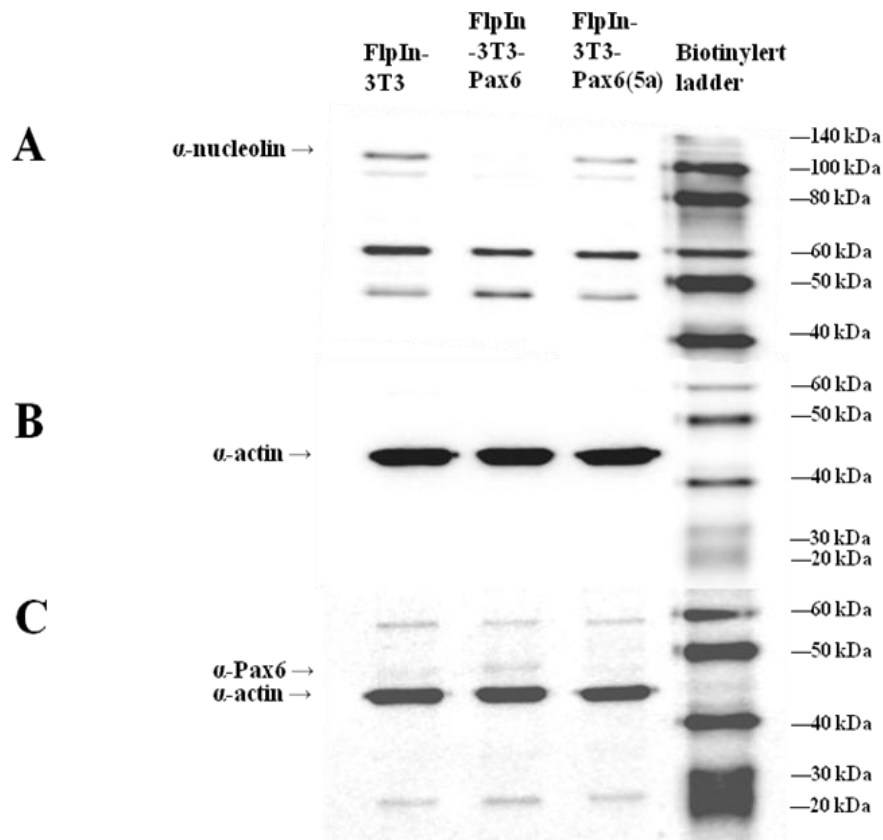


Figur 18: Western blot som viser uttrykksnivået av nucleolin, actin og Pax6 proteinene i cellelinjene FlpIn-3T3, FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a). Figur 18A) viser uttrykk av nucleolin i alle tre cellelinjene, der nucleolin er nedregulert i FlpIn-3T3-Pax6(5a) cellelinjen. Figur 18B) viser uttrykk av actin i alle tre cellelinjene og uttrykksnivået er tilnærmet lik i alle tre cellelinjene. Figur 18C) viser uttrykk av Pax6 i cellelinjene FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a), mens dette er fraværende i FlpIn-3T3-kontrollceller.

Resultatet av WB ved andre runden er vist i figur 19. Figur 19A viser uttrykk av nucleolin ved ~ 100 kDa. I motsetning til det som ble observert i første runden viser det her at uttrykksnivået av nucleolin er sterkest i FlpIn-3T3 kontrollceller, dernest i FlpIn-3T3-Pax6(5a), noe som indikerer nedregulering i FlpIn-3T3-Pax6(5a). I FlpIn-3T3-Pax6 er uttrykket av nucleolin fullstendig borte, noe som tyder på fullstendig nedregulering av nucleolin i FlpIn-3T3-Pax6. På dette membranbildet viser det også andre uspesifikke bånd i alle tre cellelinjene ved ~60 kDa og ~48kDa. For å sjekke at nedregulering i FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) ikke skyldes ulike protein konsentrasjon tilsatt, ble membranen strippet på nytt og inkubert med anti-actin antistoffet. Resultatet er vist i figur 19B. Her viser det tilnærmet lik uttrykksnivå av actin i alle tre cellelinjene ved ~ 42 kDa. Det antas dermed at nucleolin ble nedregulert i både FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a).

Videre ble det kontrollert at riktig proteinekstrakt ble tilsatt på gel ved at membranen ble igjen strippet og inkubert med Pax6 antistoffet. Resultatet er vist i figur 19C. Her ser det

ut til at uttrykk av Pax6 forekommer kun i FlpIn-3T3-Pax6. Figur 14 C viser også andre uspesifikke bånd på membranen i alle tre cellelinjene ved ~60 kDa, ~42 kDa, ~25 kDa, som ikke kan være Pax6. Båndet ved ~42 kDa kan være actin. Det vil bli kommentert nærmere på WB resultatene farget med Pax6 antistoffer i diskusjonen.



Figur 19: Western blot som viser uttrykksnivået av nucleolin, actin og Pax6 proteinene i cellelinjene **FlpIn-3T3**, **FlpIn-3T3-Pax6** og **FlpIn-3T3-Pax6(5a)**. Figur 19A) Viser uttrykk av nucleolin i alle tre cellelinjene, der nucleolin er nedregulert i FlpIn-3T3-Pax6(5a) cellelinjen og fullstendig nedregulert i FlpIn-3T3-Pax6. Figur 19B) Viser uttrykk av actin i alle tre cellelinjene der uttrykksnivået er tilnærmet lik i alle tre cellelinjene. Figur 19C) Viser uttrykk av Pax6 i FlpIn-3T3-Pax6 cellelinjen.

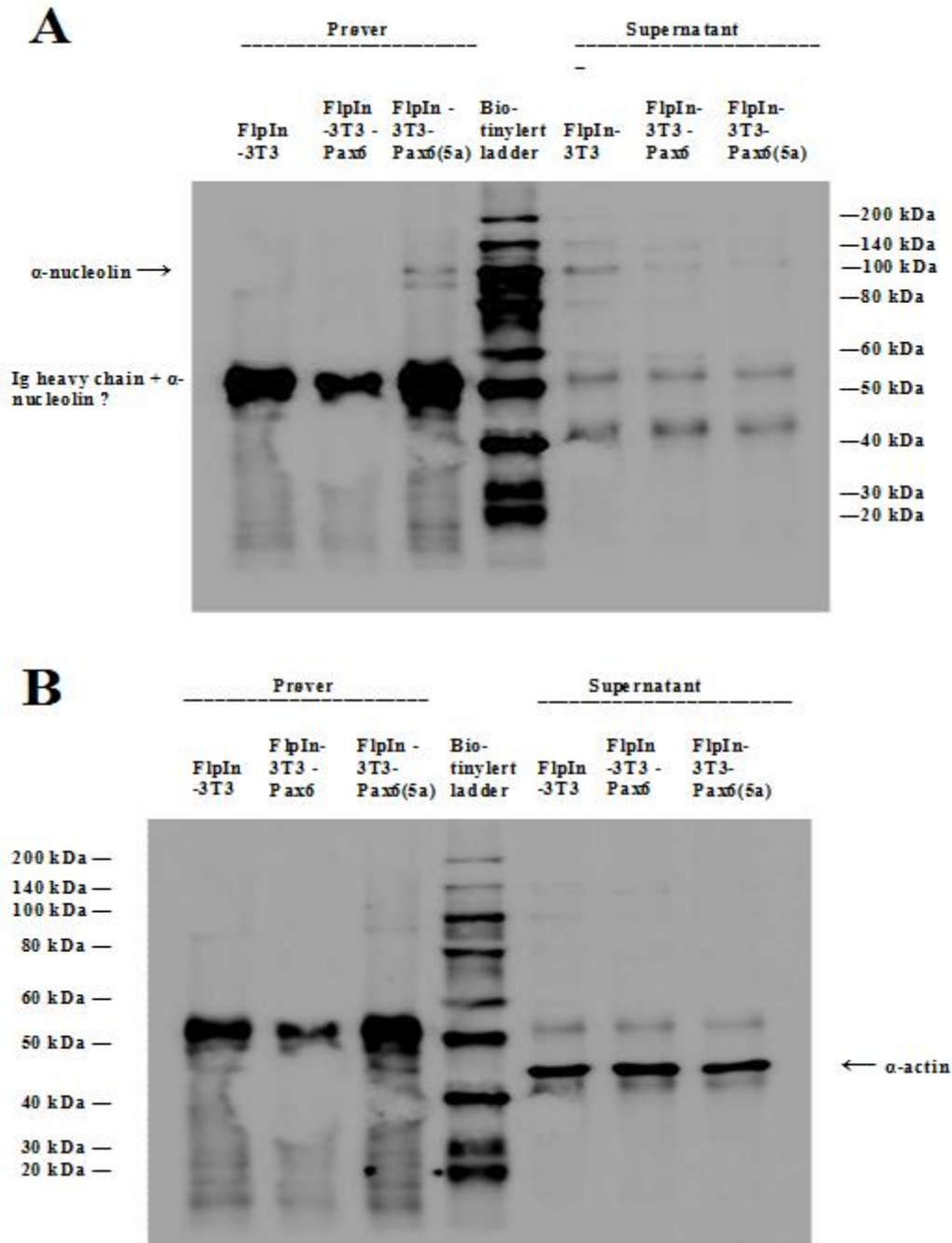
3.8 Immunopresipitering

Immunopresipitering (IP) er en teknikk som kan brukes til å identifisere og separere spesifikke antigener ved hjelp av antistoffer som binder spesifikt til dem. Her ble IP brukt for å anrike nucleolin, slik at større mengde nucleolin kan bli satt på gel før western blot i håp om at eventuelle endringer som skyldes glykosyleringer vil vises tydeligere.

Det ble observert ved hjelp av western blot at nucleolin blir nedregulering i FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) og derfor forventes det å se lignende resultat også ved IP med nucleolin. Resultat av IP med nucleolin er vist i figur 20A.

Resultat av IP med nucleolin er vist i figur 20A. Her viser det svake bånd for nucleolin ved ~100 kDa i alle tre cellelinjene i de brønnene merket med supernatanter. Uttrykk av nucleolin er sterkest i FlpIn-3T3, dernest i FlpIn-3T3-Pax6 og minst i FlpIn-3T3-Pax6(5a). Her ser det ut til at nucleolin blir nedregulert i FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) slik som det ble tidligere observert ved WB resultatene. Dette forventes å se tydeligere i de brønnene merket med prøver siden nucleolin var blitt anrikt i disse prøvene, men resultatet ble ikke som forventet. Resultatet viser svake bånd for nucleolin i FlpIn-3T3-Pax6(5a), mens uttrykk av nucleolin er fraværende både i FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3 kontrollceller. Ved omtrent 50 kDa viser det sterke bånd som antas for å være IgG tunge kjeder fra antistoffet brukt til IP.

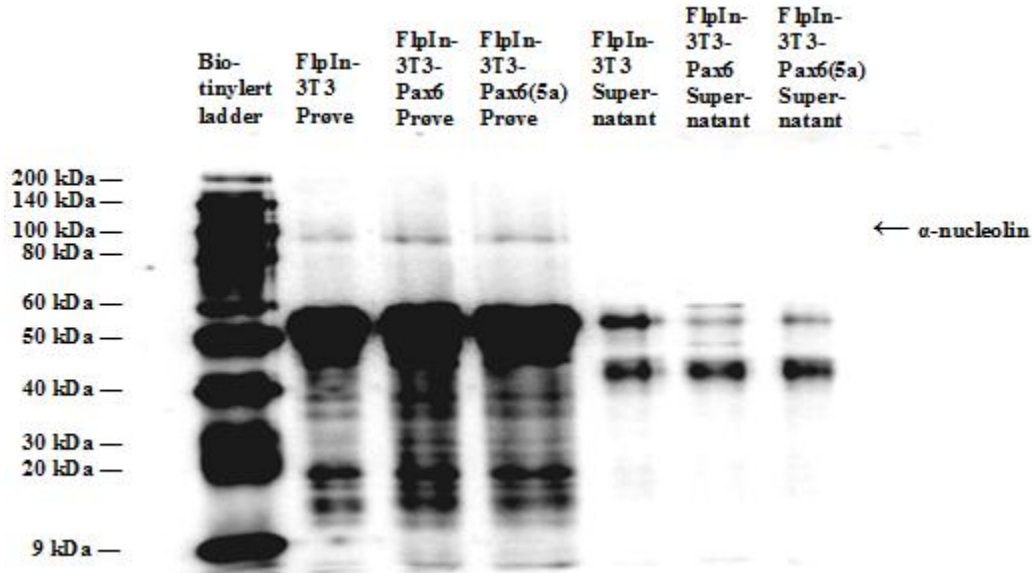
Etter innkubering med anti-nucleolin ble membranen strippet og inkubert med anti-actin for å kontrollere at jevn proteinkonsentrasjon ble tilsatt. Figur 20B viser IP resultatet med actin ved ~42 kDa i de brønnene merket med supernatant. Her ser det ut til at mengde protein som ble tilsatt på gel er tilnærmet jevnt.



Figur 20: Immunopresipitering. A) Nucleolin var blitt anrikt i de brønnene merket med prøver. I disse prøvene viser det uttrykk av nucleolin i FlpIn-3T3-Pax6, mens uttrykk av nucleolin er fraværende i FlpIn-3T3-Pax6 og kontrollceller. I supernatanter viser det uttrykt av nucleolin i alle tre cellelinjene, der nucleolin er nedregulert i FlpIn-3T3-Pax6 og i FlpIn-3T3-Pax6(5a) cellelinjene. B) viser uttrykk av actin i alle tre cellelinjene der uttrykksnivået er tilnærmet lik.

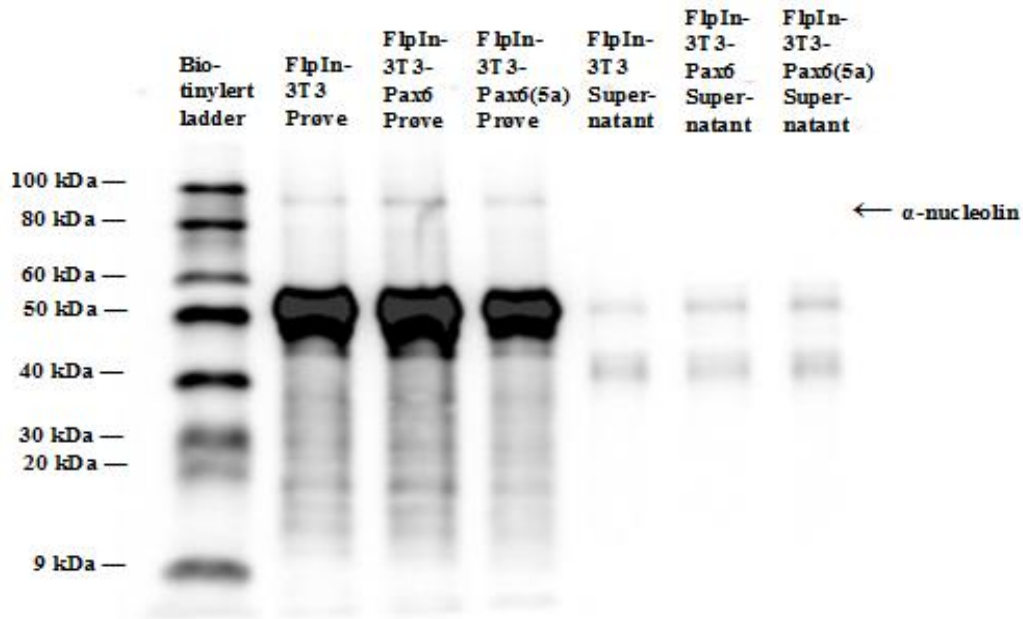
Siden IP resultatet viser ikke så godt på bildet ble hele forsøket gjentatt. Resultat av IP med nucleolin utført den andre gangen er vist i figur 21. Bildet viser at uttrykk av nucleolin forekommer i alle tre cellelinjene ved ~100 kDa. I de brønnene merket med

prøver ser det ut til at uttrykket av nucleolin er sterkest i FlpIn-3T3-Pax6, dernest i FlpIn-3T3-Pax6(5a) og minst i FlpIn-3T3 kontrollceller. I de brønnene merket med supernatant viser det derimot ingen bånd slik som vist ved første IP runden (figur 20A).



Figur 21: IP med nucleolin. Bildet viser uttrykk av nucleolin i alle tre cellelinjene ved ~100 kDa. I de brønnene merket med prøver er uttrykt av nucleolin sterkest i FlpIn-3T3-Pax6, dernest i FlpIn-3T3-Pax6(5a) og minst i FlpIn-3T3 kontrollceller.

En tredje runde med IP ble derfor gjentatt og resultatet er vist i figur 22. Her viser resultat noen lunde det samme som ved andre IP runden (figur 21).

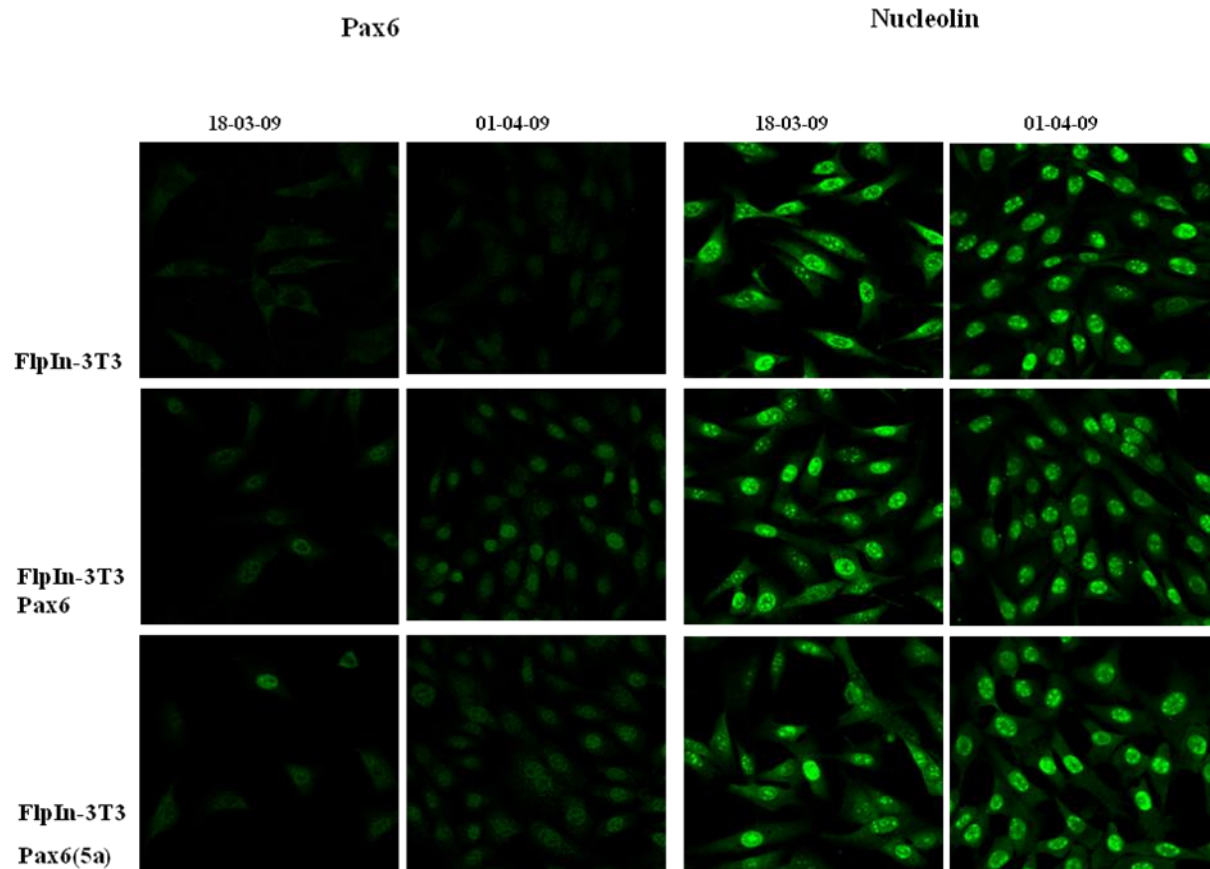


Figur 22: Ny IP runde med nucleolin. Bildet viser uttrykk av nucleolin i alle tre celle linjene på tilsvarende måte som figur 21.

3.9 Immunohistokjemi (IHC)

Immunohistokjemi (IHC) er en metode for å bestemme hvor et gitt protein er lokalisert i celler eller vev. I denne oppgaven ble IHC benyttet for å forstå distribusjonen og lokalisering av Pax6 og nucleolin protein uttrykk i ulike deler av ulike cellelinjer.

IHC resultatet (figur 23) samsvarer med RT-PCR og western blot resultater ved at det ikke uttrykker Pax6 i FIpIn-3T3 kontrollceller, men at uttrykk av Pax6 forekommer i kjernen i FIpIn-3T3-Pax6 og FIpIn-3T3-Pax6(5a) cellelinjene. Når det gjelder nucleolin ser det ut til at nucleolin uttrykkes både i kjernen og cytoplasma i alle tre cellelinjene, noe som også samsvarer med resultater av western blot med nucleolin. En svakhet med IHC teknikken sammenlignet med western blot er at ved IHC er det vanskelig å bevise at fargen korresponderer med proteinet av interesse. Det er dermed vanskelig å se ut fra bildet om det er nedregulering i cellelinjene eller ikke, mens i western blot kan vi se nedregulering av nucleolin i FIpIn-3T3-Pax6 og FIpIn-3T3-Pax6(5a) cellelinjen ved å sammenligne nucleolin uttrykket med en markør.



Figur 23: Immunohistokjemi med Pax6 og nucleolin. Bildet viser uttrykk av Pax6 i kjernen i FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) cellelinjene, mens nucleolin uttrykkes både i kjernen og cytoplasma i alle tre cellelinjene

Som kort oppsummering for IHC kan det med denne metoden finne ut hvor proteinet av interesse er lokalisert i celler eller vev, men med IHC metoden er vanskelig å fastslå om eventuelle nedreguleringer av protein av interesse i de ulike cellelinjene.

4. Diskusjon

4.1 RT-PCR

RT-PCR metoden er enkelt og raskt å utføre, samtidig krever det ikke kostbare materialer for å kjøre RT-PCR reaksjon, derfor ble metoden benyttet for å få et rask overblikk over uttrykk av de testede glykosyltransferasene i alle testede cellelinjene. En ulempe med denne metoden er at den ikke gir nøyaktig kvantifisering av sluttproduktet i PCR reaksjonene dermed er det vanskelig å si nøyaktig hvor mye gen produkter som var nedregulert.

Det ble vist hjelp av RT-PCR at uttrykk av alle de testede glykosyltransferasene St3gal6, St6gal1, Gcnt1, Gcnt2, Fut8, Mgat3 og Ugt1a7c er nedregulert i Pax6 og Pax6(5a) cellelinjene. St3gal6 og Gcnt1 er mest nedregulert i både FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) cellelinjene, mens Fut8, Gcnt2 og St6gal1 glykosyltransferasene er mindre nedregulert. Nedregulering av Ugt1a7c og Mgat3 i FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) cellelinjene viser ikke så godt på gelbildet. Årsaken til dette kan være at RT-PCR ikke gir nøyaktig kvantifisering av sluttproduktet i PCR reaksjonene.

RT-PCR resultatet (figur 9 og 10) for St3gal6 viser også bånd i begge cellelinjene mellom 1000-1650 bp (ikke vist på figuren). Det kan tenkes at dette kan være genomisk DNA, fordi et genomisk DNA har mange flere basepar enn et mRNA. Genomisk DNA består av mange segmenter av ikke-kodende DNA (introner) innimellom kodende sekvenser (eksoner). Et mRNA lages fra et genomisk DNA ved hjelp av spesielle enzymsystemer som "klipper ut" intronene av det avleste genomiske DNA og skjøter sammen eksonene. mRNA som dannes består dermed bare av eksoner med korte sekvens og har dermed mindre antall basepar enn et genomisk DNA. St3gal6 primere var lagt til to ekson der intronet imellom var på 945 basepar. Dette kan stemme med de båndene som ble observert ved 1000-1650 pb på gelen. RNA preparater kan inneholde genomisk DNA og kan det føre til falske positive signaler i RT-PCR. En metode som ble brukt i denne masteroppgaven for å bli kvitt med genomisk DNA er å behandle RNA preparater med DNase før RT-PCR reaksjon. Etter DNase behandling ble det kjørt RT-PCR reaksjon og resultat av gelbildet viser at de båndene ved 1000-1650 bp ble borte.

Uttrykk av St6gal1 ved andre RT-PCR runden (figur 10) viser også bånd i FlpIn-3T3-Pax6(5a) ved 1000-1650 bp (ikke vist på figuren). Det antas at dette også skyldes genomisk DNA som tidligere forklart ved St3gal6. Intronet imellom St6gal1 primere var på 1245 pb og dette kan stemme med de båndene som ble observert ved 1000-1650 pb på gelen.

4.2 QPCR

QPCR ble benyttet, fordi en fordel med metoden er at den måler sluttproduktet under eksponentiell faser av PCR reaksjoner, dermed kan mengde PCR produkt måles mer nøyaktigere enn ved RT-PCR. Tilgjengelig er metoden tidskrevende og krever mer kostbare materialer.

QPCR resultatet samsvarer med RT-PCR resultatet at uttrykk av alle de testede glykosyltransferasene St3gal6, St6gal1, Gcnt1, Gcnt2, Fut8, Mgat3 og Ugt1a7c er nedregulert både i FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) cellelinjene. St3gal6 og Gcnt1 er mest nedregulert av alle de testede glykosyltransferasene. Nedreguleringen av alle sju testede glykosyltransferasene er sterkere i FlpIn-3T3-Pax6(5a) enn i FlpIn-3T3-Pax6.

Nedreguleringen av St3gal6, St6gal1, Gcnt2 og Fut8, er sterkest i FlpIn-3T3-Pax6(5a), mens for Ugt1a7c, Mgat3 og Gcnt1 viser det tilnærmet lik nedregulering både i FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a). Årsaken til at det er vanskelig å se tydelig mer nedregulering av Ugt1a7c, Mgat3 og Gcnt1 i FlpIn-3T3-Pax6(5a) enn FlpIn-3T3-Pax6 med konvensjonell RT-PCR er som tidligere nevnt at RT-PCR måler ikke PCR-produktet ved eksponentielle fasen.

Fra qPCR resultatene ble det observert at det er store variasjoner mellom de tre forsøkene for de fleste av de testede glykosyltransferasene unntatt fra Gcnt1 og St3gal6. Variasjoner mellom disse forsøkene kan skyldes biologisk forskjell mellom cellene ved ulike cellepassasjer. Det ble også observert at qPCR resultatene blir stadig bedre for hvert forsøk. Dette kan skyldes tekniske årsaker slik som forbedring av pipetteringsteknikk.

4.3 Glykoprotein isolering ved hjelp av ConA og WGA

I denne oppgaven benytter vi ConA og WGA til å isolere glykoproteiner. I disse forsøkene forventes det å se mindre glykosylerte proteiner i FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) enn i FlpIn-3T3 kontrollcellene, fordi dette ble observert på RNA-nivå ved hjelp av metodene RT-PCR og qPCR.

Resultatet for glykoprotein isolering ved hjelp av ConA etter farging av gelen med Coomassie blue ble ikke som forventet. Nivået av glykosylerte proteiner i alle tre cellelinjene er tilnærmet lik og mengde eluerte glykoproteiner i prøvene er veldig svake. Dette kan bety at dårlig isolering av glykoproteiner. Det ble derfor prøvd å kjøre en annen runde med glykoprotein isolering ved hjelp av ConA med økt proteinkonsentrasjonen fra 500 µg til 1000 µg. Ved første runde ble det utprøvd en proteinkonsentrasjon på 500 µg og fikk i resultat svake bånd i eluatene. Det forventes derfor at ved andre runden med økte proteinkonsentrasjon fra 500 µg til 1000 µg skulle det viser sterkere bånd i eluatene. Resultatet ved andre runden ble ikke som forventet, det viser ingen bånd i de eluerte

glykoprotein prøvene. En forklaring til at ingen bånd synes på gel kan være proteinprøvene inneholder EDTA som vil binde opp metallioner som er nødvendig for at glykoproteinene kan binde seg til resinnet. Hvis proteinprøvene inneholder EDTA vil det derfor ikke kunne detektere bånd i eluatene etter at gelen ble farget. Denne forklaringen ble utelukket etter at alle materialene som ble brukt i forbindelsen med glykoprotein isolering ble kontrollert og sikkert på at de ikke inneholder EDTA. En annen forklaring kan være tilfeldig feil eller teknisk feil som er knyttet til selve utførelsen av glykoprotein isolering. Metallioner slik som kalsium og mangan (Ca^{2+} og Mn^{2+}) er viktig for at glykoproteinene kan binde seg til resinnet. Hvis disse stoffene ble for eksempel glemte å tilsette i for eksempel bindingsbuffer kan det muligens være en forklaring til at glykoproteiner ikke har bundet seg til resinnet og at glykoproteinene ble vasket bort. Denne begrunnelsen kanskje er heller ikke riktig, fordi det ble brukt samme bindingsbuffer hele tiden. Det ble observert bånd i eluatene ved første runde med en proteinkonsentrasjon på 500 μg . Hvis det er problem med bindingsbufferen da skulle ikke det være noe bånd i noen av tilfellene. En tredje grunn kan være at ConA ble vasket bort allerede i starten av forsøket. I metode del ble det sagt at ConA ble vasket to ganger i bindingsbuffer og sentrifugert ved 2000 x g i ett minutt ved hver vask. Det kan hende at sentrifugering ved dette trinnet ble for dårlig slik at ConA ikke har rukket å senke ned til bunns og dermed kunne ha blitt fjernet sammen med bindingsbufferen. På den måten kunne mengde ConA være for lavt til å binde til glykoproteinene. Kanskje dette er grunnen til at det ble observert svake bånd i eluatene ved første runden. En fjerde grunn kan være at glykoproteiner som har bundet til ConA kan ha blitt vasket bort. Hvis en liten del av glykoproteiner blir bortvasket da vil det kunne observere svake bånd i eluerte glykoproteinprøvene (se figur 12A). Hvis hele mengde glykoprotein blir fjernet bort vil det dermed ikke kunne observere bånd i eluerte glykoproteinprøvene (se figur 12B).

Resultat for glykoprotein isolering ved hjelp av WGA etter farging av gelen med GelCode Glykoprotein fargingskitet ble negativ. Ingen bånd er synlig på gelen unntatt fra markøren. WGA ble brukt i denne masteroppgaven med hensikt å kunne isolere glykoproteiner ved at WGA binder seg til N-acetylglucosamine og sialin syre enheter på glykoproteiner. Det forventets derfor at disse glykoproteinene skulle finnes i eluatene etter eluering. Resultatet vist i figur 13, i de brønnene merket med eluat, viser ingen bånd noe som kan tyde på at glykoproteiner ble ikke isolert. Siden det ble ingen gyldig resultat ble hele forsøket gjentatt. Resultatet fra andre forsøket er også negativt som første forsøket. Derfor ble GelCode Glykoprotein fargingskitet og Glykoprotein isoleringskitet ved hjelp av WGA testet for å sjekke om disse virker som produsentene går god for. Resultatet etter testing av fargingskitet tyder på at den virker siden det ble observert bånd i positive kontroll prøver og ingen bånd i negative kontroll prøver. Det ble videre testet på glykoprotein isoleringskitet. Skulle isoleringskitet virke burde bånd kunne ses i eluatene, fordi hele hensikten er at WGA skal binde seg til glykoproteiner som etter eluering av glykoproteinene i eluatene skulle bånd kunne ses på gel. Resultatet etter testing av

isoleringskitet viser ingen bånd i elutatene, noe som kan tyde på at isoleringskitet ikke fungerer optimalt. Mulige forklaring til at isoleringskitet ikke virker og dermed ble det ikke observert bånd i elutatene kan være at proteinprøvene inneholder EDTA som var tidligere forklart under glykoprotein isolering ved hjelp av ConA. Også her ble forklaringen utelukket, fordi materialene som ble brukt ikke inneholder EDTA. En annen forklaring kan være at noen glykoproteiner har veldig sterke affinitet til WGA og vil dermed ikke bli eluert med elueringsbuffer. Denne forklaringen ble også forkastet, fordi resinet ble kokt etter eluering og dermed forventes at glykoproteiner skal være løsnet fra ”kulene” og kunne bli detektert i eluatene. Tredje forklaring kan være at glykoproteiner bundet til resinet kunne ha vært vasket bort, fordi under utførelsen av glykoprotein isolering ble glykoproteiner som har bundet seg til resinet ble vasket til sammen tre ganger før eluering med elueringsbuffer. En fjerde forklaring som muligens kan være grunnen til at det ble ingen bånd i eluatene er at isoleringskitet ikke er effektiv nok til å isolere glykoproteiner ved lave konsentrasjoner. På den måten vil proteinkonsentrasjonen som ble tilsatt i hver brønn (100 µg) er for lite til at bånd kan synes på gel.

4.4 Western Blot

WB ble benyttet i denne masteroppgaven for å detektere tilstedeværelsen av spesifikt proteiner i en blanding. Metoden har mange fordeler og ulemper. Fordeler med WB er at metoden er effektiv og nyttig til å detektere og karakterisere proteiner i små mengder. I tillegg har metoden høy spesifisitet, noe som gjør at metoden er uavhengig av spesifisitet av antistoffer. Ulemper med WB er at luftbobler kan forekomme når proteinprøver fra gel overføres til membran, men også ved inkubering av prøven med antistoffer. Dette kan føre til skjev lesing av bånd. Andre ulemper kan være hvis overføringstiden er for kort når proteiner overføres til membranen vil proteiner med større molekylvekt ikke kunne bli overført, noe som kan føre til feil avlesing av bånd eller at ingen bånd vil synes. I blokkeringsbuffer har metanol en funksjon i å hjelpe proteiner til å binde til membraner. For mye metanol i blokkeringsbuffer vil kunne redusere overføringseffektivitet av proteiner i å bli overført til membranen. På den måten er riktig mengde metanol nødvendig for å få riktig resultat [48].

Det ble kjørt to runder av WB med nucleolin. I begge runder viste resultatet nedregulering av nucleolin i FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) cellelinjene, noe som stemte med RT-PCR og qPCR resultatene.

Ved kontroll om at riktig proteinekstrakt ble tilsatt på gel viste WB resultatet ved den andre runden at Pax6 kun ble uttrykt i FlpIn-3T3-Pax6. Det ble kjent fra tidligere RT-PCR og WB resultatet ved første runden at Pax6 uttrykkes i både FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a). I tillegg er uttrykt av Pax6 flere ganger sterkere i FlpIn-3T3-Pax6

enn i FlpIn-3T3-Pax6(5a). Siden WB resultatet ved andre runden viser uttrykk av Pax6 bare i FlpIn-3T3-Pax6 kan det være vanskelig å avgjøre om riktig proteinekstrakt ble tilsatt i gelen. Antakelig blir Pax6 også uttrykt i FlpIn-3T3-Pax6(5a), men siden farging med Pax6 antistoffet denne gangen viser meget svake bånd for Pax6 ved ~48 kDa kan det da tenkes at uttrykk av Pax6 blir altfor svak til å kunne se dette i FlpIn-3T3-Pax6(5a). Det antas derfor at riktig proteinekstrakt ble tilsatt på gelen, men at Pax6 antistoffet som ble brukt denne gangen virker ikke så godt som forventet. Figur 19 C viser også andre uspesifikke bånd på membranen i alle tre cellelinjene ved ~60 kDa, ~42 kDa, ~25 kDa, som ikke kan være Pax6. Båndet ved ~42 kDa kan være actin. Kanskje var stripping og vasking av membranen ikke godt nok slik at actin båndene fra forrige farging ble igjen.

4.5 Glycoprotein isolering ved hjelp av immunopresipitering (IP)

Fordeler med IP metoden er at proteiner i en veldig lav konsentrasjon kan bli oppkonsentrert fra et relativt stort volum. Av den grunn ble metoden brukt i denne masteroppgaven for å anrike større mengde nucleolin slik at større mengde nucleolin kan bli satt på gel før WB. Ulemper med IP er at flere proteiner kan bli presipitert sammen med proteinet av interesse og tilstedeværelsen av IgG tunge og lette kjeder i prøven kan forstyrre resultatet [49] [50].

I denne masteroppgaven forventes det IP å kunne observere nedregulering i FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) slik som det viste ved WB resultatet. Resultatet av IP ble ikke som forventet. Mulig årsak til dette kan være at tiden der membranen blottes slik av proteiner fra gelen blir overført til Hybondmembranen var for kort slik at proteiner fra gel ikke blir fullstendig overført til membran. Eller at blottingen kan være for lenge slik at proteiner som ble overført til Hybondmembran har gått tapt.

4.6 Immunohistokjemi (IHC)

En fordel med IHC metoden er at den gir informasjon om lokalisering av protein av interesse i vev. Metoden blir også brukt til å måle oppregulering eller nedregulering av spesifikt biomarkører ved ulike behandlingstilstander. På grunnlag av disse fordeler blir IHC metoden brukt i denne masteroppgaven til å forstå lokalisering av Pax6 og nucleolin uttrykket i ulike cellelinjene. IHC metoden har også noen ulemper. Disse ulempene er tilstedeværelsen av ”bakgrunnsfarge” og svak farging av stedet hvor protein av interesse er lokalisert [51]

I denne masteroppgaven viser IHC resultatet uttrykk av Pax6 i kjernen av FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a), mens i kjernen av FlpIn-3T3 kontrollceller er det fraværende av Pax6. Det ble også observert ”bakgrunnsfarge”/”heavy background” i cytoplasma i alle tre cellelinjene med antistoffet Pax6 som antas for å skylde ikke-spesifikt binding. Dette problemet kan løses ved for eksempel å være ekstra forsiktig i preparering av vev på grunn av at skade av vev kan føre til at fargestoffet diffunderer ut til andre steder. I tillegg kan inkuberingstiden med primær og sekundær antistoffer reduseres for å minimalisere ikke-spesifikt binding. Det ble også observert svak farging av Pax6 i kjernen av FlpIn-3T3-Pax6 og FlpIn-3T3-Pax6(5a) cellelinjene. Dette problemet kan kanskje løses ved å unngå overblokkering av vev, fordi overblokkering kan føre til maskering av vev med blokkeringsløsning slik at mindre primær og sekundær antistoffer kan binde til de vev der protein av interesse er lokalisert. Inkuberingstiden med primær og sekundær antistoffer kan også økes slik at flere sekundær antistoffer kan binde til primærantistoffer og øker fargesignalet.

4.7 Betydning av vårt funn

Tidligere har andre forskere gjort studier hvor de undersøkte betydningen av hvorvidt nedregulering av glykosyltransferasene har i forbindelse med utvikling av sykdommer og kreft. Blant annet har det gjort funn som tyder på at overuttrykk av Fut8 har sammenheng med lymfeknute metastase. Uttrykk av Mgat5 fremkynder metastase av kreftceller, mens uttrykk av Mgat3 utkonkurrerer Mgat5 om substrat og dermed forhindrer metastatisk spredning av kreftceller [25]. UGT1A familien har betydning for eliminering og detoksifisering av flere stoffer. Mutasjoner av UGT1A familien fører til nedsatt enzymets aktivitet og dermed fører til redusert konjugering av bilirubin. Ukonjugert bilirubin i sin tur resulterer hyperbilirubinemia, Gilbert syndrom og Crigler-Najjar syndrom type I og II [35]. Uttrykk av Gcnt1 er assosiert med utvikling av flere type tumorer slik som prostata kreft, colorectal, lungekreft, T-lymfocytisk og myelogenøs leukemi [37]. Manglende uttrykk eller mutasjon av Gcnt2 er assosiert med katarakt. Økt uttrykk av St6gal1 er assosiert med utvikling av flere typer tumorer for eksempel colon adenocarcinomas [30] og avvikende metylering i St3gal6 representerer en ondartet fenotype av gastrisk kreft [32].

I denne masteroppgaven har en gruppe glykosyltransferaser blitt identifisert som nye målgener for transkripsjonsfaktoren Pax6. Disse glykosyltransferasene er Fut8, Mgat3, Ugt1a7c, Gcnt1, Gcnt2, St3gal6 og St6gal1. I nærvær eller ved økt uttrykk av Pax6 og isoformen Pax6(5a) blir disse glykosyltransferasene nedregulert. Dette funnet i kombinasjon med teori fra tidligere funn kan det tenkes at hvis det oppstår mutasjon som fører til at Pax6 uttrykkes mindre vil konsekvensen av dette føre til økt uttrykt av de sju testede glykosyltransferasene. Et eksempel, hvis det oppstår mutasjon som fører til

mindre uttrykt av Pax6 vil konsekvensen av dette føre til økt uttrykt av Gcnt2. Dette vil i sin tur, i relasjon til det som Eran Pras og medarbeidere (2004) har funnet, vil kunne forhindre utvikling av katarakt som det hittil ikke finnes medisin i behandling av denne øyesykdommen. Det eneste alternativet i er operasjon. Et annet eksempel er mutasjon som fører til økt uttrykt av St3gal6 vil, i relasjon til det som Yuki I og medarbeidere (2008) har funnet, kunne forhindre utvikling av GI kreft. På tilsvarende måte vil økt uttrykt av Ugt1A7c, i relasjon til det som [33, 35, 52] og sine medarbeidere har funnet, vil kunne forhindre utvikling av Gilbert syndrom og Crigler – Najjar syndrom type I og II. Mutasjon av Pax6 som fører til økt uttrykt av Mgat3 vil kunne bidra til forhindring av metastatisk spredning av kreftceller.

Resultatet vi ser i denne masteroppgaven har gitt oss en innsikt i mulige rollen av Pax6 i regulering av Fut8, Mgat3, Ugt1a7c, St3gal6, St6gal1, Gcnt1 og Gcnt2 i utvikling av ulike sykdommer og kreft. Det kan derfor være interessant å forske på rollen av Pax6 i regulering av disse sju testede glykosyltransferasene i fremtiden med håp om å få kunnskap om hvilke mekanismer som er involvert i utvikling av sykdommer og kreft som er forårsaket av endret uttrykk av disse glykosyltransferasene.

5. Fremtidige perspektiver

Når arbeidet er gjort i denne masteroppgaven ser vi det nå at forbedringer som kunne ha vært gjort er å prøve et annet glykoprotein fargingskit og andre metoder for glykoprotein isolering siden vi fikk ingen resultat på dette området.

Det finnes flere metoder for isolering av glykoproteiner. Et eksempel på metoder for isolering av glykopeptider som kan nevnes er Lektin-affinitet kromatografi. Lektiner affinitet kromatografi har flere fordeler fremfor andre metoder. Først, kan metoden redusere prøve kompleksiteten og øke oppsamling av glykopeptider ved lav mengde proteiner. For det andre vil oligosakkarid kjeder av glycoproteiner ikke bli ødelagt når de blir fjernet fra lektiner bundne til kolonnen og glykaner som elueres fra glykoproteiner kan samles for å belyse sine strukturer. Andre fordeler med lektin affinitet kromatografi er at lektiner er lett tilgjengelig kommersielt og de er billig. En ulempe med metoden er uspesifikke binding av lektiner til andre proteiner [45]. Andre lektin kromatografi metoder kan for eksempel nevnes serie-lektin-affinitet kromatografi (SLAC). Denne metoden har basert at ulike undergrupper/deler av glykoproteiner kan samtidig binde til multiple lektiner slik at endringer i glykosyleringsmønster kan oppdages og sammenlignes. Ulempen er at bruken av SLAC for anriking av glykoproteiner fra komplekse biologiske prøver krever en nøye vurdering og optimalisering av rekkefølgen på lektiner for å minimere overlapp i bindende spesifisitet. [53]. Multi-lektiner-affinitet kromatografi (M-LAC) er også en metode for glykoprotein isolering som har vært brukt

av [54]. Denne metoden kan bidra til økt bindende affiniteter av lektiner til glykoproteiner ved bruk av multiple lektiner enn bruk av individuelle lektiner [53]. På tilsvarende måte har Zhao og medarbeidere (2006) brukt tre separate lektin-agarose konjugater som består av wheat germ agglutinin (WGA), Sambucus nigra lektin (SNA) og Maackia amurensis lektin (MAL) som en del av prøveopparbeidelse til å anrike glykoproteiner som inneholder sialinsyre fra humane kreft serum [55]. I tillegg til andre metoder for glykoprotein isolering kan vi også prøve andre type glykoprotein fargingskit. Til dette kan nevnes Pro-Q Emerald 300 eller 488 glykoprotein gel fargingskit som Courtenay Hart og medarbeidere (2003) har brukt til å detektere glykoproteiner i geler [56]. Pro-Q Emerald fargingskitet har flere fordeler, blant annet at den er enkel i bruk, er høy sensitive for detektering av glykoproteiner og kan detekteres glykoproteiner ved lave konsentrasjon (~5-18 ng per band) [57].

Riktig valg av metoder og arbeidsteknikker kan bidra til å gi tydeligere og valide resultater innen forskningsarbeid. I denne masteroppgaven ble det bruk individuelle lektiner til isolering av glykoproteiner. Med disse metodene ble det ingen resultat av, derfor kan det være nyttig å prøve multiple lektiner hvis tid og ressurser er tilgjengelig, fordi bruk av multiple lektiner vil kunne bidra til økt bindende affiniteter av lektiner til glykoproteiner og dermed er det større sjanse å få vellykket resultat enn bruk av individuelle lektiner. I tillegg kan metoden slik som lektin-agarose konjugater som Zhao og medarbeidere (2006) være aktuelt, fordi glykosyltransferasene St6gal1 og St3gal6 som ble brukt i denne masteroppgaven består av sialinsyre. Det kan også være interessant å prøve en annen type glykoprotein fargingskit slik som Pro-Q Emerald 300 eller 488, fordi som nevnt tidligere kan proteinkonsentrasjonene som ble brukt i denne masteroppgaven være for lav til at GelCode glykoprotein fargingskitet være sensitivt nok til å isolere glykoproteinene. Siden Pro-Q Emerald glykoprotein fargingskitet kan detektere glykoproteiner ved svært lave konsentrasjon (~4 ng per band) vil kanskje det er verdt å prøve dette kitet med håp om at dette kan løse problemet som det plages med i denne masteroppgaven.

6. Konklusjon

Verifisering om glykosyltransferasene Fut8, Mgat3, Ugt1a7c, St3gal6, St6gal1, Gcnt1 og Gcnt2 er mulige målgener for transkripsjonsfaktoren Pax6 er ikke tidligere studert, men i denne masteroppgaven er det blitt påvist ved hjelp av RT-PCR og qPCR at disse glykosyltransferasene er nedregulert i nærvær av Pax6 og isoformen Pax6(5a).

Metoder som isolering av glykoproteiner ved hjelp av concavalin A (Con A) og Wheat Germ Agglutinin (WGA), immunopresipitering (IP), Western blot (WB) og immunohistokjemi (IHC) ble også brukt for å prøve og detektere endringer i

glykosylering på protein-nivå. Resultatet fra Western blot viste at nucleolin blir nedregulert både i Pax6 og Pax6(5a), mens det ble ingen resultat av andre metoder. I denne masteroppgaven ble stort sett alle metodene utført minst to ganger unntatt fra glykoprotein isolering ved hjelp av ConA som kun ble utført en gang. Hvis tid og ressurs er tilgjengelig bør alle forsøkene bli repetert et par ganger til før det vurderes å prøve andre metoder.

7. Referanser

- 1 Chi N, Epstein JA: Getting your pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends Genet* 2002;18:41-47.
- 2 Lang D, Powell SK, Plummer RS, Young KP, Ruggeri BA: Pax genes: Roles in development, pathophysiology, and cancer. *Biochem Pharmacol* 2007;73:1-14.
- 3 Singh S, Chao LY, Mishra R, Davies J, Saunders GF: Missense mutation at the c-terminus of pax6 negatively modulates homeodomain function. *Human Molecular Genetics* 2001;10:911-918.
- 4 Mikkola I, Bruun JA, Holm T, Johansen T: Superactivation of pax6-mediated transactivation from paired domain-binding sites by dna-independent recruitment of different homeodomain proteins. *J Biol Chem* 2001;276:4109-4118.
- 5 Azuma N, Tadokoro K, Asaka A, Yamada M, Yamaguchi Y, Handa H, Matsushima S, Watanabe T, Kohsaka S, Kida Y, Shiraishi T, Ogura T, Shimamura K, Nakafuku M: The pax6 isoform bearing an alternative spliced exon promotes the development of the neural retinal structure. *Hum Mol Genet* 2005;14:735-745.
- 6 Mascarenhas JB, Young KP, Littlejohn EL, Yoo BK, Salgia R, Lang D: Pax6 is expressed in pancreatic cancer and actively participates in cancer progression through activation of the met tyrosine kinase receptor gene. *J Biol Chem* 2009;284:27524-27532.
- 7 Simpson TI, Price DJ: Pax6; a pleiotropic player in development. *Bioessays* 2002;24:1041-1051.
- 8 Hill ME, Asa SL, Drucker DJ: Essential requirement for pax6 in control of enteroendocrine proglucagon gene transcription. *Mol Endocrinol* 1999;13:1474-1486.
- 9 Lang D, Mascarenhas JB, Powell SK, Haleboua J, Nelson M, Ruggeri BA: Pax6 is expressed in pancreatic adenocarcinoma and is downregulated during induction of terminal differentiation. *Molecular Carcinogenesis* 2008;47:148-156.
- 10 Azuma N, Yamaguchi Y, Handa H, Hayakawa M, Kanai A, Yamada M: Missense mutation in the alternative splice region of the pax6 gene in eye anomalies. *Am J Hum Genet* 1999;65:656-663.
- 11 Schedl A, Ross A, Lee M, Engelkamp D, Rashbass P, van Heyningen V, Hastie ND: Influence of pax6 gene dosage on development: Overexpression causes severe eye abnormalities. *Cell* 1996;86:71-82.
- 12 Collinson JM, Quinn JC, Buchanan MA, Kaufman MH, Wedden SE, West JD, Hill RE: Primary defects in the lens underlie complex anterior segment abnormalities of the pax6 heterozygous eye. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:9688-9693.

- 13 Hingorani M, Williamson KA, Moore AT, van Heyningen V: Detailed ophthalmologic evaluation of 43 individuals with pax6 mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:2581-2590.
- 14 Li T, Lu Z, Lu L: Regulation of eye development by transcription control of ccctc binding factor (ctcf). *J Biol Chem* 2004;279:27575-27583.
- 15 Ramaesh T, Williams SE, Paul C, Ramaesh K, Dhillon B, West JD: Histopathological characterisation of effects of the mouse pax6(leca4) missense mutation on eye development. *Exp Eye Res* 2009;89:263-273.
- 16 Zhong X, Li Y, Peng F, Huang B, Lin J, Zhang W, Zheng J, Jiang R, Song G, Ge J: Identification of tumorigenic retinal stem-like cells in human solid retinoblastomas. *Int J Cancer* 2007;121:2125-2131.
- 17 Li T, Lu Z, Lu L: Pax6 regulation in retinal cells by ccctc binding factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:5218-5226.
- 18 Pinto GR, Clara CA, Santos MJ, Almeida JR, Burbano RR, Rey JA, Casartelli C: Mutation analysis of gene pax6 in human gliomas. *Genet Mol Res* 2007;6:1019-1025.
- 19 Zhou YH, Wu X, Tan F, Shi YX, Glass T, Liu TJ, Wathen K, Hess KR, Gumin J, Lang F, Yung WK: Pax6 suppresses growth of human glioblastoma cells. *J Neurooncol* 2005;71:223-229.
- 20 Wayne M Becker LJKoJH: *The world of the cell*, ed 6.utg., 2006.
- 21 Dall'olio F: Protein glycosylation in cancer biology: An overview. *Clin Mol Pathol* 1996;49:M126-M135.
- 22 Blomme B, Van Steenkiste C, Callewaert N, Van Vlierberghe H: Alteration of protein glycosylation in liver diseases. *J Hepatol* 2009;50:592-603.
- 23 Wang P-H: Altered glycosylation in cancer: Sialic acids and sialyltransferases, *Journal of Cancer Molecules* 2005,
- 24 Takahashi M, Kuroki Y, Ohtsubo K, Taniguchi N: Core fucose and bisecting glcnac, the direct modifiers of the n-glycan core: Their functions and target proteins. *Carbohydrate Research* 2009;344:1387-1390.
- 25 Zhao YY, Takahashi M, Gu JG, Miyoshi E, Matsumoto A, Kitazume S, Taniguchi N: Functional roles of n-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer. *Cancer Sci* 2008;99:1304-1310.
- 26 Alavi A, Axford JS: Sweet and sour: The impact of sugars on disease. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47:760-770.
- 27 Hwang H, Zhang J, Chung KA, Leverenz JB, Zabetian CP, Peskind ER, Jankovic J, Su Z, Hancock AM, Pan C, Montine TJ, Pan S, Nutt J, Albin R, Gearing M, Beyer RP, Shi M: Glycoproteomics in neurodegenerative diseases. *Mass Spectrom Rev* 2009

- 28 Contessa JN, Bhojani MS, Freeze HH, Rehemtulla A, Lawrence TS: Inhibition of n-linked glycosylation disrupts receptor tyrosine kinase signaling in tumor cells. *Cancer Res* 2008;68:3803-3809.
- 29 Zhao Y, Sato Y, Isaji T, Fukuda T, Matsumoto A, Miyoshi E, Gu J, Taniguchi N: Branched n-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins. *FEBS J* 2008;275:1939-1948.
- 30 Shaikh FM, Seales EC, Clem WC, Hennessy KM, Zhuo Y, Bellis SL: Tumor cell migration and invasion are regulated by expression of variant integrin glycoforms. *Exp Cell Res* 2008;314:2941-2950.
- 31 <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ST3GAL6>>
- 32 Kawamura YI, Toyota M, Kawashima R, Hagiwara T, Suzuki H, Imai K, Shinomura Y, Tokino T, Kannagi R, Dohi T: DNA hypermethylation contributes to incomplete synthesis of carbohydrate determinants in gastrointestinal cancer. *Gastroenterology* 2008;135:142-151 e143.
- 33 Kong SY, Ki CS, Yoo BC, Kim JW: Ugt1a7 haplotype is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis b carriers. *Cancer Science* 2008;99:340-344.
- 34 Strassburg CP, Vogel A, Kneip S, Tukey RH, Manns MP: Polymorphisms of the human udp-glucuronosyltransferase (ugt) 1a7 gene in colorectal cancer. *Gut* 2002;50:851-856.
- 35 Udomuksorn W, Elliot DJ, Lewis BC, Mackenzie P, Yoovathaworn K, Miners JO: Influence of mutations associated with gilbert and crigler-najjar type ii syndromes on the glucuronidation kinetics of bilirubin and other udp-glucuronosyltransferase 1a substrates. *Pharmacogenetics and Genomics* 2007;17:1017-1029.
- 36 Hagsisawa S, Ohyama C, Takahashi T, Endoh M, Moriya T, Nakayama J, Arai Y, Fukuda M: Expression of core 2 beta1,6-n-acetylglucosaminyltransferase facilitates prostate cancer progression. *Glycobiology* 2005;15:1016-1024.
- 37 Wang L, Mitoma J, Tsuchiya N, Narita S, Horikawa Y, Habuchi T, Imai A, Ishimura H, Ohyama C, Fukuda M: An a/g polymorphism of core 2 branching enzyme gene is associated with prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;331:958-963.
- 38 Pras E, Raz J, Yahalom V, Frydman M, Garzozzi HJ, Pras E, Hejtmancik JF: A nonsense mutation in the glucosaminyl (n-acetyl) transferase 2 gene (gcnt2): Association with autosomal recessive congenital cataracts. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2004;45:1940-1945.
- 39 Umana P, Jean-Mairet J, Moudry R, Amstutz H, Bailey JE: Engineered glycoforms of an antineuroblastoma igg1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nat Biotechnol* 1999;17:176-180.
- 40 Lau KS, Dennis JW: N-glycans in cancer progression. *Glycobiology* 2008;18:750-760.

- 41 Harvey BE, Toth CA, Wagner HE, Steele GD, Jr., Thomas P: Sialyltransferase activity and hepatic tumor growth in a nude mouse model of colorectal cancer metastases. *Cancer Res* 1992;52:1775-1779.
- 42 Bresalier RS, Rockwell RW, Dahiya R, Duh QY, Kim YS: Cell surface sialoprotein alterations in metastatic murine colon cancer cell lines selected in an animal model for colon cancer metastasis. *Cancer Res* 1990;50:1299-1307.
- 43 Eriksen TE: "Construction of inducible cell line for the transcription factor pax6" Masteroppgave i molekylær biologi ved Avdeling for Farmakologi, Institutt for Farmasi, University of Tromsø, 2006,
- 44 Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time rt-pcr. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.
- 45 Dai Z, Zhou J, Qiu SJ, Liu YK, Fan J: Lectin-based glycoproteomics to explore and analyze hepatocellular carcinoma-related glycoprotein markers. *Electrophoresis* 2009;30:2957-2966.
- 46 Carpentier M, Morelle W, Coddeville B, Pons A, Masson M, Mazurier JL, Legrand D: Nucleolin undergoes partial n- and o-glycosylations in the extranuclear cell compartment. *Biochemistry* 2005;44:5804-5815.
- 47 Hwang DL, Foard DE, Wei CH: Soybean trypsin-inhibitor - crystallization and x-ray crystallographic study. *Journal of Biological Chemistry* 1977;252:1099-1101.
- 48 <<http://www.Piercenet.Com/proteomics/browse.Cfm?Fldid=8259a7b6-7da6-41cf-9d55-aa6c14f31193>>
- 49 <http://www.google.no/imgres?imgurl=http://www.piercenet.com/media/co-immunoprecipitation.gif&imgrefurl=http://www.piercenet.com/Proteomics/browse.cfm%3FfldID%3D9C471132-0F72-4F39-8DF0-455FB515718F&h=269&w=382&sz=30&tbnid=tAJyL3H5GN6uCM:&tbnh=87&tbnw=123&prev=/images%3Fq%3Dimmunoprecipitation&hl=no&usq=__QR_xRAEPUQa44N NNQtolpSIGL1k=&ei=v7rJSsLYJ4Hl-Qb6l_1H&sa=X&oi=image_result&resnum=5&ct=image>
- 50 <http://74.125.77.132/search?q=cache:aSBZkutOCrCJ:www.immunok.com/pdfs/IP_Troubleshooting.doc+immunoprecipitation+troubleshooting&cd=5&hl=no&ct=clnk&gl=no>
- 51 <<http://www.piercenet.com/Proteomics/browse.cfm?fldID=F95B91A9-3DC1-4B56-8E8D-59CA044A8BA7>>
- 52 Strassburg CP, Vogel A, Kneip S, Tukey RH, Manns MP: Polymorphisms of the human udp-glucuronosyltransferase (ugt) 1a7 gene in colorectal cancer. *Gut* 2002;50:851-856.
- 53 Taylor AD, Hancock WS, Hincapie M, Taniguchi N, Hanash SM: Towards an integrated proteomic and glycomic approach to finding cancer biomarkers. *Genome Med* 2009;1:57.

- 54 Yang Z, Hancock WS: Approach to the comprehensive analysis of glycoproteins isolated from human serum using a multi-lectin affinity column. *J Chromatogr A* 2004;1053:79-88.
- 55 Zhao J, Simeone DM, Heidt D, Anderson MA, Lubman DM: Comparative serum glycoproteomics using lectin selected sialic acid glycoproteins with mass spectrometric analysis: Application to pancreatic cancer serum. *J Proteome Res* 2006;5:1792-1802.
- 56 Hart C, Schulenberg B, Steinberg TH, Leung WY, Patton WF: Detection of glycoproteins in polyacrylamide gels and on electroblots using pro-q emerald 488 dye, a fluorescent periodate schiff-base stain. *Electrophoresis* 2003;24:588-598.
- 57 Hart C, Schulenberg B, Steinberg TH, Leung WY, Patton WF: Detection of glycoproteins in polyacrylamide gels and on electroblots using pro-q emerald 488 dye, a fluorescent periodate schiff-base stain. *Electrophoresis* 2003;24:588-598.