

Mastergradsoppgave i molekylær biovitenskap
studieretning molekylærbiologi

Uttrykk av glypikanvarianter i MDCK II-celler

Guro Elisabeth Engedahl



Institutt for molekylær biovitenskap
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

November 2011

© Guro Elisabeth Engedahl

2011

Uttrykk av glypikanvarianter i MDCK II-celler

Guro Elisabeth Engedahl

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

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

Først og fremst vil jeg rette en stor takk til professor Dr. scient Kristian Prydz og Dr. scient Heidi Tveit for god veiledning gjennom masteroppgaven og spesielt i skriveprosessen. Tusen takk for alle gode råd og god støtte. Jeg har lært utrolig mye.

Videre vil jeg takke resten av "PG"-gruppa. Det har vært fantastisk å arbeide med dere og jeg har gleda meg til hver eneste dag. Tusen takk for alle gode råd og god støtte. En spesiell takk går til Gro Live Fagereng og Linn Kristin Akslen-Hoel for hjelp til det praktiske arbeidet. Jeg vil også få takke Mayes Kasem, Clara Jalland, Ingrid Kjos og Einar Bredo Erichsen for utrolig morsomme stunder både på labben og i lunsjpausene.

Tusen takk til alle gode venner!

En stor takk til mamma og pappa for all støtte og for at dere alltid er der for meg. En stor takk også til resten av familien.

Til sist vil jeg takke min samboer Kristoffer og min datter Hedda. Dere er helt fantastiske! Den lille humørsprederen som du er Hedda, som alltid kommer løpende og glad mot meg, det varmer et mammahjerte. Tusen takk for at du er den du er Kristoffer.

Steinberg, november 2011

Guro Elisabeth Engedahl

Sammendrag

Epitelcellelinjen "Madin-Darby canine kidney" (MDCK) er en velstudert polarisert cellelinje som danner tette cellelag med separate apikale og basolaterale membrandomener, som ved hjelp av polarisert transport av nysyntetiserte og resirkulerende proteiner og proteoglykaner (PGe) opprettholder de ulike membransammensetningene. Det er tidligere studert syntese og sortering av sekretoriske og transmembrane proteiner i forskningsgruppen, og det var derfor ønskelig å se nærmere på heparansulfatproteoglykanet (HSPGe) glypikan, som er kovalent bundet til den ekstracellulære siden av plasmamembranen (PM) via et glykosylfosfatidylinositol (GPI)-anker. Hos mennesker består glypikanfamilien av seks medlemmer (glypikan 1-6), og uttrykkes hovedsakelig under embryonal utvikling hvor de er involvert i celledatering. I denne oppgaven er det arbeidet med glypikan 1. Det ble laget tre ulike glypikanvarianter for å få mer innsikt i syntese og sortering i den sekretoriske vei, og grønt fluorescerende protein (GFP) ble satt inn i alle de tre glypikanvariantene for å kunne studere cellene levende i konfokalmikroskopet. Glypikanvariantene ble stabilt transfektert inn i MDCK II-celler for å undersøke membranlokaliseringen til full-lengde glypikan i tillegg til å sammenligne glykosaminoglykan (GAG)-sammensetningen og sulfateringsgraden av full-lengde glypikan med en sekretorisk glypikanvariant. For å kunne studere prosesser tidlig i den sekretoriske vei, ble en glypikanvariant med et være-i-ER-signal lysin-asparaginsyre-glutamat-leucin (KDEL)-sekvens helt C-terminalt laget, for å se om dette påvirker syntese og sortering av PGe.

Membranbiotinylering av full-lengde glypikan dyrket på filter, viste at nesten all full-lengde glypikan befant seg inne i cellen og at kun en liten fraksjon kom til celleoverflaten. Den sekretoriske glypikanvarianten ble ikke skilt ut av cellen som et sekretorisk protein, men befant seg også inne i cellen, og det ble ikke funnet GAG-kjeder på de to glypikanvariantene ved enzymatisk degradering. Både full-lengde og sekretorisk glypikanvariant lignet på glypikanvarianten med KDEL-sekvens, som befinner seg tidlig i den sekretoriske vei, og ved enzymatisk behandling ble det bekreftet at alle tre glypikanvariantene befinner seg før *medial*-Golgi, i den sekretoriske vei. En full-lengde glypikanvariant uten GFP ble laget for å undersøke om GFP påvirket sorteringen av glypikanvarianter med GFP, og dette ble bekreftet da full-lengde glypikanvariant uten GFP ble modifisert med heparansulfat (HS) GAG-kjeder, som viser at PGe har gått gjennom Golgi-apparatet.

Forkortelser

| | | | |
|-------------------|--|---------------------|---|
| AP | Adaptorprotein | GPI | Glykosylfosfatidylinositol |
| bp | Basepar | hep | Heparitinase (degraderer HS GAG-kjeder) |
| BSA | Bovint serumalbumin | HS | Heparansulfat |
| cABC | Kondroitinase-ABC (degraderer CS GAG-kjeder) | hsp | ”heat shock protein” |
| Cnx | Calnexin | HSPG | Heparansulfatproteoglykan |
| COP | ”Coat protein complex” | <i>In vivo</i> | Prosesser i levende organismer |
| Crt | Calretikulin | IP | Immunpresipitering |
| CS | Kondroitinsulfat | kb | Kilobasepar |
| C/M | Ca ²⁺ /Mg ²⁺ | kDa | Kilodalton |
| dH ₂ O | Destillert vann | KDEL | Lysin-asparaginsyre-glutamat-leucin |
| DMEM | ”Dulbecco`s modified Eagle`s medium” | LB | Luria/Bertani buljong |
| DNA | Deoksyribonukleinsyre | M | Molar |
| dNTP | Deoksyribonukleotid trifosfat | mA | Milliampere |
| DMSO | Dimetylsulfoksid | mCi | Millicurie |
| DS | Dermatansulfat | MCS | Multikloningssete |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i> | MDCK | ”Madin-Darby canine kidney” |
| ECM | Ekstracellulær matriks | mM | Millimolar |
| EDTA | Etylen-diamin-tetra-acetat | MQ-H ₂ O | MilliQ vann |
| Endo H | Endoglukosidase H | NaOH | Natriumhydroksid |
| ER | Endoplasmatisk retikulum | NO | Nitrogenoksid |
| ERAD | ER-assistert degradering | OD | Optisk tetthet |
| ERES | ”ER exit sites” | ON | Over natt |
| ERGIC | ”ER-Golgi Intermediate Compartment” | P/S | Penicillin/Streptomycin |
| FBS | Føtalt bovint serum | PBS | ”Phosphate buffered saline” |
| Gal | Galaktose | PCR | Polymerase kjedereaksjon |
| GAG | Glykosaminoglykan | PG | Proteoglykan |
| GalNAc | N-acetyl-galaktosamin | PM | Plasmamembranen |
| GFP | Grønt fluorescerende protein | PVDF- | Polyvinylidendifluorid- |
| Glc | Glukose | membran | membran |
| GlcA | Glukuronsyre | RT | romtemperatur |
| GlcN | Glukosamin | SDS | Natrium dodecyl sulfat |
| GlcNAc | N-acetyl-glukosamin | SDS- | Natrium dodecyl sulfat |
| | | PAGE | polyakrylamid gelelektroforese |

| | |
|----------------|------------------------------------|
| SOB | “Super Optimal Broth” |
| SRP | “Signal recognition particle” |
| TAE- buffer | Tris-Acetat-EDTA-buffer |
| TB | Transformasjonsbuffer |
| TBS | “Tris-bufret salin” |
| TGN | <i>trans</i> -Golgi nettverk |
| TTBS | Tris-bufret salin tilsatt Tween 20 |
| V | Volt |
| WB | Western blotting |
| Xyl | Xylose |
| x g | “times gravity” |

Innholdsfortegnelse

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUKSJON..... | 1 |
| 1.1 Epitelceller..... | 1 |
| 1.1.1 MDCK-celler..... | 2 |
| 1.2 Den sekretoriske vei..... | 2 |
| 1.2.1 Det endoplasmatiske retikulum..... | 3 |
| 1.2.2 ERGIC..... | 5 |
| 1.3 Golgi-apparatet..... | 6 |
| 1.4 Polarisert sortering..... | 7 |
| 1.4.1 Basolateral proteinsortering..... | 7 |
| 1.4.2 Apikale sorteringssignaler..... | 8 |
| 1.5 Proteoglykaner og glykoproteiner..... | 9 |
| 1.5.1 Proteoglykaner..... | 9 |
| 1.5.2 Glykoproteiner..... | 11 |
| 1.6 GPI-ankere..... | 13 |
| 1.7 Glypikan..... | 13 |
| 1.7.1 Glypikan 1..... | 16 |
| 1.8 Målet med oppgaven..... | 18 |
| 2 METODER..... | 19 |
| 2.1 Arbeid med mikroorganismer..... | 19 |
| 2.1.1 Tillaging av LB vekstskåler..... | 19 |
| 2.1.2 Dyrking av bakteriestammer fra vekstskål..... | 20 |
| 2.1.3 Oppbevaring av <i>E.coli</i> i frysekultur..... | 20 |
| 2.1.4 Oppdyrking av <i>E.coli</i> fra frysekultur..... | 20 |
| 2.1.5 Transformering av <i>E.coli</i> -celler..... | 21 |
| 2.2 Arbeid med DNA..... | 22 |
| 2.2.1 Kvikkskjekk..... | 22 |
| 2.2.2 Plasmidisolering..... | 23 |
| 2.2.3 Agarosegelelektroforese..... | 23 |
| 2.2.4 Rensing av DNA-fragmenter fra agarosegel..... | 24 |
| 2.2.5 Kvantitering av DNA - konsentrasjon..... | 24 |
| 2.3 Molekylær subkloning..... | 25 |

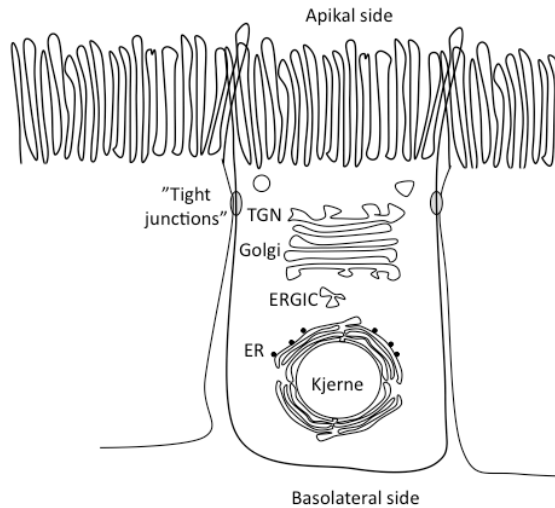
| | |
|--|----|
| 2.3.1 Polymerase kjedereaksjon | 25 |
| 2.3.2 Restriksjonskutting av DNA | 27 |
| 2.3.3 Ligering..... | 27 |
| 2.4 Sekvensering..... | 29 |
| 2.5 Celledyrkningsteknikker..... | 29 |
| 2.5.1 Opptining av MDCK II-celler | 29 |
| 2.5.2 Trypsinering av MDCK II-celler..... | 29 |
| 2.5.3 Nedfrysning av MDCK II-celler..... | 31 |
| 2.5.4 Dyrking av MDCK II-celler på filter..... | 31 |
| 2.5.5 Lactacystin-behandling..... | 32 |
| 2.5.6 Høsting av MDCK II-celler..... | 33 |
| 2.5.7 Transfeksjon med FuGENE [®] HD..... | 34 |
| 2.5.8 Fortynningsrekke av stabilt transfekterte celler..... | 35 |
| 2.5.9 Identifisering av glypikanuttrykk ved konfokalmikroskopi | 37 |
| 2.6 Proteinanalyser | 37 |
| 2.6.1 Biotinylering av celleoverflateproteiner | 37 |
| 2.6.2 Felling med Dynabeads [®] M-280 Streptavidin..... | 38 |
| 2.6.3 Metabolsk innmerkning med radioaktiv isotop | 39 |
| 2.6.4 Immunfelling med Protein-A-sepharosekuler | 40 |
| 2.6.5 Kondroitinase ABC-behandling | 42 |
| 2.6.6 Heparitinasebehandling | 42 |
| 2.6.7 PNGase F-behandling..... | 42 |
| 2.6.8 Endo H-behandling..... | 43 |
| 2.6.9 SDS-PAGE | 44 |
| 2.6.10 Western blotting..... | 44 |
| 3 RESULTATER..... | 47 |
| 3.1 Subkloning av glypikan-GFP | 48 |
| 3.1.1 Subkloning av glyp-GFP | 49 |
| 3.1.2 Subkloning av glypsekr-GFP og glypKDEL-GFP | 50 |
| 3.1.3 Overføring av glypsekr-GFP og glypKDEL-GFP til ekspresjonsvektoren pEGFP-C1..... | 53 |
| 3.2 Transfeksjon og uttrykk av glyp-GFP i MDCK II-celler | 55 |
| 3.3 Analyse av glypikan | 56 |

| | |
|---|-----|
| 3.3.1 Membranstudie av glyp-GFP..... | 56 |
| 3.3.2 GAG-analyse av glyp-GFP..... | 59 |
| 3.4 Transfeksjon og uttrykk av glypsekr-GFP i MDCK II-celler..... | 60 |
| 3.4.1 GAG-analyse av glypsekr-GFP..... | 62 |
| 3.5 Transfeksjon og uttrykk av glypKDEL-GFP i MDCK II-celler..... | 63 |
| 3.6 N-glykaner..... | 65 |
| 3.6.1 Identifisering av N-glykaner på glypikanvarianter..... | 65 |
| 3.6.2 Modifisering av N-glykaner..... | 66 |
| 3.7 Fører GFP til feilfolding av glypikankonstruktene?..... | 67 |
| 3.8 Subkloning av glypikan..... | 68 |
| 3.9 Transfeksjon av glyp i MDCK II-celler..... | 71 |
| 3.9.1 Identifisering av GAG-kjeder på glypikan..... | 71 |
| 4 DISKUSJON..... | 73 |
| Videre studier..... | 79 |
| Litteraturliste..... | 81 |
| Vedlegg 1 – Sekvenser..... | 91 |
| Vedlegg 2 – Plasmidkart..... | 96 |
| Vedlegg 3 – Molekylvektstandarder..... | 98 |
| Vedlegg 4 – Materialer..... | 99 |
| Vedlegg 5 – Løsninger..... | 104 |

1 INTRODUKSJON

1.1 Epitelceller

Kroppen består av ulike typer celler, og epitelceller er en celletype som dekker kroppens indre og ytre overflater som hud, svelg, nyreganger og tarm. Det finnes flere typer epitelvev, og strukturen til disse avhenger av hvor cellene befinner seg i kroppen og deres vevs-spesifikke funksjoner. Felles for epitelceller er at de danner tette cellelag som kan fungere som en selektiv barriere mellom kroppens hulrom på den ene siden og blodbanen på den andre siden. Plasmamembranen (PM) til epitelceller deles inn i tre domener (figur 1.1). Det området av PM som vender mot kroppens indre hulrom eller det ytre miljø, kalles det apikale domenet, og er ofte karakterisert av spesialiserte strukturer som mikrovilli og cilier (Schoenenberger *et al.*; 1994). Området av PM som vender mot naboceller er det laterale domenet og er karakterisert av proteiner involvert i celle-celle adhesjon. Kontakten mellom cellene dannes ved hjelp av kalsiumavhengige adhesjonsproteiner, som kalles cadheriner. Det basale domenet vender inn mot vevene i kroppen og fester epitelcellene til den ekstracellulære matriks (ECM) ved hjelp av blant annet en klasse glykoproteiner kalt integriner (Schoenenberger *et al.*; 1994). De laterale og basale domenenene er kontinuerlige, og omtales samlet som det basolaterale domenet. Epitelceller er polariserte, det vil si at det apikale og basolaterale domenet av PM har ulik protein- og lipidsammensetning. Det apikale domenet er adskilt fra det basolaterale ved "tight junctions", som er et proteinkompleks som ligger som et belte rundt den øvre delen av cellen (figur 1.1) (Gumbiner; 1987). "Tight junctions" sørger for å opprettholde ulik membranstruktur i det apikale og det basolaterale domenet, og gjør samtidig cellelaget tett ved å forhindre at molekyler av en viss størrelse fritt kan transporteres fra den ene til den andre siden av cellemonolaget (Dragsten *et al.*; 1981; van Meer and Simons; 1986).



Figur 1.1 Skjematisk oversikt over en epitelcelle. "Tight junctions" separerer det apikale og det basolaterale membrandomenet og hindrer diffusjon av molekyler og ioner over de to sidene av plasmamembranen. ER: Endoplasmatisk retikulum, ERGIC: "ER Golgi Intermediate compartment", TGN: *trans*-Golgi nettverk.

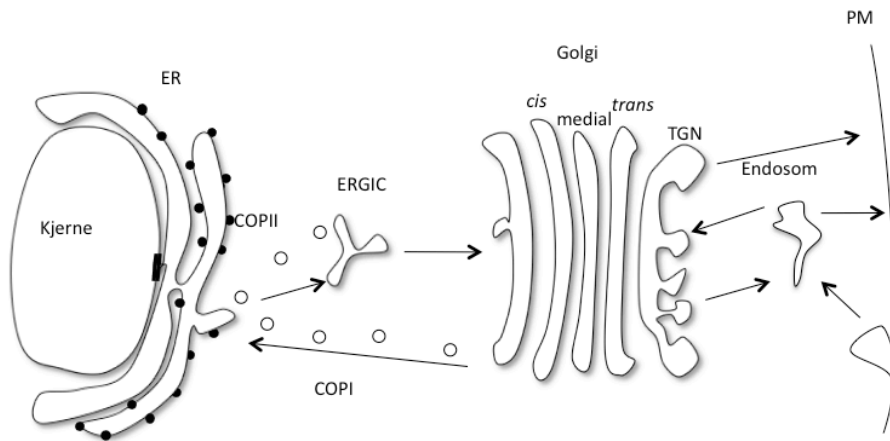
1.1.1 MDCK-celler

"Madin-Darby canine kidney" (MDCK)-celler er en heterogen nyreepitelcellelinje isolert fra en cocker spaniel i 1958. Det er en av de mest brukte epitelcellelinjene for studier av polarisert transport. Det er to hovedstammer av MDCK-celler: MDCK I- og MDCK II-celler. Stammene har ulike fysiologiske egenskaper (Barker and Simmons; 1981), som gjenspeiler at de har opphav i ulike deler av nyretubuli. MDCK I-celler har høyere elektrisk motstand over celledaget enn MDCK II-celler, og har fellestrekk med celler fra distale tubuli og samlekanalen. MDCK II-celler ligner på celler fra proksimale tubuli (Richardson *et al.*; 1981). Den elektriske motstanden over celledaget reflekterer graden av passiv ionestrøm mellom cellene i celledaget. MDCK II-celler har dermed større lekkasje av ioner enn MDCK I-celler.

Når MDCK-celler dyrkes på permeable filtre danner de et polarisert monolag med morfologi og funksjoner lik det vi finner hos epitelceller *in vivo* (Cereijido *et al.*; 1978), noe som gjør MDCK-celler til et egnet modellsystem til å studier av polarisert transport i epitelceller.

1.2 Den sekretoriske vei

En celle er en dynamisk og kompleks struktur som er avhengig av å kontinuerlig produsere nye proteiner og lipider. Proteiner som skal ut av cellen, til PM, endosomer eller til lysosomer via den sekretoriske vei, syntetiseres i ribosomer på den cytoplasmiske siden av endoplasmatisk retikulum (ER) før de translokteres inn i ER-lumen (figur 1.2).



Figur 1.2 Oversikt over den sekretoriske vei. Proteiner som skal ut av cellen, til PM, endosomer eller til lysosomer, transporteres gjennom den sekretoriske vei. ER: Endoplasmatisk retikulum, ERGIC: ”ER-Golgi intermediate compartment”, TGN: *trans*-Golgi nettverk, PM: Plasmamembran.

1.2.1 Det endoplasmatiske retikulum

Proteiner som skal gjennom den sekretoriske vei har normalt en N-terminal signalsekvens. Signalsekvensen blir gjenkjent av en ”signal recognition particle” (SRP) når proteinets N-terminale del kommer ut av ribosomet under proteintranslasjonen. SRP binder seg til signalsekvensen, noe som resulterer i en translasjonspause hvor hele SRP-komplekset fraktes til ER-membranen. SRP-reseptorer i ER-membranen gjenkjenner og binder SRP-komplekset, slik at SRP frigjøres og ribosomet bindes til translokatoren i ER-membranen og proteinet translokteres gjennom membranen mens det syntetiseres (Walter and Johnson; 1994). Transmembrane proteindomener i proteinkjeden blir ikke fullstendig overført inn i ER-lumen, men vil bli integrert i ER-membranen.

Signalsekvensen til proteiner blir ofte proteolytisk spaltet når de er kommet inn i ER-lumen, og proteinene kan deretter få ulike post-translasjonelle modifiseringer. Hydrofobe sekvenser i polypeptidkjeden vil ofte danne transmembrandomener. I noen proteiner kan en C-terminal sekvens, som forankrer proteinet til ER-membranen, bli kuttet av i ER og erstattes av et glykosylfosfatidylinositol (GPI)-anker, som holder proteinet membranbundet (Rudd and Dwek; 1997). Syntese av disulfidbroer, som er viktig for at enkelte proteiner folder riktig, katalyseres av proteindisulfidisomerase (PDI)-familien (Williams; 2006).

Mange proteiner kan N-glykosyleres ved at oligosakkaridet $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ overføres fra en "dolichol-lipid"-bærer i ER-membranen til en asparagin i et bindingssete for N-glykaner, mens proteinet translokteres gjennom ER-membranen. Bindingssetet består av aminosyresekvensen asparagin-x-serin/treonin, hvor x kan være alle aminosyrer unntatt prolin (Kornfeld and Kornfeld; 1985).

For proteiner henger konformasjon og funksjon sammen, og cellen er derfor avhengig av at proteinene foldes riktig. Proteiner som transporteres inn i den sekretoriske vei foldes til sin tertierstruktur i ER. Chaperoner muliggjør en mer effektiv folding av proteiner og danner grunnlaget for kvalitetskontrollen av feil- eller ufoldede proteiner i ER. Chaperoner holder feilfoldede proteiner igjen og bidrar til deres "ER-assisterte" degradering (ERAD). ER-chaperoner inkluderer medlemmer av "heat shock protein" (Hsp)-familien Hsp40, Hsp70, Hsp90, Hsp100 og "calnexin/calreticulin" (Cnx/Crt) (Williams; 2006). For N-glykosylerte proteiner i ER er sukkermodifiseringen viktig for kvalitetskontrollen. To terminale glukoseenheter spaltes av N-glykaner ved hjelp av glukosidase I og II. Dette gir glykoproteiner hvor N-glykanene har en terminal glukose-enhet, som bindes av Cnx/Crt, som er henholdsvis et transmembranbundet og et løselig lektinprotein. Både Cnx og Crt danner kompleks med ERp57, som er et "thiol-disulfid oksidoreduktase"-enzym, som danner forbigående disulfidbindinger med glykoproteiner bundet til Cnx/Crt (Ellgaard and Helenius; 2003). Når den terminale glukoseenheten på N-glykaner spaltes av, ved hjelp av glukosidase II, vil glykoproteinene dissosiere fra Cnx/Crt. Har et protein oppnådd riktig konformasjon, vil det bli transportert til "ER-exit sites" (ERES) og videre gjennom den sekretoriske vei (Anelli and Sitia; 2008). Dersom et protein ikke har blitt foldet riktig, blir det reglykosylert ved at den terminale glukoseenheten settes på av enzymet "UDP-glucose-glycoprotein glucosyltransferase" (UGGT). Dermed kan proteinene gå inn i Cnx/Crt-syklusen igjen. Feilfoldete glykoproteiner vil etter et forlenget opphold i Cnx/Crt-syklusen gå til ERAD. Glykoproteinenes N-glykaner vil da få spaltet av en mannose og bestå av $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, som fungerer som et degraderingssignal og styrer tilbaketransport av glykoproteinene gjennom translokonet i ER-membranen ut i cytoplasma hvor proteinene blir ubiquitinyllert, før de degraderes i proteasomet (Bagola *et al.*; 2011).

Transport av riktig foldete proteiner ut av ER skjer fra spesialiserte områder i den glatte ER-membranen kalt ERES eller "transitional ER" (tER) (Palade; 1975). ERES finnes på flere

steder i ER-membranen, fordelt ut i cellen, men er konsentrert i området nær *cis*-Golgi (Hammond and Glick; 2000) (figur 1.2). Transport av proteiner fra ERES til "ER-Golgi intermediate compartment" (ERGIC) skjer ved hjelp av "coat protein complex" (COPII)-vesikler (Belden and Barlowe; 2001). I COPII-vesikler vil sekretoriske proteiner, som skal transporteres ut av ER, oppkonsentrere seg ved å binde til COPII-komponenter eller sorteringsreseptorer som finnes i COPII-vesikler (Kuehn *et al.*; 1998; Belden and Barlowe; 2001). Den oppfatning at COPII-vesikler er alene om å transportere proteiner fra ER til ERGIC har blitt utfordret, da det også er observert store, tubulære strukturer som inneholder proteiner som skal transporteres ut av ER (Presley *et al.*; 1997).

1.2.2 ERGIC

Når proteinene har forlatt ER, vil de komme til ERGIC, også kalt "Intermediate compartment" (IC) eller "vesicular-tubular clusters" (VTC), som er et membransystem som ligger mellom ER og Golgi-apparatet, og ble identifisert ved hjelp av lektinet ERGIC-53. Biokjemiske analyser har vist at proteinsammensetningen til ERGIC-membranen er ulik den for henholdsvis ER- og Golgi-membranen (Schweizer *et al.*; 1991; Sannerud *et al.*; 2006). Funksjonen til ERGIC, samt spørsmålet om organellen er stasjonær eller mer dynamisk er omdiskutert, men det dominerende syn på ERGIC er at det er en stabil sorteringsstasjon for både retrograd transport tilbake til ER og anterograd transport til Golgi-apparatet i COPI-vesikler (Appenzeller-Herzog and Hauri; 2006).

Den spesifikke sammensetningen av proteiner og lipider i ulike organeller i cellen blir opprettholdt ved sortert polarisert transport. Både anterograd transport til Golgi-apparatet og retrograd transport tilbake til ER er signalavhengige mekanismer. Et eksempel er aminosyresekvensen lysin-asparaginsyre-glutamat-leucin (KDEL) som er lokalisert C-terminalt i mange løselige ER-proteiner. ER-proteiner med KDEL-sekvens assosierer med en KDEL-reseptor i Golgi-apparatet og blir transportert tilbake til ER i COPI-vesikler (Pelham; 1996). Binding av KDEL-sekvensen til KDEL-reseptorer er pH-avhengig, og reseptorene binder proteiner med KDEL-sekvens i lumen av *cis*-Golgi, hvor pH er 6,2 og frigjør dem i ER-lumen hvor det er nøytral pH (Wilson *et al.*; 1993; Wu *et al.*; 2001; Appenzeller-Herzog *et al.*; 2004).

1.3 Golgi-apparatet

Proteiner som transporteres i anterograd retning fra ERGIC vil komme til Golgi-apparatet som neste stopp i den sekretoriske vei. Golgi-apparatet er et organellesystem i eukaryote celler som først ble beskrevet av Camillo Golgi. Golgi-apparatet består av membranomsluttede flate *cisternae* som danner ”stacks”. Organiseringen av Golgi-apparatet varierer mellom ulike celletyper og arter, men i pattedyr er Golgi-apparatet som regel lokalisert nær kjernen og består av flere ”stacks” med *cisternae* som er bundet sammen med tubulære forbindelser (Farquhar and Palade; 1981). Golgi-apparatets ”stacks” inndeles gjerne i tre områder: *cis*-Golgi, *medial*-Golgi og *trans*-Golgi (figur 1.2), der det sistnevnte området går over i *trans*-Golgi nettverk (TGN). Hver av disse regionene i en ”stack” har ulik membran- og enzymsammensetning. Det er vist at mengden av komplekse karbohydratmodifiseringer øker fra *cis*- til *trans*-Golgi (Rambourg *et al.*; 1969), og at glykosyleringsenzymene er ulikt fordelt mellom de ulike områdene i en ”stack” (Roth and Berger; 1982). Mengden kolesterol og sfingolipider i Golgi-membranen øker også fra *cis*-Golgi mot *trans*-Golgi, noe som antakelig bidrar til den økende membrantykkelsen på *trans*-siden (Nezil and Bloom; 1992).

Golgi-apparatet blir sett på som hovedsete for sortering av proteiner og lipider til ulike organeller med funksjon sent i den sekretoriske vei. Transport, sortering og post-translasjonelle modifiseringer er Golgi-apparatets viktigste funksjoner. Nysyntetiserte proteiner og lipider modifiseres ved å få satt på karbohydratgrupper, fosfat og sulfat, samt at det foregår proteolytisk kløyving av enkelte proteiner og peptider, mens disse transporteres gjennom Golgi-apparatet (Munro; 1998).

Det er to hovedmodeller for hvordan proteiner transporteres gjennom Golgi-apparatet. I vesikkeltransportmodellen blir Golgi-apparatet sett på som en relativt statisk struktur, hvor proteiner som skal gjennom Golgi-apparatet transporteres ved hjelp av COPI-vesikler mellom de ulike Golgi-*cisternae*, og hvor hver *cisterna* har et spesifikt innhold av Golgi-enzymmer (Rothman and Wieland; 1996). I den andre modellen, kalt ”*cisternal maturation*” eller modningsmodellen, blir *cisternae* sett på som dynamiske strukturer som gradvis modnes fra *cis*-Golgi mot TGN (Glick and Malhotra; 1998). Proteinene oppholder seg da bare i lumen av en *cisterna*, mens enzyminnholdet endres ved at vesikler transporterer Golgi-enzymmer tilbake til en ”yngre” *cisterna*. Om COPI-vesikler er ansvarlige for den retrograde transporten av

Golgi-enzymmer er ikke klarlagt (Glick; 2000; Nakano and Luini; 2010). Nyere modeller forsøker å forene elementer fra begge hovedmodellene (Glick; 2000; Pelham and Rothman; 2000).

1.4 Polarisert sortering

I polariserte epitelceller er det ulik protein- og lipidsammensetning på den apikale og basolaterale plasmamembranen. Forskjellen opprettholdes ved hjelp av polarisert transport av nysyntetiserte og resirkulerte proteiner og lipider. Sortering av proteiner i den sekretoriske vei til ulike plasmamembrandomener, til endosomer og lysosomer har tidligere vært antatt å skje hovedsakelig i TGN i MDCK-celler. Dette innebærer en felles transportvei fra ER gjennom Golgi-apparatet til TGN (Griffiths and Simons; 1986). Nyere forskning har utfordret dette synet og det er gjort observasjoner som har vist at sortering av proteiner sannsynligvis kan skje før TGN (Alfalah *et al.*; 2005; Tveit *et al.*; 2005; Prydz *et al.*; 2008). Enkelte sekretoriske og cytoplasmiske proteiner transporters ut av cellen eller gjenfinnes i plasmamembranen uten at de har gått gjennom den klassiske sekretoriske vei (Nickel and Rabouille; 2009; Nickel; 2010), men har benyttet alternative ruter som går utenom Golgi-apparatet. Slike transportveier er ikke hemmet av det Golgi-ødeleggende prostaglandin-liknende stoffet Brefeldin A (BFA) (Nickel and Seedorf; 2008; Nickel and Rabouille; 2009). Transporten av proteiner og lipider utenom Golgi-apparatet omtales ofte som "Golgi bypass" og ser for sekretoriske proteiner ut til å være mediert av dGRASP, som er et Golgi-protein (Grieve and Rabouille; 2011). GPI-forankrede proteiner kan se ut til å segregere lateralt fra andre proteiner allerede tidlig i den sekretoriske vei når de forlater ER (Muniz *et al.*; 2001). GPI-forankrede proteiner som sorteres apikalt og basolateralt assosierer med detergent-uløselige lipidflåter ("rafts") og det er vist at mange GPI-forankrede proteiner som oligomeriserer sorteres apikalt (Paladino *et al.*; 2004).

1.4.1 Basolateral proteinsortering

Basolaterale sorteringssignaler befinner seg ofte i den cytoplasmatiske halen til transmembrane proteiner. Signalet er ofte enten tyrosin-basert eller dileucin-basert (Adair-Kirk *et al.*; 2003; Rodriguez-Boulan and Musch; 2005). Basolaterale cytoplasmatiske sorteringssignaler interagerer med adaptorprotein (AP)-komplekser (Folsch *et al.*; 1999). Det er identifisert fem AP-komplekser (AP1-5) (Hirst *et al.*; 2011), hvor AP1, AP3 og AP4 har

vært satt i sammenheng med sortering av basolaterale membranproteiner i TGN og/eller endosomer (Simmen *et al.*; 2002; Rodriguez-Boulan and Musch; 2005), mens AP-2 finnes ved PM og er involvert i endocytose (Nakatsu and Ohno; 2003; Folsch; 2005). AP1B har vist å ha en epitelcellespesifikk subenhet, som fremmer basolateral sortering av "low-density lipoprotein" (LDL)- og transferrin (Tf)-reseptorer i resirkulerende endosomer i en del typer epitelceller (Gan *et al.*; 2002). Det nylig identifiserte AP5 befinner seg i seie endosomer i HeLa-celler (Hirst *et al.*; 2011).

1.4.2 Apikale sorteringssignaler

Det finnes et mangfold av apikale sorteringssignaler og de har vist seg vanskeligere å karakterisere enn de basolaterale sorteringssignalene, da de ofte er post-translasjonelle lipid- og sukkermodifiseringer (Rodriguez-Boulan and Musch; 2005). Apikale sorteringssignaler kan finnes i den cytoplasmatiske halen, i det transmembrane domenet eller i det lumenale domenet av transmembrane proteiner (Corbeil *et al.*; 1992; Kundu *et al.*; 1996; Scheiffele *et al.*; 1997; Chuang and Sung; 1998; Potter *et al.*; 2006). GPI-ankret var først foreslått som et apikalt sorteringssignal (Lisanti *et al.*; 1989; Rodriguez-Boulan and Musch; 2005), hvor det var antatt at transport av GPI-forankrede proteiner til den apikale PM-siden kan være avhengig av lipidflåter (van Meer and Simons; 1988). Det ble senere vist at mange GPI-forankrede proteiner må oligomerisere for å bli sortert apikalt (Paladino *et al.*; 2004). Andre studier har vist at noen GPI-forankrede proteiner ankommer den apikale PM, men det gjør de på grunn av sine N-glykangrupper (Benting *et al.*; 1999; Urquhart *et al.*; 2005). Både N-glykaner og O-glykaner er vist å kunne mediere apikal sortering av både sekretoriske og transmembrane proteiner (Kitagawa *et al.*; 1994; Scheiffele *et al.*; 1995; Potter *et al.*; 2006; Weisz and Rodriguez-Boulan; 2009).

Apikale og basolaterale sorteringssignaler bidrar til fordeling av proteiner til ulike vesikler i TGN, på PM eller i resirkulerende endosomer. Proteiner som mangler sorteringssignal akkumuleres i Golgi-apparatet og blir mindre effektivt transportert til PM, noe som indikerer at effektiv transport videre fra Golgi-apparatet krever et sorteringssignal (Gut *et al.*; 1998). Nyere studier har vist at mange nysyntetiserte transmembrane proteiner forlater TGN og transporteres gjennom tidlige og resirkulerende endosomer før de ankommer den apikale PM, noe som kan indikere et møte med et regulatorisk maskineri i endosomer for sortering og

transport, som mikrotubuli (MT)-motorproteiner, aktincytoskjelettet og Rab og Rho GTPaser (Weisz and Rodriguez-Boulan; 2009).

1.5 Proteoglykaner og glykoproteiner

Proteoglykaner (PGER) uttrykkes av de fleste flercellede dyr, mens glykoproteiner uttrykkes av de fleste eukaryote celletyper. Et PG består av en proteinkjerne som har en eller flere lange uforgrenede glykosaminoglykan (GAG)-kjeder kovalent bundet til seg. Glykoproteiner er proteiner med korte forgrenede karbohydratstrukturer kovalent festet til proteinet.

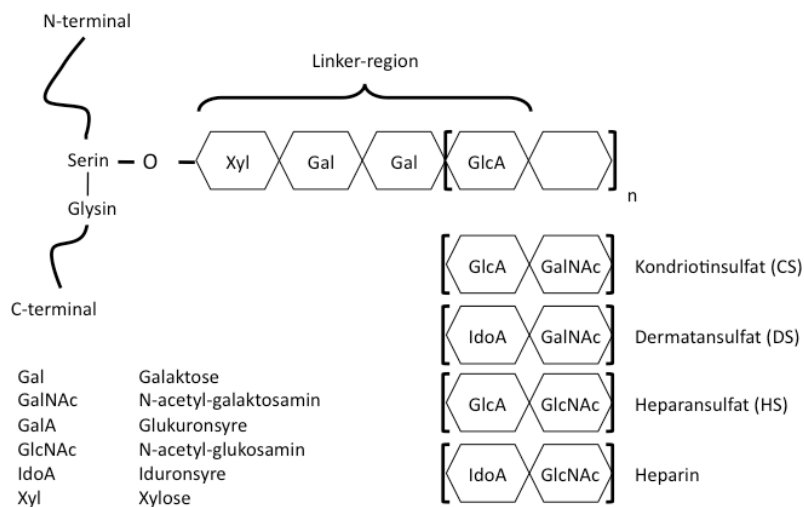
1.5.1 Proteoglykaner

PGER er en makromolekylfamilie hvor negativt ladde GAG-kjeder er kovalent bundet til et serin-glysin motiv i en proteinkjerne via et linker-tetrasakkarid (Prydz and Dalen; 2000). GAG-kjedene inneholder vanligvis heksuronsyre-enheter og er ofte sulfatert, noe som gir PGER en overordnet negativ ladning. Det er stor variasjon blant PGER både med tanke på størrelse, form og funksjon. Flere store PGER, som versikan og perlekan, skilles ut og er viktige komponenter i ECM (Kjellen and Lindahl; 1991; Prydz and Dalen; 2000; Kolset *et al.*; 2004), mens andre PGER som syndekan og glypikan, med henholdsvis transmembrane og GPI-forankrede proteinkjerner, sitter på celleoverflaten og er involvert i celledesignering (Zimmermann and Ruoslahti; 1989; Kjellen and Lindahl; 1991; Kirn-Safran *et al.*; 2009).

GAG-kjedene består av uforgrenede repeterende disakkaridenheter av enten N-acetylglukosamin (GlcNAc) eller N-acetyl-galaktosamin (GalNAc) etterfulgt av glukuronsyre (GlcA). PGER kan klassifiseres på bakgrunn av disakkaridenheten til GAG-kjedene. Heparansulfat (HS), heparin, kondriotinsulfat (CS) og dermatansulfat (DS), hvor HS og CS er de vanligste PGENe. Heparin og DS kan skilles fra HS og CS ved at de er mer sulfaterte og har epimeriserte heksuronsyre-enheter (GlcA epimerisert til iduronsyre (IdoA)). I tillegg finnes hyaluronsyre, som egentlig ikke er et PG, men bare en type GAG, fordi GAG-kjedene ikke er bundet til et protein. Hyaluronsyre finnes i ECM i en usulfatert form. PGER kan ha ulike typer GAG-kjeder bundet samtidig og kalles da hybride PG (Rapraeger *et al.*; 1985). Andre PGER er ikke ”fulltids-PG” men ”deltids-PG” fordi proteinet kan bestå av varianter både med og uten GAG-kjeder (Aono *et al.*; 2000; Prydz and Dalen; 2000).

1.5.1.1 Syntese av linker-regionen

HS- og CS-kjeder har lik linker-region som fester GAG-kjeder til proteindelen (figur 1.3) (Esko and Selleck; 2002). Linker-regionen består av fire monosakkarider: xylose (Xyl) etterfulgt av to galaktoser (Gal) og glukuronsyre (GlcA). Xyl er det første monosakkaridet i linker-regionen og er festet til en serin i et serin-glysin motiv i proteinkjeden. Xylosyltransferase I eller II starter syntesen ved å bruke ”uridine diphosphate-xylose” (UDP-xylose) som substrat og overfører Xyl til en serin i proteinkjeden (Gotting *et al.*; 2000). Det er ikke kjent hvor i den sekretoriske vei Xyl kobles til serin, men det antas å være et sted mellom ER og *cis/medial*-Golgi der Gal antas å bli overført (Jonsson *et al.*; 2003; Schon *et al.*; 2006). Påsetting av Xyl kan være den hastighetsbestemmende faktoren i GAG-syntesen (Schon *et al.*; 2006). Videre settes første og andre Gal på av henholdsvis galaktosyltransferase I og II (Almeida *et al.*; 1999; Bai *et al.*; 2001) før glukuronyltransferase I setter på GlcA (Kitagawa *et al.*; 1998) og linker-regionen er fullstendig. Galaktosyltransferase I og II er lokalisert i *cis/medial*-Golgi (Bai *et al.*; 2001). Det antas at det er de samme enzymene som syntetiserer linker-regionen til både HS- og CS-kjeder (Bai *et al.*; 1999).



Figur 1.3 Linker-regionen som er felles for CS/DS og HS/heparin.

Linker-regionen er festet til serin i et serin-glysin motiv i proteinkjeden.

Linker-regionen kan modifiseres ved fosforylering og sulfatering. Xyl kan være 2-O fosforylert i både CS (Oegema *et al.*; 1984) og HS (Fransson *et al.*; 1985). Gal i CS og ikke HS (Ueno *et al.*; 2001) kan modifiseres med sulfat på 6-O på Gal-1 og Gal-2, eller på 6-O på

Gal-1 og 4-O på Gal-2, eller kun på 6-O på Gal-1 (Sugahara *et al.*; 1988; de Waard *et al.*; 1992).

1.5.1.2 Syntese av GAG-kjeder

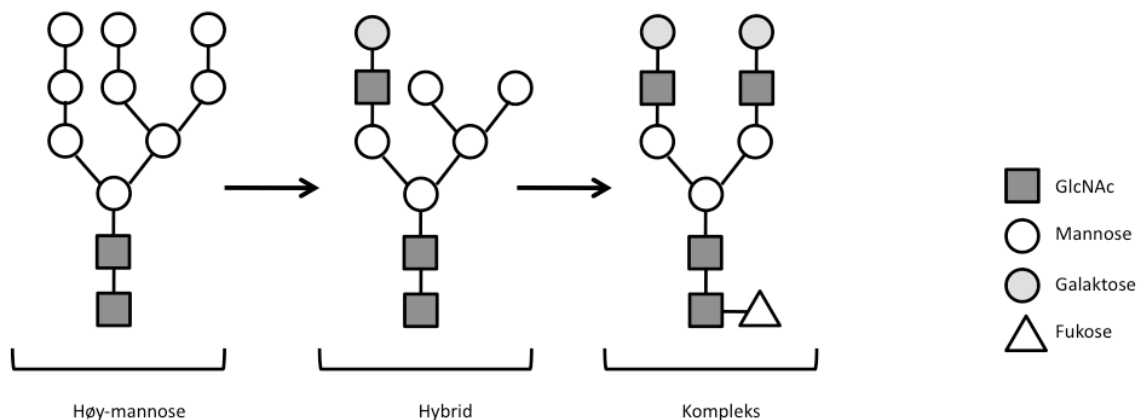
Etter å ha fullført linker-regionen vil påsetting av det femte sukkeret avgjøre om GAG-kjeden blir en CS eller HS GAG-kjede (Prydz and Dalen; 2000). I CS er GalNAc det femte sukkeret og den repeterende disakkaridenheten består av GlcA og GalNAc. Det er ulike CS-syntaser som katalyserer polymeriseringen av CS GAG-kjeder (Prydz and Dalen; 2000; Kitagawa *et al.*; 2001). Syntese av CS GAG-kjeder er antatt å skje lenger ut (senere) i Golgi-apparatet enn syntesen av HS GAG-kjeder (Spiro *et al.*; 1991). I HS er det femte sukkeret GlcNAc og den repeterende disakkaridenheten består av GlcA og GlcNAc. Polymerisering av HS katalyseres av glykosyltransferase-komplekset ”hereditary multiple exostoses” (EXT) 1 og EXT2 (Lind *et al.*; 1998), som er lokalisert i *cis/medial/trans-Golgi cisternae*.

HS og CS GAG-kjedene kan modifiseres, og både HS og CS har GlcA i den repeterende disakkaridenheten, som kan omdannes til Iduronsyre (IdoA) når HS og CS omdannes til henholdsvis heparin og DS (Kjellen and Lindahl; 1991). Disakkaridenhetene til CS og HS kan bli O-sulfaterte i ulike posisjoner (Prydz and Dalen; 2000) og sulfatering av GAG-kjedene utføres av sulfotransferaser som bruker ”3`-phosphoadenosine-5`-phosphosulphate” (PAPS) som sulfatdonor (Kusche-Gullberg and Kjellen; 2003). Det er ”N-deacetylase-N-sulfotransferase” (NDST) som starter sulfateringen i den voksende HS GAG-kjeden (Grobe *et al.*; 2002; Kusche-Gullberg and Kjellen; 2003).

1.5.2 Glykoproteiner

Glykoproteiner er proteiner med korte forgrenede karbohydratstrukturer kovalent festet til proteinet. Det finnes to hovedklasser glykaner: N-bundne og O-bundne glykaner. I N-bundet glykosylering er oligosakkaridkjedene festet til amidgruppen til asparagin i et asparagin-x-serin/treonin (N-X-S/T) motiv, hvor X kan være alle aminosyrer unntatt prolin (Freeze and Aebi; 2005). N-glykosylering er en ko-translasjonell modifisering som starter i ER og fullføres i Golgi-apparatet. Oppbygningen av N-glykanstrukturen starter på ”dolichyl phosphate” på den cytoplasmiske siden av ER. Etter påsetting av de første syv sukkerne flippes oligosakkaridet over til den lumenale siden av ER hvor syntesen fortsetter (Helenius

and Aebi; 2001). Kjernestrukturen til N-glykaner bygges opp av glykosyltransferaser og består av $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Overføring av et N-glykan til en asparagin i et protein, skjer ”en bloc” mens proteinet translokteres gjennom ER-membranen. De tre terminale glukoseenheterne og en mannose blir fjernet i ER, dersom proteinet er riktig foldet. Proteinets transporteres videre til Golgi-apparatet, hvor flere mannoseenheter blir fjernet før syntese av en mer kompleks glykanstruktur skjer ved påsetting av ulike monosakkarider som GlcNAc, GalNAc, Gal, fukose og sialinsyre. Det finnes tre hovedgrupper N-glykaner, avhengig av sukkersammensetningen: høy mannose, hybrid og komplekse N-glykaner (figur 1.4) (Rudd and Dwek; 1997). De fleste N-glykaner på PM vil være komplekse N-glykaner, som etter modifisering i Golgi-apparatet, vil være resistente mot enzymet endoglykosidase (Endo) H, som da ikke vil kunne kutte båndet mellom de to første GlcNAc etter asparagin (Nickel and Rabouille; 2009).



Figur 1.4 Oversikt over de tre hovedtypene av N-glykaner. N-glykanstrukturer kan deles inn i tre grupper avhengig av sukkersammensetningen: høy-mannose, hybrid og kompleks N-glykanstruktur.

O-linket glykosylering er en post-translasjonell modifisering som starter i Golgi-apparatet når GalNAc settes på hydroksylgruppen til et serin eller et treonin i proteinet. Ulike glykosyltransferaser setter på flere monosakkarider som inngår i O-glykanstrukturer, som danner grunnlaget for den store variasjonen blant O-bundne glykaner (Van den Steen *et al.*; 1998; Aoki *et al.*; 2008).

1.6 GPI-ankere

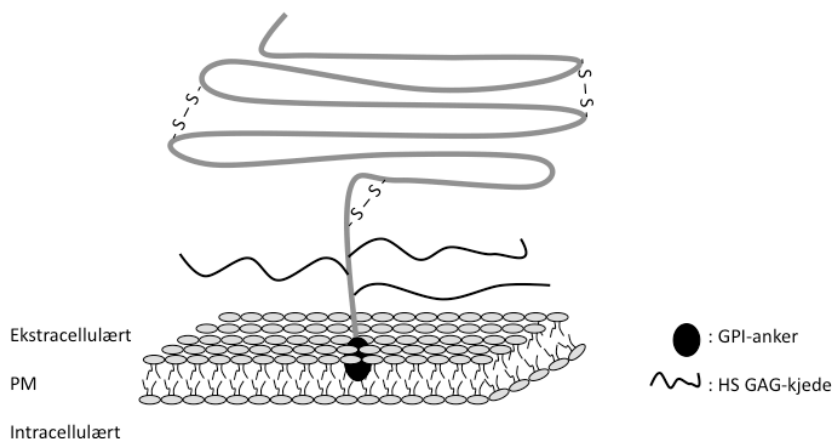
Membranbundne proteiner er enten transmembrane eller GPI-forankrede. Påsetting av et GPI-anker til proteiner er en post-translasjonell modifisering som skjer i ER. I pattedyrceller er det ca 150 proteiner som er festet til PM med et GPI-anker (Fujita and Kinoshita; 2010) og GPI-ankeret vil assosiere med spesielle subdomener i PM, som er spesielt rike på kolesterol og sfingolipider. Membrandomenene blir ofte kalt lipidflåter (lipid "rafts") og er karakterisert ved detergent resistente membraner (DRM) (Brown and London; 1998; Levental *et al.*; 2010).

GPI-ankeret er en konservert struktur bestående av fettsyrer og glyserol, fosfo-inositol (PI), GlcNAc, tre mannoser og fosfo-etanolamin (EtNP). Det kreves minst elleve reaksjonstrinn før et ferdig GPI-anker kan overføres til et protein. Syntesen av GPI-ankeret starter på den cytoplasmatiske siden av ER hvor overføring av GlcNAc til PI skjer. Reaksjonen katalyseres av GPI-GlcNAc-transferase, etterfulgt av GlcNAc deacetylering for å danne GlcN-PI, som flippes over til lumen-siden av ER hvor resten av reaksjonstrinnene skjer. En acyl-kjede settes på inositolringen og danner GlcN-(acyl)PI. Tre mannoser blir så sekvensielt satt på før EtNP settes på den tredje mannosene. EtNP anses som brobyggeren da den danner et amidbånd mellom proteinet og GPI-ankeret. GPI-transamidase gjenkjenner proteiner med et C-terminalt signal for GPI-forankring, spalter dette signalet av og overfører GPI-ankeret til proteinet. Før eksport ut av ER spaltes acyl-kjeden av, og det GPI-forankrede proteinet transporteres til Golgi-apparatet. Her vil GPI-ankeret modifiseres videre. Det er vist at lipidstrukturen til GPI-ankeret er kritisk for integrering av GPI-forankrede proteiner i lipidflåter (Fujita and Kinoshita; 2010).

1.7 Glypikan

Det er i denne oppgaven arbeidet med PGet glypikan. Glypikan er et HSPG kovalent bundet til cellemembranen på den ekstracellulære siden av PM via et GPI-anker (Filmus and Selleck; 2001; Filmus *et al.*; 2008). PGet ble først identifisert i lungefibroblastceller fra menneske og ble av artikkelforfatterne kalt glypikan (David *et al.*; 1990). I mennesker finnes det seks familiemedlemmer, glypikan 1-6, mens det er identifisert en glypikanvariant i zebrafisk (knypek), to i *Drosophila* ("*division abnormally delayed*" (*dally*) og "*dally-like*" (*dly*)) og to i *Caenorhabditis elegans* (*gpn-1* og *lon-2*) (De Cat and David; 2001; Fico *et al.*; 2011). Glypikaner faller i to brede subfamilier på bakgrunn av aminosyre sekvenslikhet: glypikan

1/2/4/6 og glypikan 3/5. Det er ca 25 % aminosyre sekvenslikhet mellom gruppene (Filmus *et al.*; 2008). Strukturen til glypikan (figur 1.5) består av en proteinkjerne på ca 60-70 kilodalton (kDa) med 14 konserverte cysteiner, hovedsakelig lokalisert i det sentrale, globulære domenet. Cysteinene kan danne intramolekylære disulfidbroer og gi glypikan en konservert tredimensjonal struktur (Bernfield *et al.*; 1999; Song and Filmus; 2002; Fico *et al.*; 2011), selv om dette aldri har blitt dokumentert (Fransson *et al.*; 2004). Glypikan har et N-terminalt signalpeptid for ER-import og et C-terminalt hydrofobt domene for påsetting av et GPI-anker. Nær PM og den C-terminale enden finnes 2-4 HS GAG-seter, avhengig av hvilken glypikanfamilie det gjelder (Song and Filmus; 2002; Fransson; 2003; Fransson *et al.*; 2004). De fleste glypikaner er kun rapportert å bære HS GAG-kjeder, men det er observert en hybrid form av glypikan 5, med både HS og CS GAG-kjeder (Saunders *et al.*; 1997). Glypikan kan ”sheddes” (avsnøres) fra PM til ekstracellulære omgivelser. Proteaser eller lipaser, som Notum, kan katalysere denne ”sheddingen” ved å kløyve GPI-ankeret (Fransson *et al.*; 2004; Filmus *et al.*; 2008; Fico *et al.*; 2011).



Figur 1.5 Oversikt over strukturen til medlemmer av glypikanfamilien.

Skjematisk fremstilling av det GPI-forankrede HSPG glypikan. Alle glypikan-PG har HS GAG-kjeder, men antall og posisjon varierer mellom de ulike glypikanvariantene. Glypikan 1, 3, 4 og 5 har også potensielle N-glykanseter. Også disse varierer i antall og posisjon, og er for enkelhets skyld ikke tegnet inn. Enkelte potensielle disulfidbroer som kan ha betydning for stabiliteten til den tredimensjonale strukturen er antydnet. GAG: Glukosaminoglykan, GPI: Glykosylfosfatidylinositol, HS: Heparansulfat, PG: Proteoglykan, PM: Plasmamembran.

Glypikan uttrykkes i alle vev og hovedsakelig under embryonal utvikling. Uttrykksnivået endres på en trinnvis og vevsspesifikk måte, noe som kan tyde på en viktig rolle for glypikan i

morfogenesen. Glypikan 1 uttrykkes mest i sentralnervesystemet og skjelettet, men også i andre vev hos voksne individer (Litwack *et al.*; 1998; Fransson *et al.*; 2004). Uttrykket av glypikan 2 er begrenset til sentralnervesystemet og er spesielt lokalisert til aksoner. I motsetning til glypikan 1, uttrykkes ikke glypikan 2 hos voksne individer (Ivins *et al.*; 1997). Glypikan 3, 5 og 6 uttrykkes i de fleste vev under embryogenesen, mens glypikan 4 hovedsakelig er uttrykt i hjerne, nyrer og lunger. Hos voksne individer uttrykkes glypikan 5 i hjernen, mens glypikan 3, 4 og 6 uttrykkes i de fleste vev (Pellegrini *et al.*; 1998; Filmus; 2001; Song and Filmus; 2002; Fransson *et al.*; 2004).

HS-kjedene på glypikan er negativt ladde og vil dermed kunne interagere med et mangfold av ekstracellulære matriksproteiner som chemokiner, vekstfaktorer, morfogener og deres reseptorer. De fleste vekstdefekter assosiert med unormalt uttrykk av glypikangener viser samme fenotype som ved mutasjoner av proteiner involvert i HS-syntese, noe som viser at mange glypikanfunksjoner er relatert til HS-kjedene (Fransson *et al.*; 2004). Avhengig av den cellulære kilden, kan *in vitro*-studier vise at HS-kjedene til glypikan kan binde fibronektin, kollagen, antitrombin og fibroblast vekstfaktorer (FGFer), mens *in vivo*-studier av *dally* i *Drosophila* kreves for riktig morfogenese av vinger, antenner og genitalier. *Dally* modulerer ”*Decapentaplegic*” (*Dpp*) og ”*Wingless*” (*Wg*) som er to kjente HS-bindende vekstfaktorer i *Drosophila*. Mutasjoner i *dally*- og *dly*-gener, som er viktige gener for ekstracellulær distribuering og signalisering av *Wg* (De Cat and David; 2001), gir alvorlige defekter på grunn av nedsatt gradientdannelse for signalmolekyler (Filmus and Selleck; 2001; Fransson *et al.*; 2004). Hos mennesker vil mutasjoner i glypikan 3 forårsake ”Simpson-Gobali-Behmel Syndrome” (SGBS) en sjelden X-bundet sykdom karakterisert av pre- og postnatal overvekst av flere vev og organer (Song and Filmus; 2002). Studier i *Drosophila* har vist at ”sheddet” glypikan spiller en rolle i transport av ulike signalmolekyler for dannelsen av morfogene gradienter (Filmus *et al.*; 2008). HS-kjeder som er knyttet til glypikaner kan også bli brukt som bindingssteder for inntrengere som virus og mikrober (Fransson *et al.*; 2004).

I polariserte epitelceller finnes mange GPI-forankrede proteiner på den apikale PM, der GPI-ankeret er assosiert med lipidflåter (van Meer and Simons; 1988). Glypikan 1 med sine HS-kjeder vil i motsetning til mange apikale GPI-forankrede proteiner, være lokalisert på den basolaterale PM av det polariserte epitelcellelaget. Hvis HS-kjedene på glypikan 1 blir fjernet, er det vist at PGet sorteres mer apikalt (Mertens *et al.*; 1996).

1.7.1 Glypikan 1

Som nevnt tidligere er det i denne masteroppgaven arbeidet med PGet glypikan, og da glypikan 1. Det er vist at glypikan 1 kan resirkuleres fra PM via caveolinmediert endocytose, og at HS-kjedene kan bli kløyvet av i endosomer. Glypikan kan deretter få HS-kjedene repolymerisert og igjen transporteres til PM og det antas derfor at glypikan 1 kan resirkulere til et tidlig område i Golgi-apparatet. Glypikan 1 kan få bundet nitrogenoksid (NO) og danner da glypikan 1-SNO (Svensson and Mani; 2009). Reaksjonen er kobberavhengig og kobberproteiner, som prionproteinet vil kunne avgi kobber-ioner til glypikan 1, som kreves for dannelse av glypikan 1-SNO (Fransson *et al.*; 2004; Cheng *et al.*; 2006), og som dermed kan endocytoses og resirkuleres fra PM til tidlige og seine endosomer. I seine endosomer vil en reduserende agens frigjøre NO fra cystein som resulterer i kløyving av HS-kjedene på N-usubstituerte glukosaminer (GlcNH_3^+) (Mani *et al.*; 2000; Belting *et al.*; 2003; Svensson and Mani; 2009). I Golgi-apparatet vil HS-stubbene på glypikan 1 bli resyntetisert før glypikan 1 transporteres tilbake til PM (Edgren *et al.*; 1997; Fransson *et al.*; 2004). Det er vist at prionproteinet kontrollerer både internalisering og den NO-avhengige degraderingen av glypikan 1 (Cheng *et al.*; 2006). Studier har vist at glypikan 1 kolokaliserer med prionproteinet på PM, noe som fører til assosiering med lipidflåter. Både prionproteinet og den sykdomsfremkallende formen av prionproteinet ko-immunopresipiterte med glypikan 1 og interaksjonen viste seg å være avhengig av HS GAG-kjeder på glypikan 1 (Taylor *et al.*; 2009; Hooper; 2011). Resirkulerende glypikan 1 er viktig for opptak av polyaminer og visse peptider (Belting *et al.*; 2003; Svensson and Mani; 2009) og i tillegg vil degraderingsprodukter av HS-kløyving i seine endosomer assosiere med oksiderte proteiner i proteasomer som kan tyde på en involvering av HS-degraderingsprodukter i fjerning av feilfoldede proteiner (Mani *et al.*; 2007; Svensson and Mani; 2009).

Glypikan 1 har to potensielle N-glykanseter, på aminosyre 79 og 116, samt 4 potensielle HS GAG-seter på aminosyre 55, 486, 488 og 490 (<http://www.uniprot.org/uniprot/P35052>). N-glykansetene er lokalisert til den N-terminale delen av glypikan, mens tre av fire potensielle HS GAG-seter er på den C-terminale delen nær PM (figur 1.6). Studier av sekundærstrukturen til glypikan utført på konstrukt hvor enten GPI-ankeret ble fjernet, eller hvor både GPI-ankeret og HS GAG-setene ble fjernet, viste 42 % α -heliksstruktur, 13 % β -plater, 18 % i "turns" og 27 % i uordnet struktur. Det ble ikke sett forskjeller på de to konstruktene med eller uten HS GAG-seter, men det ble spekulert i om α -heliks- og β -

platestrukturer befinner seg i det tettpakkede globulære domenet, mens de uordnede strukturene og ”turns” muligens var involvert i området med tre GAG-seter (Svensson *et al.*; 2009). Nyere studier har vist at de to potensielle N-glykansetene i glypikan 1 alltid er benyttet og at de påvirker proteinuttrykket, samt HS-substitueringen til glypikan 1 (Svensson *et al.*; 2011).



Figur 1.6 Oversikt over glypikan 1 sin struktur. Glypikan 1 har en N-terminal signalsekvens, og et C-terminalt sete for påsetting av et GPI-anker. Svarte streker i proteinet indikerer HS GAG-seter. Y: N-glykanseter.

HS GAG-kjedene nær PM er antatt å ha betydning for funksjonene til glypikan 1 som er overuttrykt ved ulike kreftformer blant annet brystkreft, pankreaskreft og i hjernesvulster (Kleeff *et al.*; 1998; Matsuda *et al.*; 2001; Su *et al.*; 2006). Det er også vist at glypikan 1 er involvert i progresjon av endotelcellesyklusen (Qiao *et al.*; 2008).

1.8 Målet med oppgaven

Det apikale og det basolaterale domenet av plasmamembranen til epitelceller har ulike funksjoner. De to domenene er separert ved hjelp av et proteinkompleks kalt "tight junctions". Protein- og lipidsammensetningen til det apikale og det basolaterale domenet er også ulik, og for å opprettholde denne forskjellen er epitelceller avhengige av en polarisert transport av nysyntetiserte og resirkulerende proteiner til enten det apikale eller det basolaterale domenet. Forskningsgruppen studerer syntese og transport av PGER i polariserte epitelceller (MDCK II-celler). Ved å dyrke MDCK II-celler på filter, oppnår disse en *in vivo*-lik morfologi, slik at celleoverflaten på hver side av cellelaget og makromolekyler i det apikale og det basolaterale mediet kan undersøkes. Nyere studier har antydnet at sortering til det apikale og det basolaterale domenet kan skje før TGN, som tidligere var antatt å være hovedsetet for sortering av proteiner og PGER i den sekretoriske vei. Det er i tillegg vist at sekretoriske proteiner og PGER i den sekretoriske vei kan nå PM uten å transporteres gjennom Golgi-apparatet ved å ta en alternativ rute ("Golgi bypass"). Forskningsgruppen har tidligere studert syntese og sortering av sekretoriske og transmembrane proteiner i epitelceller, og ville nå studere syntese og sortering av det GPI-forankrede PGET glypikan 1.

For å kunne studere syntese, sortering, transport og modifisering av glypikan 1, ble ulike glypikanvarianter laget og stabilt uttrykt i MDCK II-celler. Tre glypikanvarianter ble uttrykt med grønt fluorescerende protein (GFP) inkorporert som markør og kunne dermed påvises ved hjelp av antistoff rettet mot GFP. En full-lengde glypikanvariant ble laget for å studere celleoverflatelokalisering av glypikan på det apikale og det basolaterale domenet av MDCK II-celler. I tillegg var det et mål å undersøke hvilke GAG-kjeder glypikan ble modifisert med og hvor sulfaterte disse var. En sekretorisk variant ble laget for å sammenligne GAG-kjedenes lengde og sulfateringsgrad i forhold til membranbundet full-lengde glypikan. Det ble også laget en tredje glypikanvariant med en KDEL-sekvens helt C-terminalt, for å undersøke hvordan en forlenget oppholdstid tidlig i den sekretoriske vei påvirker syntese og sortering av et PG.

2 METODER

Metodedelen dekker teknikker og prosedyrer brukt i det praktiske arbeidet. Informasjon om instrumenter, buffere, løsninger, reagenser og andre materialer finnes under vedleggene.

2.1 Arbeid med mikroorganismer

Under arbeid med bakterier er det viktig å arbeide med sterile løsninger, utstyr og preparater, samt benytte seg av grunnleggende sterilteknikk for å unngå kontaminering. Utstyr og løsninger ble enten kjøpt sterilt, eller autoklavert i 20 min ved 121 °C før bruk.

I denne oppgaven ble bakteriestammen *Escherichia (E).coli* DH5 α brukt. *E.coli* er en av de mest brukte prokaryote modellorganismer og bakterien blir mye brukt ved forskning innen bioteknologi. *E.coli*-celler kan gjøres kompetente, det vil si at de kan ta opp ekstracellulært deoksyribonukleinsyre (DNA). Plasmid som tas opp av bakteriene kopieres ved celledeling og kan deretter renses og oppkonsentreres.

2.1.1 Tillaging av LB vekstskåler

Vekstskåler med luria/bertani buljong (LB)-medium inneholder de næringsstoffene bakteriene trenger for å vokse. Ved å tilsette antibiotika (ampicillin/kanamycin) til skålene, selekteres kun de bakterier som har tatt opp fremmed DNA i form av et plasmid. Plasmidet inneholder et resistensgen for et spesifikt antibiotikum og bakterier som ikke har tatt opp plasmidet vil dermed ikke kunne vokse i mediet med antibiotika.

Prosedyre:

- LB-medium med 1,5 % baktoagar lages og autoklaveres.
- Løsningen avkjøles til mellom 40-50 °C før ønsket antibiotikum (ampicillin eller kanamycin) tilsettes.
- Vekstmediet helles over i plastskåler, og fylles halvfulle (unngå bobledannelse).
- Vekstskålene settes på benken til løsningen er stivnet.
- Vekstskålene stables opp-ned og oppbevares i tette poser ved 4 °C.

2.1.2 Dyrking av bakteriestammer fra vekstskål

Prosedyre:

- I et sterilt 50 ml rør tilsettes 5 ml LB-medium med ønsket antibiotikum (ampicillin/kanamycin).
- En bakteriekoloni fra vekstskålen plukkes med en steril pipettespiss og overføres til vekstmediet.
- LB-mediet inkuberes med kraftig risting ved 37 °C i 16-18 timer (over natt (ON)).

Bakteriekulturer med *E.coli* dyrkes normalt i beholdere som er 10 ganger større enn bakteriekulturvolumet.

2.1.3 Oppbevaring av *E.coli* i frysekultur

For langtidsoppbevaring av bakteriekulturer fryses de ned til -80 °C med tilstedeværelse av 15 % glyserol. Glyserol hindrer dannelse av iskrystaller når bakteriecellene fryses ned.

Prosedyre:

I et sterilt 1,5 ml fryserør blandes:

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

2.1.4 Oppdyrking av *E.coli* fra frysekultur

Prosedyre:

- Frysekultur hentes fra -80 °C fryser og settes på is.
- Ved hjelp av en steril pipettespiss skrapes litt av frysekulturen av før den overføres til et 50 ml rør med 5 ml LB-medium med ønsket antibiotikum.
- LB-mediet med bakteriekulturen dyrkes ved 37 °C med kraftig risting ON.

2.1.5 Transformering av *E.coli*-celler

Transformasjon er en metode for å innføre ekstracellulært DNA i bakterieceller. For at bakteriecellene skal kunne ta opp plasmid-DNA må bakteriecellene gjøres kompetente, for eksempel ved behandling med CaCl_2 og dimetylsulfoksid (DMSO). Ved transformasjon blir kompetente bakterieceller og plasmid-DNA inkubert på is slik at plasmid-DNA vil legge seg utenpå bakteriecellene. Et kort varmesjokk vil gjøre bakteriemembranen permeabel for plasmid-DNA og når blandingen settes tilbake på is vil celleveggen til bakteriecellene lukke seg. Plasmid har et seleksjonsgen som gir antibiotikaresistens, og for å selekere bakterieceller som har tatt opp plasmid-DNA blir bakteriecellen dyrket på vekstskåler tilsatt antibiotika.

2.1.5.1 Tillaging av kompetente *E.coli*-celler

Denne metoden produserer *E.coli*-celler med høy transformasjonseffektivitet. Bakteriecellene dyrkes i ”super optimal Broth” (SOB) medium ON ved 18 °C til OD_{600} mellom 0,3 og 0,6, før bakteriecellene vaskes med transformasjonsbuffer (TB) og behandles med DMSO. De kompetente cellene sjokkfryses ved hjelp av flytende nitrogen og lagres deretter ved -80 °C.

Prosedyre:

- 10-12 bakteriekolonier plukkes fra et ferskt utstryk av bakteriestammen på SOB skåler.
- En forkultur lages ved å overføre bakteriekoloniene til 100 ml SOB medium i en 500 ml erlenmeyerkolbe. Forkulturen inkuberes ved 37 °C med kraftig risting i 3-4 timer.
- Optisk tetthet (OD_{600}) måles etter ca 3 timer. Deretter beregnes hvor mye av forkulturen som må tilsettes for å få $\text{OD}_{600} \approx 0,05$ i 250 ml SOB medium.
- Kulturen inkuberes med 250 ml SOB medium i en 1000 ml erlenmeyerkolbe ON ved 18 °C med kraftig risting. OD_{600} bør være mellom 0,3 og 0,6.
- Bakteriekulturen kjøles ned på is i 10 min og overføres til sterile 50 ml sentrifugerør.
- Bakteriekulturen sentrifugeres ved 2500 ”times gravity” (x g) i 10 min ved 4 °C.
- Supernatanten fjernes og bakteriepelleten løses i 80 ml iskald TB.
- Løsningen inkuberes på is i 10 min og sentrifugeres ved 2500 x g i 10 min ved 4 °C.
- Supernatanten fjernes forsiktig og pelleten løses i 20 ml TB.
- DMSO tilsettes til 3,5 %. Løsningen blandes forsiktig og settes på is i 5 min.
- DMSO tilsettes til 7 %. Løsningen blandes forsiktig og settes på is i 10 min.

- Bakteriesuspensjonen overføres til avkjølte eppendorfrør i alikvoter på 200 µl og sjokkfryses i flytende nitrogen. Oppbevares ved -80 °C.

2.1.5.2 Transformering av kompetente *E.coli*-celler

Prosedyre:

- Kompetente celler tines på is.
- Plasmidløsningen tilsettes de kompetente cellene, blandes og settes på is i 30 min.
- DNA-bakterieløsningen inkuberes ved 42 °C i 1 min før den settes tilbake på is i 2-3 min.
- Bakteriecelellene strykes ut på vekstskåler med antibiotika tilsvarende resistensgenet til plasmidet.
- Vekstskålene inkuberes ved 37 °C ON.

2.2 Arbeid med DNA

2.2.1 Kvikksjekk

Kvikksjekk er en rask og enkel metode for å se om en bakteriekultur har tatt opp et plasmid. Bakteriekulturen blir behandlet med en fenol/kloroform løsning, der fenol lyserer bakteriecelellene slik at proteiner felles ut i fenolfasen mens nukleinsyrer forblir i vannfasen. Kloroform tilsettes for lettere å skille fasene.

Prosedyre:

I et 1,5 ml eppendorfrør tilsettes:

- 100 µl bakteriekultur.
- 50 µl fenol:kloroform (1:1).
- 10 µl 6 x appliseringsbuffer.

Blandingen ristes kraftig (med en vortexer) i 10 sek og sentrifugeres ved 10 000 x g i 3 min ved romtemperatur (RT). 25 µl av den øvre fasen appliseres på en 0,8 % agarosegel (kapittel 2.2.3).

2.2.2 Plasmidisolering

Plasmid kan isoleres i ulik skala ved å utføre en mini-, midi- eller maxi-presipitering. I denne oppgaven ble plasmid isolert med både mini- og maxiprekit fra Macherey-Nagel.

Metodene baserer seg på at bakterieceller lyses i den alkaliske løsningen ved å bruke en natriumhydroksid (NaOH)/natrium dodecyl sulfat (SDS)-buffer. SDS løser opp fosfolipider og proteiner i cellemembranen mens NaOH denaturerer kromosomalt DNA og plasmid-DNA. Ved å tilsette en nøytraliseringsbuffer med høy saltkonsentrasjon vil proteiner og kromosomalt DNA presipitere sammen med SDS. Supernatanten overføres til en kolonne med en silica-membran, som plasmidet binder til. Saltet vaskes bort før plasmidet elueres i MQ-H₂O.

Plasmidisolering ble utført ved å bruke mini- og maxiprekit fra Macherey-Nagel. Prosedyren til leverandøren ble fulgt med unntak av et lavere elueringsvolum, for å oppnå en høyere plasmidkonsentrasjon.

2.2.3 Agarosegelelektroforese

Elektroforese av en agarosegel benyttes for separering av DNA-fragmenter basert på deres størrelse og form. Agarose er lineære polysakkarider ekstrahert fra sjøgress, og konsentrasjonen av agarose bestemmer tettheten i agarosegelen. Når agarosegelen settes i et elektrisk felt vil DNA-fragmenter, som er negativt ladd ved nøytral pH vandre mot den positive polen (anode). Graden av vandring avhenger av form, størrelse, konformasjon, konsentrasjon av agarose og spenning. Små DNA-fragmenter vil vandre raskere enn store DNA-fragmenter og sirkulære DNA-fragmenter vil vandre raskere enn lineære DNA-fragmenter.

Prosedyre:

- Lag en 0,8 % agarosegel:
 - 75 ml 1 x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-buffer tilsettes 0,6 g agarose.
 - Løsningen kokes i mikrobølgeovn til løsningen blir blank. NB: Agarose støtkoker.
 - 3 µl Etidiumbromid (EtBr) tilsettes når løsningen er ca 50 °C.
 - Løsningen helles i en gelform og brønnkammer settes i. Gelen får stivne i 30 min.
- Gelformen overføres til et elektroforeseapparat, og kamrene fylles opp med 1 x TAE-buffer til gelen er dekket før brønnkammeret fjernes.
- 6 x appliseringsbuffer tilsettes prøvene før de appliseres på gelen.
- Gelelektroforesen kjøres i 30-45 min ved 100 volt (V).
- Gelen legges på en ultrafiolett (UV)-transilluminator for visualisering av DNA-bånd.

2.2.4 Rensing av DNA-fragmenter fra agarosegel

For å rense DNA-fragmenter fra en agarosegel kuttes ønsket DNA-fragment ut av agarosegelen ved hjelp av en skalpell. Deretter løses agarosegelbiten opp ved oppvarming i en buffer. Løsningen overføres så til en membrankolonne der DNA vil binde kolonnen ved nøytral pH. Urenheter vaskes bort før DNA elueres i MQ-H₂O.

Ved rensing av DNA-fragmenter fra agarosegel ble NucleoSpin[®] Extract II fra Machery-Nagel benyttet og prosedyren fra kittet ble fulgt.

2.2.5 Kvantitering av DNA - konsentrasjon

DNA ble kvantitert ved hjelp av NanoDrop[™] ND-1000 spektrofotometer, og anbefalt prosedyre fra forhandleren ble fulgt. DNA-konsentrasjon bestemmes ved ultrafiolett (UV)-absorbansmålinger og baserer seg på nukleotidenes evne til å absorbere lys i den ultrafiolette delen av lysspekteret. Det er de aromatiske ringene til nukleotidene som absorberer lys, og absorpsjonsmaksimum for DNA er 260 nm. Renheten til prøven bestemmes av forholdet mellom målinger ved 260 og 280 nm. Ved 280 nm absorberer også eventuelle proteiner som forurensrer prøven.

2.3 Molekylær subkloning

2.3.1 Polymerase kjedereaksjon

”Polymerase Chain Reaction” (PCR) er en metode for amplifisering av en spesifikk DNA-sekvens *in vitro* ved hjelp av en DNA-polymerase. DNA-polymerasen er avhengig av primere for å binde seg til og forlenge en DNA-sekvens. Primere er oligonukleotider som fester seg til en komplementær DNA-sekvens. Ved å bruke primere som er komplementære til sekvensen som flankerer selve målsekvensen, vil kun målsekvensen bli amplifisert. Gjennom repeterende sykluser av PCR vil målsekvensen bli amplifisert eksponentielt.

Advantage® 2 polymerasemiks (Clontech) ble benyttet i denne oppgaven, og denne DNA-polymerasen er en varmestabil polymerase slik at det ikke er nødvendig å tilsette nytt enzym etter denatureringstrinnet.

En PCR-reaksjon består ofte av 20 til 40 sykluser, der hver syklus består av tre trinn:

1. **Denaturering** ved 94 °C. Hydrogenbindinger mellom dobbeltrådet DNA brytes slik at det dannes enkelttrådet DNA.
2. **Hybridisering**. Primerne vil bindes til deres komplementære DNA-sekvens, og temperaturen i dette trinnet avhenger av primerne.
3. **Elongering** ved 68 °C eller 72 °C, avhengig av DNA-polymerasens optimale reaksjonstemperatur. En varmestabil DNA-polymerase forlenger primerne i 5`-3` retning og lager en komplementær DNA-sekvens. Tiden polymerasen bruker på å lage en DNA-sekvens avhenger av størrelsen på målsekvensen, ca 1 min pr kilobasepar (kb).

METODER

Prosedyre:

I et 0,2 ml PCR-rør blandes:

- 50 ng DNA-templat.
- 1,0 μ l forover-primer (20 pmol/ μ l).
- 1,0 μ l revers-primer (20 pmol/ μ l).
- 1 μ l deoksyribonukleotid trifosfat (dNTP)-miks (10 mM).
- Tilsett MQ-H₂O til 40 μ l.

Når reaksjonen er klar til å startes, tilsett følgende:

- 5,0 μ l 10x PCR-buffer.
- 1 μ l Advantage® 2 polymerasemiks.

dNTP-miks: 10 μ l av hvert nukleotid (100 mM) blandes med 60 μ l MQ-H₂O, slik at sluttvolumet blir 100 μ l med en sluttkonsentrasjon på 10 mM for hvert nukleotid.

PCR program:

- Steg 1 94 °C i 1,5 min.
- Steg 2 94 °C i 30 sek.
- Steg 3 56-58 °C gradient i 30 sek.
- Steg 4 68 °C i 2,5 min.
- Steg 5 Tilbake til steg 2, gjenta 30 sykler.
- Steg 6 68 °C i 10 min.
- Steg 7 4 °C ∞ .
- Steg 8 Slutt.

PCR-produktene appliseres på en 0,8 % agarosegel (kapittel 2.2.3) før de kuttet ut og isoleres ved hjelp av gelekstraksjonskit fra Macherey-Nagel (kapittel 2.2.4).

2.3.2 Restriksjonskutting av DNA

Restriksjonsenzymmer, også kalt endonukleaser, er enzymer som binder og kutter dobbeltrådet DNA ved spesifikke DNA-sekvenser, kalt restriksjonssteder. Restriksjonssetene er ofte korte (4-6 bp), palindrome DNA-sekvenser. Enkelte restriksjonsenzymmer kutter DNA-tråden rett av og danner stumpe ender, mens andre restriksjonsenzymmer kutter DNA-tråden slik at det dannes baseoverheng på DNA-molekylene.

Prosedyre:

I et 1,5 ml eppendorfrør blandes:

- 5-10 µl plasmid-DNA.
- 0-5 µl MQ-H₂O (sluttvolum 12 µl).
- 1,2 µl 10 x reaksjonsbuffer.
- 0.2 µl 100 x bovint serumalbumin (BSA).
- 1 µl restriksjonsenzym.
- Inkuber ved 37 °C i 1-2 timer.

Ved bruk av to restriksjonsenzymmer kan det kuttes sekvensielt eller samtidig dersom samme buffer kan benyttes. Dette må undersøkes i leverandørens katalog.

2.3.3 Ligering

DNA-ligaser er enzymer som danner fosfodiesterbindinger mellom en 3' hydroksylgruppe i et nukleotid og en 5' fosfatgruppe i et annet nærliggende nukleotid. DNA-ligase benyttes til å lime DNA-fragmenter inn i en kuttet vektor. Det molare forholdet mellom vektor og innskudd (DNA-fragment) bør være mellom 1:2 og 1:3. Ligerings temperaturen er et kompromiss mellom størst mulig enzymaktivitet og stabiliteten til bindingen mellom DNA-fragmenter og vektor.

2.3.3.1 Ligering inn i kloningsvektoren pGEM®-T Easy

Kloningsvektoren pGEM®-T Easy har 3'-T-overheng ved multikloningssetet (MCS) som vil øke ligeringseffektiviteten av PCR-produkt med A-overheng, og hindre religering av vektor. I MCS finnes flere restriksjonskuttsteder (vedlegg 2) og PCR-produktet liggeres inn mellom to kuttsteder for *EcoR*I. pGEM-T Easy vektoren har seleksjonsgen for ampicillinresistens.

METODER

Prosedyre:

I et 1,5 ml eppendorfrør blandes:

- 10 µl rensert PCR produkt (volum avhenger av størrelsen på fragment og konsentrasjon).
- 10 µl 2 x ligeringsbuffer.
- 1 µl pGEM-T Easy vektor.
- 1 µl T4 DNA-ligase.
- Ligeringsblandingen inkuberes i 1 time ved RT, transformeres inn i kompetente DH5α *E.coli*-celler (kapittel 2.1.5.2) og strykes deretter ut på vekstskåler med ampicillin (kapittel 2.1.1), som inkuberes ved 37 °C ON.

2.3.3.2 Ligering inn i ekspresjonsvektoren pEGFP-C1

Ekspresjonsvektoren pEGFP-C1 har seleksjonsgen for kanamycinresistens.

Prosedyre:

I et mikrorør blandes:

- 6 µl restriksjonskuttet DNA fragment.
- 1 µl 10 x T4 ligasebuffer.
- 0,5 µl restriksjonskuttet ekspresjonsvektor.
- 1,5 µl MQ H₂O.
- 1 µl T4 DNA ligase.
- Ligeringsblandingen inkuberes ved 16 °C ON, transformeres inn i kompetente DH5α *E.coli*-celler (kapittel 2.1.5.2), og strykes ut på vekstskåler med kanamycin (kapittel 2.1.1). Vekstskålene inkuberes ved 37 °C ON.

2.4 Sekvensering

Sekvenseringen ble utført av sekvenseringslaboratoriet ved Institutt for molekylær biovitenskap/Biologisk institutt ved Universitetet i Oslo.

Prosedyre:

I et PCR-rør blandes:

- 8 μ l plasmid (15-30 ng/ μ l).
- 2 μ l sekvenseringsprimer (5 μ M) (vedlegg 1).

2.5 Celledyrkningsteknikker

MDCK II-celler ble dyrket i 75 cm² cellekulturflasker med 20 ml ”Dulbecco`s modified Eagle`s medium” (DMEM) tilsatt 5 % føtalt serumalbumin (FBS), 1 % L-glutamin og 1 % penicillin og streptomycin (P/S) (Heretter referert til som dyrkningsmedium).

Arbeid med celledyrkning foregår sterilt, og alle løsninger holder 37 °C. Arbeidet ble utført i en sterilbenk med laminær luftstrøm. Cellekulturflaskene ble plassert i en inkubator ved 37 °C og 5 % CO₂.

2.5.1 Opptining av MDCK II-celler

Prosedyre:

- Celler tas opp fra nitrogentank og ampullen tines i vannbad ved 37 °C.
- Tinte cellene overføres raskt til en 75 cm² flaske med 20 ml dyrkningsmedium.

2.5.2 Trypsinering av MDCK II-celler

Epitelceller er bundet tett sammen ved hjelp av ”tight junctions”, som er proteinkomplekser avhengige av Ca²⁺. Ved å tilsette ”etylen-diamin-tetra-acetate” (EDTA), som binder Ca²⁺, vil ”tight junctions” åpne seg og gi økt permeabilitet. Trypsin-EDTA kan da diffundere mellom cellene til det basale domenet og proteasen trypsin bryter bindingene mellom cellene og underlaget, slik at cellene løsner.

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

Prosedyre:

- Dyrkningsmediet helles av.
- Cellen vaskes to ganger med 7 ml ”phosphate buffered salines” (PBS) med EDTA. La stå noen min og hell av.
- 5 ml (75 cm²)/2 ml (25cm²) trypsin-EDTA tilsettes og helles av når cellene begynner å runde seg opp.
- 2 ml (75 cm²)/1 ml (25cm²) trypsin-EDTA tilsettes og inkuberes ved 37 °C og 5 % CO₂ til cellene har løsnet.
- 10 ml (75 cm²)/5 ml (25cm²) dyrkningsmedium tilsettes for å hemme trypsin.
- Cellene resuspenderes før ønsket mengde overføres til nye flasker eller skåler.

2.5.2.2 Trypsinering av MDCK II-celler i skåler

Prosedyre:

- Dyrkningsmediet helles av.
- Cellene vaskes to ganger med 2 ml PBS med EDTA. La stå noen min og hell av.
- 2 ml trypsin-EDTA tilsettes til skålen og helles av når cellene begynner å runde seg opp.
- 1 ml trypsin-EDTA tilsettes og inkuberes ved 37 °C og 5 % CO₂ til cellene har løsnet.
- Ønsket mengde celler overføres til nye flasker eller skåler.

2.5.2.3 Trypsinering av MDCK II-celler i 6 brønners plater

Prosedyre:

- Dyrkningsmediet suges av ved hjelp av en steril pipette.
- Cellen vaskes to ganger med 2 ml PBS med EDTA. La stå noen min og hell av.
- 1 ml trypsin-EDTA tilsettes og helles av når cellene begynner å runde seg opp.
- 0,5 ml trypsin-EDTA tilsettes og inkuberes ved 37 °C og 5 % CO₂ til cellene har løsnet.
- Ønsket mengde celler overføres til nye flasker eller skåler.

2.5.3 Nedfrysning av MDCK II-celler

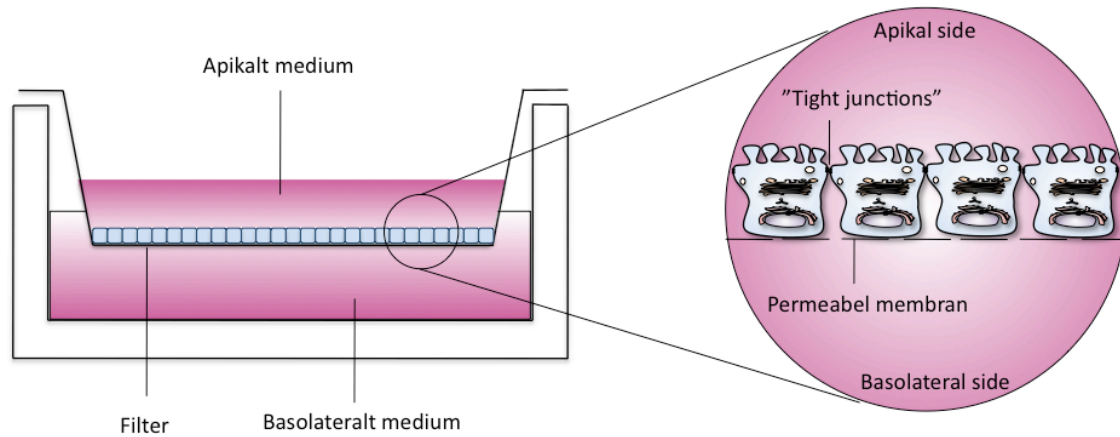
MDCK II-celler oppbevares i flytende nitrogen (-196 °C). 10 % DMSO tilsettes dyrkningsmedium for å hindre krystallisering i cellene når vannet fryser.

Prosedyre:

- Frysemedium lages ved å tilsette 10 % sterilfiltrert DMSO til dyrkningsmedium med 10 % FBS.
- Cellene trypsineres (kapittel 2.5.2.1) og overføres til et 15 ml sentrifugerør.
- Cellene sentrifugeres ved 1500 x g ved 4 °C i 5 min.
- Supernatanten helles av og cellene resuspenderes i 1 ml frysemedium.
- Cellene overføres til fryserør og plasseres i - 80 °C fryser i 2 timer før de flyttes over til en nitrogentank.

2.5.4 Dyrking av MDCK II-celler på filter

MDCK II-celler er polariserte epitelceller. For å studere MDCK II-celler som polariserte epitelceller kan de dyrkes på filter, hvor de oppnår den samme polariseringen som *in vivo*. Porestørrelsen på filtrene er 0,4 µm, slik at makromolekyler slipper gjennom porene, mens epitelcellene selv ikke kan passere. Epitelcellene danner et tett enkelt cellelag med ”tight junctions”, som binder cellene tett sammen og hindrer passasje av makromolekyler og reduserer passasje av ioner mellom det apikale og det basolaterale domenet (figur 2.1). Et tett epitelcellelag på filter fungerer dermed som en barriere mellom det apikale og basolaterale mediet, slik at de ulike mediene kan høstes separat. Ulike membranproteiner på det apikale og det basolaterale celleoverflatedomenet kan studeres ved å biotinylere de to celleoverflatene separat (kapittel 2.6.1).



Figur 2.1 Polariserte MDCK II-celler på filter. MDCK II-celler blir sådd ut på filter og danner tette monolag som separerer det apikale og det basolaterale mediet.

Prosedyre:

- Celler dyrkes tette i 75 cm² celleflasker før de trypsineres (kapittel 2.5.2.1).
- Cellesuspensjonen overføres til et 15 ml sentrifugerør og sentrifugeres ved 1500 x g i 5 min.
- Supernatanten helles av og cellene resuspenderes i 10 ml dyrkningsmedium.
- Filtre settes i filterholderne som står i autoklaverte 150 mm glasskåler.
- 90 ml dyrkningsmedium tilsettes glasskålene.
- 1,5 ml resuspensert celledøsning tilsettes hvert filter (4,7 cm²).
- Cellene inkuberes ved 37 °C og 5 % CO₂.

Etter 3-4 døgn er cellene tette og polariserte, så filtrene overføres til 6-brønners plater. 1,5 ml serumfritt medium tilsettes basolateralt og 1 ml tilsettes apikalt. Cellene høstes etter 16-18 timer (kapittel 2.5.6.1).

2.5.5 Lactacystin-behandling

Lactacystin hemmer proteasomer i cytoplasma. Dette vil føre til en opphopning av ubiquitinylerede proteiner som ellers blir degradert av proteasomer. Behandling med lactacystin brukes for å undersøke om det blir en økt proteinmengde i cellefraksjonen når proteasomer hemmes i forhold til uten hemmer. Eksperimentet vil vise om proteinene som studeres normalt degraderes i proteasomet.

Prosedyre:

- Celler dyrkes på filter (kapittel 2.5.4).
- Etter 3-4 dager overføres filtrene til 6-brønners plater. Serumfritt medium med 5 μ M lactacystin tilsettes. 1 ml medium apikalt og 1,5 ml basolateralt.
- Platen inkuberes ved 37 °C og 5 % CO₂ i 18 timer, før cellene høstes (kapittel 2.5.6.1).

2.5.6 Høsting av MDCK II-celler

Siden dyrkningsmedium tilsatt serum kan inneholde proteaser som er aktive ved RT, kjøles høstet medium ned på is og tilsettes proteasehemmer for å unngå proteindegradering. Det apikale mediet sentrifugeres for å fjerne løse celler, mens cellelysatsent sentrifugeres for å fjerne store aggregater og cellerester.

2.5.6.1 Høsting av MDCK II-celler fra filter

Prosedyre:

- 6-brønnersplater med filtre settes på is.
- Det apikale mediet høstes og overføres til 2 ml eppendorfrør, før det sentrifugeres i 3 min ved 3600 x g. Supernatanten overføres til nye eppendorfrør og fryses ned ved -20 °C.
- Det basolaterale mediet høstes og fryses ned ved -20 °C.
- Filtrene vaskes 2 ganger med 2 ml kald PBS som tilsettes til den apikale og basolaterale siden av filtret. Lå stå 15 min på is med vipping før PBS fjernes.
- 2 ml kald immunfelling (IP)-lyseringsbuffer tilsettes den apikale siden av filtret. Inkuberes i 1 time ved RT med vipping.
- Cellelysatsent overføres til 2 ml eppendorfrør.
- Supernatanten overføres til nye eppendorfrør og fryses ned ved -20 °C.

2.5.6.2 Høsting av MDCK II-celler fra 6-brønnersplater og 25 cm² celleflasker

Prosedyre:

- Dyrkningsmediet suges/helles av og overføres til eppendorfrør før det sentrifugeres ved 3600 x g i 3 min.
- Supernatanten overføres til et nytt eppendorfrør og fryses ned ved -20 °C.
- Cellene vaskes to ganger med 2 ml PBS.
- 2 ml (25 cm² celleflasker)/1 ml (6-brønnersplater) IP-lyseringsbuffer tilsettes. Inkuber i 45 min ved RT med vipping.
- Cellelysate overføres til eppendorfrør før det sentrifugeres i 3 min ved 3600 x g.
- Supernatanten overføres til nye eppendorfrør og fryses ned ved -20 °C.

2.5.6.3 Høsting av MDCK II-celler fra 75 cm² celleflasker

Prosedyre:

- Dyrkningsmediet helles av.
- Cellene vaskes med 10 ml kald PBS før det helles av.
- 5 ml kald PBS tilsettes og cellene skrapes av flaskebunnen med en celledrape.
- Løsningen overføres til et 15 ml sentrifugerør og sentrifugeres i 3 min ved 3600 x g.
- Supernatanten helles av og resuspenderes i 1 ml kald PBS.
- Løsningen overføres til et eppendorfrør og sentrifugeres i 3 min ved 3600 x g.
- Supernatanten helles av.
- 200 µl IP-lyseringsbuffer tilsettes. Inkuber i 45 min ved RT med rotasjon.
- Fryses ned ved -20 °C.

2.5.7 Transfeksjon med FuGENE[®] HD

Transfeksjon er en metode for å bringe fremmed DNA som koder for et protein inn i celler, slik at proteinets uttrykk og funksjon kan studeres. Det er to hovedtyper transfeksjon, transient og stabil. Ved transient transfeksjon blir plasmidet ført inn i cellene, men ikke integrert i genomet. Dermed blir det en midlertidig transfeksjon hvor plasmidet fortynnes gjennom celledelinger og effekten tapes. Fordelen med transient transfeksjon er at det tar liten tid sammenlignet med stabil transfeksjon. Ved stabil transfeksjon blir plasmidet stabilt integrert i genomet til vertcellen, noe som vil gi et varig uttrykk av DNA-produktet til

plasmidet også etter celledeling. Stabilt transfekterte celler vil gi opphav til individuelle kolonier, som etter å ha nådd en viss størrelse kan høstet.

FuGENE[®] HD transfeksjonsreagens (Roche) er et lipidbasert transfeksjonsreagens som danner komplekser med DNA og transporterer kompleksene inn i cellen. Egner seg både til transient og stabil transfeksjon.

I denne oppgaven ble stabil transfeksjon utført. For å selekttere cellekloner som har tatt opp plasmid-DNA, ble de ulike konstruktene satt inn i ekspresjonsvektoren pEGFP-C1 som har resistensgen mot G-418. G-418 er et antibiotikum som hemmer funksjonen til ribosomene og som dermed dreper ikke-resistente celler.

Prosedyre:

- MDCK II-celler sås ut på 10 cm² petriskåler og er klare for transfeksjon når cellene er 50-70 % tette.
- 90 µl serumfritt medium tilsettes et eppendorfrør.
- 10 µl FuGENE[®] HD tilsettes mediet uten å komme i kontakt med veggene i eppendorfrøret.
- 4 µg plasmid-DNA tilsettes FuGENE[®] HD løsningen, slik at plasmid-DNA (µg) til FuGENE[®] HD (µl) ratio blir (2:5).
- Løsningen blandes og inkuberes i 45 min ved RT.
- FuGENE[®] HD:DNA løsningen tilsettes dråpevis til cellene.
- Det hele inkuberes i 72 timer ved 37 °C og 5 % CO₂.

En kontrollskål uten DNA lages parallelt.

2.5.8 Fortynningsrekke av stabilt transfekterte celler

Ved stabil transfeksjon lages det en fortynningsrekke av cellene etter 72 timer. Dette gjøres fordi transfeksjonseffektiviteten på dette tidspunktet ikke er kjent og det ønskes en optimal tetthet av positive kloner. For å selekttere for transfekterte celler tilsettes dyrkningsmediet G-418 med en sluttkonsentrasjon på 1 mg/ml.

Prosedyre:

- Cellene trypsineres (kapittel 2.5.2.2).
- Skålen med de trypsinerte cellene fordeles til nye 10 cm² petriskåler i ulike fortynninger: 1:30, 1:100 og 1:250. Totalvolum med dyrkningsmedium tilsatt G-418 er 10 ml. I den fjerde skålen tilsettes resten av de trypsinerte cellene til dyrkningsmedium med G-418 til et totalvolum på 10 ml.
- Kontrollskålen fordeles til to nye 10 cm² petriskåler i ulike fortynninger: 1:30 og resten av cellene. Totalvolum med dyrkningsmedium tilsatt G-418 er 10 ml.

Skålene med celler inkuberes ved 37 °C og 5 % CO₂ til cellene i kontrollskålene er døde. Dyrkningsmediet med G-418 byttes etter ca 4 dager, for å fjerne døde celler.

2.5.8.1 Høsting av positive kolonier av transfekterte celler

Når cellene i kontrollskålene er døde, skal i prinsippet alle cellekoloniene som vokser i de transfekterte skålene ha tatt opp plasmid-DNAet. Kolonier av celler over 1 cm i diameter som ikke har vokst sammen med andre kolonier kan plukkes.

Prosedyre:

- Koloniene merkes på undersiden av plastskålen.
- Dyrkningsmediet fjernes fra skålen.
- En metallring plasseres over den markerte kolonien.
- 200 µl trypsin-EDTA tilsettes inni hver metallring, og noen dråper dyrkningsmedium tilsettes skålen for å dekke cellene utenfor metallringene.
- Skålen med cellene inkuberes ved 37 °C og 5 % CO₂ til cellene har løsnet.
- Cellene overføres til en "Microwell"-skål med 2 ml dyrkningsmedium med G-418.
- Cellene inkuberes ved 37 °C og 5 % CO₂.

Glypikanuttrykket til cellene ble undersøkt i konfokalmikroskop (kapittel 2.5.9).

2.5.9 Identifisering av glypikanuttrykk ved konfokalmikroskopi

Konfokalmikroskopi er en teknikk brukt til å studere uttrykk og lokalisering av fluorescerende proteiner og lipider. Fordelen med et konfokalmikroskop er muligheten til å kontrollere dybden på fokusplanet ved å eliminere lys som er ute av fokus.

Glypikan-GFP-konstruktene brukt i oppgaven har genet som koder for GFP. GFP er isolert fra maneten *Aequorea victoria* og er et mye brukt reporterprotein. GFP-proteinet vil lyse fluorescerende grønt (507 nm) når det blir eksitert med fiolett eller blått lys (488 nm). Identifisering av positive kolonier med tilfredsstillende proteinuttrykk ble utført på et konfokalt fluorescensmikroskop IX81.

Cellelinjer med et høyt uttrykk ble trypsinert og overført til 25 cm² celleflasker med vekstmedium med G-418.

2.6 Proteinanalyser

2.6.1 Biotinylering av celleoverflateproteiner

Biotinylering av celleoverflaten er et viktig verktøy for å separere og isolere proteinmolekyler på cellemembranen. EZ-Link® "Sulfosuccinimidyl-6-[biotin-amino] hexanoate (Sulfo-NHS-LC-Biotin) ble brukt til å merke celleoverflateproteiner. Biotin er lite og naturlig forekommende vitamin (Vitamin B₇) som binder avidin og streptavidinproteiner med høy affinitet. Siden Biotin har en masse på 244 Da, kan det konjugeres til proteiner uten å endre deres biologiske aktivitet. Biotinylerte celleoverflateproteiner kan separeres fra umerkede proteiner ved å bruke immobilisert streptavidin før Western blotting (WB).

Prosedyre:

- Alle løsninger holdes kalde under prosedyren.
- 6-brønnersplaten med filtrene settes på is.
- Det apikale og basolaterale mediet høstes (kapittel 2.5.6.1).
- Filtret vaskes to ganger med PBS med $MgCl_2$ og $CaCl_2$ (Ca^{2+} (C)/ Mg^{2+} (M)). 1 ml tilsettes apikalt og 1,5 ml basolateralt.
- 1 ml PBS(C/M)-biotin (0,5 mg/ml) tilsettes apikalt eller 1,5 ml basolateralt.
- Inkuberes på is i 30 min.
- PBS(C/M)-biotin fjernes.
- PBS(C/M)-glysin tilsettes og inkuberes i 10 min ved 4 °C. Dette gjentas 2 ganger.
- 1 ml IP-lyseringsbuffer tilsettes den apikale siden av filtret. Inkuberes i 1 time ved RT med vipping.
- Cellelysate høstes (kapittel 2.5.6.1).
- 30 μ l tas av og merkes som total cellefraksjon.

2.6.2 Felling med Dynabeads® M-280 Streptavidin

Dynabeads® M-280 Streptavidin (Invitrogen) er superparamagnetiske kuler på 2,8 μ m i diameter, og er dekket av et monolag med streptavidin. Biotinylerte proteiner vil binde streptavidinkulene og kan isoleres fra ubundne proteiner ved å bruke et magnetfelt, som streptavidinkulene vil binde, ved vask.

Prosedyre:

- Streptavidinkulene resuspenderes ved å riste kraftig på røret.
- Ønsket mengde streptavidinkuler beregnes, 50 μ l per 1 ml prøve, og overføres til et 1,5 ml eppendorfrør.
- Vask:
 - Eppendorfrøret med streptavidinkulene settes i en magnetholder i 2 min.
 - Supernatanten pipetteres av mens eppendorfrøret står i magnetholderen.
 - Streptavidinkulene vaskes og resuspenderes ved å tilsette PBS pH 7,4. Samme volum som beregnet mengde streptavidinkuler benyttes.
- Vask gjentas 2 ganger, totalt 3 vasketrinn.
- 30 μ l streptavidinkuler tilsettes til 1 ml cellelysate av biotinylert prøve (kapittel 2.6.1).
- Prøven inkuberes i 30 min ved RT med rotasjon.

- Vask:
 - Eppendorfrøret settes i magnetholderen i 2 min.
 - Supernatanten pipetteres av.
 - Streptavidinkulene vaskes ved å tilsette PBS pH 7,4.
- Vask gjentas 2 ganger, totalt 3 vasketrinn.
- Eppendorfrøret settes i magnetholderen i 2 min.
- Supernatanten pipetteres av.
- 30 µl MQ-H₂O brukes ved eluering.

2.6.3 Metabolsk innmerkning med radioaktiv isotop

Ved metabolsk innmerkning av celler med radioaktiv isotop kan syntese, sortering og modifisering av proteoglykaner og glykoproteiner studeres.

[³⁵S]-sulfatinnmerkning: GAG-kjeder på proteoglykaner blir modifisert med sulfat. Ved å erstatte ikke-radioaktivt sulfat med radioaktivt sulfat i dyrkningsmediet kan mengden av sulfaterte proteoglykaner, som er syntetisert under innmerkningsperioden, bli kvantitert og studert.

Prosedyre:

- Celler dyrkes på filter (kapittel 2.5.4).
- Når cellene er tette fjernes dyrkningsmediet og filtrere overføres til 6-brønnersplater.
- RPMI-1640 medium med 2 % FBS og 1 % glutamin, uten sulfat brukes for [³⁵S]-sulfat innmerkning.
- Den radioaktive isotopen tilsettes til dyrkningsmediet med en sluttkonsentrasjon på 0,2 mCi/ml dyrkningsmedium.
- 2 ml av det radioaktive dyrkningsmediet tilsettes basolateralt og 1,2 ml apikalt.
- Filtrene inkuberes i 24 timer ved 37 °C og 5 % CO₂.
- Cellemedier (apikalt og basolateralt) og cellelysater høstes (kapittel 2.5.6.1).

Proteiner og PGER med GFP isoleres ved IP med Protein-A-sepharosekuler (kapittel 2.6.4).

2.6.4 Immunfelling med Protein-A-sepharosekuler

Ved immunfelling (også kalt immunpresipitering) med protein-A koblet til sepharosekuler, kan proteiner isoleres ved binding til antistoff.

Prosedyre:

Klargjøring av kuler:

- Ønsket mengde protein-A-sepharosekuler (Dynabeads[®]Protein-A), 30 µl per prøve, tilsettes et 1,5 ml eppendorfrør.
- Eppendorfrøret settes i magnetholderen i 1 min.
- Supernatanten pipetteres av.
- Kulene vaskes ved å tilsette 500 µl 0,1 M Na-fosfatbuffer, pH 8,1. Røret ristes til kulene er løst.
- Eppendorfrøret plasseres i magnetholderen i 1 min.
- De tre siste punktene gjentas 2 ganger, deretter fjernes supernatanten.

Binding av antistoff til sepharosekuler:

- 1 µl Ab6556 (anti-GFP) per IP-prøve tilsettes til 30 µl 0,1 M Na-fosfatbuffer, pH 8,1.
- Antistoffløsningen tilsettes til eppendorfrøret med kuler og inkuberes ved RT med rotasjon i 1-2 timer.
- Eppendorfrøret settes i magnetholderen i 2 min, og supernatanten fjernes.
- 500 µl 0,1 M Na-fosfatbuffer, pH 8,1, tilsettes for å vaske bort ubundne antistoffmolekyler.
- De to siste punktene gjentas 2 ganger. Ved siste vask tilsettes 30 µl 0,1 M Na-fosfatbuffer, pH 8,1, per IP-prøve. Kulene porsjoneres slik at hvert rør inneholder kuler til en IP (30 µl).

Binding av antigen til antistoff:

- Eppendorfrørene plasseres i magnetholderen og supernatanten fjernes.
- 1 ml av høstet metabolsk innmerket prøve, mediefraksjon eller cellefraksjon, tilsettes eppendorfrør med antistoff bundet til sepharosekuler.
- Løsningen inkuberes ON med rotasjon ved 4 °C.

Vask:

- Eppendorfrør settes i magnetholderen og supernatanten pipetteres av til ett nytt 1,5 ml eppendorfrør.
- 1 ml IP-vaskeløsning med BSA tilsettes, etterfulgt av vask i 15 min med rotasjon ved 4 °C. Vasketrinnet hindrer uspesifikk binding av proteiner, ved at BSA binder seg uspesifikt til kuler og antistoff, i tillegg til at ubundne proteiner vaskes bort.
- Eppendorfrør settes i magnetholderen og supernatanten fjernes.
- 0,5 ml IP-vaskeløsning med BSA tilsettes. Vaskes i 15 min med rotasjon ved 4 °C. Eppendorfrøret settes i magnetholderen og supernatanten fjernes.
- Siste punkt gjentas en gang.
- 0,5 ml IP-vaskeløsning uten BSA tilsettes for å vaske bort BSA. Vaskes i 15 min med rotasjon ved 4 °C.
- Eppendorfrør settes i magnetholderen og supernatanten fjernes.
- De to siste punktene gjentas 2 ganger.

Eluering:

- Hver prøve elueres i 10 µl IP-vaskebuffer uten BSA eller i MQ-H₂O.
- 4 µl 4 x "Sample buffer" og 1 µl 20 x "Reducing agent" tilsettes hver prøve.

Fremkalling:

- Prøvene varmes i 5 min ved 96 °C.
- Prøvene sentrifugeres i 5 min ved 3600 x g.
- Eppendorfrørene plasseres i magnetholderen og supernatanten appliseres på en SDS-polyakrylamid (PAGE)-gel og elektroforese utføres.
- Etter endt elektroforese legges gelen i en fikseringsløsning i 40 min med langsom vipping.
- Fikseringsløsningen erstattes med Amplify™ i 20 min.
- Gelen tørkes i en geltørker i 2 timer ved 70 °C, før den legges på screen i en kassett ON og scannes ved hjelp av Typhoon 9400 Variable Mode Imager for et digitalt avtrykk av radioaktiviteten i gelen.

2.6.5 Kondroitinase ABC-behandling

Kondroitinase ABC (cABC) er et enzym isolert fra bakterien *Proteus vulgaris*. Enzymet degraderer CS og DS GAG-kjeder, ved å bryte bindingen mellom GalNAc og GlcA. Hele GAG-kjeden blir degradert med unntak av de seks første suktermolekylene og nærmest proteinkjernen. Behandling med cABC brukes til å påvise CS og/eller DS på proteoglykaner.

Prosedyre:

I et 1,5 ml eppendorfrør blandes:

- 10 µl prøve.
- 2 µl 10 x cABC buffer.
- 3 µl MQ H₂O.
- 5 µl 10 mU cABC enzym.

Prøven inkuberes ved 37 °C i 15 min.

2.6.6 Heparitinasebehandling

Heparitinase (Hep) er et enzym som degraderer HS GAG-kjeder, og er en metode som brukes til å påvise HS på proteoglykaner.

Prosedyre:

I et 1,5 ml eppendorfrør blandes:

- 10 µl prøve.
- 2 µl 10 x Hepbuffer.
- 3 µl MQ H₂O.
- 5 µl Heparitinasemix (0,02 mU/µl).

Løsningen inkuberes ved 28 °C ON.

2.6.7 PNGase F-behandling

Peptid: N-Glykosidase F (PNGase F) er et enzym som fjerner N-glykaner fra glykoproteiner. Enzymet kutter bindingen mellom asparagin i proteinet og første GlcNAc i sukkerkjeden. Behandling med PNGase F brukes til å påvise N-glykaner på proteiner.

Prosedyre:

I et 1,5 ml eppendorfrør blandes:

- 22 µl prøve.
- 2,4 µl denaturerende buffer.

Løsningen inkuberes ved 96 °C i 10 min.

- Følgende tilsettes:
 - 3 µl G7 buffer.
 - 3 µl NP40.
 - 1 µl PNGase F.

Løsningen inkuberes ved 37 °C i 1-2 timer.

2.6.8 Endo H-behandling

Endoglykosidase (Endo) H er et enzym som kutter bindingen mellom de to første GlcNAc, etter asparagin, på høy mannose og enkelte hybride glykoproteiner. Glykoprotein med høy mannose og hybrid N-glykanstruktur (GlcNAc₂Man₅GlcNAc) er sensitive for Endo H, mens glykoproteiner er resistente mot Endo H hvis de har en kompleks N-glykanstruktur (GlcNAc₂Man₃GlcNAc).

Prosedyre:

I et 1,5 ml eppendorfrør blandes:

- 22 µl prøve.
- 2,2 µl denaturerende buffer.

Løsningen inkuberes ved 100 °C i 10 min.

- Følgende tilsettes:
 - 3 µl 10 x G5 reaksjonsbuffer.
 - 1 µl MQ-H₂O.
 - 1 µl Endo H.

Løsningen inkuberes ved 37 °C i 1-2 timer.

2.6.9 SDS-PAGE

SDS-PAGE er en metode som separerer proteiner i en gel basert på molekylmassen under denaturerende betingelser. Proteiner denatureres ved tilsetning av dithiotreitol (DTT) og SDS. DTT vil bryte disulfidbroer i proteiner, mens den anioniske detergenten SDS vil denaturere proteiner ved å danne et kompleks med proteinene, hvor ett SDS-molekyl vil binde seg per omtrent hver andre aminosyre. Proteinets opprinnelige ladning blir maskert av SDS, som er negativt ladd, og dermed er det kun molekylmassen til proteinet, samt porestørrelsen i gelen som avgjør proteinets vandring i gelen. Små proteiner vil vandre raskere enn større proteiner. Porestørrelsen i gelen kan varieres med ulike konsentrasjoner av bisakrylamid. Et protein vil vandre saktere i en gel med høy bisakrylamidkonsentrasjon enn i en gel med lavere konsentrasjon.

Prosedyre:

- 30 µl prøve blandes med 10 µl 4 x XT Sample Buffer og 2 µl 20 x XT Reducing Agent.
- Prøvene varmes ved 96 °C i 5 min.
- Sentrifuger prøvene ved 3600 x g i 5 min.
- Den hvite teipen nederst på gelen må fjernes.
- XT-MOPS-buffer tilsettes øvre og nedre gelkammer.
- Brønnkammen fjernes forsiktig.
- Prøvene appliseres på gelen.
- Gelen kjøres ved 180 V, 90 milliampere (mA) og 100 W i 1 time og 20 min. Kjøres to geler samtidig endres innstillingene til 180 V, 310 mA og 100 W i 1 time og 10 min.

2.6.10 Western blotting

WB er en metode for å påvise spesifikke proteiner i en prøve. Proteinene blir først separert ved elektroforese (SDS-PAGE (kapittel 2.6.9)), før de overføres til en membran (PVDF eller nitrocellulose) ved elektroblotting. I denne oppgaven skjer overføringen til en PVDF-membran ved en halvtørr metode. Antistoff blir benyttet til å påvise proteinet på membranen. Primærantistoff vil binde proteinet på membranen og sekundærantistoff vil binde primærantistoffet. Sekundærantistoffet har i tillegg egenskaper som gjør at det kan visualiseres. Ab 6556 (anti-GFP) ble benyttet som primærantistoff for glypikan-GFP-

konstruktene, mens Ab 55971 (anti-glypikan 1) ble benyttet til glyp-konstruktet (vedlegg 4). NA 934 ble benyttet som sekundærantistoff (vedlegg 4).

PVDF-membranen har mulighet til å binde alle slags proteiner i en prøve og blokkeres derfor før deteksjon med antistoff for å unngå uspesifikk antistoffbinding. Ved å inkubere PVDF-membranen i en blokkeringsløsning (5 % tørrmelk i 1 x Tris-bufret-salin tilsatt Tween 20 (TTBS)) vil proteiner i blokkeringsløsningen binde til PVDF-membranen, unntatt seter som allerede er okkupert av proteiner som ble overført fra gelen. Når primærantistoff så tilsettes vil kun epitoper på målproteinet ha ledige bindingsseter for dette.

Prosedyre:

Overføring til membran:

- Etter endt elektroforese (SDS-PAGE) legges gelen i katodebuffer for avkjøling.
- To blottefiltre legges i et kar med katodebuffer.
- To blottefiltre legges i et kar med anodebuffer.
- Hybond™-P PVDF-membranen (GE Healthcare) aktiveres i metanol i 10 sek før den overføres til et kar med anodebuffer og inkuberes i 5 min.
- Det lages en blottesandwich på Trans-Blot® Semi-dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) i følgende rekkefølge fra bunn til topp:
 - 2 blottefiltre fuktet i anodebuffer.
 - PVDF-membran.
 - Gel.
 - 2 blottefiltre fuktet i katodebuffer.
- Blottingen utføres ved 25 V, 170 mA og 100 W i 1 time.

Blokkering:

- PVDF-membranen blokkeres ved inkubering i 1 x TTBS med 5 % tørrmelk i 1-2 timer ved RT med vipping. Dette blokkerer flest mulig uspesifikke bindingsseter for primærantistoffet.

Inkubering med primær- og sekundærantistoff:

- Det primære antistoffet (1:5000) fortynnes i 1 x TTBS med 1 % tørrmelk.
- PVDF-membranen inkuberes med fortynnet antistoff ved 4 °C ON med vipping.

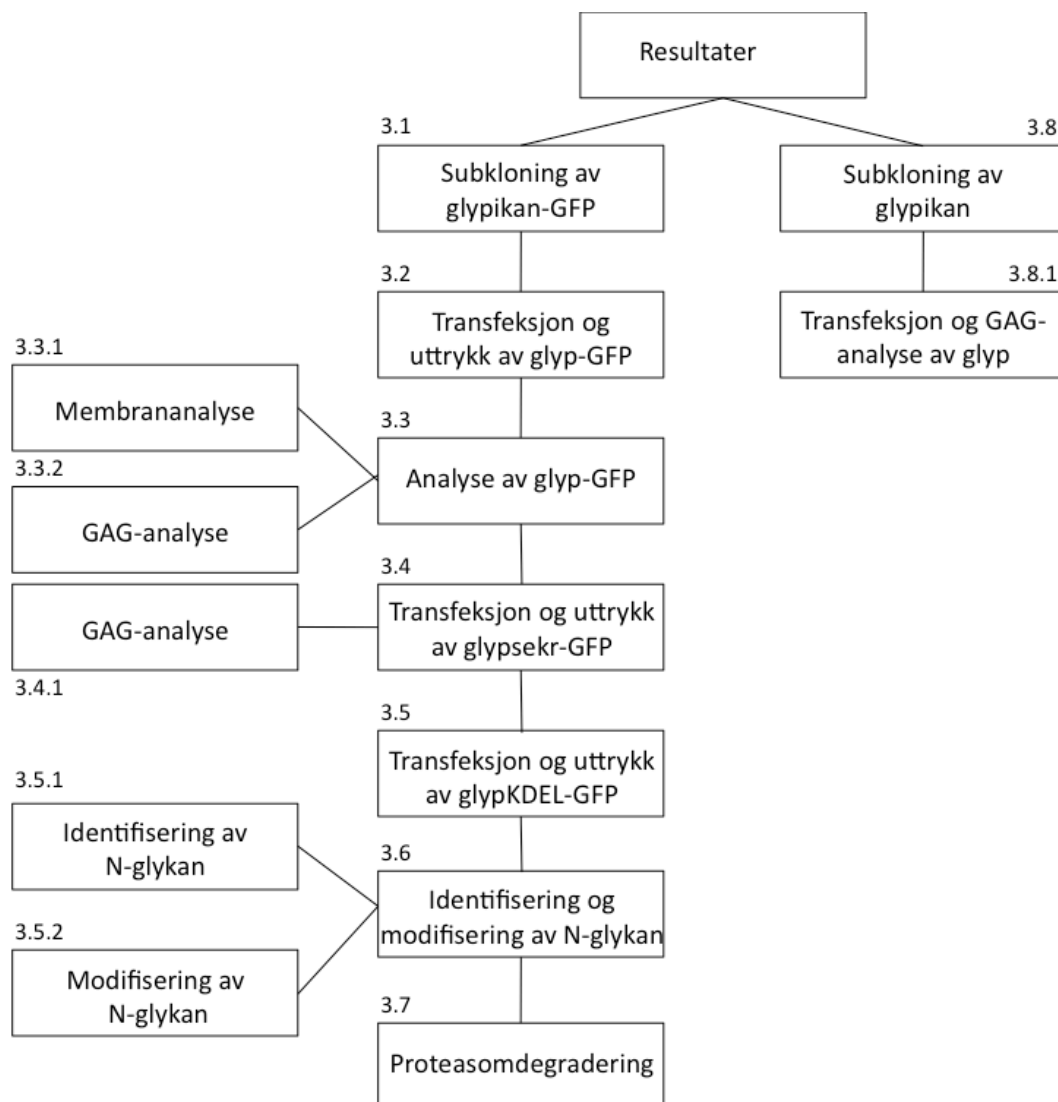
METODER

- PVDF-membranen vaskes 3 x 15 min med 1 x TTBS.
- Det sekundære antistoffet (1:10000) fortynnes i 1 x TTBS med 1 % tørrmelk.
- PVDF-membranen inkuberes med sekundærantistoff i 1-2 timer ved RT med vipping.
- PVDF-membranen vaskes 3 x 15 min med 1 x TTBS.
- PVDF-membranen vaskes i 15 min med Tris-bufret-salin (TBS).

PVDF-membranen fremkalles ved å tilsette 1 ml ECL™ substrat (GE Healthcare) til membranen før inkubasjon i 5 min. Sekundærantistoffet (NA 934) er koblet til et "horseradish peroxidase" (HRP)-enzym, som vil reagere med et peroksidasesubstrat. Dette vil danne et produkt som avgir lys som lett avbildes med et CCD-kamera.

3 RESULTATER

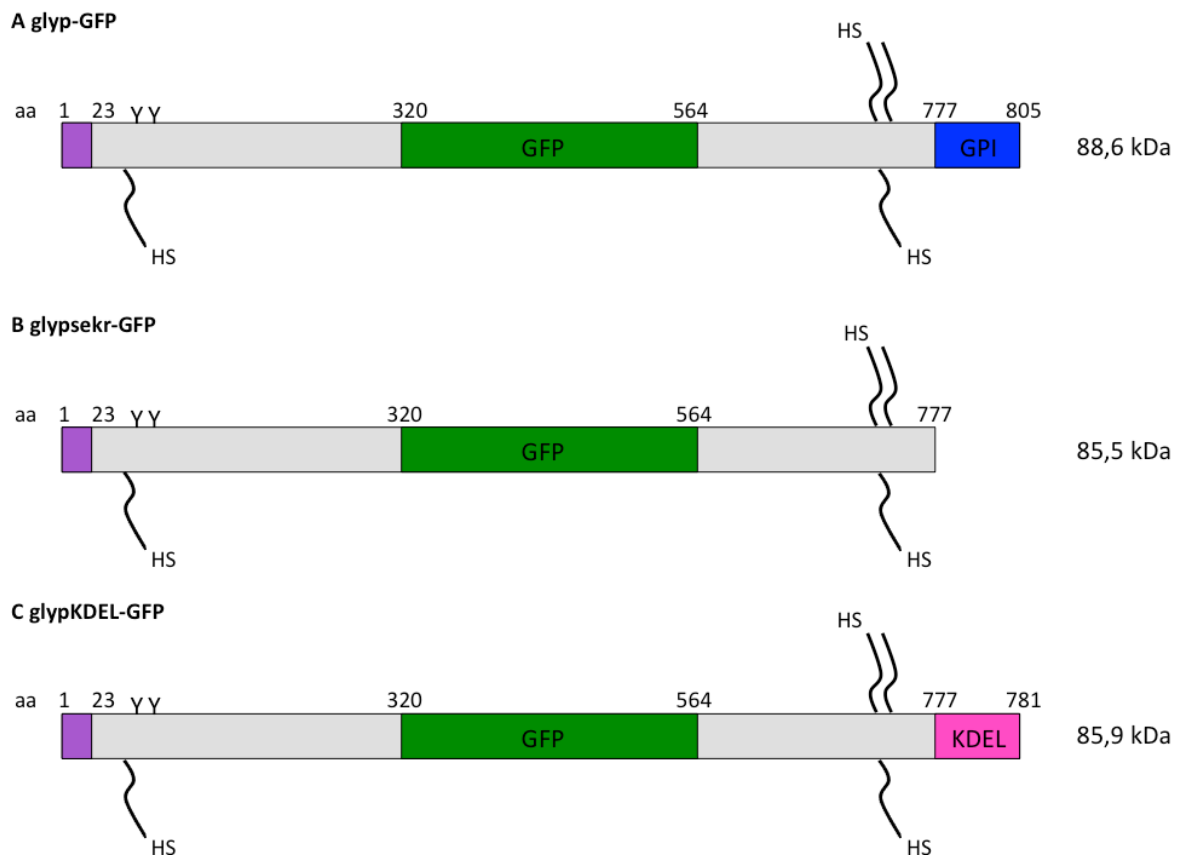
Polariserte epitelceller har to adskilte membrandomener, det apikale og det basolaterale domenet, men mekanismen bak sortering og transport av molekyler som sørger for en opprettholdelse av denne cellepolariteten, er ennå ikke fullstendig klarlagt. Arbeidet utført i denne oppgaven omfatter subkloning av PGet glypikan 1 (glypikan), samt studier av transport, lokalisering og modifisering av PGet når det er stabilt uttrykt i MDCK II-celler. I konstrukter vil glypikan bli kalt glyp. En oversikt over arbeidet utført i denne oppgaven er vist i figur 3.1.



Figur 3.1 Oversikt over arbeidet utført i denne oppgaven.

3.1 Subkloning av glypikan-GFP

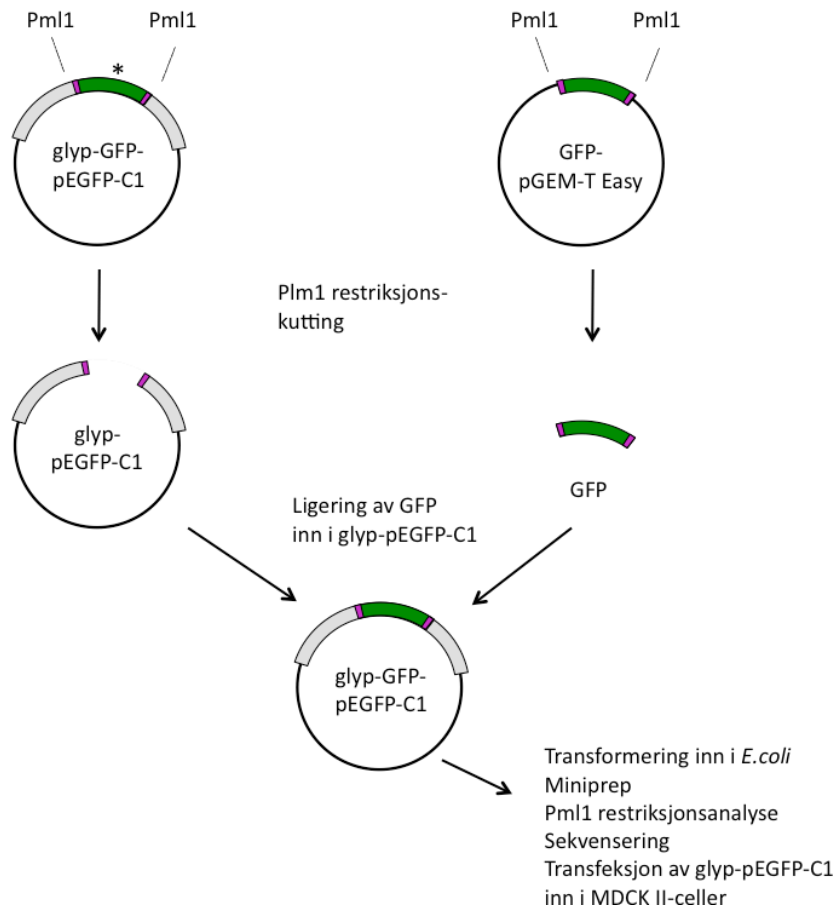
Et humant full-lengde glypikan i plasmidet pcDNA3 ble mottatt av Dr. Hans Christian Åsheim ved Oslo Universitetssykehus, Ullevål. For å kunne påvise glypikan i levende celler ved hjelp av konfokalmikroskop, ble GFP satt inn i det globulære domenet (glyp-GFP, figur 3.2 A). Deretter ble konstruktet glyp-GFP benyttet til å lage to nye konstrukt, en sekretorisk variant av glypikan, der GPI-ankeret er fjernet (glypsekr-GFP, figur 3.2 B), og en sekretorisk variant hvor aminosyrene KDEL er satt inn helt C-terminalt i proteinet (glypKDEL-GFP, figur 3.2 C). GFP er satt inn etter aminosyre 320 i alle de tre konstruktene.



Figur 3.2 Oversikt over glyp-GFP-konstruktene. Alle glypikankonstruktene har GFP satt inn etter aa 320. Mulige N-glykanfeseseter er på aa 79 og 116, mens HS-feseseter er på aa 55, 486, 488 og 490. **A:** glyp (61,7 kDa) med GFP (26,9 kDa) har en proteinkjerne på 88,6 kDa. **B:** glypsekr (58,6 kDa) med GFP (26,9 kDa) har en proteinkjerne på 85,5 kDa. **C:** glypKDEL (59 kDa) med GFP (26,9 kDa) har en proteinkjerne på 85,9 kDa. Størrelsesforhold er ikke tatt hensyn til i figuren. aa: Aminosyre, glyp: Glypikan, GPI: Glykosylfosfatidylinositol, Glypsekr: sekretorisk glypikan, KDEL: enbokstavforkortelse av aminosyrene lysin-aspartat-glutamat-leucin, HS: Heparansulfat, kDa: kiloDalton, Y: N-glykansete.

3.1.1 Subkloning av glyp-GFP

En oversikt over subkloning av glyp-GFP er vist i figur 3.3.



Figur 3.3 Subkloning av glyp-GFP. GFP i glyp-GFP-pEGFP-C1 har en mutasjon (*), og ble kuttet ut ved hjelp av restriksjonsenzymet PmlI. GFP, uten mutasjon i kloningsvektoren pGEM-T Easy, ble kuttet ut ved hjelp av PmlI og ligert inn i PmlI-kuttet glyp-pEGFP-C1. Plasmidet ble transformert inn i kompetente *E.coli*-celler før kvikksjekk og restriksjonsanalyse med PmlI ble utført. Plasmid med GFP-innskudd ble sendt til sekvensering. Plasmid med riktig sekvens ble stabilt transfektert inn i MDCK II-celler.

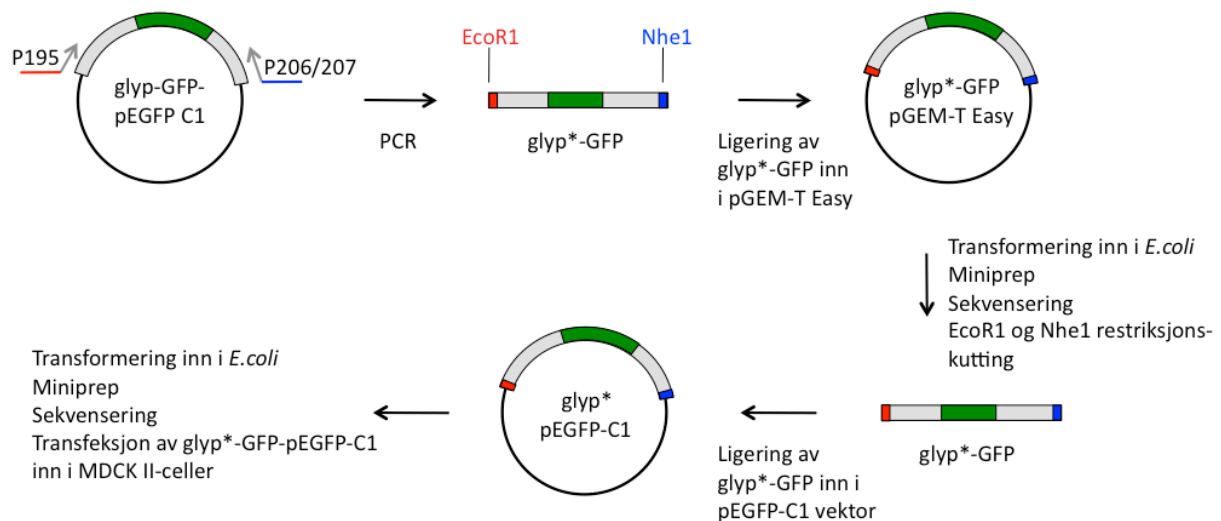
GFP var tidligere blitt satt inn i glypikans eget PmlI-restriksjonssete i ekspresjonsvektoren pEGFP-C1, men etter sekvensering viste det seg at det var en mutasjon i GFP. Da dette masterprosjektet ble satt i gang, ble kloningsstrategien å kutte ut det muterte GFP ved hjelp av restriksjonsenzymet PmlI, før applisering på en 0,8 % agarosegel. Glypikan i ekspresjonsvektoren pEGFP-C1 (glyp-GFP-C1) ble isolert og rensset opp ved hjelp av et gelekstraksjonskit. Ferdiglaget GFP med riktig sekvens og med restriksjonssetene PmlI i både 5'- og 3'-ende i kloningsvektoren pGEM-T Easy ble restriksjonskuttet med PmlI, før

applisering på en 0,8 % agarosegel. GFP ble isolert og rensert opp ved hjelp av et gelekstraksjonskit, før den ble ligert inn i gel-renset glyp-pEGFP-C1. Det ferdige glyp-GFP-C1-plasmidet ble deretter transformert inn i kompetente *E.coli*-celler og strøket ut på vekstskåler tilsatt kanamycin. Bakteriekolonier ble plukket og dyrket opp i ON-kulturer før kvikksjekk ble utført for å verifisere plasmid med riktig størrelse. Isolerte plasmid ble restriksjonskuttet med Pml1 før de ble applisert på en 0,8 % agarosegel for å undersøke om GFP var blitt ligert inn i glyp-GFP-C1. Plasmid med riktig størrelse ble sendt til sekvensering.

Masterarbeidet med å lage glyp-GFP-C1 ble startet opp av undertegnede før permisjonen, men ble fullført av en PhD-student, noe som er grunnen til at det ikke er noen gelbilder av denne kloningsdelen.

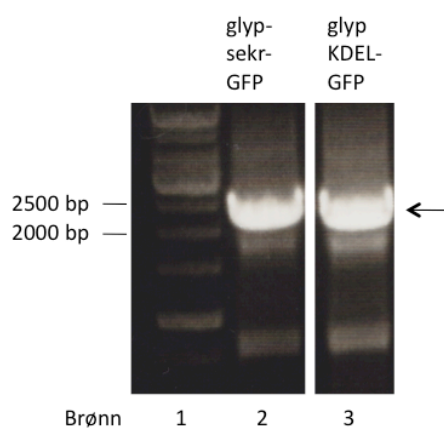
3.1.2 Subkloning av glypsekr-GFP og glypKDEL-GFP

En oversikt over subkloning av konstruktene glypsekr-GFP og glypKDEL-GFP er vist i figur 3.4.



Figur 3.4 Subkloning av glypsekr-GFP og glypKDEL-GFP. Glypikan ble amplifisert ved hjelp av PCR med Advantage® 2 Polymerase og forover-primeren P-195 (vedlegg 1), som har restriksjonssete for EcoR1, og revers-primer P-206 eller P-207, som begge har restriksjonssetet Nhe1, og ble benyttet til henholdsvis glypsekr-GFP og glypKDEL-GFP. P-207 har innsatte baser som koder for aminosyre KDEL, og glyp-GFP-C1 ble benyttet som templat for PCR-reaksjonene ved laging av begge konstruktene. PCR-produktene ble ligert inn i pGEM-T Easy vektor og sendt til sekvensering, før DNA-sekvensen ble kuttet ut ved hjelp av restriksjonsenzymene EcoR1 og Nhe1 og ligert inn i restriksjonskuttet (EcoR1 og Nhe1) pEGFP-C1 vektor. Plasmid med riktig sekvens ble stabilt transfektert inn i MDCK II-celler. Merknaden * i figuren indikerer enten glypsekr-GFP eller glypKDEL-GFP.

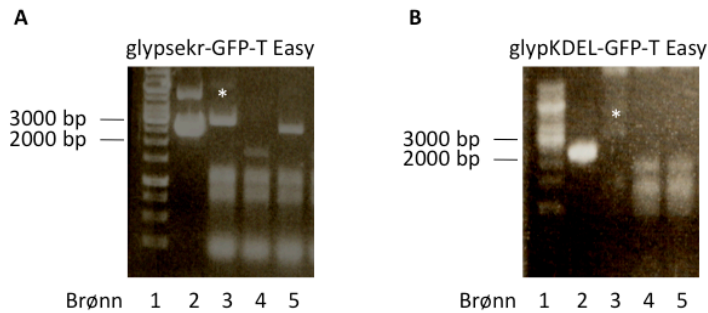
Glypsekr-GFP og glypKDEL-GFP ble amplifisert ved hjelp av Advantage® 2 Polymerase (kapittel 2.3.1) der glyp-GFP-C1 ble benyttet som templat. Forover-primer P-195 har restriksjonssetet EcoR1, mens revers-primer P-206, som ble benyttet til glypsekr-GFP-konstruktet, vil ha fjernet deler av glypiklan slik at GPI-ankeret ikke settes på, etterfulgt av Nhe1 restriksjonssete. For glypKDEL-GFP-konstruktet ble P-207 benyttet som revers-primer, som har innsatte baser som koder for aminosyrene KDEL, etterfulgt av et stopp-kodon slik at GPI-ankeret ikke kan settes på, samt et Nhe1-restriksjonssete (vedlegg 1). PCR-produktene ble applisert på en 0,8 % agarosegel (figur 3.5), før PCR-produktene med riktig størrelse (2331 bp for glypsekr-GFP og 2343 bp for glypKDEL-GFP) ble kuttet ut (markert med pil) og isolert ved hjelp av et gelekstraksjonskit (kapittel 2.2.4).



Figur 3.5 PCR-amplifisering av glypsekr-GFP og glypKDEL-GFP. Glypsekr-GFP og glypKDEL-GFP ble amplifisert ved hjelp av PCR med Advantage® 2 Polymerase med forover-primer P-195. P-206 og P-207 ble benyttet som revers-primer til henholdsvis glypsekr-GFP og glypKDEL-GFP. PCR-produktene ble applisert på en 0,8 % agarosegel og riktig PCR-produkt, 2331 bp og 2343 bp for henholdsvis glypsekr-GFP og glypKDEL-GFP, er indikert med pil. I brønn 1 er en MW-standard applisert.

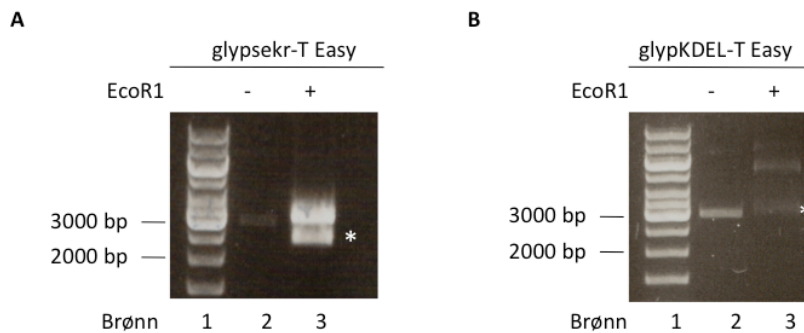
De isolerte PCR-fragmentene glypsekr-GFP og glypKDEL-GFP ble ligert inn i kloningsvektoren pGEM-T Easy (glypsekr-GFP-T Easy og glypKDEL-GFP-T Easy), før de ble transformert inn i kompetente *E.coli*-celler og strøket ut på vekstskåler tilsatt ampicillin. Bakteriekolonier ble plukket og dyrket opp i ON-kulturer før kvikksjekk ble utført for å verifisere plasmid med riktig størrelse (figur 3.6). Plasmid indikert med stjerne (figur 3.6 A, brønn 3 og figur 3.6 B, brønn 3) ble videre isolert.

RESULTATER



Figur 3.6 Kvikksjekk av glypsekr-GFP-T Easy og glypKDEL-GFP-T Easy. Flere bakteriekulturer transformert med glypsekr-GFP (A) og glypKDEL-GFP (B), ble behandlet med en fenol/kloroformløsning, og den vandige fasen med nukleinsyrer ble applisert på en 0,8 % agarosegel. I brønn 1 er det en MW-standard, og i brønn 2 er glyp-GFP-T Easy tatt med som en indikator på plasmid med riktig størrelse. I brønn 3-5 i både A og B er det ulike bakteriekolonier, og kolonier som har plasmid med riktig størrelse er indikert med stjerne (*) og analysert videre.

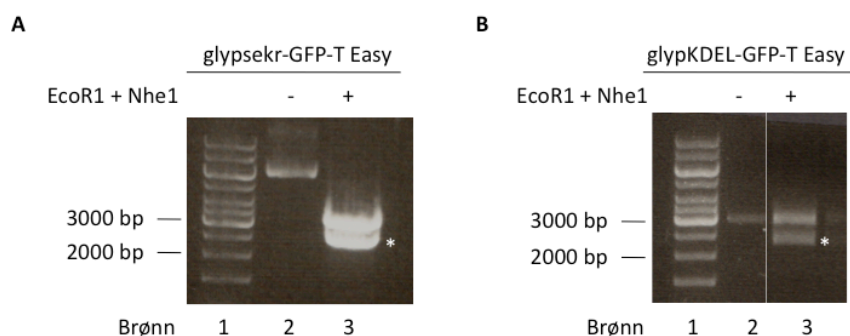
Isolerte plasmid ble restriksjonskuttet med EcoR1 før de ble applisert på en 0,8 % agarosegel (figur 3.7). Restriksjonskutting med EcoR1 ble benyttet for å undersøke om DNA-innskuddene hadde riktig størrelse, siden EcoR1 er satt inn både oppstrøms og nedstrøms for kloningssetet. Plasmid med riktig størrelse på DNA-innskuddet ble sendt til sekvensering.



Figur 3.7 Restriksjonsanalyse av glypsekr-GFP-T Easy og glypKDEL-GFP-T Easy. Konstruktene glypsekr-GFP-T Easy (A) og glypKDEL-GFP-T Easy (B) ble kuttet med restriksjonsenzymet EcoR1, siden det kutter på begge sider av DNA-innskuddet, og applisert på en 0,8 % agarosegel. I brønn 1 er en MW-standard applisert. I brønn 2 er det ukuttet glypsekr/KDEL-GFP-T Easy, og i brønn 3 er det EcoR1-kuttet glypsekr/KDEL-GFP-T Easy. DNA-fragment med riktig størrelse (2331 bp og 2343 bp for henholdsvis glypsekr-GFP og glypKDEL-GFP) er indikert med stjerne (*).

3.1.3 Overføring av glypsekr-GFP og glypKDEL-GFP til ekspresjonsvektoren pEGFP-C1

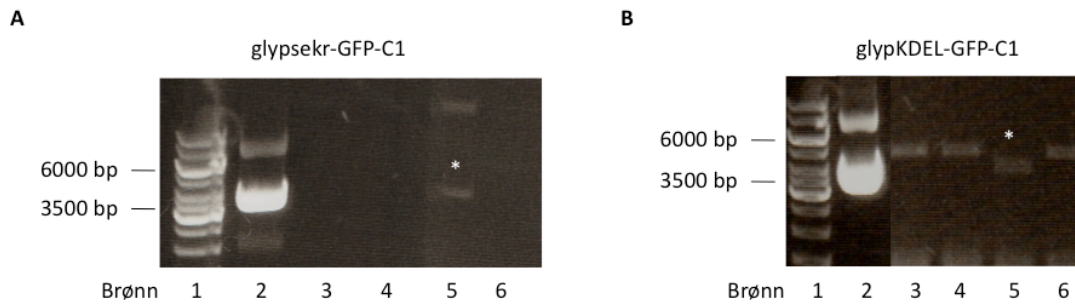
For å overføre glypsekr-GFP og glypKDEL-GFP fra kloningsvektoren pGEM-T Easy til ekspresjonsvektoren pEGFP-C1 ble både glypsekr-GFP-T Easy, glypKDEL-GFP-T Easy og ekspresjonsvektoren pEGFP-C1 restriksjonskuttet med enzymene EcoR1 og Nhe1 (vedlegg 1) før applisering på en 0,8 % agarosegel (figur 3.8).



Figur 3.8 Restriksjonsanalyse av glypsekr-GFP-T Easy og glypKDEL-GFP-T Easy. Glypsekr-GFP-T Easy (A) og glypKDEL-GFP-T Easy (B) ble kuttet ut av pGEM-T Easy med restriksjonsenzymene EcoR1 og Nhe1 før applisering på en 0,8 % agarosegel. I brønn 1 er MW-standard applisert, mens ukuttet og restriksjonskuttet plasmid er i henholdsvis brønn 2 og 3, i både A og B. DNA-fragmenter med riktig størrelse (2331 bp og 2343 bp for henholdsvis glypsekr-GFP og glypKDEL-GFP), er indikert med stjerne (*).

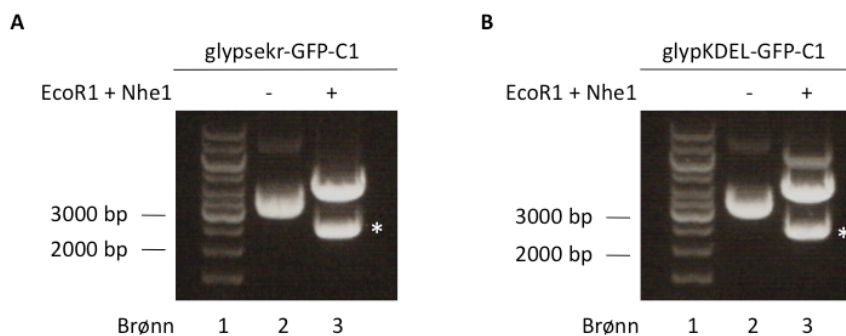
DNA-fragmenter med riktig størrelse, indikert med stjerne (*) i figur 3.8, av glypsekr-GFP og glypKDEL-GFP ble kuttet ut av gelen og rensert opp med et gelekstraksjonskit. Glypsekr-GFP og glypKDEL-GFP ble så ligert inn i EcoR1 og Nhe1 restriksjonskuttet ekspresjonsvektor, pEGFP-C1, før konstruktene ble transformert inn i kompetente *E.coli*-celler og strøket ut på vekstskåler tilsatt kanamycin. Bakteriekolonier ble plukket og dyrket opp i ON-kulturer før kvikksjekk ble utført for å verifisere plasmid med riktig størrelse (figur 3.9) (indikert med stjerne i figur 3.9 A, brønn 5, og B, brønn 5), som dermed ble isolert.

RESULTATER



Figur 3.9 Kvikksjekk av glypsekr-GFP-C1 og glypKDEL-GFP-C1. Bakteriekolonier transformert med glypsekr-GFP-C1 (A) og glypKDEL-GFP-C1 (B), ble behandlet med en fenol/kloroformløsning, før den vandige fasen ble applisert på en 0,8 % agarosegel. I brønn 1 er en MW-standard applisert, og i brønn 2 i både A og B er plasmidet glyp-GFP-C1 med mutasjon men riktig størrelse brukt som en størrelseskontroll. Brønn 3-6 i både A og B er ulike bakteriekolonier, og kolonier med riktig størrelse er indikert med stjerne (*), og disse ble analysert videre.

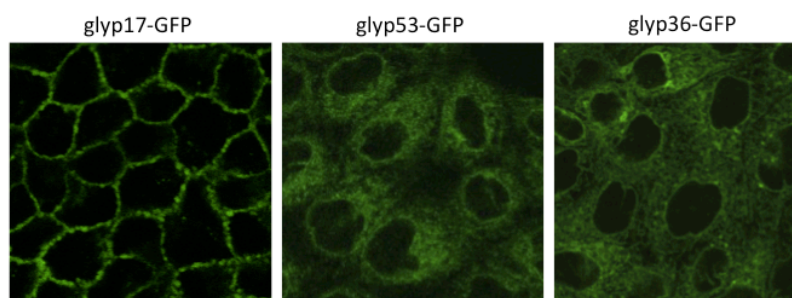
Isolerte plasmid ble restriksjonskuttet med EcoR1 og Nhe1 før de ble applisert på en 0,8 % agarosegel (figur 3.10). Restriksjonsenzymanalyse med EcoR1 og Nhe1 vil gi et DNA-fragment på 2331 bp (glypsekr-GFP) eller 2343 bp (glypKDEL-GFP) og et DNA-fragment på 4 kb (pEGFP-C1 uten GFP). Plasmid med riktig størrelse på DNA-innskuddet markert med stjerne (*) i figur 3.10 ble sendt til sekvensering. Plasmid med riktig DNA-sekvens ble deretter stabilt transfektert inn i MDCK II-celler.



Figur 3.10 Restriksjonsanalyse av glypsekr-GFP-C1 og glypKDEL-GFP-C1. Glypsekr-GFP-C1 (A) og glypKDEL-GFP-C1 (B) ble kuttet med restriksjonsenzymene EcoR1 og Nhe1, som kutter på hver sin side av DNA-fragmentet, før applisering på en 0,8 % agarosegel. MW-standard er applisert i brønn 1, mens henholdsvis ukuttet og kuttet vektor med DNA-innskudd er i brønn 2 og 3 i både A og B. DNA-fragment med riktig størrelse er indikert med stjerne (*), og disse ble sendt til sekvensering.

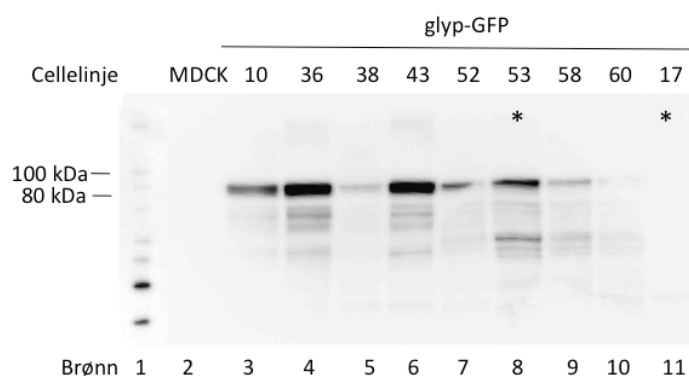
3.2 Transfeksjon og uttrykk av glyp-GFP i MDCK II-celler

Glyp-GFP ligert inn i ekspresjonsvektoren pEGFP-C1 ble stabilt transfektert inn i MDCK II-celler ved hjelp av FuGENE® HD transfeksjonsreagens. Cellelinjer som overlevde seleksjonstrykket med G-418 ble sådd ut på ”Microwell”-skåler og uttrykket av glypikanvariantene i transfekterte MDCK II-celler ble studert ved hjelp av et konfokalmikroskop (figur 3.11).



Figur 3.11 glyp-GFP i MDCK II-celler. Tre stabilt transfekterte MDCK II-cellelinjer som uttrykker glyp-GFP, ble etter seleksjonstrykk med G-418 sådd ut på ”Microwell”-skåler og studert i konfokalmikroskopet.

Kun et fåtall av de transfekterte MDCK II-cellelinjene hadde et høyt nok uttrykk av glyp-GFP ved undersøkelse i konfokalmikroskopet, og disse ble valgt ut til videre undersøkelser. MDCK II-celler som stabilt uttrykte glyp-GFP ble dyrket i 25 cm² celleflasker og høstet (kapittel 2.5.6). Cellelysate ble applisert på en 4-12 % SDS-PAGE-gel og elektroforesen ble etterfulgt av WB med antistoff mot GFP (ab 6556, abcam) (figur 3.12).



Figur 3.12 glyp-GFP i MDCK II-celler. Forskjellige MDCK II-cellekolonier som stabilt uttrykker glyp-GFP ble dyrket i 25 cm² celleflasker, og etter høsting ble cellelysate applisert på en 4-12 % SDS-PAGE-gel og WB med anti-GFP ble utført. Brønn 1, MW-standard; brønn 2, cellelysate av utransfekte MDCK II-celler som kontroll; brønn 3-11, cellelysate fra forskjellige MDCK II-cellekolonier av glyp-GFP, indikert med stjerne (*), ble studert videre.

Glyp-GFP modifisert med sukkerkjeder (GAG-kjeder) vil etter WB gi et tykt og utflytende PG-bånd mellom 100 og 220 kDa, men foruten noen svake skygger i enkelte cellelinjer ble

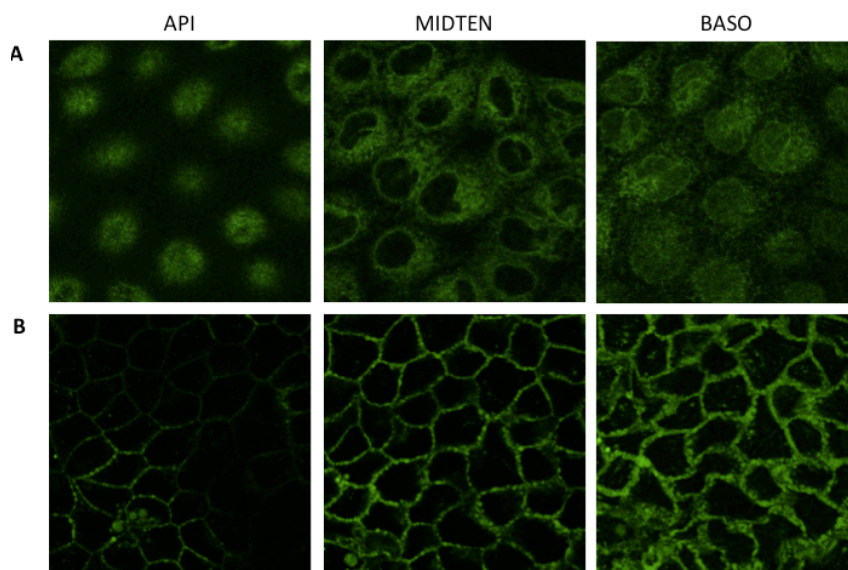
typiske PG-bånd ikke observert for noen av MDCK II-cellelinjene som uttrykte glyp-GFP. Noe overraskende ble det for enkelte cellelinjer (glyp-GFP 36, 43 og 53) kun observert et tykt proteinbånd mellom 80 og 100 kDa, noe som stemmer overrens med størrelsen på proteinkjernen til glyp-GFP som er 88,6 kDa. Det ble valgt ut to cellelinjer av glyp-GFP for videre analyser: glyp53-GFP og glyp17-GFP. Glyp17-GFP ble valgt ut, selv med manglende WB-uttrykk, på grunn av lokaliseringen av proteinet i MDCK II-celler som ble observert i konfokalmikroskopet (figur 3.11).

3.3 Analyse av glypikan

To cellelinjer av glyp-GFP stabilt transfektert i MDCK II-celler ble valgt til videre studier, og utvelgelsen ble gjort på bakgrunn av observasjoner i konfokalmikroskopet (figur 3.11) og ved WB (figur 3.12). Glypikan er et PG koblet til PM med et GPI-anker, vi ønsket derfor å lokalisere glypikan på celleoverflaten til MDCK II-celler stabilt transfektert med glyp-GFP, samt å studere eventuelle post-translasjonelle modifiseringer av PGet.

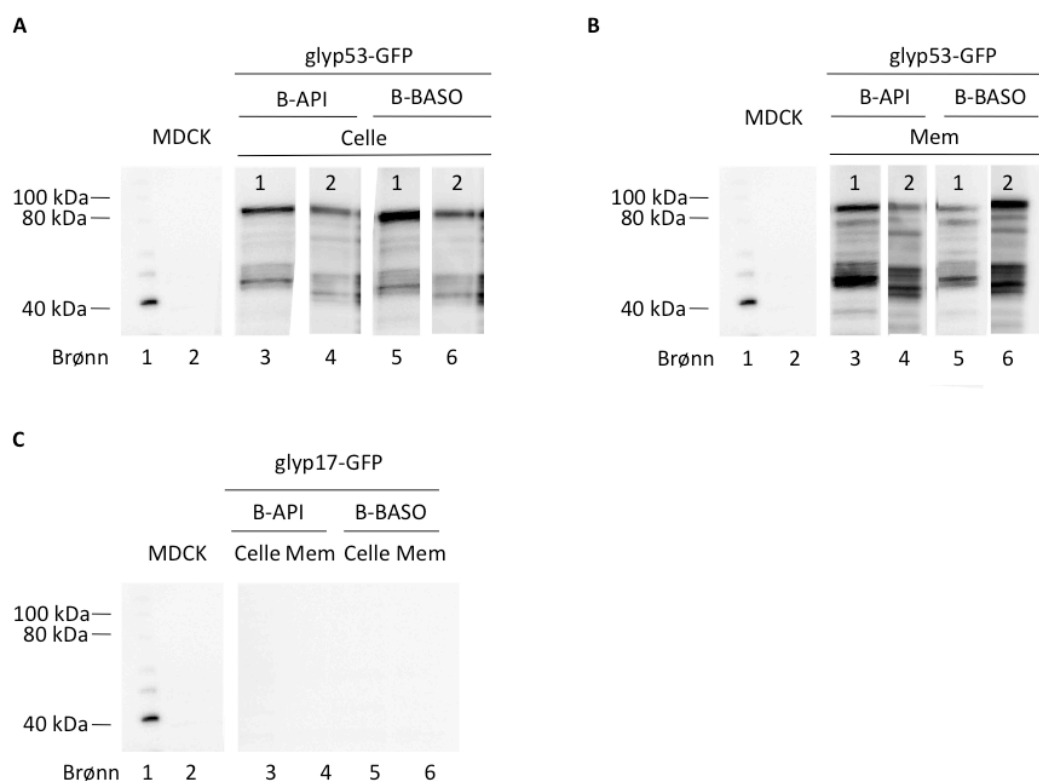
3.3.1 Membranstudie av glyp-GFP

Polariserte MDCK II-celler har både en apikal og en basolateral cellemembran, og vi ønsket å undersøke hvilket membrandomene glyp53-GFP og glyp17-GFP var lokalisert til, ved å studere de to glyp-GFP-variantene i konfokalmikroskopet (figur 3.13).



Figur 3.13 Glyp53-GFP og glyp17-GFP i MDCK II-celler. To MDCK II-cellelinjer stabilt transfektert med glyp53-GFP (A) og glyp17-GFP (B) ble sådd tett i "Microwell"-skåler og studert i konfokalmikroskopet. Det ble tatt bilder av øverste del av cellen (API), midterste del av cellen (MIDTEN) og nederste del av cellen (BASO).

I figur 3.13 A observeres glyp53-GFP hovedsakelig inne i cellen, mens glyp17-GFP observeres hovedsakelig på den basolaterale PM-siden i MDCK II-celler. For å studere membranlokalisering av glyp53-GFP og glyp17-GFP nærmere, ble også cellemembranen biotinyllert. MDCK II-celler som stabilt uttrykte glyp53-GFP og glyp17-GFP ble dyrket på filter i 3 døgn før serumfritt medium ble tilsatt ON. Cellene ble biotinyllert på den apikale eller den basolaterale siden av PM før biotinyllerte overflateproteiner ble isolert ved hjelp av streptavidinkuler, etterfulgt av SDS-PAGE og WB med anti-GFP (figur 3.14).

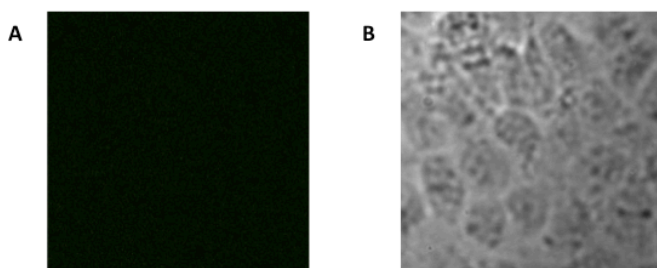


Figur 3.14 Membranlokalisering av glyp53-GFP og glyp-17-GFP. MDCK II-celler som stabilt uttrykker glyp53-GFP eller glyp17-GFP ble dyrket på filter i 3 døgn før serumfritt medium ble tilsatt ON. Celleoverflaten ble biotinyllert, enten på den apikale eller basolaterale siden av cellene, før lysing og 3/100 av cellelysatet ble tatt ut (total cellelysat = celle). Resten av cellefraksjonen ble behandlet med streptavidinkuler for isolering av biotinyllerte membranmolekyler (membran = mem), og applisert på en 4-12 % SDS-PAGE-gel sammen med total cellelysat, før WB med anti-GFP ble utført. **A** viser total mengde glyp53-GFP i cellelysatet (celle) for to uavhengige forsøk (1 og 2), mens **B** viser apikal og basolateral membranlokalisert (mem) glyp53-GFP fra de samme to forsøkene. I **C** vises total mengde glyp17-GFP i cellelysatet (celle) og apikal og basolateral membranlokalisering (mem) av glyp17-GFP. Forsøket er utført 2 ganger, men kun ett er vist for glyp17-GFP, mens for glyp53-GFP er begge forsøkene vist. B-API: Biotinyllert på apikal side av filtret, B-BASO: Biotinyllert på basolateral side av filtret.

RESULTATER

Figur 3.14 viser eksperimenter hvor det ble det undersøkt hvor mye av glyp17-GFP og glyp53-GFP som er lokalisert på den apikale eller den basolaterale membranen, samt hvor mye som er totalt i cellefraksjonen. Mengden av glyp-GFP inne i cellen (figur 3.14 A) viser at fra to uavhengige forsøk (1 og 2) er variasjonen stor fra filter til filter (se figur 3.14 A brønn 3 og 5). Figur 3.14 B viser hvor mye glyp53-GFP som er lokalisert på den apikale eller den basolaterale membranen i MDCK II-celler, og i figur 3.14 B er det en 30 ganger oppkonsentrering av prøvene i forhold til i figur 3.14 A. På tross av dette er proteinbåndene tilnærmet like sterke (1 og 2), noe som indikerer at lite av glyp53-GFP befinner seg på cellemembranen. I figur 3.14 B kan vi registrere at i forsøk 1 er det mest av glyp53-GFP på den apikale membranen (figur 3.14 B brønn 3 og 5), men i forsøk 2 er mest glyp53-GFP på den basolaterale membranen. Resultatene i figur 3.14 A og B stemmer overens med observasjonene i figur 3.13 A som også viser at glyp53-GFP hovedsakelig er lokalisert inne i cellen.

Mengde membranbundet glyp17-GFP ble sammenlignet med total mengde i cellefraksjonen, og vist i figur 3.14 C. I figur 3.13 B ble glyp17-GFP observert på PM, og hovedsakelig på den basolaterale membranen. Det er ikke mulig å detektere noe glypikan hverken i cellefraksjonen eller på membranen i figur 3.14 C. Vi sådde derfor ut glyp17-GFP på "Microwell"-skåler igjen, og gikk tilbake til konfokalmikroskopet for å studere lokaliseringen av glyp17-GFP om igjen (figur 3.15).

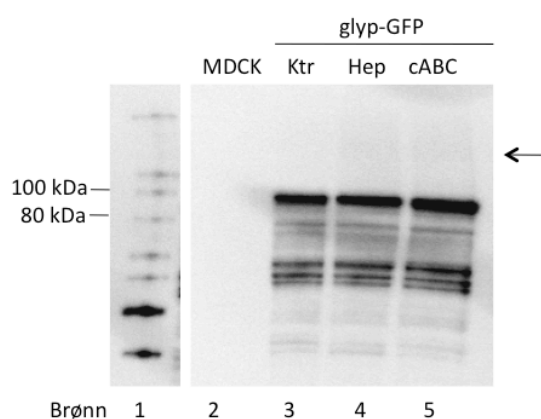


Figur 3.15 Uttrykk av glyp17-GFP i MDCK II-celler. MDCK II-celler stabilt transfektert med glyp17-GFP ble sådd ut på "Microwell"-skåler og studert i konfokalmikroskopet. **A:** viser glyp17-GFP med 488 laser og **B:** viser glyp17-GFP med transmisjonslys.

Figur 3.15 A viser ingen uttrykk av glyp17-GFP ved bruk av 488 nm laser, og dette stemmer overens med WB-analysen vist i figur 3.12 og 3.14 C, som heller ikke ga et uttrykk av glyp17-GFP, mens figur 3.15 B viser at med transmisjonslys kan cellene påvises. Etter å ha jobbet med denne klonen i lengre tid, ble arbeidet med denne, på grunn av manglende glyp17-GFP-uttrykk, avsluttet. Glyp53-GFP vil dermed videre bli omtalt som glyp-GFP.

3.3.2 GAG-analyse av glyp-GFP

Det er tidligere vist at glypikan er modifisert med HS GAG-kjeder i andre celledslag (Fransson *et al.*; 2004) og at HS-kjedene fører til en mer basolateral enn apikal lokalisering i MDCK II-celler (Mertens *et al.*; 1996). For å undersøke hvilken type GAG-kjeder som var å finne på glyp-GFP, ble MDCK II-celler som stabilt uttrykte glyp-GFP dyrket i 25 cm² celleflasker og høstet. Cellelysate ble behandlet med heparitinase, som degraderer HS GAG-kjeder som er festet til proteinkjernen, eller cABC, som degraderer CS GAG-kjeder, før applisering på en 4-12 % SDS-PAGE-gel etterfulgt av WB med anti-GFP (figur 3.16).



Figur 3.16 GAG-analyse av glyp-GFP i MDCK II-celler. MDCK II-celler stabilt transfektert med glyp-GFP ble dyrket i 25 cm² celleflasker og høstet. Samme mengde (10 µl) cellelysate ble ikke-behandlet (ktr), heparitinase-behandlet (Hep) eller cABC-behandlet (cABC). Prøvene ble så analysert på en 4-12 % SDS-PAGE-gel og WB med anti-GFP ble utført. Skyggen i området mellom 100 og 220 kDa er markert med pil. Forsøket ble gjentatt med samme resultat.

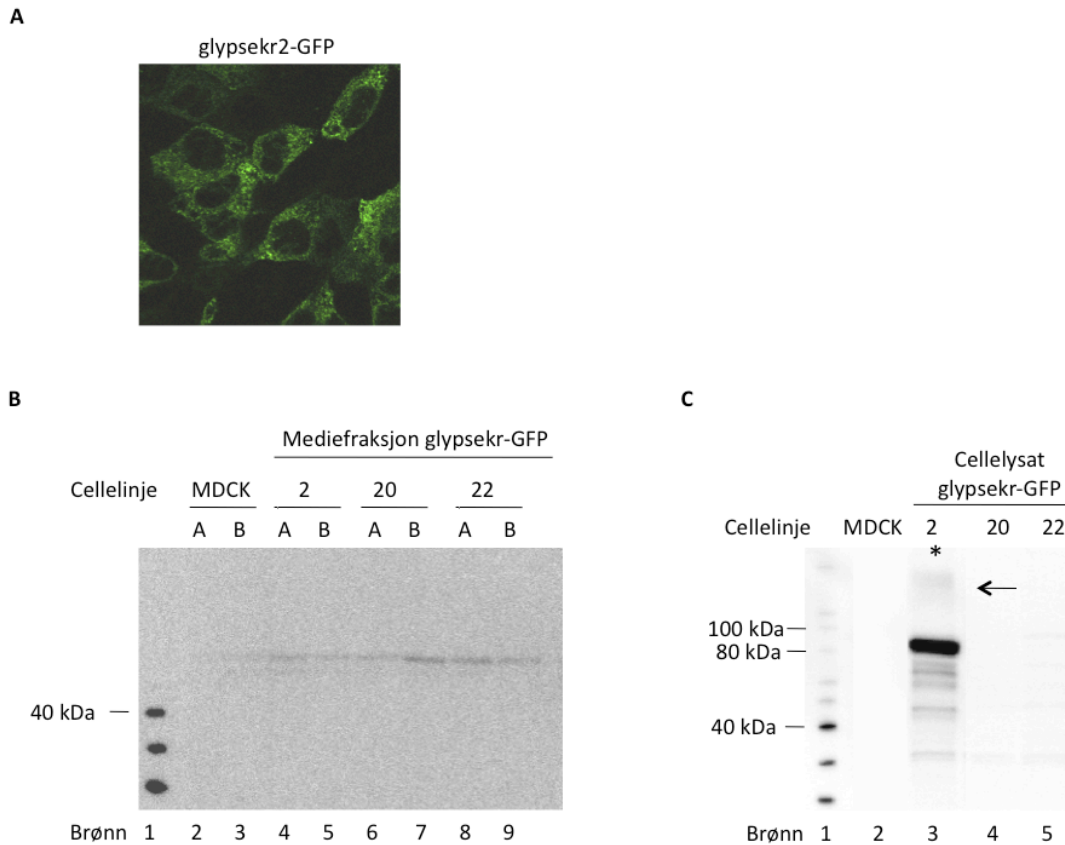
Figur 3.16 viser ingen endring av størrelsen på proteinkjernen til glyp-GFP etter degradering av HS-kjeder ved hjelp av heparitinase, eller CS-kjeder ved hjelp av cABC-behandling. Skyggen som observeres over proteinkjernen mellom 120 og 220 kDa, markert med pil, forsvinner heller ikke ved behandlingene, noe som betyr at glyp-GFP ikke har fått på seg GAG-kjeder.

Det ble også utført en [³⁵S]-sulfatinnmerkning av celler som uttrykker glyp-GFP for å se om en liten andel av glyp-GFP var glykosylert. Radioaktiv innmerkning med [³⁵S]-sulfat er en sensitiv måte å detektere GAG-kjeder på, og MDCK II-celler som stabilt uttrykker glyp-GFP ble dyrket på filter i tre døgn før inkubering med 0,2 millicurie (mCi)/ml [³⁵S]-sulfat i 24 timer. Cellelysate ble høstet før IP (kapittel 2.6.4) med anti-GFP ble utført. Cellelysate ble separert på en 4-12 % SDS-PAGE-gel, og fremkallingen av gelen viste intet signal, og dermed ingen sulfatering av glyp-GFP (data ikke vist).

For at et PG skal kunne bli modifisert med sulfaterte GAG-kjeder, må det transporteres igjennom den sekretoriske vei, og hvor GAG-kjeder polymeriseres under transport igjennom Golgi-apparatet. Det er kjent at glypikan kan endocytteres fra celleoverflaten og at GAG-kjedene da blir kuttet av, med unntak av noen få sukkerenheter, før glypikan så kan transporteres tilbake til Golgi-apparatet, der GAG-kjedene igjen kan forlenges (Fransson *et al.*; 2004). For å minimere muligheten for at GAG-kjedene på glyp-GFP ble kuttet av etter endocytose fra PM, lagde vi en sekretorisk glypikanvariant av glyp-GFP (glypsekr-GFP), som ikke kan endocytteres.

3.4 Transfeksjon og uttrykk av glypsekr-GFP i MDCK II-celler

Glypsekr-GFP ble laget som presentert i kapittel 3.1.2, ligert inn i ekspresjonsvektoren pEGFP-C1 og stabilt transfektert inn i MDCK II-celler ved hjelp av FuGENE[®] HD transfeksjonsreagens. Etter seleksjonstrykk med G-418 ble uttrykket av glypsekr-GFP i de forskjellige MDCK II-cellelinjene undersøkt ved hjelp av konfokalmikroskopi og ved WB. For undersøkelse i konfokalmikroskop ble glypsekr-GFP-cellelinjer sådd ut på "Microwell"-skåler før de ble studert i konfokalmikroskopet (figur 3.17 A). MDCK II-celler som stabilt uttrykte glypsekr-GFP ble dyrket i 25 cm² celleflasker og høstet (kapittel 2.5.6). Mediefraksjon (figur 3.17 B) og cellelysatsat (figur 3.17 C) ble applisert på en 4-12 % SDS-PAGE-gel etterfulgt av WB med antistoff mot GFP.

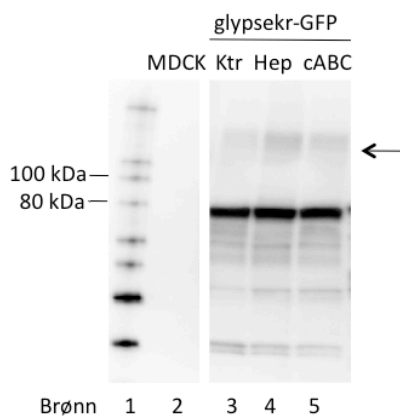


Figur 3.17 Glypsekr-GFP i MDCK II-celler. **A:** MDCK II-celler stabilt transfektert med glypsekr-GFP ble sådd ut på ”Microwell”-skåler og studert levende i konfokalmikroskopet. **B:** Tre forskjellige MDCK II-cellelinjer som uttrykker glypsekr-GFP ble dyrket på filter i 3 døgn før serumfritt medium ble tilsatt ON, mediet høstet, og applisert på en 4-12 % SDS-PAGE-gel før WB med anti-GFP. A = apikalt medium, B = basolateralt medium. **C:** 25 cm² celleflasker med MDCK II, og tre forskjellige MDCK II-cellelinjer som uttrykker glypsekr-GFP ble dyrket, og cellelysatet høstet, før applisering på en 4-12 % SDS-PAGE-gel og WB med anti-GFP. Cellelinjen som ble valgt til videre studier er indikert med stjerne (*). Pilen i C markerer skyggen som observeres.

Glypsekr-GFP forventes å bli sortert og transportert ut av cellen, så vi forventet derfor å finne et PG-bånd i mediefraksjonen. I figur 3.17 B ble ingen spesifikke PG-bånd observert for glypsekr-GFP. Det er kun bakgrunnsbånd for sekundærantistoff (NA934, abcam) som vises (data ikke vist). I cellelysatet (figur 3.17 C) ble det kun observert glypsekr-GFP-uttrykk i en cellelinje (markert med stjerne). Her observeres et proteinbånd mellom 80 og 100 kDa i tillegg til en svak skygge mellom 120 og 220 kDa (markert med pil). Glypsekr2-GFP ble valgt til videre studier og vil bli kalt glypsekr-GFP videre.

3.4.1 GAG-analyse av glypsekr-GFP

Ut fra figur 3.17 B, så vi at lite glypsekr-GFP ble transportert ut av cellen, mens det for cellelinje 2 ble sett et tydelig bånd i WB i cellelysate og i tillegg en skygge mellom 120 og 220 kDa som kunne representere glypsekr-GFP modifisert med GAG-kjeder (markert med pil) (figur 3.17 C, brønn 2). MDCK II-celler som stabilt uttrykte glypsekr-GFP ble derfor dyrket i 25 cm² celleflasker og høstet. Cellelysate ble behandlet med heparitinase, som degraderer HS GAG-kjeder, eller cABC, som degraderer CS GAG-kjeder, før applisering på en 4-12 % SDS-PAGE-gel og WB med anti-GFP (figur 3.18).



Figur 3.18 GAG-analyse av glypsekr-GFP. MDCK II-celler stabilt transfektert med glypsekr-GFP ble dyrket i 25 cm² celleflasker og høstet. Lik mengde (10 µl) cellelysate ble ikke-behandlet (ktr), heparitinase-behandlet (Hep) eller cABC-behandlet (cABC), og applisert på en 4-12 % SDS-PAGE-gel for WB med anti-GFP ble utført. Skyggen mellom 100 og 220 kDa er indikert med pil. To separate forsøk ble utført, og begge ga samme resultat.

Figur 3.18 viser ingen endring i størrelsen til glypsekr-GFP ved behandling med heparitinase eller cABC, og skyggen mellom 100 og 220 kDa endres ikke i intensitet, noe som betyr at glypsekr-GFP ikke har GAG-kjeder bundet til proteinkjernen.

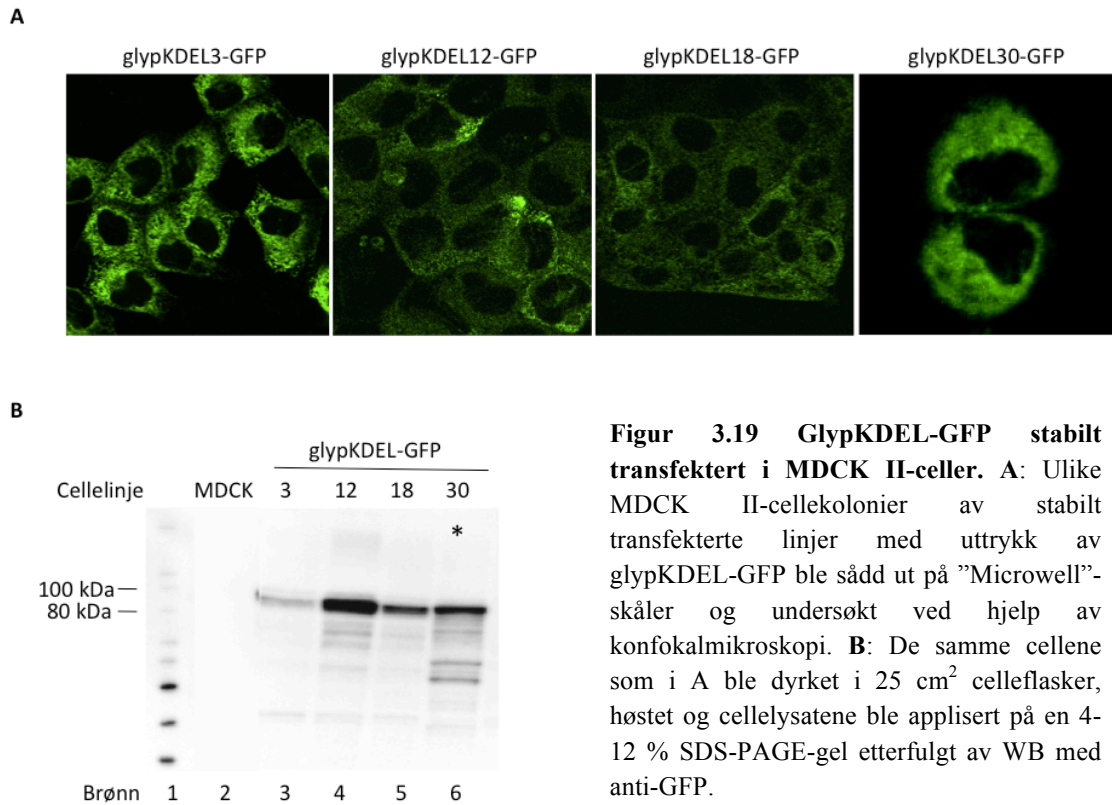
Det ble også utført [³⁵S]-sulfatinnmerking på glypsekr-GFP for å undersøke om det var målbar inkorporering av sulfat i glypsekr-GFP. Dette ble utført ved at MDCK II-celler med stabilt uttrykk av glypsekr-GFP ble dyrket på filter i tre døgn før inkubering med 0,2 mCi/ml [³⁵S]-sulfat i 24 timer. Cellelysate ble høstet før IP (kapittel 2.6.4) med anti-GFP ble utført. Prøvene ble etter IP applisert på en 4-12 % SDS-PAGE-gel. Etter fremkalling var det ikke mulig å påvise sulfatering av glypsekr-GFP (data ikke vist). Det var dermed ikke mulig å påvise GAG-kjeder på glypsekr-GFP.

3.5 Transfeksjon og uttrykk av glypKDEL-GFP i MDCK II-celler

I MDCK II-celler med stabilt uttrykk av glyp-GFP ble det rekombinante PGet hovedsakelig observert inne i cellen og var heller ikke påviselig modifisert med GAG-kjeder (figur 3.16). En sekretorisk glypikanvariant ble laget for å utelukke en endocytose av PGet og degradering av GAG-kjeder, men heller ikke denne glypikanvarianten ble transportert ut av cellen eller ble modifisert med GAG-kjeder (figur 3.18), den ble kun observert inne i cellen i konfokalmikroskopet og kunne ikke påvises i mediet ved WB. Det så ut til at både glyp-GFP og glypsekr-GFP befant seg inne i cellen og kanskje ikke engang kom ut av ER. Det var derfor interessant å sammenlikne disse med en tredje variant av glypikan med en KDEL-sekvens helt C-terminalt. KDEL-sekvensen gjør at proteinet oppholder seg tidlig i den sekretoriske vei, der det sirkulerer mellom ER og tidlig i Golgi-apparatet på grunn av KDEL-reseptorer i post ER-organelle som vil føre løselige proteiner med KDEL-sekvens tilbake til ER ved hjelp av vesikkeltransport. GlypKDEL-GFP er en løselig glypikanvariant der GPI-ankeret er fjernet og KDEL-sekvensen er satt på helt C-terminalt (figur 3.2 C).

GlypKDEL-GFP ble laget som beskrevet i kapittel 3.1.2, ligert inn i ekspresjonsvektoren pEGFP-C1 og stabilt transfektert inn i MDCK II-celler ved hjelp av FuGENE[®] HD transfeksjonsreagens. Etter seleksjonstrykk med G-418 ble uttrykket til glypKDEL-GFP i de transfekterte MDCK II-celle undersøkt ved hjelp av konfokalmikroskopi og WB. MDCK II-celler som stabilt uttrykte glypKDEL-GFP ble sådd ut i ”Microwell”-skåler for levende undersøkelse i konfokalmikroskopet (figur 3.19 A) og ble dyrket i 25 cm² celleflasker og høstet (kapittel 2.5.6) for WB-analyse. Cellelysaten ble applisert på en 4-12 % SDS-PAGE-gel før WB med anti-GFP ble utført (figur 3.19 B).

RESULTATER



Figur 3.19 GlypKDEL-GFP stabilt transfektert i MDCK II-celler. **A:** Ulike MDCK II-cellekolonier av stabilt transfekterte linjer med uttrykk av glypKDEL-GFP ble sådd ut på "Microwell"-skåler og undersøkt ved hjelp av konfokalmikroskopi. **B:** De samme cellene som i A ble dyrket i 25 cm² celleflasker, høstet og cellelysaten ble applisert på en 4-12 % SDS-PAGE-gel etterfulgt av WB med anti-GFP.

GlypKDEL-GFP forventes å bli funnet i cellefraksjonen, siden proteinkjerne holdes tilbake av KDEL-reseptorer i den tidlige sekretoriske vei. I figur 3.19 A viste glypKDEL-GFP en forventet lokalisering inne i cellen. Fire cellelinjer av glypKDEL-GFP (3, 12, 18 og 30) ble valgt ut etter undersøkelser i konfokalmikroskop, og ble nærmere studert ved WB. GlypKDEL30-GFP i figur 3.19 B, indikert med stjerne (*), ble valgt for videre studier og vil bli kalt glypKDEL-GFP i resten av oppgaven.

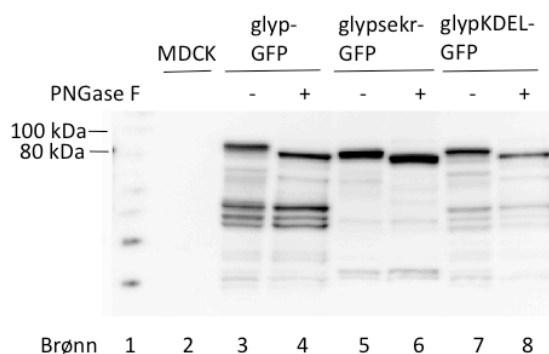
GlypKDEL-GFP er et molekyl som skal oppholde seg tidlig i den sekretoriske vei, og returnerer til ER og har dermed hovedsakelig en ER-lokalisering. Både figur 3.13 A av glyp-GFP og figur 3.17 A av glypsekr-GFP, ser ut til å ha samme lokalisering som glypKDEL-GFP, noe som indikerer at disse proteinene antagelig ikke kommer ut av ER.

3.6 N-glykaner

Ved undersøkelser i konfokalmikroskopet og ved hjelp av WB ble det observert at glyp-GFP, glypsekr-GFP og glypKDEL-GFP var lokalisert inne i cellen. Glyp-GFP ble observert hovedsakelig inne i cellen når celleoverflateproteiner ble biotinyleret og anriket ved hjelp av streptavidinkuler (figur 3.14 A og B). Det var forventet å finne glypsekr-GFP i mediefraksjonene, men glypsekr-GFP ble kun observert inne i cellen ved WB-analyse, det vil si i totalt cellelysat (figur 3.17). I tillegg hadde hverken glyp-GFP eller glypsekr-GFP blitt modifisert med GAG-kjeder (figur 3.16 og 3.18). Selv om glypikanvariantene ikke kom ut av ER, blir N-glykaner syntetisert og satt på glykoproteiner i ER, og siden glypikan har to potensielle N-glykanseter, ønsket vi å undersøke om glypikanvariantene hadde påsatte N-glykaner.

3.6.1 Identifisering av N-glykaner på glypikanvarianter

Humant glypikan har to potensielle N-glykanseter (se figur 3.2). For å undersøke om glyp-GFP, glypsekr-GFP og glypKDEL-GFP var N-glykosylerte, ble cellelysater behandlet med PNGase F, som er et enzym som fjerner N-glykaner fra glykoproteiner (kapittel 2.6.7). Glyp-GFP, glypsekr-GFP og glypKDEL-GFP ble dyrket i 25 cm² celleflasker og høstet. Cellelysatet ble behandlet med PNGase F før applisering på en 4-12 % SDS-PAGE-gel, etterfulgt av WB med anti-GFP (figur 3.20).



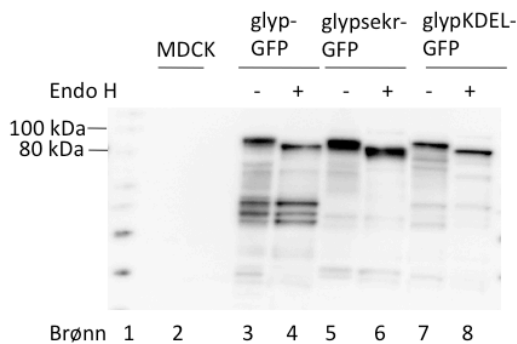
Figur 3.20 N-glykan-analyse av glypikanvarianter i MDCK II-celler. MDCK II-celler som stabilt uttrykker glyp-GFP, glypsekr-GFP og glypKDEL-GFP ble dyrket i 25 cm² celleflasker og høstet, før cellelysatet ble behandlet med PNGase F og applisert på en 4-12 % SDS-PAGE-gel og WB med anti-GFP ble utført. Cellelysat fra ubehandlede MDCK II-celler er tatt med som kontroll i brønn 2. Figuren viser en representativ gel fra tre uavhengige forsøk.

Det observeres en reduksjon i molekylmassen til glyp-GFP, glypsekr-GFP og glypKDEL-GFP etter behandling med PNGase F, noe som viser tilstedeværelse av N-glykan(er) på proteinet.

3.6.2 Modifisering av N-glykaner

Det ble påvist N-glykaner på proteinkjernen til alle tre glypikanvariantene (figur 3.20). Ved nærmere undersøkelse av N-glykaner kan vi få informasjon om hvor langt langs den sekretoriske vei glypikanvariantene har blitt transportert. N-glykaner modifiseres fra høy-mannosestruktur til en mer kompleks N-glykanstruktur en gang før *medial*-Golgi. For å skille mellom de ulike strukturene og dermed også identifisere hvor langt i den sekretoriske vei glypikanvariantene var kommet, ble endoglykosidase (Endo) H benyttet. Endo H er en glykosidase som kløyver bindingen mellom de to første sukkerne etter asparagin på høy-mannose og enkelte hybride glykostrukturer. Glykoproteiner er sensitive for Endo H-behandling når de har en høy-mannose og/eller hybrid N-glykanstruktur (GlcNAc₂Man₅GlcNAc), mens de er resistente for Endo H-behandling når de har en kompleks N-glykanstruktur (GlcNAc₂Man₃GlcNAc), som de får i siste del av Golgi-apparatet.

For å undersøke dette, ble MDCK II-celler med stabilt uttrykk av glyp-GFP, glypsekr-GFP og glypKDEL-GFP dyrket i 25 cm² celleflasker og høstet. Cellelysaten ble behandlet med Endo H før applisering på en 4-12 % SDS-PAGE-gel og WB med anti-GFP ble utført (figur 3.21).

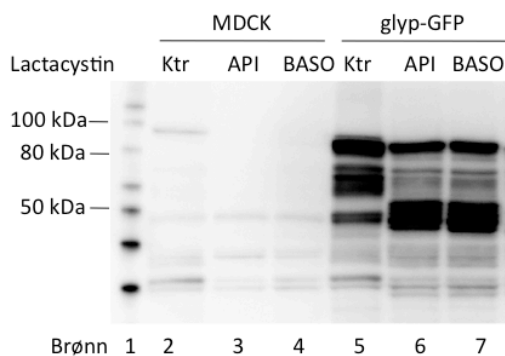


Figur 3.21 N-glykan-strukturanalyse av glypikanvarianter i MDCK II-celler. MDCK II-celler med stabilt uttrykk av glyp-GFP, glypsekr-GFP og glypKDEL-GFP ble dyrket i 25 cm² celleflasker og høstet. Cellelysaten ble behandlet med Endo H før applisering på en 4-12 % SDS-PAGE-gel og WB med anti-GFP. Cellelysate fra ubehandlede MDCK II-celler er tatt med som kontroll i brønn 2. Forsøket er utført to ganger, med samme resultat.

Alle glypikanvariantene var sensitive for behandling med Endo H, noe som indikerer at glyp-GFP, glypsekr-GFP og glypKDEL-GFP ikke har oppnådd en kompleks N-glykanstruktur, men har en høy-mannose eller hybrid struktur og befinner seg dermed tidlig i den sekretoriske vei, i ER eller et sted tidlig i Golgi-apparatet.

3.7 Fører GFP til feilfolding av glypikankonstruktene?

Glyp-GFP var sensitiv for Endo H-behandling, noe som kan indikere at GFP kan påvirke strukturen til glypikan og mulig forårsake en feilfolding av proteinet, som igjen fører til at proteinet ikke transporteres videre i den sekretoriske vei, men heller blir sendt til ERAD i cytoplasma, for degradering i proteasomet. For å undersøke dette ble MDCK II-celler som stabilt uttrykker glyp-GFP behandlet med lactacystin, som er en selektiv hemmer av proteasomet, og som uten hemmer tilstedet gir degradering av ubiquitinylerede proteiner. MDCK II-celler som stabilt uttrykker glyp-GFP ble dyrket på filter i tre døgn før serumfritt medium med 5 μ M lactacystin ble tilsatt enten apikalt eller basolateralt. Cellelysate ble høstet etter 18 timer og applisert på en 4-12 % SDS-PAGE-gel før WB med anti-GFP ble utført (figur 3.22).

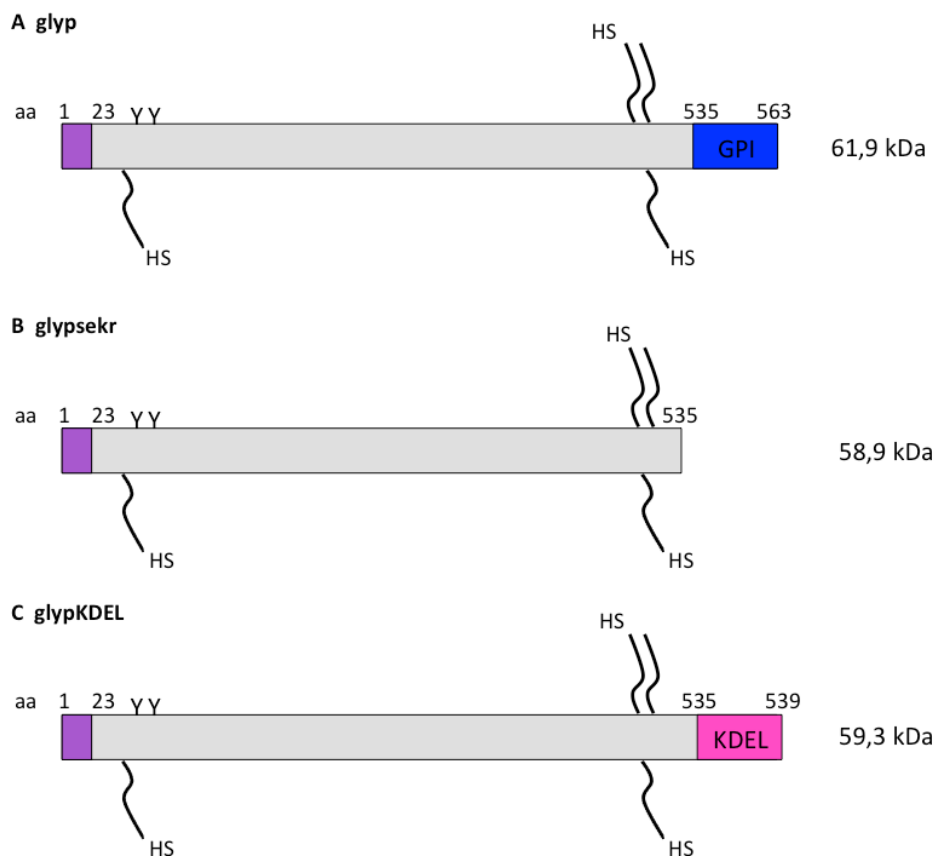


Figur 3.22 Lactacystin-behandling av MDCK II-celler med uttrykk av glyp-GFP og glypsekr-GFP. MDCK II-celler som stabilt uttrykker glyp-GFP ble dyrket på filter i tre døgn før serumfritt medium med 5 μ M lactacystin ble tilsatt apikalt (API) eller basolateralt (BASO). Ktr viser til serumfritt medium uten lactacystin. Cellelysate fra ubehandlede MDCK II-celler er tatt med som kontroll i brønn 2-4. Etter 18 t lactacystin-behandling, ble cellelysate høstet og applisert på en 4-12 % SDS-PAGE-gel før WB med anti-GFP ble utført.

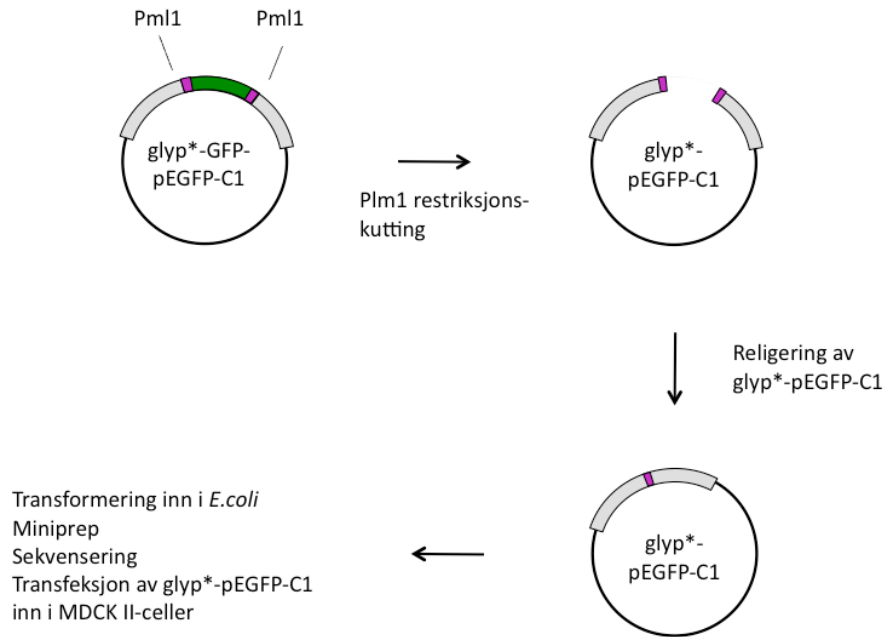
En reduksjon av proteinkjernen til glyp-GFP ses ved behandling med lactacystin. Dette indikerer at hemming av proteasomet ikke gir en økt proteinmengde av glyp-GFP. Et proteinbånd ved ca 50 kDa får en kraftig økning ved lactacystin-behandling.

3.8 Subkloning av glypikan

Siden GFP var satt inn i det globulære domenet til glypikanvariantene, og på grunn av mange potensielle disulfidbroer i dette området, kan GFP muligens påvirke sortering og modifisering av glyp-GFP og glypsekr-GFP ved å påvirke foldingen av proteinet. Det ble derfor laget enda tre nye konstrukt av glypikan uten GFP. En oversikt over konstruktene er vist i figur 3.23, mens en oversikt over selve kloningsprosessen sees i figur 3.24.



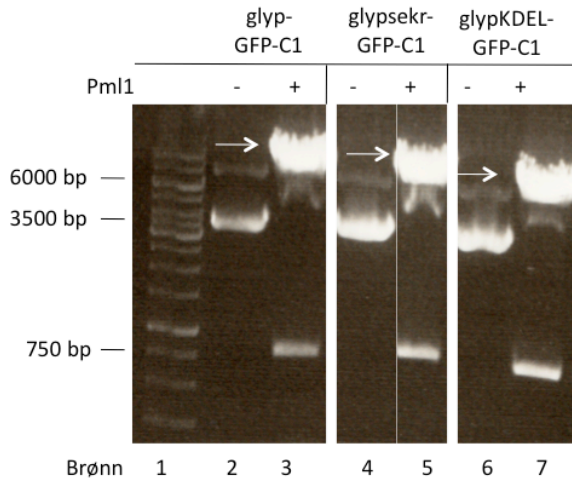
Figur 3.23 Oversikt over glyp-konstruktene. **A:** Human glypikan har en proteinkjerne på 61,9 kDa. **B:** Den sekretoriske glypikanvarianten (glypsekr) har en proteinkjerne på 58,9 kDa. **C:** Den sekretoriske glypikanvarianten med et være-i-ER-signal (glypKDEL) har en proteinkjerne på 59,3 kDa. N-glykanfesteseter for alle glypikanvariantene er på aa 79 og 116. HS-festeseter er på aa 55, 486, 488 og 490. Størrelsesforhold er ikke tatt hensyn til i denne figuren. glyp: Glypikan, GPI: Glykosylfosfatidylinositol, HS: Heparansulfat, aa: Aminosyre, glypsekr: sekretorisk glypikan, KDEL: enbokstavforkortelse av aminosyrene lysin-aspartat-glutamat-leucin, kDa: kiloDalton, Y: N-glykansete.



Figur 3.24 Subkloning av glypikankonstrukter. GFP ble kuttet ut av alle glypikan-GFP-varianter vist i figur 3.2, ved hjelp av restriksjonsenzymet Pml1, som ble benyttet da GFP ble satt inn i glypikan. Vektoren ble deretter religert og sendt til sekvensering. Plasmid med rett sekvens ble transfektert inn i MDCK II-celler. Merknaden * i figuren indikerer enten glyp, glypsekr eller glypKDEL.

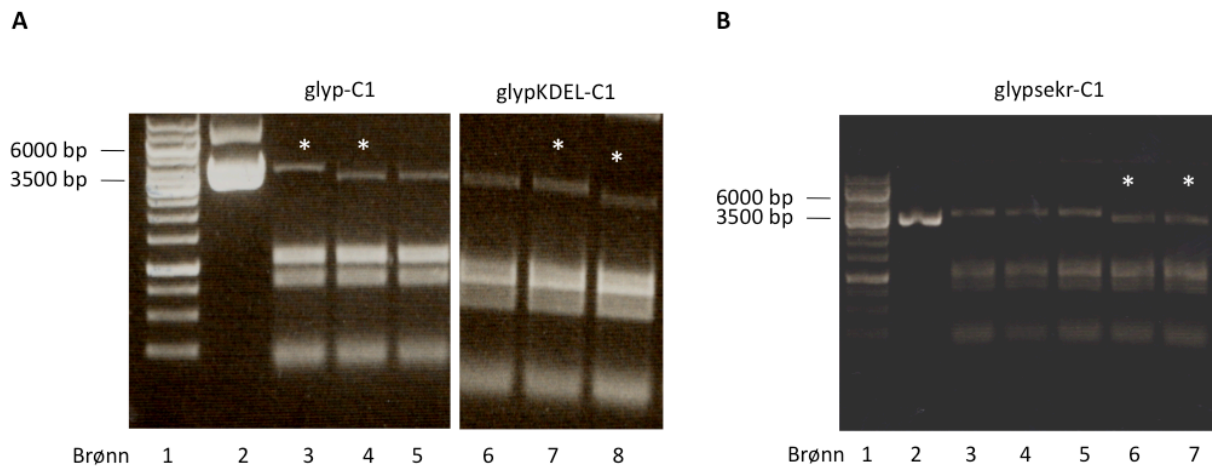
For å kutte ut GFP fra glyp-GFP-C1-, glypsekr-GFP-C1- og glypKDEL-C1-konstruktene ble de behandlet med restriksjonsenzymet Pml1 (vedlegg 4) før applisering på en 0,8 % agarosegel (figur 3.25). Restriksjonsenzymanalyse med Pml1 vil gi to DNA-fragmenter, med et DNA-fragment på 750 bp, som er GFP, og et på 5,7 kb, som er linearisert glypsekr-C1 eller glypKDEL-C1. Lineariserte konstrukt uten GFP indikert med stjerne (*) i figur 3.25 ble kuttet ut av gelen og rensset opp ved hjelp av et gelekstraksjonskit.

RESULTATER



Figur 3.25 Restriksjonsanalyse av glyp-GFP-C1, glypsekr-GFP-C1 og glypKDEL-GFP-C1. Restriksjonsenzymet PmlI kutter ut GFP fra alle tre glypikankonstruktene, og etter fjerning av GFP ble resterende DNA-fragmenter (se pil) kuttet ut av gelen, rensset og religert.

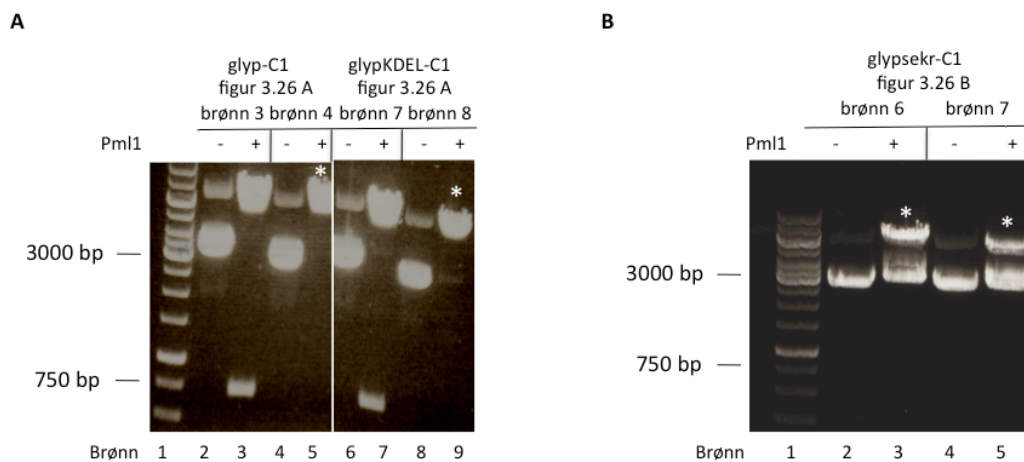
De isolerte lineariserte DNA-fragmentene glyp-C1, glypsekr-C1 og glypKDEL-C1 ble religert før de ble transformert inn i kompetente *E.coli*-celler og strøket ut på vekstskåler tilsatt kanamycin. Bakteriekolonier ble plukket og dyrket opp i ON-kulturer før kvikksjekk ble utført for å verifisere plasmid med riktig størrelse (figur 3.26). Plasmid indikert med pil ble videre undersøkt.



Figur 3.26 Kvikksjekk av glyp-C1, glypKDEL-C1 og glypsekr-C1. Flere bakteriekolonier transformert med **A:** glyp eller glypKDEL samt **B:** glypsekr, ble behandlet med en fenol/kloroformløsning før den vandige fasen med nukleinsyrene ble applisert på en 0,8 % agarosegel. To kolonier fra hvert glypikankonstrukt, indikert med stjerne (*), ble undersøkt videre.

To plasmid fra glyp-C1 (figur 3.26 A brønn 3 og 4), glypsekr-C1 (figur 3.26 B brønn 6 og 7) og glypKDEL-C1 (figur 3.25 A brønn 7 og 8) ble isolert og restriksjonskuttet med PmlI før applisering på en 0,8 % agarosegel (figur 3.27). Plasmid med riktig størrelse vil kun gi et linearisert DNA-molekyl på 5689 bp (glyp), 5605 bp (glypsekr) og 5617 bp (glypKDEL). I

figur 3.27 A har plasmid i brønn 5 (korresponderende til brønn 4 i figur 3.26 A) og 9 (korresponderende til brønn 8 i figur 3.26 A) blitt linearisert og har dermed riktig størrelse. I figur 3.27 B har hverken brønn 3 eller 5 (korresponderende til henholdsvis brønn 6 og 7 i figur 3.26 B) GFP i plasmidet og har dermed riktig størrelse. Plasmid med riktig størrelse, indikert med stjerne (*) i figur 3.27, ble sendt til sekvensering.



Figur 3.27 Restriksjonsanalyse av glyp-C1, glypKDEL-C1 og glypsekr-C1. Isolerte og rensede **A:** glyp- og glypKDEL- og **B:** glypsekr-plasmid ble behandlet med restriksjonsenzymet Pml1 etterfulgt av applisering på en 0,8 % agarosegel. Plasmid med riktig størrelse er indikert med stjerne (*) og disse ble sendt videre til sekvensering.

3.9 Transfeksjon av glyp i MDCK II-celler

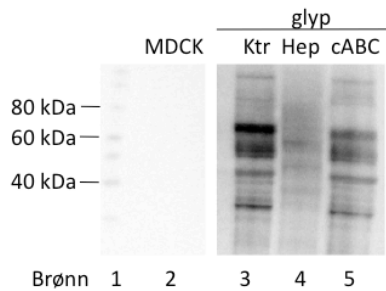
Glyp ligert inn i ekspressjonsvektoren pEGFP-C1 ble stabilt transfektert inn i MDCK II-celler ved hjelp av FuGENE[®] HD transfeksjonsreagens. Under tillaging av fortynningsrekken (kapittel 2.5.8) av de stabilt transfekterte MDCK II-celle vokste cellekoloniene så fort at de vokste i hverandre. På grunn av tidsperspektivet en masteroppgave har, ble en 10 cm² petriskål trypsinert og cellene ble overført til en 75 cm² celleflaske med seleksjonsageneset G-418 tilsatt mediet.

3.9.1 Identifisering av GAG-kjeder på glypikan

Det er tidligere vist at glypikan kan ha HS GAG-kjeder bundet til proteinkjernen (Fransson *et al.*; 2004), og siden hverken glyp-GFP eller glypsekr-GFP hadde GAG-kjeder (figur 3.16 og 3.18), ønsket vi å undersøke om glyp uten GFP ble modifisert med GAG-kjeder. MDCK II-

RESULTATER

celler transfektert med glyp ble dyrket i 75 cm² celleflasker og høstet (kapittel 2.5.6). Cellelysate ble behandlet med heparitinase, som degraderer HS GAG-kjeder, eller cABC som degraderer CS GAG-kjeder, før applisering på en 4-12 % SDS-PAGE-gel etterfulgt av WB med antistoff mot glypikan (figur 3.28).



Figur 3.28 Identifisering av GAG-kjeder på glyp i MDCK II-celler. Transfekterte MDCK II-celler med glyp ble dyrket i 75 cm² celleflasker og høstet. Cellelysate ble behandlet med heparitinase (hep) eller cABC, før applisering på en 4-12 % SDS-PAGE-gel og WB med antistoff rettet mot humant glypikan ble benyttet. Ktr: ubehandlet cellelysate med glyp. Cellelysate fra utransfekterte MDCK II-celler er tatt med som kontroll i brønn 2. Forsøket er kun utført en gang.

I figur 3.27 ble det observert en kraftig reduksjon av glyp etter behandling med heparitinase. Heparitinase degraderer HS GAG-kjeder og reduksjonen observert i figur 3.28 tyder på at glyp har HS GAG-kjeder bundet til proteinkjernen.

4 DISKUSJON

Nysyntetiserte proteiner som skal transporteres til PM, lysosomer, endosomer eller ut av cellen, beveger seg gjennom den sekretoriske vei, hvor de underveis passerer ulike sorteringsstasjoner og gjennomgår ulike post-translasjonelle modifiseringer. PGer er proteiner som modifiseres med lange lineære sukkerkjeder, GAG-kjeder, mens glykoproteiner er proteiner som modifiseres med korte forgrenede sukkerkjeder. PGer kan også være glykoproteiner, fordi de i tillegg til GAG-kjeder også kan bære andre glykaner. PGer kan være membranbundne, enten med et transmembrant domene eller via et GPI-anker. Sett i en fysiologisk sammenheng har den apikale siden av epitelceller ansvar for epitelets spesialiserte oppgaver. For eksempel er epitelceller i tarmen aktive i opptak av næringsstoffer på den apikale siden og forankret til ECM på den basolaterale siden, som også står i kontakt med blodtilførselen. PGer som skilles ut av cellen basolateralt kan være viktige bestanddeler i ECM, mens andre PGer, som det transmembrane PGet syndekan, er med på å forankre cellene i ECM. Sekretoriske proteiner vil ved tette cellelag transporteres enten til den apikale eller den basolaterale siden av cellemonolaget i polariserte MDCK II-celler. De vanligste GAG-kjedene bundet til PG-proteinkjerner er CS- og HS-kjeder, men lite er kjent om hva som bestemmer hvilken type GAG-kjede som dannes på et gitt modifiseringssete.

I forskningsgruppen er det tidligere studert syntese, transport og sortering av sekretoriske og transmembrane PGer i MDCK II-celler, og det var nå ønskelig å studere dette også for det GPI-forankrede PGet glypikan. Siden det er kjent at full-lengde glypikan kan endocytteres og at GAG-kjedene kan bli degradert, før glypikan kan transporteres tilbake til Golgi-apparatet og bli modifisert med nye GAG-kjeder, ble det også laget en sekretorisk glypikanvariant. I den sekretoriske glypikanvarianten ble GPI-ankeret fjernet, og det var ønskelig å sammenligne GAG-sammensetningen og sulfateringsgraden i denne glypikanvarianten med full-lengde glypikan. I tillegg var det ønskelig å undersøke modifiseringer som skjer tidlig i den sekretoriske vei, og det ble derfor laget en sekretorisk glypikanvariant med en KDEL-sekvens helt C-terminalt, som vil gjøre at denne glypikanvarianten sirkulerer mellom ER og tidlig i Golgi-apparatet. For å kunne studere PGet i et konfokalmikroskop, ble GFP satt inn omtrent midt i proteinet og etter aminosyre 320, på de tre glypikanvariantene.

Tidligere studier av glypikan har vist at PGet hovedsakelig er lokalisert på den basolaterale siden av epitelcellelaget (Mertens *et al.*; 1996). Ved undersøkelse i konfokalmikroskopet viste glyp53-GFP (figur 3.13 A) en noe uventet lokalisering inne i cellen, mens glp17-GFP (figur 3.13 B) viste en celleoverflatelokalisering og da hovedsakelig til den basolaterale siden av epitelcellelaget, som stemmer med tidligere observerte studier av glypikan (Mertens *et al.*; 1996). For å undersøke celleoverflatelokaliseringen til de to glypikanvariantene nærmere, og se på hvor mye av glyp53-GFP og glyp17-GFP som var lokalisert inne i cellen, ble celleoverflatemolekyler biotinyleret og felt ut ved hjelp av streptavidinkuler. Resultatet viste at mengden glyp53-GFP inne i cellen (figur 3.14 A) varierer fra filter til filter (se figur 3.14 A brønn 3 og 5). Figur 3.14 B viste hvor mye glyp53-GFP som var lokalisert på den apikale eller basolaterale membranen, og her var prøvene oppkonsentrert 30 ganger i forhold til 3.14 A. På tross av dette er proteinbåndene omtrent like sterke (figur 3.14 forsøk 1 og 2), noe som indikerer at kun en liten andel av glyp53-GFP kommer ut til den apikale eller den basolaterale membranen. I figur 3.14 B forsøk 1, viste glyp53-GFP en lokalisering til den apikale membranen, mens forsøk 2 viste at mest glyp53-GFP var på den basolaterale membranen. Resultatene av dette siste forsøket stemmer med observasjonene gjort i figur 3.13 A, der glyp53-GFP var lokalisert inne i cellen. Siden forsøket kun er utført to ganger, og har gitt varierende resultater, i tillegg til at andre i forskningsgruppen har hatt problemer ved bruk av samme metode, kreves det en optimalisering av metoden for å kunne få mer innsikt i sorteringen av glyp53-GFP til den apikale eller basolaterale membranen. Glyp17-GFP viste lite proteinuttrykk både i den totale cellefraksjonen og på celleoverflaten (figur 3.14 C), etter at celleoverflateproteiner var biotinyleret og felt med streptavidinkuler. Dette tyder på at MDCK II-cellene kan ha "mistet" uttrykket av glyp17-GFP, som også ble bekreftet ved ny undersøkelse i konfokalmikroskopet som viste et tett cellelag med transmisjonslys (figur 3.15 B), men som ikke viste noe uttrykk når 488 nm laser ble benyttet (figur 3.15 A). Arbeid med denne klonen ble derfor avsluttet.

Ferdig syntetiserte PGer har lange lineære GAG-kjeder, og det er vist at glypikan er modifisert med HS GAG-kjeder (Mertens *et al.*; 1996). For å undersøke dette ble glyp-GFP dyrket tette i 25 cm² celleflasker, før cellelysatsen ble behandlet med heparitinase eller cABC, som henholdsvis degraderer HS GAG-kjeder og CS GAG-kjeder. Resultatene indikerte at glyp-GFP ikke hadde blitt modifisert hverken med HS eller CS GAG-kjeder (figur 3.16). I tillegg ble det utført en [³⁵S]-sulfatinnmerking i 24 timer, for å bruke en alternativ metode til

å undersøke om eventuelle GAG-kjeder kunne være modifisert med sulfat, siden radioaktiv innmerkning er en svært sensitiv metode for påvisning av GAG-kjeder. Resultatet viste ingen sulfatering av glyp-GFP (data ikke vist), og dataene ga samme indikasjon som figur 3.16, som viser at glyp-GFP ikke har GAG-kjeder bundet til proteinkjernen. Når dette settes i sammenheng med biotinyleringsforsøk av glyp-GFP (figur 3.14 B), som viste at kun en liten andel glyp-GFP ankom PM, kan dette tyde på at glyp-GFP ikke har blitt sortert og transportert til Golgi-apparatet der HS-kjeder blir syntetisert, mens en liten andel har nådd celleoverflaten ved å ta en alternativ rute utenom Golgi-apparatet. Denne "Golgi bypass"-ruten har også blitt registrert for andre proteiner (Nickel and Rabouille; 2009; Nickel; 2010) og er vist å eksistere også i MDCK II-celler (Tveit *et al.*; 2009).

Den uventede lokaliseringen av glyp-GFP inne i cellen, observert i konfokalmikroskop (figur 3.13 A), i tillegg til at PGet ikke var modifisert med GAG-kjeder, førte til at vi ville se nærmere på den sekretoriske glypikanvarianten, hvor GPI-ankret er fjernet. Et sekretorisk protein vil normalt sorteres ut av cellen, og det ble forventet at den sekretoriske glypikanvarianten skulle finnes både i mediefraksjonen og i cellefraksjonen. Resultatene viste derimot at glypsekr-GFP ikke var å finne i mediefraksjonen (figur 3.17 B), men ble noe uventet funnet i cellelysatsen (figur 3.17 C). For å undersøke om glypsekr-GFP var modifisert med GAG-kjeder, ble den totale cellefraksjonen behandlet med heparitinase og cABC. Resultatene viste at glypsekr-GFP ikke var modifisert hverken med HS eller CS GAG-kjeder. I tillegg ble glypsekr-GFP [³⁵S]-sulfatinnmerket i 24 timer, for å undersøke om eventuelle GAG-kjeder kunne være modifisert med sulfat, da radioaktiv innmerkning er den mest sensitive måten å påvise GAG-kjeder på. Resultatet viste ingen målbar sulfatering (data ikke vist), og dataene gir samme indikasjon som figur 3.18, som viser at glypsekr-GFP ikke har bundet GAG-kjeder til proteinkjernen.

Det at hverken glyp-GFP eller glypsekr-GFP viste en forventet lokalisering og ingen modifisering med GAG-kjeder, førte til at vi ville undersøke en glypikanvariant med en KDEL-sekvens helt C-terminalt, som naturlig vil sirkulere tidlig i den sekretoriske vei, mellom ER og tidlig i Golgi-apparatet, på grunn av KDEL-reseptorer i post-ER organeller. Resultatene viste en lokalisering av glypKDEL-GFP inne i cellen ved studier i konfokalmikroskopet (figur 3.19 A) og ved WB-analyse (figur 3.19 B). Denne lokaliseringen

kunne skyldes KDEL-retensjonssignalet eller kunne ha samme årsak som for glyp-GFP og glypsekr-GFP.

Alle de tre glypikanvariantene lokaliserer seg inne i cellen ved studier i konfokalmikroskopet (figur 3.13 A, 3.17 A og 3.19 A), og på grunn av denne like sammenfallende intracellulære lokaliseringen, i tillegg til manglende transport av glyp-GFP og glypsekr-GFP til henholdsvis PM og ut i mediet, ville vi undersøke prosesser tidlig i den sekretoriske vei nærmere. Når proteinet først translokteres over ER-membranen, mens det fortsatt syntetiseres på ribosomer, kan N-glykangrupper bli satt på proteinets N-glykanseter (Kornfeld and Kornfeld; 1985), etter at den N-terminale signalsekvensen er spaltet av (Walter and Johnson; 1994). Glypikan har to potensielle seter for N-glykanmodifisering og resultatene viste en reduksjon i molekylmassen til alle de tre glypikanvariantene (figur 3.20), når de ble behandlet med PNGase F, et enzym som kutter båndet mellom det innerste sukkeret og asparaginet i et N-glykansete (figur 1.4). Alle tre glypikanvarianter har derfor blitt overført til ER-lumen og fått tilkoblet N-glykan(er). Siden det kan se ut til at alle de tre glypikanvariantene befinner seg tidlig i den sekretoriske vei, ville vi undersøke hvor langt i den sekretoriske vei de var kommet. N-glykaner vil etter å ha blitt satt på proteiner i ER modifiseres videre fra en høy mannose til en hybrid eller til en kompleks N-glykanstruktur (figur 1.4). Ved å bruke enzymet Endo H, som kutter båndet mellom de to første sukkerne etter asparagin på høy mannose N-glykaner og til dels også på hybride N-glykaner, men aldri for komplekse N-glykaner (Nickel and Rabouille; 2009), ville man kunne se om glypikanvariantene var kommet til *medial*-Golgi, der man antar at N-glykaner har oppnådd en kompleks N-glykanstruktur. Resultatene viste at alle tre glypikanvariantene var sensitive for behandling med Endo H (figur 3.21), noe som tyder på at glypikanvariantene ikke har oppnådd en kompleks N-glykanstruktur, og dermed antakelig befinner seg tidlig i den sekretoriske vei, i ER eller et sted mellom ER og *medial*-Golgi. Denne informasjonen er i overensstemmelse med tidligere observasjoner gjort av glyp-GFP og glypsekr-GFP som ikke viste en forventet sortering til henholdsvis PM eller ut av cellen, i tillegg til at hverken glyp-GFP eller glypsekr-GFP var modifisert med GAG-kjeder.

Siden glyp-GFP, glypsekr-GFP og glypKDEL-GFP var sensitive for Endo H-behandling, og dermed var lokalisert tidlig i den sekretoriske vei, indikerte dette at innføring av GFP i proteindelen kan ha påvirket strukturen og dermed også gjenkjennelse og sortering av glypikan. GFP har en stabil β -tønnestruktur med en α -heliks, kovalent bundet til kromoforen,

inne i β -tønnen (Yang *et al.*; 1996), og er en mye brukt ”protein-tag”, fordi celler som uttrykker GFP kan studeres levende, i tillegg til at GFP er en stabil struktur som i mange proteiner ikke påvirker proteinenes fysiologiske væremåte (Kahana and Silver; 2001). Upubliserte data i forskningsgruppen har vist at GFP kan påvirke sorteringen til det transmembrane PGet syndekan 4, hvor syndekan 4 med en ”HA-tag” i stedet for GFP, men satt inn etter samme aminosyre som GFP, sorteres og modifiseres forskjellig fra hva syndekan 4 med GFP gjør. I denne masteroppgaven er GFP satt inn etter aminosyre 320, som er lokalisert til den globulære delen av glypikans proteindel. Det kan tenkes at på grunn av de 14 konserverte cysteinene som befinner seg i dette området, og som kan danne flere disulfidbroer med hverandre, vil GFP kunne ødelegge strukturen til det globulære domenet slik at sorteringen og modifiseringen til glypikan endres. Det ville vært interessant å se om denne strukturendringen fører til en feilfolding av proteinet, som igjen kan føre til binding av chaperoner i ER, transport ut av ER, ubiquitinylering og degradering i proteasomet. Det finnes kits som kan påvise ubiquitinylerede proteiner, og det ville vært interessant å undersøke dette nærmere.

På grunn av denne mulige påvirkningen av GFP på glypikan-GFP konstruktens sortering og modifisering, ble det også laget tre glypikanvarianter der GFP var fjernet. Det er tidligere vist at glypikan normalt er modifisert med HS GAG-kjeder (Mertens *et al.*; 1996). Tidsperspektivet en masteroppgave har, gjorde at kun glyp ble transfektert inn i MDCK II-celler, før glyp ble behandlet med heparitinase eller cABC. Resultatene viste en kraftig reduksjon etter behandling med heparitinase (figur 3.28), som tyder på at glyp er modifisert med HS GAG-kjeder, og dermed har gått gjennom den sekretoriske vei gjennom Golgi-apparatet, hvor syntese av GAG-kjeder skjer. Dette stemmer også med tidligere publiserte data, som viser at glypikan er modifisert med HS GAG-kjeder (Mertens *et al.*; 1996). Det syntes å være en liten reduksjon av glyp når det behandles med cABC (figur 3.28), som degraderer CS GAG-kjeder, men forsøket er kun utført en gang, med en parallell, og det er derfor for tidlig å avgjøre om glyp bærer noen få CS GAG-kjeder eller ikke.

For å oppsummere oppnådde resultater, så viste forsøkene med biotinylering av PM i filterdyrkede MDCK II-celler som uttrykker full-lengde glypikan, at omtrent all full-lengde glypikan befant seg inne i cellen og at kun en liten fraksjon kom til celleoverflaten, og da antagelig ved å ta en ”Golgi bypass”-rute. Den sekretoriske glypikanvarianten ble ikke sortert

ut av cellen, men befant seg inne i cellen, og det ble ikke påvist GAG-kjeder på disse to glypikanvariantene ved enzymatisk degradering eller ved radioaktiv innmerkning med [³⁵S]-sulfat. Både full-lengde og sekretorisk glypikanvariant lignet på glypikanvarianten med KDEL-sekvens, som selv ved normal transport i cellen naturlig befinner seg tidlig i den sekretoriske vei, og ved enzymatisk behandling ble det bekreftet at ingen av de tre glypikanvariantene hadde nådd fram til *medial*-Golgi. En full-lengde glypikanvariant uten GFP ble laget for å undersøke om GFP påvirket sorteringen av glypikanvarianter med GFP, og dette ble bekreftet da full-lengde glypikan uten GFP var modifisert med HS GAG-kjeder, som viser at PGet har gått gjennom Golgi-apparatet og dermed transporteres på vanlig måte gjennom den sekretoriske vei. Dette tyder altså på at GFP her påvirker sorteringen av glypikan i MDCK II-celler, sannsynligvis ved chaperonmediert retensjon i ER.

Videre studier

Gjennom arbeidet utført i denne oppgaven er det vist at alle de tre glypikanvariantene (glyp-GFP, glypsekr-GFP og glypKDEL-GFP) som ble produsert og uttrykt i MDCK II-celler oppholder seg tidlig i den sekretoriske vei, i ER eller et sted mellom ER og tidlig i Golgi-apparatet. Siden forskningsgruppen har fokus på tidlige stadier i den sekretoriske vei, vil man kunne bruke disse glypikanvariantene til å studere initiell syntese av linker-regionen på PGene nærmere. Det ville vært interessant å undersøke om PGene har fått på seg Xyl, da det antas at Xyl settes på et serin-glysin-sete i proteindelen i ER, eller mellom ER og *medial*-Golgi (Kearns *et al.*; 1991; Kearns *et al.*; 1993; Vertel *et al.*; 1993). Forsøket kan utføres ved hjelp av massespektrometri etter at glypikanvariantene er immunoisolert via GFP, og vil kunne kaste lys over prosesser tidlig i den sekretoriske vei. Det faktum at glyp-GFP kanskje når celleoverflaten uten å gå gjennom Golgi-apparatet kan kanskje benyttes som en selektiv markør for en slik transportvei. Det er tidligere vist at feilfoldet GFP kan skilles ut av cellen via en ukonvensjonell transportvei (Tanudji *et al.*; 2002), men dette skjer direkte fra cytoplasma, mens glyp-GFP må ha fulgt en membranavhengig transportvei (Marie *et al.*; 2008; Tveit *et al.*; 2009).

Det faktum at full-lengde glyp-GFP (glyp53-GFP) i noen eksperimenter så ut til å bli transportert til celleoverflaten kan tyde på at en eventuell feilfolding ikke er fullstendig irreversibel og at det er mulig å undersøke om kjemiske chaperoner som glyserol, smørsyre eller 4-fenyl-smørsyre kan bidra til normal modifisering og transport til celleoverflaten. Hvis det skulle være tilfelle, vil man kunne håpe på å utvikle et system hvor man kan titrere fram en transport av de ulike glypikanvariantene i den sekretoriske vei. Samtidig er det mulig at de uten bruk av kjemiske chaperoner kan benyttes til å studere degradering av de samme glypikanvariantene av ERAD-systemet. Bruken av lactacystin i denne oppgaven viste to hovedbånd for glyp-GFP i WB (figur 3.22), hvor et bånd rundt 50 kDa ble mer fremtredende i nærvær av hemmer. Hva dette båndet inneholder kunne være interessant å undersøke. Det kan se ut som om et innledende degraderingstrinn ikke hemmes av lactacystin, mens proteindelen på rundt 50 kDa ikke degraderes videre. Ved å benytte glypikanvariantene uten GFP, vil man kunne studere syntese og sortering av et GPI-forankret protein, både med tanke på celleoverflatelokalisering, GAG-sammensetning og sulfateringsgrad. Dette avhenger av at man har et spesifikt antistoff mot proteindelen til glypikan og gjør at lokaliseringen ikke kan

VIDERE STUDIER

studies i levende celler, men først etter fiksering. Prosesser tidlig i den sekretoriske vei kan undersøkes ved å bruke en glypikanvariant med KDEL-sekvens, og eventuelt sammenligne resultatene med glypikanvarianter som skilles ut av cellen eller som er festet til membranen med GPI-anker.

Litteraturliste

- Adair-Kirk, T. L., F. C. Dorsey, et al.** (2003). "Multiple cytoplasmic signals direct the intracellular trafficking of chicken kidney AE1 anion exchangers in MDCK cells." *J Cell Sci* **116**(Pt 4): 655-663.
- Alfalah, M., G. Wetzel, et al.** (2005). "A novel type of detergent-resistant membranes may contribute to an early protein sorting event in epithelial cells." *J Biol Chem* **280**(52): 42636-42643.
- Almeida, R., S. B. Levery, et al.** (1999). "Cloning and expression of a proteoglycan UDP-galactose:beta-xylose beta1,4-galactosyltransferase I. A seventh member of the human beta4-galactosyltransferase gene family." *J Biol Chem* **274**(37): 26165-26171.
- Anelli, T. and R. Sitia** (2008). "Protein quality control in the early secretory pathway." *EMBO J* **27**(2): 315-327.
- Aoki, K., M. Porterfield, et al.** (2008). "The diversity of O-linked glycans expressed during *Drosophila melanogaster* development reflects stage- and tissue-specific requirements for cell signaling." *J Biol Chem* **283**(44): 30385-30400.
- Aono, S., H. Keino, et al.** (2000). "Genomic organization and expression pattern of mouse neuroglycan C in the cerebellar development." *J Biol Chem* **275**(1): 337-342.
- Appenzeller-Herzog, C. and H. P. Hauri** (2006). "The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function." *J Cell Sci* **119**(Pt 11): 2173-2183.
- Appenzeller-Herzog, C., A. C. Roche, et al.** (2004). "pH-induced conversion of the transport lectin ERGIC-53 triggers glycoprotein release." *J Biol Chem* **279**(13): 12943-12950.
- Bagola, K., M. Mehnert, et al.** (2011). "Protein dislocation from the ER." *Biochim Biophys Acta* **1808**(3): 925-936.
- Bai, X., G. Wei, et al.** (1999). "Chinese hamster ovary cell mutants defective in glycosaminoglycan assembly and glucuronosyltransferase I." *J Biol Chem* **274**(19): 13017-13024.
- Bai, X., D. Zhou, et al.** (2001). "Biosynthesis of the linkage region of glycosaminoglycans: cloning and activity of galactosyltransferase II, the sixth member of the beta 1,3-galactosyltransferase family (beta 3GalT6)." *J Biol Chem* **276**(51): 48189-48195.
- Barker, G. and N. L. Simmons** (1981). "Identification of two strains of cultured canine renal epithelial cells (MDCK cells) which display entirely different physiological properties." *Q J Exp Physiol* **66**(1): 61-72.

- Belden, W. J. and C. Barlowe** (2001). "Role of Erv29p in collecting soluble secretory proteins into ER-derived transport vesicles." *Science* **294**(5546): 1528-1531.
- Belting, M., K. Mani, et al.** (2003). "Glypican-1 is a vehicle for polyamine uptake in mammalian cells: a pivotal role for nitrosothiol-derived nitric oxide." *J Biol Chem* **278**(47): 47181-47189.
- Benting, J. H., A. G. Rietveld, et al.** (1999). "N-Glycans mediate the apical sorting of a GPI-anchored, raft-associated protein in Madin-Darby canine kidney cells." *J Cell Biol* **146**(2): 313-320.
- Bernfield, M., M. Gotte, et al.** (1999). "Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans." *Annu Rev Biochem* **68**: 729-777.
- Brown, D. A. and E. London** (1998). "Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes." *J Membr Biol* **164**(2): 103-114.
- Cereijido, M., E. S. Robbins, et al.** (1978). "Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support." *J Cell Biol* **77**(3): 853-880.
- Cheng, F., J. Lindqvist, et al.** (2006). "Copper-dependent co-internalization of the prion protein and glypican-1." *J Neurochem* **98**(5): 1445-1457.
- Chuang, J. Z. and C. H. Sung** (1998). "The cytoplasmic tail of rhodopsin acts as a novel apical sorting signal in polarized MDCK cells." *J Cell Biol* **142**(5): 1245-1256.
- Corbeil, D., G. Boileau, et al.** (1992). "Expression and polarized apical secretion in Madin-Darby canine kidney cells of a recombinant soluble form of neutral endopeptidase lacking the cytosolic and transmembrane domains." *J Biol Chem* **267**(4): 2798-2801.
- David, G., V. Lories, et al.** (1990). "Molecular cloning of a phosphatidylinositol-anchored membrane heparan sulfate proteoglycan from human lung fibroblasts." *J Cell Biol* **111**(6 Pt 2): 3165-3176.
- De Cat, B. and G. David** (2001). "Developmental roles of the glypicans." *Semin Cell Dev Biol* **12**(2): 117-125.
- de Waard, P., J. F. Vliegthart, et al.** (1992). "Structural studies on sulfated oligosaccharides derived from the carbohydrate-protein linkage region of chondroitin 6-sulfate proteoglycans of shark cartilage. II. Seven compounds containing 2 or 3 sulfate residues." *J Biol Chem* **267**(9): 6036-6043.
- Dragsten, P. R., R. Blumenthal, et al.** (1981). "Membrane Asymmetry in Epithelia - Is the Tight Junction a Barrier to Diffusion in the Plasma-Membrane." *Nature* **294**(5843): 718-722.

- Edgren, G., B. Havsmark, et al.** (1997). "Glypican (heparan sulfate proteoglycan) is palmitoylated, deglycanated and reglycanated during recycling in skin fibroblasts." *Glycobiology* **7**(1): 103-112.
- Ellgaard, L. and A. Helenius** (2003). "Quality control in the endoplasmic reticulum." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(3): 181-191.
- Esko, J. D. and S. B. Selleck** (2002). "Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate." *Annu Rev Biochem* **71**: 435-471.
- Farquhar, M. G. and G. E. Palade** (1981). "The Golgi apparatus (complex)-(1954-1981)-from artifact to center stage." *J Cell Biol* **91**(3 Pt 2): 77s-103s.
- Fico, A., F. Maina, et al.** (2011). "Fine-tuning of cell signaling by glypicans." *Cell Mol Life Sci* **68**(6): 923-929.
- Filmus, J.** (2001). "Glypicans in growth control and cancer." *Glycobiology* **11**(3): 19R-23R.
- Filmus, J., M. Capurro, et al.** (2008). "Glypicans." *Genome Biol* **9**(5): 224.
- Filmus, J. and S. B. Selleck** (2001). "Glypicans: proteoglycans with a surprise." *J Clin Invest* **108**(4): 497-501.
- Folsch, H.** (2005). "The building blocks for basolateral vesicles in polarized epithelial cells." *Trends Cell Biol* **15**(4): 222-228.
- Folsch, H., H. Ohno, et al.** (1999). "A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells." *Cell* **99**(2): 189-198.
- Fransson, L. A.** (2003). "Glypicans." *Int J Biochem Cell Biol* **35**(2): 125-129.
- Fransson, L. A., M. Belting, et al.** (2004). "Novel aspects of glypican glycobiology." *Cell Mol Life Sci* **61**(9): 1016-1024.
- Fransson, L. A., I. Silverberg, et al.** (1985). "Structure of the heparan sulfate-protein linkage region. Demonstration of the sequence galactosyl-galactosyl-xylose-2-phosphate." *J Biol Chem* **260**(27): 14722-14726.
- Freeze, H. H. and M. Aebi** (2005). "Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation." *Curr Opin Struct Biol* **15**(5): 490-498.
- Fujita, M. and T. Kinoshita** (2010). "Structural remodeling of GPI anchors during biosynthesis and after attachment to proteins." *FEBS Lett* **584**(9): 1670-1677.
- Gan, Y., T. E. McGraw, et al.** (2002). "The epithelial-specific adaptor AP1B mediates post-endocytic recycling to the basolateral membrane." *Nat Cell Biol* **4**(8): 605-609.
- Glick, B. S.** (2000). "Organization of the Golgi apparatus." *Curr Opin Cell Biol* **12**(4): 450-456.

- Glick, B. S. and V. Malhotra** (1998). "The curious status of the Golgi apparatus." *Cell* **95**(7): 883-889.
- Gotting, C., J. Kuhn, et al.** (2000). "Molecular cloning and expression of human UDP-d-Xylose:proteoglycan core protein beta-d-xylosyltransferase and its first isoform XT-II." *J Mol Biol* **304**(4): 517-528.
- Grieve, A. G. and C. Rabouille** (2011). "Golgi bypass: skirting around the heart of classical secretion." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(4).
- Griffiths, G. and K. Simons** (1986). "The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex." *Science* **234**(4775): 438-443.
- Grobe, K., J. Ledin, et al.** (2002). "Heparan sulfate and development: differential roles of the N-acetylglucosamine N-deacetylase/N-sulfotransferase isozymes." *Biochim Biophys Acta* **1573**(3): 209-215.
- Gumbiner, B.** (1987). "Structure, biochemistry, and assembly of epithelial tight junctions." *Am J Physiol* **253**(6 Pt 1): C749-758.
- Gut, A., F. Kappeler, et al.** (1998). "Carbohydrate-mediated Golgi to cell surface transport and apical targeting of membrane proteins." *EMBO J* **17**(7): 1919-1929.
- Hammond, A. T. and B. S. Glick** (2000). "Dynamics of transitional endoplasmic reticulum sites in vertebrate cells." *Mol Biol Cell* **11**(9): 3013-3030.
- Helenius, A. and M. Aebi** (2001). "Intracellular functions of N-linked glycans." *Science* **291**(5512): 2364-2369.
- Hirst, J., D. B. L, et al.** (2011). "The fifth adaptor protein complex." *PLoS Biol* **9**(10): e1001170.
- Hooper, N. M.** (2011). "Glypican-1 facilitates prion conversion in lipid rafts." *J Neurochem* **116**(5): 721-725.
- Ivins, J. K., E. D. Litwack, et al.** (1997). "Cerebroglycan, a developmentally regulated cell-surface heparan sulfate proteoglycan, is expressed on developing axons and growth cones." *Dev Biol* **184**(2): 320-332.
- Jonsson, M., E. Eklund, et al.** (2003). "Initiation of the decorin glycosaminoglycan chain in the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment." *J Biol Chem* **278**(24): 21415-21420.
- Kahana, J. A. and P. A. Silver** (2001). "Use of the A. Victoria green fluorescent protein to study protein dynamics in vivo." *Curr Protoc Pharmacol* **Chapter 6**: Unit 6 6.

- Kearns, A. E., S. C. Campbell, et al.** (1991). "Initiation of chondroitin sulfate biosynthesis: a kinetic analysis of UDP-D-xylose: core protein beta-D-xylosyltransferase." *Biochemistry* **30**(30): 7477-7483.
- Kearns, A. E., B. M. Vertel, et al.** (1993). "Topography of glycosylation and UDP-xylose production." *J Biol Chem* **268**(15): 11097-11104.
- Kirn-Safran, C., M. C. Farach-Carson, et al.** (2009). "Multifunctionality of extracellular and cell surface heparan sulfate proteoglycans." *Cell Mol Life Sci* **66**(21): 3421-3434.
- Kitagawa, H., Y. Tone, et al.** (1998). "Molecular cloning and expression of glucuronyltransferase I involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans." *J Biol Chem* **273**(12): 6615-6618.
- Kitagawa, H., T. Uyama, et al.** (2001). "Molecular cloning and expression of a human chondroitin synthase." *J Biol Chem* **276**(42): 38721-38726.
- Kitagawa, Y., Y. Sano, et al.** (1994). "N-glycosylation of erythropoietin is critical for apical secretion by Madin-Darby canine kidney cells." *Exp Cell Res* **213**(2): 449-457.
- Kjellen, L. and U. Lindahl** (1991). "Proteoglycans: structures and interactions." *Annu Rev Biochem* **60**: 443-475.
- Kleeff, J., T. Ishiwata, et al.** (1998). "The cell-surface heparan sulfate proteoglycan glypican-1 regulates growth factor action in pancreatic carcinoma cells and is overexpressed in human pancreatic cancer." *J Clin Invest* **102**(9): 1662-1673.
- Kornfeld, R. and S. Kornfeld** (1985). "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides." *Annu Rev Biochem* **54**: 631-664.
- Kuehn, M. J., J. M. Herrmann, et al.** (1998). "COPII-cargo interactions direct protein sorting into ER-derived transport vesicles." *Nature* **391**(6663): 187-190.
- Kundu, A., R. T. Avalos, et al.** (1996). "Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells." *J Virol* **70**(9): 6508-6515.
- Kusche-Gullberg, M. and L. Kjellen** (2003). "Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis." *Curr Opin Struct Biol* **13**(5): 605-611.
- Levental, I., M. Grzybek, et al.** (2010). "Greasing their way: lipid modifications determine protein association with membrane rafts." *Biochemistry* **49**(30): 6305-6316.
- Lind, T., F. Tufaro, et al.** (1998). "The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 are glycosyltransferases required for the biosynthesis of heparan sulfate." *J Biol Chem* **273**(41): 26265-26268.

- Lisanti, M. P., I. W. Caras, et al.** (1989). "A glycopospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells." *J Cell Biol* **109**(5): 2145-2156.
- Litwack, E. D., J. K. Ivins, et al.** (1998). "Expression of the heparan sulfate proteoglycan glypican-1 in the developing rodent." *Dev Dyn* **211**(1): 72-87.
- Mani, K., F. Cheng, et al.** (2007). "Heparan sulfate degradation products can associate with oxidized proteins and proteasomes." *J Biol Chem* **282**(30): 21934-21944.
- Mani, K., M. Jonsson, et al.** (2000). "A novel role for nitric oxide in the endogenous degradation of heparan sulfate during recycling of glypican-1 in vascular endothelial cells." *Glycobiology* **10**(6): 577-586.
- Marie, M., R. Sannerud, et al.** (2008). "Take the 'A' train: on fast tracks to the cell surface." *Cell Mol Life Sci* **65**(18): 2859-2874.
- Matsuda, K., H. Maruyama, et al.** (2001). "Glypican-1 is overexpressed in human breast cancer and modulates the mitogenic effects of multiple heparin-binding growth factors in breast cancer cells." *Cancer Res* **61**(14): 5562-5569.
- Mertens, G., B. Van der Schueren, et al.** (1996). "Heparan sulfate expression in polarized epithelial cells: the apical sorting of glypican (GPI-anchored proteoglycan) is inversely related to its heparan sulfate content." *J Cell Biol* **132**(3): 487-497.
- Muniz, M., P. Morsomme, et al.** (2001). "Protein sorting upon exit from the endoplasmic reticulum." *Cell* **104**(2): 313-320.
- Munro, S.** (1998). "Localization of proteins to the Golgi apparatus." *Trends Cell Biol* **8**(1): 11-15.
- Nakano, A. and A. Luini** (2010). "Passage through the Golgi." *Curr Opin Cell Biol* **22**(4): 471-478.
- Nakatsu, F. and H. Ohno** (2003). "Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-Golgi network." *Cell Struct Funct* **28**(5): 419-429.
- Nezil, F. A. and M. Bloom** (1992). "Combined influence of cholesterol and synthetic amphiphilic peptides upon bilayer thickness in model membranes." *Biophysical Journal* **61**(5): 1176-1183.
- Nickel, W.** (2010). "Pathways of unconventional protein secretion." *Curr Opin Biotechnol* **21**(5): 621-626.
- Nickel, W. and C. Rabouille** (2009). "Mechanisms of regulated unconventional protein secretion." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(2): 148-155.

- Nickel, W. and M. Seedorf** (2008). "Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells." *Annu Rev Cell Dev Biol* **24**: 287-308.
- Oegema, T. R., Jr., E. L. Kraft, et al.** (1984). "Phosphorylation of chondroitin sulfate in proteoglycans from the swarm rat chondrosarcoma." *J Biol Chem* **259**(3): 1720-1726.
- Palade, G.** (1975). "Intracellular aspects of the process of protein synthesis." *Science* **189**(4200): 347-358.
- Paladino, S., D. Sarnataro, et al.** (2004). "Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins." *J Cell Biol* **167**(4): 699-709.
- Pelham, H. R.** (1996). "The dynamic organisation of the secretory pathway." *Cell Struct Funct* **21**(5): 413-419.
- Pelham, H. R. and J. E. Rothman** (2000). "The debate about transport in the Golgi--two sides of the same coin?" *Cell* **102**(6): 713-719.
- Pellegrini, M., G. Pilia, et al.** (1998). "Gpc3 expression correlates with the phenotype of the Simpson-Golabi-Behmel syndrome." *Dev Dyn* **213**(4): 431-439.
- Potter, B. A., R. P. Hughey, et al.** (2006). "Role of N- and O-glycans in polarized biosynthetic sorting." *Am J Physiol Cell Physiol* **290**(1): C1-C10.
- Presley, J. F., N. B. Cole, et al.** (1997). "ER-to-Golgi transport visualized in living cells." *Nature* **389**(6646): 81-85.
- Prydz, K. and K. T. Dalen** (2000). "Synthesis and sorting of proteoglycans." *J Cell Sci* **113** Pt 2: 193-205.
- Prydz, K., G. Dick, et al.** (2008). "How many ways through the Golgi maze?" *Traffic* **9**(3): 299-304.
- Qiao, D., X. Yang, et al.** (2008). "Glypican-1 regulates anaphase promoting complex/cyclosome substrates and cell cycle progression in endothelial cells." *Mol Biol Cell* **19**(7): 2789-2801.
- Rambourg, A., W. Hernandez, et al.** (1969). "Detection of complex carbohydrates in the Golgi apparatus of rat cells." *J Cell Biol* **40**(2): 395-414.
- Rapraeger, A., M. Jalkanen, et al.** (1985). "The cell surface proteoglycan from mouse mammary epithelial cells bears chondroitin sulfate and heparan sulfate glycosaminoglycans." *J Biol Chem* **260**(20): 11046-11052.
- Richardson, J. C., V. Scalera, et al.** (1981). "Identification of two strains of MDCK cells which resemble separate nephron tubule segments." *Biochim Biophys Acta* **673**(1): 26-36.

- Rodriguez-Boulan, E. and A. Musch** (2005). "Protein sorting in the Golgi complex: shifting paradigms." *Biochim Biophys Acta* **1744**(3): 455-464.
- Roth, J. and E. G. Berger** (1982). "Immunocytochemical localization of galactosyltransferase in HeLa cells: codistribution with thiamine pyrophosphatase in trans-Golgi cisternae." *J Cell Biol* **93**(1): 223-229.
- Rothman, J. E. and F. T. Wieland** (1996). "Protein sorting by transport vesicles." *Science* **272**(5259): 227-234.
- Rudd, P. M. and R. A. Dwek** (1997). "Glycosylation: heterogeneity and the 3D structure of proteins." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **32**(1): 1-100.
- Sannerud, R., M. Marie, et al.** (2006). "Rab1 defines a novel pathway connecting the pre-Golgi intermediate compartment with the cell periphery." *Mol Biol Cell* **17**(4): 1514-1526.
- Saunders, S., S. Paine-Saunders, et al.** (1997). "Expression of the cell surface proteoglycan glypican-5 is developmentally regulated in kidney, limb, and brain." *Dev Biol* **190**(1): 78-93.
- Scheiffele, P., J. Peranen, et al.** (1995). "N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells." *Nature* **378**(6552): 96-98.
- Scheiffele, P., M. G. Roth, et al.** (1997). "Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain." *EMBO J* **16**(18): 5501-5508.
- Schoenenberger, C. A., A. Zuk, et al.** (1994). "Integrin expression and localization in normal MDCK cells and transformed MDCK cells lacking apical polarity." *J Cell Sci* **107** (Pt 2): 527-541.
- Schon, S., C. Prante, et al.** (2006). "Cloning and recombinant expression of active full-length xylosyltransferase I (XT-I) and characterization of subcellular localization of XT-I and XT-II." *J Biol Chem* **281**(20): 14224-14231.
- Schweizer, A., K. Matter, et al.** (1991). "The isolated ER-Golgi intermediate compartment exhibits properties that are different from ER and cis-Golgi." *J Cell Biol* **113**(1): 45-54.
- Simmen, T., S. Honing, et al.** (2002). "AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells." *Nat Cell Biol* **4**(2): 154-159.
- Song, H. H. and J. Filmus** (2002). "The role of glypicans in mammalian development." *Biochim Biophys Acta* **1573**(3): 241-246.

- Spiro, R. C., H. H. Freeze, et al.** (1991). "Uncoupling of chondroitin sulfate glycosaminoglycan synthesis by brefeldin A." *J Cell Biol* **115**(5): 1463-1473.
- Su, G., K. Meyer, et al.** (2006). "Glypican-1 is frequently overexpressed in human gliomas and enhances FGF-2 signaling in glioma cells." *Am J Pathol* **168**(6): 2014-2026.
- Sugahara, K., I. Yamashina, et al.** (1988). "Structural studies on sulfated glycopeptides from the carbohydrate-protein linkage region of chondroitin 4-sulfate proteoglycans of swarm rat chondrosarcoma. Demonstration of the structure Gal(4-O-sulfate)beta 1-3Gal beta 1-4XYL beta 1-O-Ser." *J Biol Chem* **263**(21): 10168-10174.
- Svensson, G., A. Hyrenius Wittsten, et al.** (2011). "The Structural Role of N-Linked Glycans on Human Glypican-1." *Biochemistry*.
- Svensson, G., S. Linse, et al.** (2009). "Chemical and thermal unfolding of glypican-1: protective effect of heparan sulfate against heat-induced irreversible aggregation." *Biochemistry* **48**(42): 9994-10004.
- Svensson, G. and K. Mani** (2009). "S-Nitrosylation of secreted recombinant human glypican-1." *Glycoconj J* **26**(9): 1247-1257.
- Tanudji, M., S. Hevi, et al.** (2002). "Improperly folded green fluorescent protein is secreted via a non-classical pathway." *J Cell Sci* **115**(Pt 19): 3849-3857.
- Taylor, D. R., I. J. Whitehouse, et al.** (2009). "Glypican-1 mediates both prion protein lipid raft association and disease isoform formation." *PLoS Pathog* **5**(11): e1000666.
- Tveit, H., L. K. Akslen, et al.** (2009). "A secretory Golgi bypass route to the apical surface domain of epithelial MDCK cells." *Traffic* **10**(11): 1685-1695.
- Tveit, H., G. Dick, et al.** (2005). "A proteoglycan undergoes different modifications en route to the apical and basolateral surfaces of Madin-Darby canine kidney cells." *J Biol Chem* **280**(33): 29596-29603.
- Ueno, M., S. Yamada, et al.** (2001). "Structural characterization of heparan sulfate and chondroitin sulfate of syndecan-1 purified from normal murine mammary gland epithelial cells. Common phosphorylation of xylose and differential sulfation of galactose in the protein linkage region tetrasaccharide sequence." *J Biol Chem* **276**(31): 29134-29140.
- Urquhart, P., S. Pang, et al.** (2005). "N-glycans as apical targeting signals in polarized epithelial cells." *Biochem Soc Symp*(72): 39-45.
- Van den Steen, P., P. M. Rudd, et al.** (1998). "Concepts and principles of O-linked glycosylation." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **33**(3): 151-208.

- van Meer, G. and K. Simons** (1986). "The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells." *EMBO J* **5**(7): 1455-1464.
- van Meer, G. and K. Simons** (1988). "Lipid polarity and sorting in epithelial cells." *J Cell Biochem* **36**(1): 51-58.
- Varki, A., R. Cummings, et al.** (1999). "Essentials of Glycobiology." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Vertel, B. M., L. M. Walters, et al.** (1993). "Xylosylation is an endoplasmic reticulum to Golgi event." *J Biol Chem* **268**(15): 11105-11112.
- Walter, P. and A. E. Johnson** (1994). "Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane." *Annu Rev Cell Biol* **10**: 87-119.
- Weisz, O. A. and E. Rodriguez-Boulan** (2009). "Apical trafficking in epithelial cells: signals, clusters and motors." *J Cell Sci* **122**(Pt 23): 4253-4266.
- Williams, D. B.** (2006). "Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum." *J Cell Sci* **119**(Pt 4): 615-623.
- Wilson, D. W., M. J. Lewis, et al.** (1993). "pH-dependent binding of KDEL to its receptor in vitro." *J Biol Chem* **268**(10): 7465-7468.
- Wu, M. M., M. Grabe, et al.** (2001). "Mechanisms of pH regulation in the regulated secretory pathway." *J Biol Chem* **276**(35): 33027-33035.
- Yang, F., L. G. Moss, et al.** (1996). "The molecular structure of green fluorescent protein." *Nat Biotechnol* **14**(10): 1246-1251.
- Zimmermann, D. R. and E. Ruoslahti** (1989). "Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican." *EMBO J* **8**(10): 2975-2981.

Vedlegg 1 – Sekvenser

Glypikan 1 DNA-sekvenser

Grønn = GFP

Rød = EcoR1 restriksjonssete

Lilla = Pml1 restriksjonssete

Blå = Nhe1 restriksjonssete

Rosa = KDEL-sekvens

ATG = Startkodon for glypikan

GlypGFP

GCTAGCATGAGCTCCGGGCCCCGAGGCTGGTGGCTGCTATGTGCGGCCGACGCGCTGGTCGCCTGCGCCCGCGGG
 GACCCGGCCAGCAAGAGCCGGAGCTGCGGGCAGGTCCGCCAGATCTACGGAGCCAAGGGCTTCAGCCTGAGCGAC
 GTGCCCCAGGCGGAGATCTCGGGTGAGCACCTGCGGATCTGTCCCCAGGGCTACACCTGCTGCACCAGCGAGATG
 GAGGAGAACCTGGCCAACCGCAGCCATGCCGAGCTGGAGACCCGCGCTCCGGGACAGCAGCCGCGTCTGCAGGCC
 ATGCTTGCCACCCAGCTGCGCAGCTTCGATGACCACTTCCAGCACCTGCTGAACGACTCGGAGCGGACGCTGCAG
 GCCACCTTCCCCGGCGCCTTCGGAGAGCTGTACACGCAGAACCGCAGGGCCTTCCGGGACCTGTACTCAGAGCTG
 CGCCTGTACTACCGCGGTGCCAACCTGCACCTGGAGGAGACGCTGGCCGAGTTCTGGGCCCCGCTGCTCGAGCGC
 CTCTTCAAGCAGCTGCACCCCCAGCTGCTGCTGCCTGATGACTACCTGGACTGCCTGGGCAAGCAGGCCGAGGCC
 CTGCGGCCCTTCGGGGAGGCCCCGAGAGAGCTGCGCCTGCGGGCCACCCGTGCCTTCGTGGCTGCTCGCTCCTTT
 GTGCAGGGCCTGGGCGTGGCCAGCGACGTGGTCCGGAAAGTGGCTCAGGTCCCCCTGGGCCCCGAGTGCCTCGAGA
 GCTGTGATGAAGCTGGTCTACTGTGCTCACTGCCTGGGAGTCCCCGGCCAGGCCCTGCCCTGACTATTGCCGA
 AATGTGCTCAAGGGCTGCCTTGCCAACCAGGCCGACCTGGACGCCGAGTGGAGGAACCTCCTGGACTCCATGGTG
 CTCATCACCGACAAGTTCTGGGGTACATCGGGTGTGGAGAGTGTGATCGGCAGCGTGCAACAGTGGATGGTGAGC
 AAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAACCGGCCACAAGTTC
 AGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAG
 CTGCCCCTGCCCCTGGCCCCACCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCAC
 ATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGAC
 GACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGC
 ATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATC
 ATGGCCGACAAGCAGAAGAACCGGCATCAAGGTGAAGTTCGAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAG
 CTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGC
 ACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGGATCACATGGTCCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC
 GGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGCACAGTGGCTGGCGGAGGCCATCAACGCCCTCCAGGACAAC
 AGGGACACGCTCACGGCCAAGGTCATCCAGGGCTGCGGGAACCCCAAGGTC AACCCCAAGGGCCCTGGGCCTGAG
 GAGAAGCGGCGCCGGGGCAAGCTGGCCCCGCGGGAGAGGCCACCTTCAGGCACGCTGGAGAAGCTGGTCTCTGAA
 GCCAAGGCCAGCTCCGCGACGTCCAGGACTTCTGGATCAGCCTCCAGGGACACTGTGCAGTGAGAAGATGGCC
 CTGAGCACTGCCAGTGTATGACCCGCTGCTGGAACGGGATGGCCAGAGCCGGTACCTCCCCGAGGTGATGGGTGAC
 GGCCTGGCCAACCAATCAACAACCCCGAGGTGGAGGTGGACATACCAAGCCGGACATGACCATCCGGCAGCAG
 ATCATGCAGCTGAAGATCATGACCAACCGGCTGCGCAGCGCCTACAACGGCAACGACGTGGACTTCCAGGACGCC
 AGTGACGACGGCAGCGGCTCGGGCAGCGGTGATGGCTGTCTGGATGACCTCTGCGGCCGGAAGGTCAGCAGGAAG
 AGCTCCAGCTCCCGACGCCCTTGACCCATGCCCTCCCAGGCCTGTGAGAGCAGGAAGGACAGAAGACCTCGGCCT
 GCCAGCTGCCCCAGCCCCGACCTTCTCCTGCCCTCCTCCTTCTCCTGGCCCTTACAGTAGCCAGGCCCCCGG
 TGGCGGTAAGAATTC

Glyp-GFP: 2415 bp, 805 aminosyrer og 88,6 kDa

GlypGFP-sekr

GCTAGCATGAGCTCCGGGCCCGAGGCTGGTGGCTGCTATGTGCGGCCGACGCTGGTCGCCTGCGCCCGCGGG
 GACCCCGCCAGCAAGAGCCGGAGCTGCGGGCAGGTCCGCCAGATCTACGGAGCCAAGGGCTTCAGCCTGAGCGAC
 GTGCCCCAGGCGGAGATCTCGGGTGAGCACCTGCGGATCTGTCCCCAGGGCTACACCTGCTGCACCAGCGAGATG
 GAGGAGAACCTGGCCAACCGCAGCCATGCCGAGCTGGAGACCCGCGCTCCGGGACAGCAGCCGCGTCTGCAGGCC
 ATGCTTGCCACCCAGCTGCGCAGCTTCGATGACCACTTCCAGCACCTGCTGAACGACTCGGAGCGGACGCTGCAG
 GCCACCTTCCCCGGCGCCTTCGGAGAGCTGTACACGCAGAACCGGAGGGCCTTCCGGGACCTGTACTCAGAGCTG
 CGCCTGTACTACCGCGGTGCCAACCTGCACCTGGAGGAGACGCTGGCCGAGTTTCTGGGCCCCGCTGCTCGAGCGC
 CTCTTCAAGCAGCTGCACCCCCAGCTGCTGCTGCCTGATGACTACCTGGACTGCCTGGGCAAGCAGGCCGAGGCCG
 CTGCGGCCCTTCCGGGAGGCCCGAGAGAGCTGCGCCTGCGGGCCACCCGTGCCTTCGTGGCTGCTCGCTCCTTT
 GTGCAGGGCCTGGGCGTGGCCAGCGACGTGGTCCGAAAGTGGCTCAGGTCCCCCTGGGCCCGGAGTGCTCGAGA
 GCTGTATGAAGCTGGTCTACTGTGCTCACTGCCTGGGAGTCCCCGGCGCCAGGCCCTGCCCTGACTATTGCCGA
 AATGTGCTCAAGGGCTGCCTTGCCAACCAGGCCGACCTGGACGCCGAGTGGAGGAACCTCCTGGACTCCATGGTG
 CTCATCACCGACAAGTTCTGGGGTACATCGGGTGTGGAGAGTGTATCGGCAGCGTGCAACCGTGGATGGTGAGC
 AAGGGCGAGGAGCTGTTTACCGGGGTGGTGCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTC
 AGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAG
 CTGCCCCGTGCCCTGGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCAC
 ATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGAC
 GACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGC
 ATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATC
 ATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAG
 CTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGCCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGC
 ACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCAGCCGCC
 GGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGCACCGTGGCGGAGGCCATCAACGCCCTCCAGGACAAC
 AGGGACACGCTCACGGCCAAGGTCATCCAGGGCTGCGGGAACCCCAAGGTC AACCCCCAGGGCCCTGGGCCGTGAG
 GAGAAGCGGCGCCGGGGCAAGCTGGCCCCGCGGGAGAGGCCACCTTCAGGCACGCTGGAGAAGCTGGTCTCTGAA
 GCCAAGGCCAGCTCCGCGACGTCCAGGACTTCTGGATCAGCCTCCAGGGACACTGTGCAGTGAGAAGATGGCC
 CTGAGCACTGCCAGTGATGACCGCTGCTGGAACGGGATGGCCAGAGGCCGGTACCTCCCCGAGGTGATGGGTGAC
 GGCCTGGCCAACCAGATCAACAACCCCGAGGTGGAGGTGGACATACCAAGCCGGACATGACCATCCGGCAGCAG
 ATCATGCAGCTGAAGATCATGACCAACCCGGCTGCGCAGCGCCTACAACGGCAACGACGTGGACTTCCAGGACGCC
 AGTGACGACGGCAGCGGCTCGGGCAGCGGTGATGGCTGTCTGGATGACCTCTGCGGCCGGAAGTTCAGCAGGAAG
 AGCTCCAGCTCCCGGACGCCCTTGACCCATGCCCTCCCAGGCCTGTTCAGAGCAGGAAGGACAGAAGACCTAATAA
 GAATTC

Glypsekr-GFP: 2331 bp, 777 aminosyrer og 85,5 kDa

GlypGFP-KDEL

GCTAGCATGAGCTCCGGGCCCGAGGCTGGTGGCTGCTATGTGCGGCCGACGCTGGTCGCCTGCGCCCGCGGG
 GACCCCGCCAGCAAGAGCCGGAGCTGCGGGCAGGTCCGCCAGATCTACGGAGCCAAGGGCTTCAGCCTGAGCGAC
 GTGCCCCAGGCGGAGATCTCGGGTGAGCACCTGCGGATCTGTCCCCAGGGCTACACCTGCTGCACCAGCGAGATG
 GAGGAGAACCTGGCCAACCGCAGCCATGCCGAGCTGGAGACCCGCGCTCCGGGACAGCAGCCGCGTCTGCAGGCC
 ATGCTTGCCACCCAGCTGCGCAGCTTCGATGACCACTTCCAGCACCTGCTGAACGACTCGGAGCGGACGCTGCAG
 GCCACCTTCCCCGGCGCCTTCGGAGAGCTGTACACGCAGAACCGGAGGGCCTTCCGGGACCTGTACTCAGAGCTG
 CGCCTGTACTACCGCGGTGCCAACCTGCACCTGGAGGAGACGCTGGCCGAGTTTCTGGGCCCCGCTGCTCGAGCGC
 CTCTTCAAGCAGCTGCACCCCCAGCTGCTGCTGCCTGATGACTACCTGGACTGCCTGGGCAAGCAGGCCGAGGCCG
 CTGCGGCCCTTCCGGGAGGCCCGAGAGAGCTGCGCCTGCGGGCCACCCGTGCCTTCGTGGCTGCTCGCTCCTTT
 GTGCAGGGCCTGGGCGTGGCCAGCGACGTGGTCCGAAAGTGGCTCAGGTCCCCCTGGGCCCGGAGTGCTCGAGA
 GCTGTATGAAGCTGGTCTACTGTGCTCACTGCCTGGGAGTCCCCGGCGCCAGGCCCTGCCCTGACTATTGCCGA
 AATGTGCTCAAGGGCTGCCTTGCCAACCAGGCCGACCTGGACGCCGAGTGGAGGAACCTCCTGGACTCCATGGTG
 CTCATCACCGACAAGTTCTGGGGTACATCGGGTGTGGAGAGTGTATCGGCAGCGTGCAACCGTGGATGGTGAGC
 AAGGGCGAGGAGCTGTTTACCGGGGTGGTGCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTC
 AGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAG
 CTGCCCCGTGCCCTGGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCAC
 ATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGAC

GACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGC
 ATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATC
 ATGGCCGACAAGCAGAAGAACCGGCATCAAGGTGAAGTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAG
 CTCGCCGACCCTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGC
 ACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC
 GGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGCACGTTGGCTGGCGGAGGCCATCAACGCCCTCCAGGACAAC
 AGGGACACGCTCACGGCCAAGGTCATCCAGGGCTGCGGGAACCCCAAGGTCAACCCCAAGGGCCCTGGGCCTGAG
 GAGAAGCGGCGCCGGGGCAAGCTGGCCCCGCGGGAGAGGCCACCTTCAGGCACGCTGGAGAAGCTGGTCTCTGAA
 GCCAAGGCCAGCTCCGCGACGTCCAGGACTTCTGGATCAGCCTCCAGGGACACTGTGCAGTGAGAAGATGGCC
 CTGAGCACTGCCAGTGATGACCGCTGCTGGAACGGGATGGCCAGAGGCCGGTACCTCCCCGAGGTCATGGGTGAC
 GGCCTGGCCAACCAGATCAACAACCCCGAGGTGGAGGTGGACATCACCAAGCCGGACATGACCATCCGGCAGCAG
 ATCATGCAGCTGAAGATCATGACCAACCGGCTGCGCAGCGCCTACAACGGCAACGACGTGGACTTCAGGACGCC
 AGTGACGACGGCAGCGGCTCGGGCAGCGGTGATGGCTGTCTGGATGACCTCTGCGGCCGGAAGGTCAGCAGGAAG
 AGCTCCAGCTCCCGGACGCCCTTGACCCATGCCCTCCAGGCCTGTGAGCAGGAAGGACAGAAAGACC**AAAGAC**
GAACTTTAATAAG**AATTC**

GlypKDEL-GFP: 2343 bp, 781 aminosyrer og 85,9 kDa

Glyp

GCTAGCATGGAGCTCCGGGCCCCGAGGCTGGTGGCTGCTATGTGCGGCCGACGCGCTGGTGCCTGCGCCCCGCGGG
 GACCCGGCCAGCAAGAGCCGGAGCTGCGGCGAGGTCCGCCAGATCTACGGAGCCAAGGGCTTCAGCCTGAGCGAC
 GTGCCCCAGGCGGAGATCTCGGGTGGACACCTGCGGATCTGTCCCCAGGGCTACACCTGCTGCACCAGCGAGATG
 GAGGAGAACCTGGCCAACCGCAGCCATGCCGAGCTGGAGACCGCGCTCCGGGACAGCAGCCGCGTCTGCAGGCC
 ATGCTTGCCACCCAGCTGCGCAGCTTCGATGACCACTTCCAGCACCTGCTGAACGACTCGGAGCGGACGCTGCAG
 GCCACCTTCCCCGGCGCCTTCGGAGAGCTGTACACGAGAACCGGAGGGCCTTCCGGGACCTGTACTCAGAGCTG
 CGCCTGTACTACCGCGGTGCCAACCTGCACCTGGAGGAGACGCTGGCCGAGTTCTGGGCCCGCCTGCTCGAGCGC
 CTCTTCAAGCAGCTGCACCCCAAGCTGCTGCTGCCTGATGACTACCTGGACTGCCTGGGCAAGCAGGCCGAGGCG
 CTGCGGCCCTTCCGGGAGGCCCCGAGAGAGCTGCGCCTGCGGGCCACCCGTGCCTTCGTGGCTGCTCGCTCCTTT
 GTGCAGGGCCTGGGCGTGGCCAGCGACGTGGTCCGAAAAGTGGCTCAGGTCCCCCTGGGCCCGGAGTGCTCGAGA
 GCTGTGATGAAGCTGGTCTACTGTGCTCACTGCCTGGGAGTCCCCGGCGCCAGGCCCTGCCCTGACTATTGCCGA
 AATGTGCTCAAGGGCTGCCTTGCCAACCAGGCCGACCTGGACCGGAGTGGAGGAACCTCCTGGACTCCATGGTG
 CTCATCACCGACAAGTTCTGGGGTACATCGGGTGTGGAGAGTGTGATCGGCAGCGTGCA**CACGTTG**GCTGGCGGAG
 GCCATCAACGCCCTCCAGGACAACAGGGACACGCTCACGGCCAAGGTCATCCAGGGCTGCGGGAACCCCAAGGTC
 AACCCCAAGGGCCCTGGGCCCTGAGGAGAAGCGGCGCCGGGGCAAGCTGGCCCCGCGGGAGAGGCCACCTTCAGGC
 ACGCTGGAGAAGCTGGTCTCTGAAGCCAAGGCCAGCTCCGCGACGTCCAGGACTTCTGGATCAGCTCCCAGGG
 AACTGTGCAAGTGAAGAAGATGGCCCTGAGCACTGCCAGTGATGACCGCTGCTGGAACGGGATGGCCAGAGGCCGG
 TACCTCCCCGAGGTCATGGGTGACGGCCTGGCCAACCAGATCAACAACCCCGAGGTGGAGGTGGACATCACCAAG
 CCGGACATGACCATCCGGCAGCAGATCATGCAGCTGAAGATCATGACCAACCGGCTGCGCAGCGCCTACAACGGC
 AACGACGTGGACTTCCAGGACGCCAGTGACGACGGCAGCGGCTCGGGCAGCGGTGATGGCTGTCTGGATGACCTC
 TGCGGCCGGAAGGTGAGCAGGAAGAGCTCCAGCTCCCGGACGCCCTTGACCCATGCCCTCCAG**GCCT**GTGAGAG
 CAGGAAGGACAGAAGACCTCGGCTGCCAGCTGCCCCAGCCCCGACCTTCTCCTGCCCTCCTCCTCTTCCTG
 GCCCTTACAGTAGCCAGGCCCGGTTGGCGGTA**GAATTC**

Glyp: 1689 bp, 563 aminosyrer og 61,9 kDa

Glypsekr

GCTAGCATGGAGCTCCGGGCCCCGAGGCTGGTGGCTGCTATGTGCGGCCGCAGCGCTGGTCGCCTGCGCCCCGCGGG
 GACCCGGCCAGCAAGAGCCGGAGCTGCGGGCAGGTCCGCCAGATCTACGGAGCCAAGGGCTTCAGCCTGAGCGAC
 GTGCCCCAGGCGGAGATCTCGGGTGAGCACCTGCGGATCTGTCCCAGGGCTACACCTGCTGCACCAGCGAGATG
 GAGGAGAACCTGGCCAACCGCAGCCATGCCGAGCTGGAGACCCGCGCTCCGGGACAGCAGCCGCGTCTGCAGGCC
 ATGCTTGCCACCCAGCTGCGCAGCTTCGATGACCACTTCCAGCACCTGCTGAACGACTCGGAGCGGACGCTGCAG
 GCCACCTTCCCCGGCGCCTTCGGAGAGCTGTACACGCAGAACCGGAGGGCCTTCCGGGACCTGTACTCAGAGCTG
 CGCCTGTACTACCGCGGTGCCAACCTGCACCTGGAGGAGACGCTGGCCGAGTTTCTGGGCCCCGCTGCTCGAGCGC
 CTCTTCAAGCAGCTGCACCCCCAGCTGCTGCTGCCTGATGACTACCTGGACTGCCTGGGCAAGCAGGCCGAGGCC
 CTGCGGCCCTTCCGGGAGGCCCGAGAGAGCTGCGCCTGCGGGCCACCCGTGCCTTCGTGGCTGCTCGCTCCTTT
 GTGCAGGGCCTGGGCGTGGCCAGCGACGTGGTCCGAAAGTGGCTCAGGTCCCCCTGGGCCCGGAGTGCTCGAGA
 GCTGTGCTGAAGCTGGTCTACTGTGCTCACTGCCTGGGAGTCCCCGGCGCCAGGCCCTGCCCTGACTATTGCCGA
 AATGTGCTCAAGGGCTGCCTTGCCAACCAGGCCGACCTGGACGCCGAGTGGAGGAACCTCCTGGACTCCATGGTG
 CTCATCACCGACAAGTTCTGGGGTACATCGGGTGTGGAGAGTGTGATCGGCAGCGTGCAACACTGGCTGGCGGAG
 GCCATCAACGCCCTCCAGGACAACAGGGACACGCTCACGGCCAAGGTTCATCCAGGGCTGCGGGAACCCCAAGGTC
 AACCCCCAGGGCCCTGGGCGCTGAGGAGAAGCGGCGCCGGGGCAAGCTGGCCCCGCGGGAGAGGCCACCTTCAGGC
 ACGCTGGAGAAGCTGGTCTCTGAAGCCAAGGCCAGCTCCGCGACGTCCAGGACTTCTGGATCAGCCTCCCAGGG
 AACTGTGCTGAGAAGATGGCCCTGAGCACTGCCAGTGATGACCGCTGCTGGAACGGGATGGCCAGAGGCCGG
 TACCTCCCCGAGGTTCATGGGTGACGGCCTGGCCAACCAGATCAACAACCCGAGGTGGAGGTGGACATCACCAG
 CCGGACATGACCATCCGGCAGCAGATCATGCAGCTGAAGATCATGACCAACCGGCTGCGCAGCGCTACAACGGC
 AACGACGTGGACTTCCAGGACGCCAGTACGACGGCAGCGGCTCGGGCAGCGGTGATGGCTGTCTGGATGACCTC
 TGGCGCCGGAAGGTTCAGCAGGAAGAGCTCCAGCTCCCGGACGCCCTTGACCCATGCCCTCCCAGGCTGTGAGAG
 CAGGAAGGACAGAAGACCTAATAAGAATTC

Glypsekr: 1605 bp, 535 aminosyrer og 58,9 kDa

GlypKDEL

GCTAGCATGGAGCTCCGGGCCCCGAGGCTGGTGGCTGCTATGTGCGGCCGCAGCGCTGGTCGCCTGCGCCCCGCGGG
 GACCCGGCCAGCAAGAGCCGGAGCTGCGGGCAGGTCCGCCAGATCTACGGAGCCAAGGGCTTCAGCCTGAGCGAC
 GTGCCCCAGGCGGAGATCTCGGGTGAGCACCTGCGGATCTGTCCCAGGGCTACACCTGCTGCACCAGCGAGATG
 GAGGAGAACCTGGCCAACCGCAGCCATGCCGAGCTGGAGACCCGCGCTCCGGGACAGCAGCCGCGTCTGCAGGCC
 ATGCTTGCCACCCAGCTGCGCAGCTTCGATGACCACTTCCAGCACCTGCTGAACGACTCGGAGCGGACGCTGCAG
 GCCACCTTCCCCGGCGCCTTCGGAGAGCTGTACACGCAGAACCGGAGGGCCTTCCGGGACCTGTACTCAGAGCTG
 CGCCTGTACTACCGCGGTGCCAACCTGCACCTGGAGGAGACGCTGGCCGAGTTTCTGGGCCCCGCTGCTCGAGCGC
 CTCTTCAAGCAGCTGCACCCCCAGCTGCTGCTGCCTGATGACTACCTGGACTGCCTGGGCAAGCAGGCCGAGGCC
 CTGCGGCCCTTCCGGGAGGCCCGAGAGAGCTGCGCCTGCGGGCCACCCGTGCCTTCGTGGCTGCTCGCTCCTTT
 GTGCAGGGCCTGGGCGTGGCCAGCGACGTGGTCCGAAAGTGGCTCAGGTCCCCCTGGGCCCGGAGTGCTCGAGA
 GCTGTGCTGAAGCTGGTCTACTGTGCTCACTGCCTGGGAGTCCCCGGCGCCAGGCCCTGCCCTGACTATTGCCGA
 AATGTGCTCAAGGGCTGCCTTGCCAACCAGGCCGACCTGGACGCCGAGTGGAGGAACCTCCTGGACTCCATGGTG
 CTCATCACCGACAAGTTCTGGGGTACATCGGGTGTGGAGAGTGTGATCGGCAGCGTGCAACACTGGCTGGCGGAG
 GCCATCAACGCCCTCCAGGACAACAGGGACACGCTCACGGCCAAGGTTCATCCAGGGCTGCGGGAACCCCAAGGTC
 AACCCCCAGGGCCCTGGGCGCTGAGGAGAAGCGGCGCCGGGGCAAGCTGGCCCCGCGGGAGAGGCCACCTTCAGGC
 ACGCTGGAGAAGCTGGTCTCTGAAGCCAAGGCCAGCTCCGCGACGTCCAGGACTTCTGGATCAGCCTCCCAGGG
 AACTGTGCTGAGAAGATGGCCCTGAGCACTGCCAGTGATGACCGCTGCTGGAACGGGATGGCCAGAGGCCGG
 TACCTCCCCGAGGTTCATGGGTGACGGCCTGGCCAACCAGATCAACAACCCGAGGTGGAGGTGGACATCACCAG
 CCGGACATGACCATCCGGCAGCAGATCATGCAGCTGAAGATCATGACCAACCGGCTGCGCAGCGCTACAACGGC
 AACGACGTGGACTTCCAGGACGCCAGTACGACGGCAGCGGCTCGGGCAGCGGTGATGGCTGTCTGGATGACCTC
 TGGCGCCGGAAGGTTCAGCAGGAAGAGCTCCAGCTCCCGGACGCCCTTGACCCATGCCCTCCCAGGCTGTGAGAG
 CAGGAAGGACAGAAGACCAAGACTTAATAAGAATTC

GlypKDEL: 1617 bp, 539 aminosyrer og 59,3 kDa

Primersekvenser

Tabell 1 – PCR primere

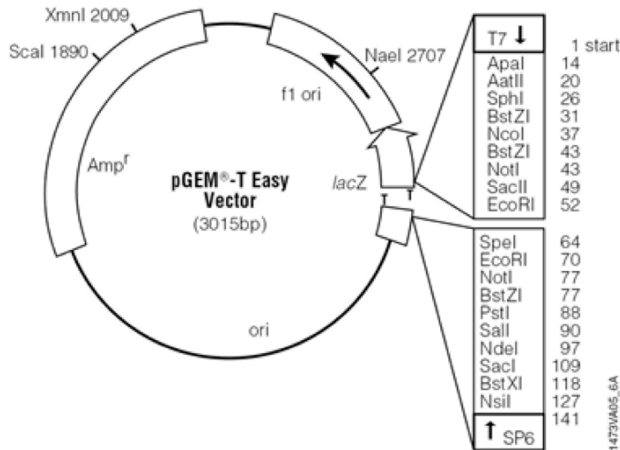
| Primer | Forover/ Revers | Sekvens | Konstrukt | T _m |
|--------|--------------------|--|-------------------------------|----------------|
| P-195 | Forover | 5`-GCTAGCATGGAGCTCCGGGCC-3` | Glypsekr-GFP, GlypKDEL-GFP | 57,0 °C |
| P-206 | Revers | 5`-GAATTC TTATTAGGTCTTCTGTCCTT CCTGCTC-3` | Glypsekr-GFP | 56,8 °C |
| P-207 | Revers | 5`-GAATTC TTATTAAAGTTCGTCTTTG GTCTTCTGTCCTTC-3` | GlypKDEL-GFP | 57,3 °C |

Tabell 2 - Sekvenseringsprimere

| Primer | Forover/ Revers | Sekvens | Vektor/GFP | T _m |
|--------|--------------------|------------------------------|------------------------|----------------|
| SP6 | Revers | 5`-GATTTAGGTGACACTATAG-3` | pGEM®-T Easy vektor | 52,0 °C |
| T7 | Forover | 5`-AATACGACTCACTATAGGG-3` | pGEM®-T Easy vektor | 54,0 °C |
| P-118 | Revers | 5`-TGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAA-3` | pEGFP-C1 vektor | 47,9 °C |
| P-158 | Forover | 5`-GGCGTGTACGGTGGGAGGTC-3` | pEGFP-C1 vektor | 56,0 °C |
| P-107 | Forover | 5`-ATGCCACCTAGCGCAAGCTGAC-3` | GFP | 53,45 °C |
| P-200 | Revers | 5`-GCACTGCACGCCGTAGGT-3` | GFP | 49,7 °C |

Vedlegg 2 – Plasmidkart

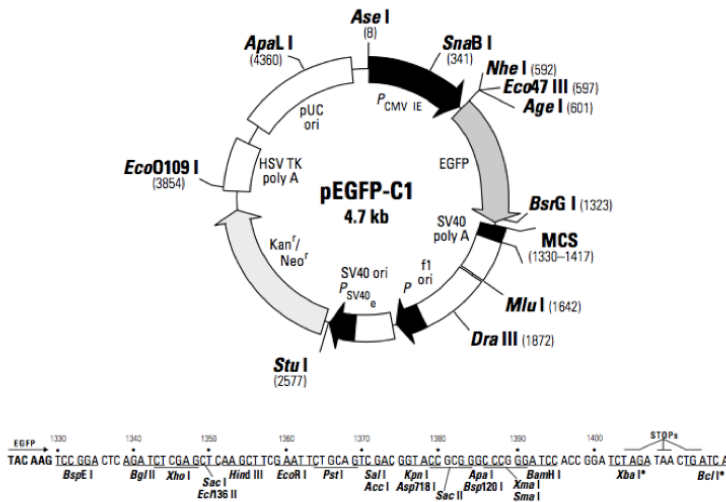
Plasmidkart av pGEM-T Easy



pGEM®-T Easy vektor (Promega).

Vektoren er kuttet med restriksjonsenzymet *EcoRV* og 3`terminal thymidin er tilført på hver ende. Ligerings effektiviteten vil øke på PCR-produkter med A-overheng, samtidig som religering av vektoren vil bli begrenset. pGEM®-T Easy vektor har T7 og SP6 RNA-polymerase promotorseter som flankerer MCS. Vektoren har et ampicillinresistensgen.

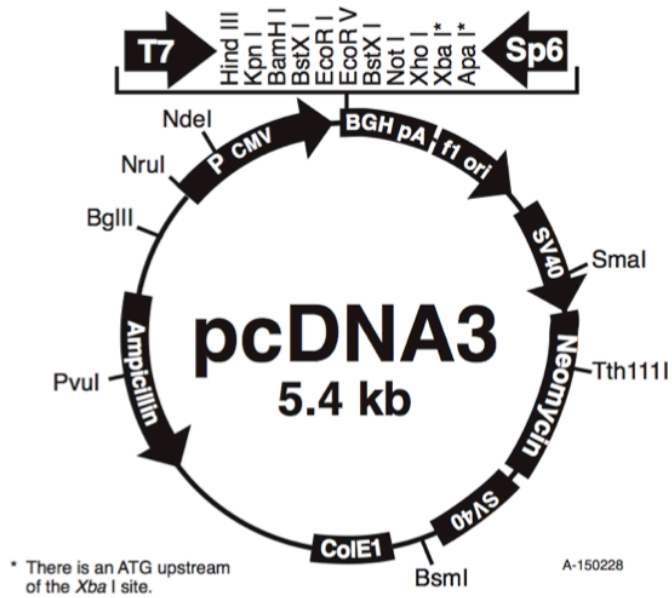
Plasmidkart av pEGFP-C1



pEGFP-C1 ekspresjonsvektor (Clontech).

Vektoren er en eukaryot ekspresjonsvektor med CMS-promotor. pEGFP-C1 har et kanamycinresistensgen for seleksjon i *E.coli* og et G-418 resistensgen for seleksjon i eukaryote celler.

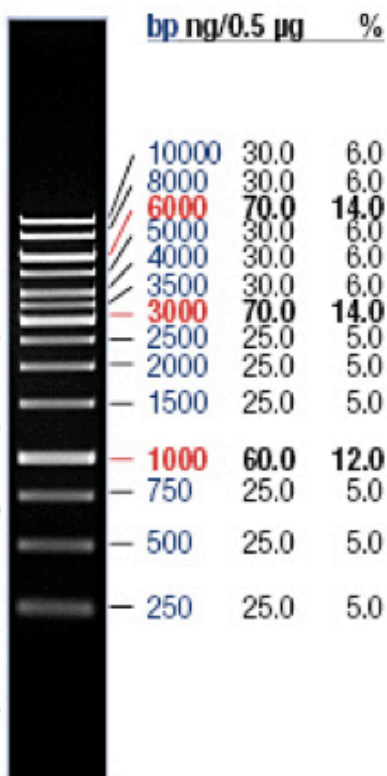
Plasmidkart av pcDNA3



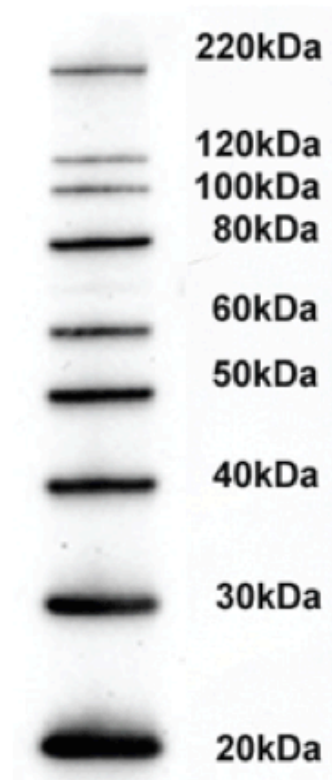
pcDNA3 ekspresjonsvektor (Invitrogen). Vektoren har T7 og SP6 RNA-polymerase-promotorer som flankerer MCS. Vektoren inneholder genet som koder for ampicillinresistens, og dette gjør at vektoren kan benyttes under transformering av *E.coli*-celler. I tillegg har pcDNA3-vektoren genet som koder for neomycinresistens, slik at G-418 kan benyttes ved seleksjon av mammalske celler.

Vedlegg 3 – Molekylvektstandarder

GeneRuler™ 1 kb
DNA Ladder
(Fermentas)



MagicMark™ XP
Western Standard
(Invitrogen)



Vedlegg 4 – Materialer

Tabell 1 – Bakterier/Celler

| Celler | Spesifikasjon | Leverandør |
|---------------------|--|------------|
| <i>E. coli DH5α</i> | <i>SupE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi1, relA1, λ-, deoR, delta (lacZYA-argF), U169, φ80lacZ-delta-M15, F-</i> | |
| MDCK II-celler | | ATCC |

Tabell 2 – Restriksjonsenzym og buffere

| Restriksjonsenzym | Kuttesete | Leverandør | Kat. Nr. |
|-------------------|---------------|------------|----------|
| NheI | 5`-G CTAGC-3` | NEB | R0131S |
| PmlI | 5`-CAC GTG-3` | NEB | R0532S |
| EcoRI | 5`-G AATTC-3` | NEB | B0101S |
| EcoRI Buffer | | NEB | B0101S |
| BSA (100x) | | NEB | B9001S |
| Buffer 1 (10x) | | NEB | B7001S |
| Buffer 2 (10x) | | NEB | B7002S |

Tabell 3 - Øvrige enzymer

| Enzymer og buffere | Leverandør | Kat. Nr. |
|---|-----------------|----------|
| 10x T4 DNA Ligase Buffer | Fermentas | B69 |
| Advantage® 2 Polymerase Mix (Enzym + Buffer) | Clontech | 639201 |
| cABC | Seikagaku Corp. | 100332 |
| Fosfolipase C, fosfatidylinositolspesitikk (PI-PLC) fra <i>Bacillus cereus</i> , 100 U/ml | Invitrogen | P-6466 |
| Heparitinase | Iduron | |
| PNGase F | NEB | P0705S |
| Endo H | NEB | P0702L |
| T4 DNA Ligase | Fermentas | EL0014 |

Tabell 4 - Kit

| Kit | Leverandør | Kat. Nr. |
|---|-------------------|-----------------|
| ECL Advance™ Western Blotting Detection Kit | GE Healthcare | RPN 2135 |
| NucleoSpin® Plasmid | MACHEREY-NAGEL | 740 588.250 |
| NucleoSpin® Extract II | MACHEREY-NAGEL | 740 609.50 |
| NucleoBond® Xtra Maxi | MACHEREY-NAGEL | 740 414.50 |
| pGEM® - T Easy Vector System | Promega | A1360 |

Tabell 5 - Antistoff

| Antistoff | Leverandør | Kat. Nr. |
|--|---------------------|-----------------|
| Rabbit pAb mot GFP (ab6556), 25µg | Abcam | ab6556-25 |
| Rabbit pAb mot glypikan 1 | Abcam | ab55971 |
| ECL™ Anti-Rabbit IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Whole antibody | Amersham Bioscences | NA934-100UL |

Tabell 6 - Radioaktive isotoper

| Radioaktive isotoper | Leverandør | Kat. Nr. |
|--|-------------------|-----------------|
| [³⁵ S]-Sulphuric Acid. 185MBq, 5mCi i 500 µl | Hartmann Analytic | SRA 1/05 |
| [³⁵ S]-Met-label. 185MBq, 5mCi i 500 µl | Hartmann Analytic | IS 103/185 |

Tabell 7 - Bruksutstyr

| Bruksutstyr | Leverandør |
|--|-------------------|
| 10 cm ² petriskål | Sarstedt |
| 10 ml sprøyte | BD |
| Plastrør (15 og 50 ml) | Sarstedt |
| Fryserør | Corning |
| Celleflasker (25 cm ² og 75 cm ²) | Sarstedt |
| 6 well culture cluster | Costar |
| Criterion XT gel 4-12 % Bis-Tris gel | Bio-Rad |
| Criterion XT gel 10 % Bis-Tris gel | Bio-Rad |
| Eppendorfrør (1,5 ml og 2 ml) | Sarstedt |

| Brukststyr | Leverandør |
|---|----------------------|
| Erlenmeyerkolber | Diverse leverandører |
| Filter, porestørrelse 0,2 µm | Nalgene |
| Filterpapir, ”Extra tick Blotting paper” | Bio-Rad |
| Filter (Transwell® Permeable Support 0,4 µm Polycarbonate Membrane) | Costar |
| Glass Bottom Microwell Dishes, 35 mm petri dish, 14 mm Microwell | MatTek CORPORATION |
| Hybond™-P PVDF membrane | GE Healthcare |
| Sterile 5, 10 og 25 ml pipetter | Sarstedt |

Tabell 8 - Utstyr

| Utstyr | Leverandør |
|--|-------------------|
| Agarosegel elektroforesekammer | VWR |
| Autoklav SS-325 | TOMY |
| Inkubator | |
| Konfokal fluorescensmikroskop 1X81 | Olympus |
| Elektroforese, strømforsyning | Pharmacia |
| NANODROP 2000 spectrophotometer | Thermo SCIENTIFIC |
| GS-15R sentrifuge | Beckman |
| Avanti™ J-25 sentrifuge | Beckman |
| Microfuge® 18 sentrifuge | Beckman |
| Dri –Block DB -2D | Techne |
| MiniSpin | Eppendorf |
| Peltier Thermal Cycler 200 | BioRad |
| PTC-100™ Programmable Thermal Controller | BioRad |
| CCD Image Station 4000R Pro Kodak | Fisher Scientific |
| pH-meter 420 | Thermo |
| DRI-BLOCK® DB-2D | Techne |
| Trans–Blot semi-Dry Transfer Cell | BioRad |
| UV-transilluminator | UVI Tec |
| Slab Gel Dryer 4050 | SAVANT |
| Typhoon 9400 Variable Mode Imager | GE Healthcare |

Tabell 9 – Reagenser

| Reagens | Leverandør | Kat. Nr. | Brukt til |
|--|-------------------------------|----------------------------|----------------|
| Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets | Roche | 04693159001 | Cellekultur |
| DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium) | Lonza | BE12-614F | Cellekultur |
| DMSO (Dimetylsulfoksid) | Duchefa Biochemie | D1370.0250 | Cellekultur |
| FuGENE [®] HD | Roche | E2311 | Cellekultur |
| Fetal Bovine Serum standard Quality | PAA The Cell Cultured Company | A15-101 | Cellekultur |
| G-418 | InvivoGen | Ant-gn-5 | Cellekultur |
| L-Glutamin | Lonza | 17-605E | Cellekultur |
| Penicillin/Streptomycin (Pen-Strep) | Lonza | 17-602E | Cellekultur |
| RPMI-1640 medium | GIBCO | 041-90985M | Cellekultur |
| Trypsin-EDTA | Gibco | 25300-104 | Cellekultur |
| Dynabeads [®] Protein A | Invitrogen | 100.02D | IP |
| 1 kb DNA Ladder, GeneRuler [™] | Fermentas | SM0313 | Kloning |
| 6x Loading Dye Solution | Fermentas | R0611 | Kloning |
| Ampicillin sodium salt | Sigma | A0166-25G | Kloning |
| Bacto [™] Agar | BD | 214010 | Kloning |
| Chloroform | Prolabo | 22 710.290 | Kloning |
| Difco [™] LB Broth | BD | 244620 | Kloning |
| dNTP | Fermentas | R0149, R0159, R0169, R0179 | Kloning |
| EDTA | Sigma | E5134-500G | Kloning |
| Ethidiumbromide | Sigma | E1510 | Kloning |
| Glycerol | VWR | 24388.295 | Kloning |
| Kanamycinsulfat | Sigma | K1377-5G | Kloning |
| Tris | VWR | 33621.26 | Kloning |
| UltraPure [™] Agarose | Invitrogen | 15510-027 | Kloning |
| Dynabeads M-280 Streptavidin | Invitrogen | 112.06D | Proteinanalyse |
| EZ-Link [®] Sulfo-NHS-LC-Biotin | Thermo SCIENTIFIC | 21335 | Proteinanalyse |
| XT MOPS Running Buffer 20x | Bio-Rad | 161-0788 | SDS-PAGE |
| XT Reducing Agent 20x | Bio-Rad | 161-0792 | SDS-PAGE |
| XT Sample Buffer 4x | Bio-Rad | 161-0791 | SDS-PAGE |
| Protein Molecular weight marker [methyl- ¹⁴ C] methylated | Perkin Elmer | 81101 UC | SDS-PAGE |

| Reagens | Leverandør | Kat. Nr. | Brukt til |
|--|-------------------|-------------|-----------------|
| 10x Tris/CAPS Buffer | Bio-Rad | 161-0778 | WB |
| Polyoxyethylene-sorbitan monolaureate (Tween 20) | Sigma | P7949 | WB |
| Precision Plus Protein All Blue standard | Bio-Rad | 161-0373 | WB |
| Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards | Bio-Rad | 161-0376 | WB |
| MagicMark™ XP Western Standard | Invitrogen | LC5603 | WB |
| Skim Milk Powder | Fluka Analytica | 70166 | WB |
| Methanol | Sigma | 32213 | WB |
| Nonidet P-40 | BioChemika | 74385 | Lyseringsbuffer |
| PMFS | Sigma | 78830 | Lyseringsbuffer |
| Glycine | Duchefa Biochemie | G07.09.1000 | Biotinylering |
| MgCl ₂ | ALDRICH® | 24.696-4 | Biotinylering |
| CaCl ₂ | Sigma | 21108 | Biotinylering |

Vedlegg 5 – Løsninger

MilliQ (MQ)-H₂O

Ultrarent destillert vann renses på Millipore MQ system og autoklavert før bruk.

Dyrkningsmedium

5 % FBS (varmeinaktivert ved 56 °C i 30 min), 1 % P/S, 1 % L-glutamin tilsettes til DMEM ("Dulbecco`s modified Eagle`s medium").

Fenol:Kloroform (1:1)

Like mengder fenol og kloroform blandes ved risting. Blandingen oppbevares ved 4 °C i flasker med aluminiumsfolie rundt.

Frysemedium

10 % FSB (varmeinaktivert ved 56 °C i 30 min), 1 % P/S, 1 % L-glutamin og 10 % DMSO tilsettes dyrkningsmediet, før sterilfiltrering.

IP-Lyseringsbuffer

1 % Nonidet P-40 (NP-40), 2 mM EDTA, 35 µg/ml PMFS, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5. Juster volumet til 500 ml ved å tilsette MQ-H₂O.

LB-medium

Tilsett 20 g LB broth til 1000 ml MQ-H₂O. Autoklaver og kjøøl ned til 40 °C før tilsetting av 500 µl ampicillin (50 µg/ml) eller kanamycin (50 µg/ml).

LB-skåler

LB-medium med 1,5 % baktoagar autoklaveres og kjøles ned til 50 °C før tilsetting av ønsket antibiotika (ampicillin (50 µg/ml) eller kanamycin (50 µg/ml)). Løsningen helles over i plastskåler til de dekker bunnen, før lokket settes på. Skålene stables oppå hverandre for å hindre kondens. Skålene tørkes et par timer i RT og lagres deretter opp ned i forseglede plastposer ved 4 °C.

SOB-medium

10 g Trypton, 2,5 g gjærekstrakt, 0,25 g NaCl og 415 µl 3M KCl blandes, og pH justeres til 7,0. Tilsett MQ-H₂O til 500 ml. Autoklaver løsningen og tilsett 2,5 ml sterilt 2M MgCl₂.

SOB-skåler

SOB-medium med 1,5 % baktoagar autoklaveres og kjøles ned til 50 °C før tilsetting av 2,5 ml sterilt 2M MgCl₂ og ønsket antibiotika. Løsningen helles over i plastskåler til de dekker bunnen, før lokket settes på. Skålene stables oppå hverandre for å hindre kondens. Skålene tørkes et par timer i RT og lagres deretter opp ned i forseglede plastposer ved 4 °C.

Tris-HCl (1 M)

121 g Tris-Base, fyll opp til nesten 1000 ml med dH₂O. Juster til ønsket pH med HCl. Juster volumet til 1000 ml med dH₂O.

0,8 % agarose

8 g UltraPure™ Agarose tilsettes 1000 ml 1x TAE. Løsningen autoklaveres ved 121 °C i 15 min. NB. Snu flasken opp ned et par ganger når den tas ut av autoklaven for å fordele agarosen jevnt. Løsningen settes i varmeskap ved 50 °C.

10 % SDS

10 g SDS blandes med 90 ml dH₂O.

10x PBS

0,019 M NaH₂PO₄ x H₂O, 0,0810 M Na₂HPO₄ x 2H₂O, 1,5 M NaCl. Tilsett dH₂O til 1 liter. NB: Tilsett kun halve mengden med dH₂O og bland til det løser deg. Tilsett så dH₂O til 1 liter.

10x PBS-EDTA

0,019 M NaH₂PO₄ x H₂O, 0,0810 M Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 1,5 M NaCl, 50 mM EDTA. Tilsett dH₂O til 1 liter. NB: Tilsett kun halve mengden med dH₂O og bland til det løser deg. Tilsett så dH₂O til 1 liter.

50x TAE

242 g Tris-base, 57,1 ml iseddik, 100 ml 0,5 M EDTA. Tilsett MQ-H₂O til 700 ml, og juster til pH 8 med NaOH. MQ-H₂O til 1000 ml.

Transformasjonsbuffer

10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂ blandes og dH₂O tilsettes til nesten 500 ml, og pH justeres til 6,7 med 5M KOH før volumet justeres til 500 ml.

BIOTINYLERING

PBS(C/M)

1 mM MgCl₂, 0,1 mM CaCl₂. Fyll opp med PBS til 1 liter.

PBS(C/M)-biotin (0,5 mg/ml)

40 ml PBS(C/M) til 0,02 g Sulfo-NHS-LC-Biotin. NB: Må lages rett før bruk pga rask hydrolyse.

PBS(C/M)-glycine

100 mM glycine. Fyll opp med PBS(C/M) til 1 liter.

Immunopresipitering (IP) med Protein-A-sepharosekuler

0,1 M Na-fosfatbuffer pH 8.1

0,86 g NaH₂PO₄ (MW 137,99) og 7,9 g Na₂HPO₄ (MW 177,99) blandes. Volumet justeres til 500 ml og pH til 8,1.

IP-vaskeløsning pH 7,4 uten BSA (0,5 l)

50 mM Tris (25 ml 1 M pH 7,4), 150 mM NaCl (4,38 g), 0,05 % Triton X-100 (0,25 ml) blandes. Fyll opp til 500 ml med dH₂O og juster pH til 7,4.

IP-vaskeløsning pH 7,4 med BSA (0,5 l)

50 mM Tris (25 ml 1 M pH 7,4), 150 mM NaCl (4,38 g), 0,05 % Triton X-100 (0,25 ml) og 1 % BSA (5 g) blandes. Fyll opp til 500 ml med dH₂O og juster pH til 7,4.

Fikseringsløsning

Metanol, dH₂O og eddiksyre blandes i et 1:5:1 forhold.

SDS-PAGE**XT-MOPS Running Buffer**

50 ml XT-MOPS (20x) til 950 ml dH₂O.

Western blotting**Katodebuffer**

100 ml Tris/CAPS buffer (10x), 10 ml 10 % SDS og 890 ml dH₂O blandes.

Anodebuffer

100 ml Tris/CAPS buffer (10x), 150 ml metanol og 750 ml dH₂O blandes.

10x TBS

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

1x TTBS

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

Blokkeringsløsning

5 % tørrmelk blandes i 1xTTBS.