

**STUDIER AV G-PROTEIN KOBLEDE RESEPTORER VED
BRUK AV FLUORESCENS -TEKNIKKER**

av

Wenche Jørgensen

Masteroppgave i farmasi



Senter for farmasi/ Institutt for indremedisin

Universitetet i Bergen

Mai 2009

Oppgaven er utført ved

Seksjon for farmakologi, UiB

FORORD

Denne masteroppgaven er utført ved Seksjon for farmakologi, Universitet i Bergen i perioden august 2008 til mai 2009.

En stor takk til min veileder professor Staffan Uhlen for faglig veiledning. En spesiell takk for mye hjelp i den siste perioden med bearbeiding av resultater og fullføring av det skriftlige arbeidet. Uten din hjelp hadde det blitt vanskelig å bli ferdig med oppgaven i tide.

Doktorgradsstipendiat Jan Anker Jahnsen fortjener også takk for hjelp og støtte underveis. Uten din tilstedeværelse hadde dagene blitt lange og veien tyngre å gå. Takk også for din hjelp med korrekturlesing av oppgaven.

Vil også takke alle ansatte ved Seksjon for farmakologi. Dere er en kjempeflott gjeng hvor jeg følte meg velkommen fra første dag. Oppmuntrende ord i vanskelige stunder har varmet.

Alle mine medstudenter fortjener også takk. Dere har uten tvil vært til stor støtte når dagene på laben ikke alltid gikk som de skulle og humøret var deretter.

Takker dessuten min samboer og mine to barn som har holdt ut med meg i disse tre årene, det kan ikke bare har vært enkelt å ha en til tider småstresst samboer og mamma i hus.

Jeg vil også takke resten av min familie og alle mine venner for støtte og oppmuntring i vanskelige tider.

Nyborg, mai 2009

Wenche Jørgensen

SAMMENDRAG

Masteroppgaven tar for seg betydningen av den N-terminale halen på 5-HT_{2C} og α_{2C} -reseptorene, to forskjellige G-proteinkoblede reseptorer. Et spørsmål var om de har endogene signalpeptid, som predikert i prediksjonsdatabasen SignalP 3.0.

Det første prosjektet fokuserer på undersøkelser om 5-HT_{2C} reseptoren har et endogent signalpeptid i sin N-terminalhale. Det finnes en polymorfisme som fører til en substitusjon av cystein med serin i posisjon 23 i den humane 5-HT_{2C} reseptoren. Hos hvite er andelen som har en cystein i posisjon 23 87 %, mens 13 % har en serin. Det gjøres store epidemiologiske undersøkelser om dette har noen funksjonell konsekvens. Vi syntes at bakgrunnen for disse spekulasjoner var tynn. Dersom reseptoren har et 32 aminosyre langt klippbart signalpeptid vil Cys23Ser SNP være fraværende i det fungerende reseptorproteinet.

I mitt andre prosjekt har vi undersøkt om den hydrofobe sekvensen i N-terminalhalen på α_{2C} -reseptoren har en slik struktur fordi den skal være en del av et fungerende signalpeptid, eller om denne uvanlig hydrofobe sekvens fyller en annen funksjon, som det i dag vites lite om.

Konstrukt med FLAG epitop ble undersøkt ved bruk av fluorescensmikroskopi. Fluorescens-innmerking ble gjort ved bruk av to forskjellige primære antistoff (M1 og M2, pluss sekundært fluorescent antistoff). Antistoffet M2 merker in FLAG-epitopen uansett posisjon i proteinet. M1 merker in FLAG kun i absolutt N-posisjon, altså kun etter klipping foran FLAG-epitopen.

Resultatene viste tydelig at det endogene antatte signalpeptidet i 5-HT_{2C}-reseptoren fungerer som et klippbart SP. Det var også dette som ble predikert i SignalP 3.0. Videre viste radioligandbinding at signalpeptidsekvensen ikke er nødvendig for uttrykk av 5-HT_{2C}-reseptorerer i plasmamembranen da et trunkert konstrukt ble like bra uttrykt som villtypen.

De samme forsøkene ble gjort med α_{2C} -konstruktene. Disse viste at det predikerte endogene signalpeptidet i α_{2C} -reseptoren ikke fungerte som et klippbart SP. Dette er stikk i strid med hva som ble predikert for α_{2C} -reseptoren i SignalP 3.0. Radioligandbindingforsøk med trunkerte α_{2C} konstrukt viste at sekvensen imidlertid er viktig for reseptoruttrykk da en trunkert reseptor uttryktes 100 ganger lavere i membranen sammenlignet med villtypen.

INNHOLDSFORTEGNELSE

FORORD	3
SAMMENDRAG	4
INNHOLDSFORTEGNELSE	5
1. FORKORTELSER	8
2. INNLEDNING	9
2.1 Bakgrunn	9
2.2 Målsetning	10
3. INTRODUKSJON	11
3.1 G-protein koblede reseptorer (GPCR:er) og G-proteiner.....	11
3.2 N-terminalen som signalpeptid	14
3.3 5-HT _{2C} reseptoren med Cys23Ser SNP	15
3.4 Adrenerge reseptorer (AR)	16
4. MATERIALE OG UTSTYR	17
4.1 Kjemikalier	17
4.2 Utstyr	19
5. METODER OG TEORI.....	20
5.1 Metoder brukt ved tillaging av genkonstrukt.....	20
5.1.1 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	20
5.1.2 Gel elektroforese av DNA	21
5.1.3 GeneClean	22
5.1.4 Klipping av DNA med restriksjonsenzym.....	22
5.1.5 Ligering av klypt, rensed DNA inn i en vektor	23
5.1.6 Transformasjon (Heatshock)	24
5.1.7 Isolering av DNA ved bruk av Qiagen Miniprep Kit.	25
5.1.8 Restriksjonsanalyse og sekvensering.....	25
5.1.9 Maxipreparasjoner.....	26
5.2 COS-7 celler	27
5.2.1 Dyrking av COS-7 celler	27
5.2.2 Splitting av COS-7 celler	27
5.3.1 Transfektering.....	28
5.4.1 Radioligandbinding.....	29
5.5.1 Fiksering og innmerking.....	30
6. EKSPERIMENTELT	31
6.1 Detaljert fremstilling av $\alpha_{2C.2-8d}$, $\alpha_{2C.2-15d}$ og $\alpha_{2C.2-33d}$	31
6.1.1 Første pcr-kjøring.....	31
6.1.2 Klipping med restriksjonsenzym	33

6.1.3 Ligering av bånd inn i vektor, restriksjonsanalyse og sekvensering	33
6.1.4 Radioligandbinding	35
6.2 Fremstilling av FLAG α_{1B}	36
7. RESULTATER	40
7.1 Presentasjon av 5-HT _{2C} genkonstrukt	40
7.2 Resultat fra radioligandbindingsforsøk 5-HT _{2C}	41
7.3 Satureringskurve for 5-HT _{2C} , villtypen.....	41
7.4 Resultat fra innmerkning med M1 og M2 hos 5-HT _{2C} -konstrukt	43
7.5 Bilder fra fluorescensmikroskopi 5-HT _{2C}	44
7.6 Presentasjon av α_{2C} genkonstrukt	46
7.7 Resultat fra radioligandbindingsforsøk α_{2C}	47
7.8 Satureringskurve for α_{2C} , villtypen	47
7.9 Resultat fra innmerkning med M1 og M2 hos α_{2C} -konstrukt.....	49
7.10 Bilder fra fluorescensmikroskopi α_{2C}	49
8. DISKUSJON	50
8.1. Immunofluorescensmikroskopi og innmerkning med M1 og M2	50
8.2 Radioligandbinding.....	52
9. KONKLUSJON	53
10. OPPFØLGINGSSTUDIER.....	53
10.1 α_{2C} -AR	53
10.2 FLAG- α_{1B}	54
11. REFERANSELISTE	55
12. VEDLEGG.....	58
12.1 5-HT _{2C} -konstrukt	58
12.1.1 Presentasjon av 5-HT _{2C} N-terminalhalene.....	58
12.1.2 HMM resultat for 5-HT _{2C} , villtypen	59
12.1.3 Satureringskurver for 5-HT _{2C} -konstruktene	60
12.2 α_{2C} -konstrukt.....	61
12.2.1 Presentasjon av α_{2C} N-terminalhalene	61
12.2.2 HMM resultat for α_{2C} , villtypen	62
12.2.3 Satureringskurver for α_{2C} konstruktene	63
12.3 Protokoller brukt i forsøkene	64
12.3.1 GeneClean	64
12.3.2 Transformasjon (Heatshock)	64
12.3.3 Transfektering tilpasset for 9 cm ² petri-skål.....	65
12.3.4 Membranpreparasjon.....	65
12.3.5 Proteinbestemmelse etter Lowry-SDS-metoden.....	66
12.3.6 Radioligandbinding	67

12.3.7 Fiksering og innmerking	70
12.4 Oppskrifter på løsninger	71
12.4.1 Til fiksering og innmerking for fluorescensmikroskopi	71
12.4.2 Løsninger til radioligandbindingsforsøk	73
12.5 Diverse.....	74

1. FORKORTELSER

5-HT	5-hydroksytryptamin
AR	Adrenerge reseptorer
B _{max}	Maksimal binding av reseptorer
BSA	Bovine serum albumin
COS-7	African green monkey kidney fibroblast
CPM	Counts per minute = antall DPM som detekteres av β-telleren
dNTPs	Byggesteinene, N= adenosin, tymidin, cytidin eller guanosin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulphoxide
DPM	Disintegration per minute= antall atom i radioaktivt materiale som henfaller pr minutt
FCS	Fetal calf serum (kalveserum fra foster)
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GPCR:er	G-protein koblede reseptorer
HMM	Hidden Markow Model
IHSP	Influenza hemagglutinin signal peptid
K _d	Konstant som beskriver ligandaffinitet
LB-medium	Luria-Bertani medium
PFA	Paraformaldehyd
PCR	Polymerase Chain Reaction
PBS	Phosphate Buffered Saline
RPM	Revolutions per minute = omdreiningstall
SDS	Sodium dodecyl sulphate
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethane
SNP	Single nucleotide polymorphism
TBS	Tris Buffered Saline
TM	Transmembran

2. INNLEDNING

2.1 Bakgrunn

Da jeg begynte på min masteroppgave kom jeg inn i et prosjekt som hadde pågått siden 2006. Forskningsgruppen bestod av min veileder, professor i farmakologi Staffan Uhlen, og doktorgradsstipendiat Jan Anker Jahnsen. En stor del av deres forskning har vært studier av N-terminalen hos G-protein koblede reseptorer (GPCR:er) og N-terminalens betydning for reseptorenes uttrykk i plasmamembraner. Mange GPCR:er inneholder en klippbar signalsekvens i N-terminalen, men de fleste, ca 90 % gjør det ikke [1]. Man kan undersøke GPCR:er og andre proteiner for innhold av signalpeptider (SP) ved å bruke et databasert predikteringsprogram, SignalP 3.0 [2]. Predikteringsprogrammet bruker to forskjellige metoder basert på "neural network" og "hidden Markow model algoritme" [3]. Uhlen hadde sett at programmet indikerte at 5-HT_{2C}-og α_{2C} -reseptorene begge skulle ha et endogent klippbart signalpeptid. Dette er uvanlig for den type GPCR:er som disse to reseptorene hører til, nemlig de som binder små monoaminerge ligander. Alle andre slike monoamin-reseptorer prediktertes til ikke å ha et signalpeptid. De fleste SP klippes bort når det har gjort jobben sin, som i dette tilfellet er å lokalisere proteinet til plasmamembranen.

Metoden som anvendes i prosjektet for å bestemme om et antatt signalpeptid virkelig er et signalpeptid som klippes bort av cellenes signalpeptidase er å introdusere en FLAG-epitop (DYKDDDDA) etter det antatte signalpeptidet. Et antistoff, M1, kan kun binde til FLAG-epitopen når det er i den absolutte N-terminalen. Ikke engang et metionin (kodet av startkodonet ATG) får finnes før DYKDDDDA-sekvensen. Antistoffet M2 derimot, binder FLAG-epitopen også inne i proteiners aminosyresekvenser. Dette gjør at M2 viser om reseptoren uttrykkes i cellene. Parallelt viser M1 om den uttrykte reseptoren har fått signalpeptidet foran FLAG-epitopen bortklippt. Dette gir indikasjoner på om reseptorkonstruktet har et klippbart signalpeptid eller ikke.

Uhlen og Jahnsen hadde tidligere laget åtte forskjellige konstrukt av 5-HT_{2C}-reseptoren med utgangspunkt i villtypen (se figur 7.1, side 40), og fem ulike konstrukt av α_{2C} -reseptoren med utgangspunkt i villtypen (se figur 7.4, side 46). Disse konstruktene er tenkt å gi beskjed om reseptorene har et klippbart signalpeptid. Om det predikterte signalpeptid klippes fra 5HT_{2C}-reseptoren så innebærer det at cystein eller serin i posisjon 23 i reseptoren fjernes. Ettersom denne Cys23Ser polymorfismen anses å være av betydning ved diverse psykiske tilstander [4]

så syntes Uhlen og Jahnsen at det var viktig å klargjøre om aminosyre 23 virkelig klippes bort. Av lignende grunner er det interessant å se om den uvanlig hydrofobe N-terminale halen i α_{2C} -AR klippes bort eller om den sitter igjen, og kanskje fyller en funksjon. Radioligandbinding på 5-HT_{2C} konstruktene hadde vist at det endogene antatte signalpeptidet ikke var nødvendig for at reseptorene skulle kunne uttrykkes; konstrukt D og F som er uten det antatte signalpeptidet (figur 7.1, side 40) ble godt uttrykt. Uhlen og Jahnsens foreløpige resultat på α_{2C} -konstruktene viste at trunkering av reseptoren med 22 aminosyrer drastisk nedsatt reseptorens uttrykksnivå. Dette er resultater som ennå ikke er publisert.

2.2 Målsetning

Masteroppgaven har to hovedmålsetninger da det er jobbet både med 5-HT_{2C} og α_{2C} -reseptorene; to forskjellige G-proteinkoblede reseptorer.

Det første prosjektet fokuserer på undersøkelser om 5-HT_{2C} reseptoren har et endogent signalpeptid i sin N-terminalhale. Det skal undersøkes om posisjonen til den kjente Cys23Ser polymorfismen i N-terminalhalen til 5-HT_{2C} blir klipt bort som en del av et signalpeptid. I tillegg til konstruktene tidligere laget av Uhlen og Jahnsen skal samlingen i masterprosjektet utvides ved å lage ytterligere fire 5-HT_{2C} konstrukt og teste disse sammen med de andre åtte ved bruk av radioligandbinding og fluorescensmikroskopi.

Som nevnt er det prediktert at α_{2C} -reseptoren har et endogent klippbart signalpeptid. Den andre målsetningen fokuserer på dette. Tidligere hadde Uhlen og Jahnsen trunkert α_{2C} -reseptoren med 22 aminosyrer og sett av dette drastisk nedsatte reseptorens uttrykknivå. Dette var overraskende for gruppen, og man ønsket derfor å undersøke dette fenomen ytterligere ved å trunkere reseptoren med færre og flere aminosyrer. Det skal lages tre trunkerte konstrukt til ved å fjerne 7, 14 og 32 aminosyrer fra N-terminalhalen og bruke disse i radioligandbindingsstudier. Hypotesen er at det hydrofobe området på 12 aminosyrer i N-terminalhalen, kun Ala, Val og Leu, gir α_{2C} -reseptoren et funksjonelt kjennetegn; enten at det er en del av et signalpeptid eller at det gir α_{2C} -reseptorens N-terminalhale en spesiell egenskap. I tillegg skal det lages et konstrukt hvor både et kjent signalpeptid, nemlig influensa virus hemagglutinin signalpeptid, IHSP, og en FLAG epitop blir satt på foran den endogene N-terminalen (konstrukt α_{2C} -6 i figur 7.4, side 46). Alle konstrukt, som uttrykker reseptorer

med FLAG epitop, skal så undersøkes ved bruk av fluorescensmikroskopi. Dette for å se om sekvensen foran FLAG-epitopen klippes bort eller ikke.

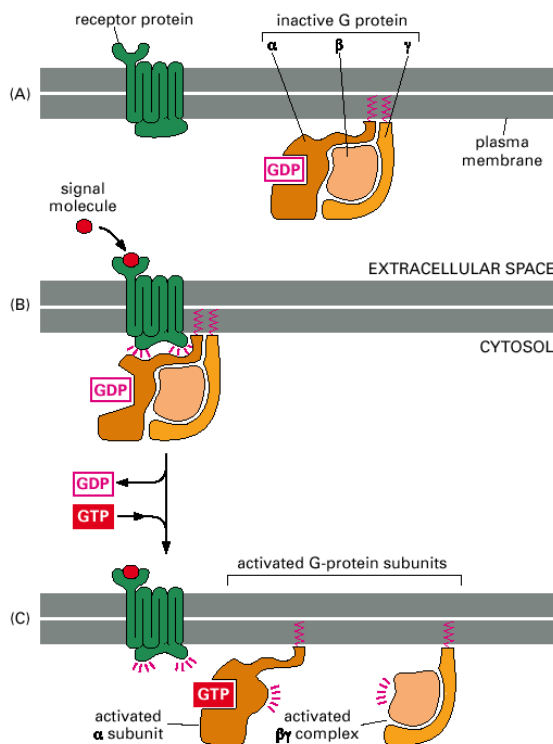
3. INTRODUKSJON

3.1 G-protein koblede reseptorer (GPCR:er) og G-proteiner.

I masterprosjektet er det kun jobbet med GPCR:er. Dette er den største familien av reseptorer i det menneskelige genomet [5]. Flere hundre reseptorer er kjent [6], og GPCR:er representerer det viktigste og største målet for legemidler. Store legemiddelfirmaer vier disse reseptorene også mye oppmerksomhet [7]. Biologiske funksjoner som kan være mediert av disse reseptorene kan for eksempel være hormonsekresjon, kontroll av blodtrykk, smak, lukt og syn [8]. Tidligere ble de ulike humane GPCR:er delt inn i tre grupper av familier. Den rhodopsin-lignende familie A var den største og best studerte når det gjaldt struktur og funksjon. Både 5-HT_{2C} og α_{2C} -reseptorerne inngår i denne familien. Familie B var den sekretin-lignende reseptor som bandt neuropeptider og andre peptidhormoner. Den siste ble omtalt som familie C og var lik på den metabotrope glutamat reseptor (mGluR). I 2003 ble de humane GPCR:er reklassifisert ved å bruke fylogenetisk analyse og ble delt opp i fem forskjellige grupper og gitt navnet GRAFS. Dette navnet gjenspeilte forbokstaven til hver av gruppene, glutamate, rhodopsin, adhesjon, frizzled/smak2 og sekretin. Hver av disse klassene har blitt videre delt opp i underklasser basert på en kombinasjon av sekvenslikhet, funksjonelle domene og ligandbindings egenskaper [5]. I masteroppgaven er det hensiktsmessig å skille mellom proteiner som ha en klippbar signalsekvens i N-terminalen og proteiner som ikke har det. Denne inndelingen er også brukt tidligere [9].

Alle kjente GPCR:er har den samme gjenkjennelige struktur. Reseptorene inneholder syv transmembrane helikser, tre ekstracellulære looper og tre intracellulære looper. En N-terminal finnes ekstracellulært og en C-terminal intracellulært. De 7-TM heliksene er hver tilnærmet 24 aminosyrer lange, mens både C- og N-halene kan variere veldig i lengde med opp til flere hundre aminosyrer. Når et ekstracellulært signalmolekyl binder til reseptoren vil det skje en konformasjonsendring som gjør reseptoren i stand til å aktivere et G-protein som er festet til innsiden av plasmamembranen. Det finnes flere varianter av G-proteiner, men de har alle en lik generell struktur og opererer på samme måte. De er sammensatt av tre proteinenheter; α , β , og γ . To av dem, α og γ er festet til plasmamembranen med korte lipid-haler. Ustimulert er

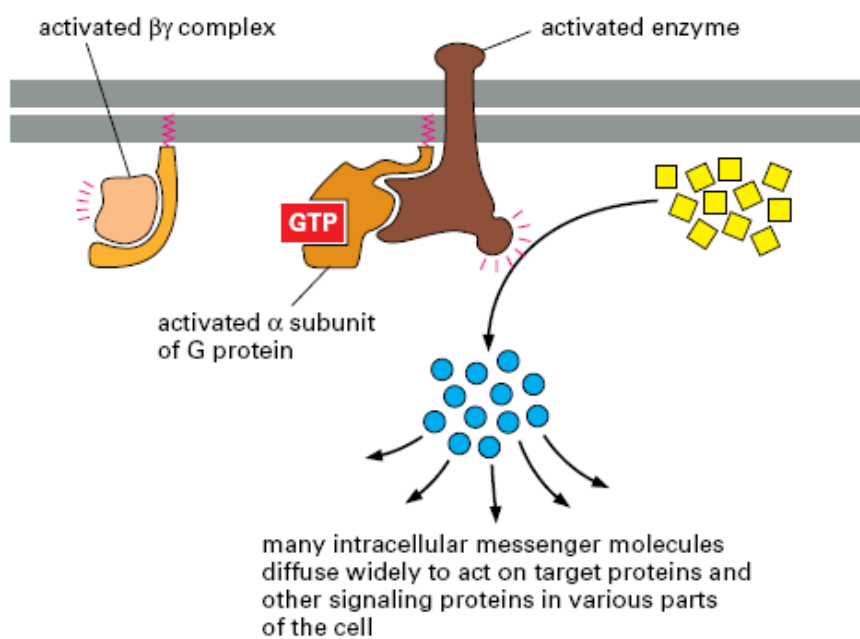
både reseptoren og G-proteinet inaktive (A). Ved binding av en agonist til reseptoren vil denne forandre konformasjon. Dette vil igjen føre til at G-proteinet som nå er bundet til reseptoren vil forandre sin konformasjon (B). Dette gjør at G-proteinet kan bytte ut sitt GDP med GTP. Bindingen av GTP gjør at G-proteinet deles opp i to aktive komponenter; en α -subenhet, med GTP bundet og et $\beta\gamma$ -kompleks. Aktiviteten avsluttes når GTP på α -subenheten hydrolyseres til GDP + P_i. α -subenheten og $\beta\gamma$ -komplekset kan begge regulere aktiviteten til målproteiner i plasmamembranen. Så lenge en agonist er bundet til reseptoren, er den i aktiv tilstand og kan derfor katalysere aktiveringen av mange G-protein molekyll (C) [10].



Figur 3.1 G-proteiner dissosierer til to signalproteiner når de aktiveres. Kilde:[10]

Det finnes fire hovedtyper av reseptorer for hormoner og transmittorsubstanser, GPCR:er er en av dem. GPCR:er er også kjent som metabotrope reseptorer eller 7TM reseptorer. Målproteinene for G-protein subenhetene er enten ionekanaler eller membranbundne enzymer. Det finnes fire hovedgrupper av G-proteiner; G_s, G_i, G_q og G_{12/13}. 5-HT_{2C} reseptoren virker på gruppen av G_q, α_{2C} reseptoren virker på gruppen av G_i. Selv om det finnes unntak, er som oftest G_i-typen hemmende, mens G_q-typen er kalsiummobiliserende [11]. Enzymene som aktiveres av G-proteiner katalyserer syntesen av intracellulære second-messenger molekyll. Hvert av de aktiverte enzymene kan generere mange slike second-messenger molekyll. Dette

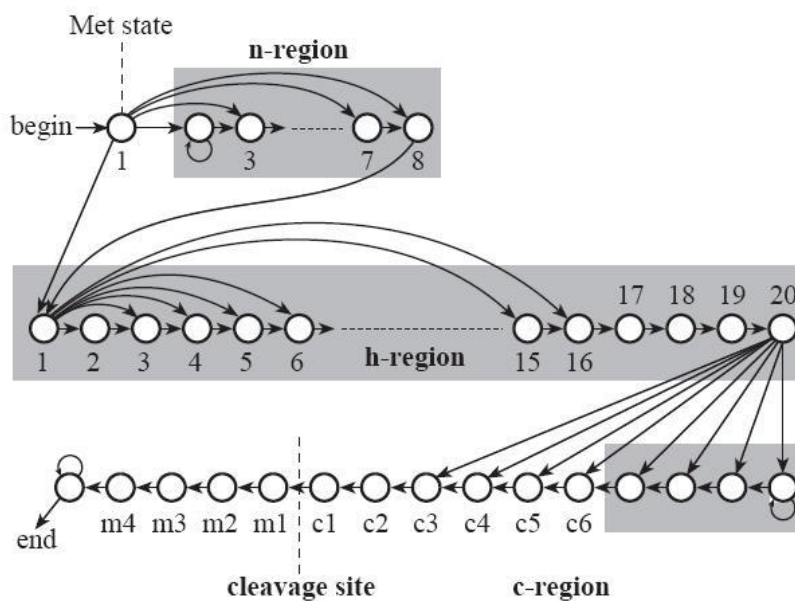
betyr at signalet blir sterkt amplifisert på dette trinnet. Signalet sendes videre av disse molekylene som binder til målproteinene og andre signalproteiner i cellen og virker inn på deres aktivitet. Forskjellige molekyl vil skape forskjellige cellulære responser. Målenzymet for G_i er adenyl sykklase. Dette enzymet er ansvarlig for dannelsen av det lille intracellulære signalmolekylet syklisk AMP, og det hemmes av G_i . G-proteinet G_q , som aktiveres av $5-HT_{2c}$ reseptoren er ansvarlig for produksjonen av de små intracellulære signalmolekylene inositol trifosfat og diacylglycerol.



Figur 3.2 Viser hvordan aktivert enzym gir opphav til dannelse av second.messenger molekyl. Kilde [10].

3.2 N-terminalen som signalpeptid

Det har tidligere vært vist at den ekstracellulære N-terminalen hos GPCR:er som mangler signalpeptid er relativt korte og har færre uladete aminosyrer i forhold til N-terminalen hos GPCR:er som har et signalpeptid [9]. Fra starten av signalpeptiders aminosyresekvens ligger n-regionen, som vanligvis består av to til seks aminosyrer, hvor minst en har positiv ladning. Det mest karakteristiske fellestrekket hos signalpeptider er en sekvens av hydrofobe aminosyrer. Dette strekket kalles for h-regionen. Mellom h-regionen og stedet hvor N-terminalen klippes ligger c-regionen. Dette området består for det meste av tre til syv polare, men uladete aminosyrer. Helt i nærheten av klippstedet finnes et spesielt mønster med aminosyrer; området ved posisjon-3 og-1 må være små og nøytrale for at klippingen skal skje korrekt [12].



Figur 3.3 Modell brukt for signalpeptider.

Dette kan eksempligeres med influensa virus hemagglutinin signal peptidet:

MKT IIALSYIF CLVFA

Innen familien av rhodopsin-lignende GPCR:er kan man si at 5-HT_{2C} og α_{2C} -reseptorerne inngår i en subgruppe, nemlig GPCR:er som binder små, monoaminerge transmittorsubstanser. For denne gruppen er rollen til N-terminalhalen i stor grad ukjent. Reseptorer som tilhører denne gruppen har vanligvis korte haler, oftest 15-60 aminosyrer

lange. Uhlen har tidligere gjort forsøk på α_{1D} -reseptoren. Denne monoaminreseptoren har en uvanlig lang N-terminalhale (95 aminosyrer). Ved tillegg av signalpeptidet som finnes på influensavirusets hemagglutinin-protein (IHSP), viste det seg at uttrykksnivået til α_{1D} -reseptoren økte cirka 10 ganger. Nivåene av detekterbare reseptorer økte gradvis med økende trunkerte N-terminaler i området 17, 30, 49 og 58 trunkerte aminosyrer [13]. Dette viser at N-terminalhalens struktur og lengde kan ha stor betydning for reseptorenes uttrykksnivå i plasmamembranen.

3.3 5-HT_{2C} reseptoren med Cys23Ser SNP

Serotonin er et fylogenetisk gammelt molekyl. Navnet ble gitt til en ukjent vasokonstriktorsubstans som ble funnet i serum etter at blodet hadde koagulert. Kjemisk ble det identifisert som 5-hydroxytryptamin (5-HT) i 1948. Det finnes tretten subtyper av selve serotoninreseptoren. Tolv er hittil identifisert som GPCR:er, og en er identifisert som ionotrop reseptor (6). 5-HT_{2C} er en av GPCR:erne. Flere ulike farmakologiske klassifikasjoner av reseptorene har kommet og gått. Den nåværende klassifikasjonen skiller mellom syv hovedreseptortyper, 5-HT₁₋₇, hvor type 1 og 2 er videre inndelt i subtyper [14]. 5-HT_{2C}-reseptoren er bare funnet i hjernen, hvor den imidlertid uttrykkes sterkt i regioner som assosieres med blant annet angst, humør, nevroendokrin regulering og appetitt [15]. Etter aktivering fører 5-HT_{2C}-reseptoren til aktivering av fosfolipase C og inositol 1,4,5-trifosfat. N-terminalenhalen hos 5-HT_{2C} reseptoren er 59 aminosyrer lang.

I 1995 ble det publisert en artikkel som fastslo at en polymorfisme i et humant 5-HT_{2C} reseptorgen førte til en substitusjon av cystein med serin i posisjon 23 [16]. I dag er denne kjent som Cys23Ser SNP. Denne aminosyren finnes i den endogene ekstracellulære N-terminalen, altså i den delen av 5-HT_{2C}-reseptoren som vi er interessert i. Hos hvite er andelen som har en cystein i posisjon 23 87 %, mens 13 % har en serin (16). Fordelingen kan variere mellom rase. En SNP kan forandre aminosyresekvensen til et protein. For en GPCR kan dette tenkes å forstyrre blant annet proteinfoldingen, ligandbindingen og interaksjonen med G-proteiner [17]. Det er fortsatt uklart om Cys23Ser SNP har noen funksjonell konsekvens [18]. Et søk på "Cys23Ser" på PubMed gir 42 treff. To tidligere studier viser motsatte resultater. Okada og medarbeider viste i sin studie at polymorfismen i 5-HT_{2C}-reseptoren var funksjonell [19], mens Fentress og medarbeidere viste i sin studie at Cys23Ser SNP ikke hadde noen funksjonelle konsekvenser [4]. N-terminalen ble testet i SignalP 3.0. Denne viste med 86 %

sannsynlighet at reseptoren har et 32 aminosyre langt klippbart signalpeptid. (Se vedlegg 12.1.2, side 59). Det vil med andre ord si at SNP vil være fraværende i det fungerende reseptorproteinet om dette stemmer. I prosjektet er det undersøkt om 5-HT_{2C}-reseptorene har et signalpeptid som klippes av sammen med den aminosyren som finnes i Cys23Ser-SNP-posisjonen.

3.4 Adrenerge reseptorer (AR)

Det finnes i dag ni ulike adrenerge reseptorer som alle er GPCR:er [20]. Flere studier har gjort at man i dag vet en del om disse forskjellige reseptorene som formidler responser fra de endogene katekolaminene noradrenalin og adrenalin. Hormonet adrenalin frigjøres fra binyrebarken, mens neurotransmitteren NA frisettes fra nerveender. Blant funksjonene de kontrollerer er de kardiovaskulære, fordøyelsen, respiratoriske, pupilledilatasjon og endokrine funksjoner. AR er derfor viktige mål for legemidler i behandling av veldig mange sykdommer, både ved bruk av agonister og antagonist [20]. De første forsøk på å klassifisere AR inn i forskjellige farmakologiske klasser ble først gjort i 1948, de ble da delt opp i α - og β [21]. α -AR ble først studert nærmere i 1970-årene og da inndelt i α_1 -AR og α_2 -AR. Flere studier førte til inndelinger i undergrupper. Medlemmene i undergruppene (reseptor-subtypene) deler sekvenslikhet først og fremst i de transmembrane regionene. I våre forsøk brukte vi α_{2C} -reseptoren. Denne reseptoren ble identifisert på begynnelsen av 90-tallet ved bindingsstudier i pungenyrer og i cellelinjer fra dette organet, og ble dessuten klonet fra den menneskelige nyre [22]. En oversikt over nyttig viten om α_{2C} -reseptoren finnes på IUPHAR Database sine nettsider [23]. Hos α_{2C} -reseptoren er halen i N-terminalen 49 aminosyrer lang. De ytre 22 aminosyrene predikteres til å være et signalpeptid. Sekvensen er MASPALAAALAVAAAAGPNASG. Blant disse aminosyrene finnes et veldig hydrofobt område på 12 aminosyrer, dette skulle kunne være h-regionen i et signalpeptid. α_{2C} -reseptoren kopleter via G_i og fører derfor til hemming av adenylylase. Dette fører til at mengden av cAMP inne i målcellene synker. Reseptoren kan også hemme Ca²⁺-kanaler med minsket frisettelse av transmittorsubstanser som resultat, eller den kan øke andelen av åpnete K⁺-kanaler (hyperpolariserende) [24]. I prosjektet er det undersøkt om den hydrofobe sekvensen i N-terminalhalen på α_{2C} -reseptoren finnes fordi den skal fungere som et signalpeptid, eller om denne uvanlig hydrofobe N-halen fyller en annen funksjon, som man i dag ikke vet noe om.

4. MATERIALE OG UTSTYR

4.1 Kjemikalier

Tabell 4.1 Kjemikalier brukt ved tillaging av genkonstrukt og i forsøkene

Materiale	Produsent
Ammoniumklorid	Sigma-Aldrich, Tyskland
Ampicillin, natriumsalt	Calbiochem
Anti-Mouse IgG- FITC antistoff, F0257	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Askorbinsyre	Apotekproduksjon AS, Oslo
Bovin serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Tyskland
COS-7 celler	ATCC, Rockville, USA
DMEM	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
6X DNA Loading Dye	Fermentas
DMSO	Merck, Tyskland, kjøpt hos A/S Pihl, Oslo
<i>E.coli</i> celler (DH5 α)	Invitrogen
EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate, 99+%)	Sigma-Aldrich, Tyskland
Fetal Calf Serum (FCS)	Sigma-Aldrich, Tyskland
5-HT _{2C} -reseptorkonstrukt i pcDNA3.1 vektor	UMR, Missouri, USA
[³ H]-Mesulergin, 91 Ci/mmol	Amersham Biosciences, Uppsala, Sverige
[³ H]-RX 821002, 49 Ci/mmol	Amersham Biosciences, Uppsala, Sverige
Isopropanol prima	Arcus AS
LB-medium	Steril produksjon, Armauer Hansens Hus
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Metafectene	Biontex, Tyskland
Methysergid	Sandoz, Basel, Sveits (gave)
Monoclonal ANTI-FLAG ®M1 antistoff, F3040	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Monoclonal ANTI-FLAG ®M2 antistoff, F3165	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natrium hydrosulfitt ca 85 %	Sigma-Aldrich, Tyskland
Natriumjodid	Sigma-Aldrich, Tyskland

OptiMEM	Invitrogen
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Tyskland
PCR primere	TAG Copenhagen A/S, Danmark
Penicillin 10.000 units-Streptomycin 10mg/ml Stabilisert, sterilfiltrert	Sigma-Aldrich, Tyskland
Platinum® PCR SuperMix High Fidelity	Invitrogen
Rektifisert sprit	Kemetyl Norge AS
Restriksjonsenzym m/buffere	Fermentas
SeaKem® low melting agarose	BMA, Rockland, USA
TAE 50X bufferkonsentrat	Millipore Corporation, Bedford MA
T4 DNA ligase+ T4 DNA ligase buffer	Fermentas
Tris (Sigma 7-9 ®), min.99 %	Sigma-Aldrich, Tyskland
Trypsin/EDTA (1x), T3924	Sigma-Aldrich, Tyskland

4.2 Utstyr

Tabell 4.2 Utstyr brukt under tillaging av konstrukt og i forsøkene

Utstyr	Produsent
Biofuge A bordsentrifuge, → 13.000 rpm	Heraeus sepatech
Brandel cell harvester Model M-24	Brandel Instruments, Gaithersburg, Md
Chromato –Vue Transilluminator Model TM-36	San Gabriel, USA
DNA Engine DYAD™, Peltier Thermal Cycler	Bio-Rad Life Sciences, Hercules , USA
Holten Lamin Air, Type S-2010	Heto-Holten AS, Danmark
Jouan MR 1812 high speed centrifuge	Jouan, France
Kubota 8800 sentrifuge	Medinor produkter AS
Mettler PC 4400 Delta Range®	Mettler-Toledo, Sveits
Mettler Toledo vekt AG 204 Delta Range	Mettler-Toledo, Sveits
Milli-Q plus destillasjonsapparat	Millipore, USA
Minitron Infors AG risteinkubator, CH-4103	Infors
Olympus digital camera C-400 Zoom	Olympus
Olympus fluorescensmikrokopi BX 51	Olympus
Olympus mikroskop IMT-2	Olympus Optical, Japan
PHM 220 pH-meter	MeterLab
Sorvall RC-5B refrigerated Superspeed Centrifuge, GSA-Rotor	Sorvall
Sorvall RC-5C Plus, Rotor SS-34, kode 05	Sorvall, leverandør Tamro
Steri-Cult incubator Model 3035 S/N 30716-316	Forma Scientific, Ohio, USA
Steril benk type BSB 4A	Gelaire Flow Laboratories, Italia
Tri-Carb 2900TR, Liquid Scintillation Analyzer	Packard BioScience Company,
Ultra-turrax T25 basic med 10mm probe	IKA-Werke, Tyskland
UV-1601 spektrofotometer	Shimadzu
Vannbad, grade-innstilt	Heto-Lab equipment, Danmark
Vortex-2 Genie Model no G560E	Scientific industries, Inc.
Whatman GF/C filter	Whatman

5. METODER OG TEORI

5.1 Metoder brukt ved tillaging av genkonstrukt

5.1.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR er en molekylær teknikk som gjør det mulig å amplifisere den ønskede DNA-sekvens fra bare et enkelt molekyl opp til flere billioner molekyl i en enzymreaksjon som gjentas i flere sykluser [25]. For hver syklus vil den ønskede DNA sekvens bli amplifisert eksponensielt inntil et visst nivå hvor reaksjonskomponentene er brukt opp, mengden produkt vil da nå et platå. En syklus består av et denaturerings-trinn, et annealing-trinn og til slutt et elongerings-trinn [8]. Et PCR program vil alltid begynne med oppvarming til over 90 °C. Hver PCR reaksjon krever tilstedeværelse av fire komponenter; et templat med kjent sekvens, to oligonukleotid primere, en varmestabil DNA polymerase og alle fire deoksynukleosid trifosfatene (dNTPs). Templatet inneholder DNA-sekvensen som ønskes amplifisert. Denne trenger ikke være kjent i sin helhet, det holder at noe av DNA sekvensen på hver side er kjent. Hvilket som helst DNA molekyl kan benyttes bare det inneholder den ønskede sekvensen. I det første trinnet i syklusen vil den doble heliksen ved oppvarming til over 90 °C i 25 sekunder bli denaturert, og DNA molekylet vil separeres til enkeltråder. I det andre trinnet i syklusen reduseres temperaturen til ca 50 °C slik at primerne kan binde seg til de enkeltrådet DNA. Primere er korte, enkeltrådet DNA molekyl. Den ene primeren binder til sin komplementære sekvens på den ene tråden av templat DNA molekylet, den andre primeren binder til sin komplementære sekvens et annet sted i templatet. Denne prosessen kalles hybridisering, eller på engelsk ”annealing”. Sekvensen i primerne velges slik at de binder ved komplementær baseparing til motsatte DNA tråder på hver side av sekvensen som skal amplifiseres. I det tredje trinnet i en PCR reaksjon skjer DNA syntesen ved hjelp av DNA polymerasen. DNA polymerase trenger en startsekvens og til dette fungerer den hybridiserte primeren. Polymeriseringen skjer fra 3` enden av primeren. Dette skjer ved at enzymet binder til enkelt-trådet DNA og syntetiserer en ny tråd komplementær til den originale tråden. I dette polymeriserings- eller elongeringstrinnet økes temperaturen til ca 72 °C som er den optimale temperatur for Pfx DNA polymerasen. Polymerasen elongerer begge primere i retning av den ønskede sekvens fordi DNA syntetiseres i 5`-til 3` retning. DNA syntese skjer på begge trådene, innenfor der hvor primerne binder. dNTPs molekylene korresponderer til de fire basene til stede i DNA (adenin, guanin, tymin og cytosin) og blir brukt av DNA polymerasen

som byggesteiner for å syntetisere nytt DNA. Totalt vil det i en PCR reaksjon vanligvis kjøres 20-35 sykluser avhengig av tilstedeværelsen av den ønskede sekvens i templatet. Kary B. Mullis er mannen bak oppfinnelsen fra 1984 som han også mottok Nobelprisen i kjemi for i 1993.

5.1.2 Gel elektroforese av DNA

Gel elektroforese brukes for å separere DNA-fragmenter av ulik størrelse fra hverandre, prøven blir da plassert i et elektrisk felt. Denne separasjonen avhenger av flere parametre, voltstyrke, gelprosenten og hvilken buffer som benyttes. Det er vanlig å benytte agarose- eller polyakrylamidgeler som medium for DNA-molekyler. Agarose er et polysakkarid som er isolert fra alger og bygget opp av et nettverk av polymerer. Vandring av DNA på gelen vil avhenge av løsningsens pH. I en løsning som er nøytral eller svakt basisk, vil DNA molekylene være negativt ladet og vil da i et elektrisk felt vandre mot den positivt ladete polen. På en gel vil korte fragmenter vandre raskt i gelen mens lange fragmenter vandrer seint, dette vil være tilnærmet omvendt proporsjonalt. Styrken på gelen som lages avhenger av størrelsen på båndene som skal separeres. Normalt vil 1,2-1,3 % være greit for separasjon av bånd på 600-700 basepar. Ved separasjon av oppklippede vektorer med basepar på størrelsesorden 6500 bp, må gelprosenten være lavere, typisk 1,1 %. Etidiumbromid tilsettes for at DNA-fragmentene senere skal kunne visualiseres under UV-lys. Stoffet interkalierer mellom basene i dobbeltrådet-DNA. Etidiumbromid er et karsinogent stoff og må behandles med stor forsiktighet. I forsøkene ble det brukt modifisert TAE-buffer i stedet for standard Den modifiserte bufferen inneholder en lavere konsentrasjon av EDTA enn standard TAE. Det ble benyttet tre forskjellige molekylvektstandarder; lavt område (50-1500 bp), ekspress (100-5000 bp) og 1 Kb (250-10000 bp). Elektroforesegelen ble kjørt ved 90-100V (Power Pac 2000). Hvor lenge den ble kjørt var avhengig av lengdene på båndene vi ønsket å se. Båndene ble til slutt visualisert under UV-lys og de ønskede lengdene klipt ut og rengjort ved GeneClean prosedyre.

5.1.3 GeneClean

Denne prosessen går ut på å rense opp det ønskede DNA i fire enkle trinn: smelte agarose i NaI, binding av frigjort DNA til silica, vasking og til slutt eluering av DNA. Det ble laget egenprodusert silicasuspensjon [26]. Det finnes mange ulike GeneClean protokoller på markedet, ferdige kit kan også kjøpes. Protokollene varierer litt, men prinsippet er det samme. I forsøkene ble protokollen som finnes i vedlegget til oppgaven brukt (vedlegg 12.3.1, side 64).

5.1.4 Klipping av DNA med restriksjonsenzym

For at de klipte DNA-bånd senere skal kunne liggeres inn i en vektor og få et nytt konstrukt, må båndene klippes med samme restriksjonsenzym som er brukt ved klippingen av vektoren. De bakterielle restriksjonsenzymene ble oppdaget på 1970-tallet og var et gjennombrudd for den rekombinante DNA teknologien. Noen av de første enzymene som ble rensset var EcoRI fra *Escherichia coli* og Hind II fra *Haemophilus influenzae*. Restriksjonsenzymene blir også kalt for restriksjons endonukleaser. De gjenkjenner spesifikke basesekvenser i den doble DNA-heliksen og kutter begge trådene på bestemte steder. Restriksjonsenzymene deles inn i tre typer; type 1, 2 og type 3 endonukleaser. De aller fleste som brukes i genteknologi kommer fra type 2, det er også disse som ble benyttet i masterprosjektet. Mange restriksjonsenzym gjenkjenner spesifikke sekvenser på fire til åtte basepar og hydrolyserer en fosfodiesterbinding i hver tråd i denne regionen. Et påfallende kjennetegn ved disse kuttstedene er at de nesten alltid besitter dobbel rotasjons-symmetri, også kalt palindrom. Eksempel EcoRI:



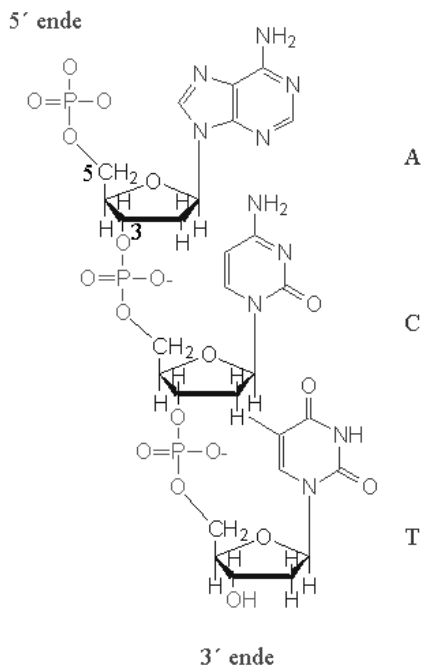
Figur 5.1 Viser hvor restriksjonsenzymet EcoRI klipper

Som figur 5.1 viser, klipper enzymet G-A fosfodiesterbindingen på 3` enden av en symmetrisk akse. Flere hundre restriksjonsenzym har blitt rensset og karakterisert. Navnene deres består av en trebokstavers forkortelse som refererer til vertsorganismen; Eco står for *Escherichia coli* og Hin for *Haemophilus influenzae*. Navnet har deretter eventuelt en

bokstavbenevnelse og et romertall etter seg dersom flere enn et restriksjonsenzym fra samme opphav har blitt identifisert [8]. Enzymene varierer veldig i størrelse fra det minste på 157 aminosyrer (PvuII) til det største på 1250 aminosyrer (CjeI) [27]. Mellom disse to størrelsene finnes det mange. Ved bruk av restriksjonsenzym er det viktig å undersøke nøye temperaturen de klipper best ved og hvilken buffer som egner seg best. Dette gjøres lettest ved å bruke hjemmesidene til leverandørene. Der finnes all den informasjon som trengs. De fleste enzymene foretrekker 37 °C inkubasjonstemperatur. Ved kjøp av enzym fra de ulike produsentene får man alltid med en buffer som enzymene klipper best i. Som regel klippes pcr-båndene ved 37 °C en times tid. Klipping av vektor tar lengre tid, vanligvis står de over natten. Etter klipping kjøres prøven på gel, analyseres under UV-lys og renses som tidligere beskrevet før båndene eventuelt kan brukes videre.

5.1.5 Ligering av klipt, renset DNA inn i en vektor

Når en vektor kuttet med restriksjonsenzym vil den omdannes fra et sirkulært DNA til et lineært. For å kunne ligere et DNA- molekyl inn i en vektor, må vektoren og DNA-molekylet normalt være klipt med samme restriksjonsenzym slik at de får kompatible ender; de får samme overheng. Denne sammenkoblingen kalles for ligering. Et fire baseoverheng ligger lettere inn enn et to baseoverheng. Disse endene har da komplementær basepar og vil kunne bindes til hverandre. Den ene DNA-tråden må ha en fri 5`-P-ende, og den andre tråden en fri 3`-OH-ende [28]. Bindingen vil ikke være stabil da den kun holdes sammen av hydrogenbindinger mellom basene. I en ligeringsreaksjon benyttes derfor T4 DNA ligase. Dette enzymet katalyserer dannelsen av en fosfodiesterbinding i sukker-fosfat-kjeden, en mye sterkere kovalent binding, mellom 5`-P og 3`-OH-endene. Se figur 5.2. side 24. T4 DNA ligase krever ATP (adenosintrifosfat) som kofaktor [29]. Dette enzymet er tilsatt i bufferen som leveres sammen med enzymet og som brukes i forsøkene. Løsningene blir inkubert ved 16 °C i flere timer, vanligvis natten over. Det ble alltid laget en prøve med bare vektoren uten innskudd. Dette for å teste om denne kan produsere falske positive bakteriekolonier på ampicillin-skåler. I forsøkene ligerte vi inn de klipte, fremrensede bånd i ekspresjonsvektorene pcDNA.3 og pci-Neo.



Kilde: Genetikk (DNA og genstruktur) fra bio.uio.no)

Figur 5.2 Viser fosfodiesterbindingen mellom sukker og fosfat

5.1.6 Transformasjon (Heatsjock)

Transformasjon blir definert som opptaket og uttrykket av fremmed DNA i bakterieceller [30]. I genteknologi er DNA transformasjon ved bruk av varmesjokk en vanlig brukt metode. Metoden har vært kjent i over 30 år, men fremdeles er mekanismen for hva som skjer uklar. Det har vært foreslått av forskere at det plutselige varmesjokket til 41,5 °C gjør at cellemembranens egenskaper endres til å bli mer flytende og permeabel slik at det ukjente DNA lettere kan transporteres gjennom cellemembranen og inn i cellens cytoplasma [31]. Den typiske DNA transformasjonsprosess har to viktige element; bakterieceller som *Escherichia coli*, og plasmid DNA. Plasmid DNA kan replikere seg selv etter transformasjonsprosessen. For at bakteriecellene skal kunne ta opp plasmidet må de være kompetente. Kompetent brukes som betegnelse på celler som er blitt forbehandlet på en slik måte at de er i stand til å ta opp fritt DNA [30]. De ulike protokollene som er tilgjengelig varierer litt. *E.coli* cellene som ble anvendt ble gjort kompetente etter en av disse metodene [32]. I begynnelsen ble cellene som oftest behandlet med kalsiumklorid alene. Vi bruker både kalsiumioner, magnesiumioner og DMSO for å bedre effektiviteten. Forskere tror at kalsiumkloridet hjelper DNA-adsorpsjonen til celleoverflaten til de kompetente cellene og at varmesjokket letter gjennomtrengeligheten av adsorbent DNA inn i cellens cytoplasma [33]. Inni bakteriecellen kan plasmidet som er tatt opp produsere mange kopier av seg selv. Alle

kopiene er like fordi cellen bare tar opp ett plasmid. I mange tilfeller tar ikke cellen opp plasmid i det hele tatt. Celler som har tatt opp plasmid kan isoleres ved å la bakteriecellene vokse på medium som inneholder antibiotika. Dersom plasmid er tatt opp vil dette vise seg ved vekst av kolonier på mediet. I et plasmid er det antibiotikaresistens-gener som gjør bakteriecellen som har tatt opp plasmidet motstandsdyktig mot ampicillin på skålen. Protokollen finnes som vedlegg til oppgaven (vedlegg 12.3.2 side 64).

5.1.7 Isolering av DNA ved bruk av Qiagen Miniprep Kit.

Metoden som brukes isolerer en mindre mengde oppformet plasmid fra en bakteriekultur. Prosedyren som brukes består av tre trinn; bakteriell lysing, adsorpsjon av DNA til QIAprep kolonner i sentrifugerør, og til slutt vasking og eluering av plasmid DNA. Bakteriene lyses under basiske forhold og lysatet blir deretter hurtig nøytralisert og tilpasset til høye saltbindingsforhold i et trinn. For en detaljert beskrivelse av protokollen og prosedyren henvises til nettsiden til Qiagen [34] eller til videopresentasjonen av en av teknikkene som brukes [35].

5.1.8 Restriksjonsanalyse og sekvensering

Før DNA prøven kan sendes til sekvensering, kjøres en restriksjonsanalyse. Denne gir en pekepinn på om innligeringen av det ønskede DNA- båndet i vektoren har vært vellykket. Aliquots fra fremrensede minipreparasjoner blir klipt med restriksjonsenzym og lengden på de oppklippede båndene blir estimert. Dersom det etter kjøring på gel viser seg ved å se på gelen under UV-lys at de riktige båndene kommer frem, settes det i gang en sekvenseringsreaksjon. Prøvene blir kjørt i en pcr-maskin og det brukes primere som man vet at det finnes komplementære baser til i prøven. To prøver av hver miniprep blir sekvensert, dette ved bruk av en forward primer i den ene prøven, og en revers primer i den andre. Disse overlappende sekvensene lest i hver sin retning gir sikrere sekvensresultat.

Sekvenseringsreaksjonen følger de samme trinnene som i en pcr-reaksjon; oppvarming til over 90 °C, deretter et denaturerings-trinn, et annealing-trinn og et elongerings-trinn som gjentas i 26 sykluser. Etter at reaksjonen er ferdig tilsettes ytterligere 10 µl dH₂O før prøvene kan sendes til sekvensering. Vi sendte våre prøver til Seqlab ved Universitet i Bergen. Denne DNA sekvenseringslaben tilbyr sekvensering, analyser og plasmid preparasjoner for brukere ved blant annet Universitet i Bergen og Haukeland Universitetssykehus. Etter noen dager kom

prøvene tilbake via nettsiden til SeqLab. Disse ble da sammenlignet med fasit ved bruk av dataprogrammet "Sequencher" from Gene Codes of Ann Arbor, Michigan [36]. Programmet gjør det veldig enkelt å sammenligne den innsendte prøve med en på forhånd innlagt DNA referanse (i vårt tilfelle fasit), og å se etter mutasjoner eller andre forandringer. Denne analysen ble gjort av min veileder, professor Staffan Uhlen). Det var også han som på forhånd hadde lagt inn den ønskede fasit.

5.1.9 Maxipreparasjoner

For å få en mer høykonsentrert prøve, lages det maxipreparasjoner med utgangspunkt i minipreparasjonene. Prosedyren følger de samme trinnene som ved tillaging av disse, det gjøres først en transformasjon med utgangspunkt i minipreper med kompetente *E.coli* celler, løsningen blandes med LB-medium og såes ut på agarplater innsatt med ampicillin 150 mg/l. Neste dag er koloniantallet høyt. Det plukkes en koloni som formeres i 250 ml LB-medium, og protokollen til Qiagen når det gjelder tillaging av maxiprep følges [37]. For å jobbe videre med maxipreparasjonene må konsentrasjonen bestemmes. Den vanligste metoden som benyttes for å bestemme renhet og konsentrasjonen av en DNA-prøve, er absorbansmåling. Aminosyrer har et absorpsjonsmaksimum ved 260 nm. Forurensninger slik som blant annet andre proteiner har et absorpsjonsmaksimum ved 280 nm. Ved å måle absorbansen til prøven ved disse to bølgelengdene og deretter regne ut forholdet mellom dem, kan man si noe om renheten til prøven. Ligningen som brukes er: $\frac{A[260]}{A[280]} = \text{renhet DNA}$ [38]

Jo høyere ratioen er, desto høyere er renheten på maxiprepen . Den skal helst ligge i området 1,6-1,9 [37]. Ved måling av absorbansen ble prøven fortynnet slik at absorbansen ble liggende under 1 fordi dette er det lineære området. Det må tas hensyn til fortynningen ved utregning av konsentrasjonen. Ligning for utregning av konsentrasjonen i $\mu\text{g}/\mu\text{l}$:

$$\frac{\text{Abs}_{260} * 50 * \text{fortynning}}{1000}$$

Som et eksempel vises utregning dersom absorbansen ved 260 nm hadde vært 0,8 og fortynningen hadde vært 1:25

$$\frac{0,8 \times 50 \times 25}{1000} = 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Først etter at hele prosessen beskrevet foran er gjennomført, er DNA-prøvene med de nye konstruktene klare til transfektering av mammale COS-7 celler. COS-7 celler har det biokjemiske system som trengs for at det transfekterte DNA skal gi opphav til uttrykte proteiner.

5.2 COS-7 celler

5.2.1 Dyrking av COS-7 celler

Ved oppstart av dyrkingen ble en ampulle tilsvarende 1 ml av COS-7 cellene hurtig tint ved å holde den i vannbad ved 37 °C i 1-2 minutter. Cellesuspensjonen ble tilsatt til en plastikk cellekulturflaske som på forhånd inneholdt en 10 ml forvarmet blanding av DMEM tilsatt 20 % FCS og penicillin-streptomycin. Cellene ble under hele forsøket dyrket i en Steri-Cult inkubator ved 37 °C, 95 % luft og 5 % CO₂. Vekstmediet som ble brukt var Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), i tillegg til 9 % kalveserum fra foster (FCS) og 100 U ml⁻¹ penicillin og 0,1 mg ml⁻¹ streptomycin (P/S). Cellene fikk vokse i standard plastikk cellekulturflasker på 75 cm² og vekstmediet ble skiftet 2 ganger pr uke. Alt arbeid med cellene ble utført i en sterilbenk (type BSB 4A fra Gelaire Flow Laboratories) ved bruk av aseptiske arbeidsmetoder.

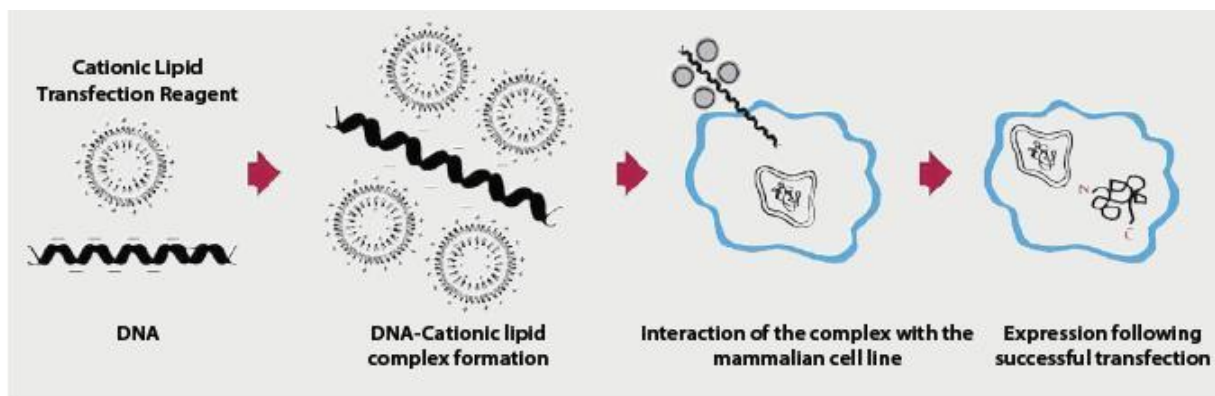
5.2.2 Splitting av COS-7 celler

Cellene ble splittet når de var ca. 90 % konfluente, vanligvis hver fjerde dag. Ved splittingen ble det gamle vekstmediet sugd av og cellene vasket med 5 ml trypsin/EDTA løsning som på forhånd var varmet til 37 °C. Samme mengde trypsin/EDTA ble deretter tilsatt til cellene og inkubert i 30 minutter ved 37 °C. Det er viktig å få fjernet FCS i den første vaskingen fordi dette inaktiverer trypsinet som brukes for å løsne cellene fra bunnen av flasken under inkuberingen. I mellomtiden ble 10 ml av en blanding av DMEM/9 % FCS/P-S varmet opp til samme temperatur og tilsatt til en ny cellekulturflaske. Etter inkuberingen var cellene løsnet

fra bunnen av flasken og en homogen blanding av celler ble deretter overført til den nye cellekulturflasken for videre vekst. Ved splitting er det vanlig å gå videre med ca 1/5 av cellene. De resterende cellene ble enten kastet eller splittet videre for transfektering. Ved transfeksjon sentrifugeres cellene og supernatanten inneholdende trypsin fjernes. Cellene resuspenderes i egnet medium og fordeles i petriskåler dagen før transfeksjonen.

5.3.1 Transfeksjon

I forsøkene ble de nye α_2C - og 5-HT $_2C$ -konstruktene transfektert inn i COS-7 celler. Flere ulike teknikker har blitt beskrevet for transfeksjon, jeg brukte både Lipofectamine 2000 fra Invitrogen og MetafecteneTM fra Biontex. Dette er kationbaserte liposom som sørger for at transfeksjonseffektiviteten inn i cellene blir høy. Under normale fysiologiske forhold vil DNA-konstruktet i ekspresjonsvektoren pcDNA3.1 eller pciNeo ha netto negativ ladning. Cellemembranen som den skal trenge gjennom bærer også en netto negativ ladning. Dette gjør at disse to vil frastøte hverandre. Strukturen på kationbaserte liposomer består av et positiv ladet "head group" og en eller to hydrokarbonkjeder. Liposomene vil danne et kompleks med DNA som gjør at de ikke frastøtes av den negative cellemembranen, men heller tas opp av cellen [39]. Man tror at liposom/DNA-komplekset entrer cellen ved endocytose [40]



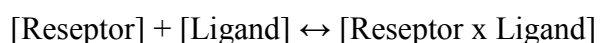
Figur 5.3 Mekanisme for transfeksjon

Ved transfeksjonen ble protokollene anbefalt av leverandørene brukt [41, 42]. Vi prøvde først å lage egentprodusert lipofectin ved å bruke en prosedyre som tidligere er beskrevet [43]. Dette ble mislykket. Mediet ble fort gult og cellene døde. Det ble derfor bestemt å kjøpe det

tilgjengelige Lipofectamine 2000 fra Invitrogen, og når dette var dyrt, Metafectene fra Biontex. Transfeksjonen ble utført når cellene var ca 90 % konfluente dersom de skulle brukes i radioligandforsøk. Ved bruk i fluorescensforsøk, var cellene ca 70 % konfluente når de ble transfektert. Her er det viktig å være oppmerksom på forskjellen mellom visuell og reell konfluens. Best resultat oppnås hvis transfeksjonen blir utført ved 30-60 % reell konfluens. Dette samsvarer ofte med en visuell konfluens på 90-100 %. Ved dette tidspunktet er cellene i den beste delings- og vekstfasen. To-tre dager etter transfeksjonen er cellene klare til å gå videre med. Før bruk i radioligandbinding gjøres membranpreparasjon (se vedlegg 12.3.4 side 65 for protokoll). Før bruk i fluorescensmikroskop ble cellene fiksert og merket med primært og fluorescent sekundært antistoff.

5.4.1 Radioligandbinding

I forsøkene ble det brukt radioligandbinding for å bestemme uttrykksnivåene i plasmamembranen etter transfeksjon av COS-7 celler med de ombygde genkonstruktene. Et radioaktivt merket stoff som kan binde til for eksempel en reseptor eller et enzym, kalles en radioligand [44]. Ved å måle graden eller omfanget av bindingen kan man få nyttig informasjon om antallet av reseptorer og affiniteten til ulike stoffer. Radioligandbindingsstudier kan gjøres på flere måter; metnings binding, konkurrerende binding og kinetikkes eksperimenter. I forsøkene ble førstnevnte metode brukt. Det ble anvendt ulike konsentrasjoner av radioliganden og målt binding ved likevekt. Forholdet mellom binding og ligandkonsentrasjon kan si noe om bindingssteder, maksimal binding (B_{max}) og ligandaffinitet (K_d). K_d er den konsentrasjon av radioligand som trengs for at liganden skal okkupere halvparten av reseptorene i løsningen, tilsvarende $\frac{1}{2} B_{max}$. Analyser av radioligandforsøk tar utgangspunkt i massevirkningsloven. Denne sier at ligander beveger seg ved diffusjon og at binding mellom reseptor og ligand oppstår når disse kommer i tilstrekkelig nær kontakt. Reseptoren og liganden vil være bundet til hverandre en stund, før de dissosierer og går tilbake til ubundet tilstand:



Likevekt oppnås når hastigheten av dannelsen av reseptor-ligand kompleks er lik med hastigheten på dissosiasjonen av de samme typer kompleks. Radioliganden kan også binde

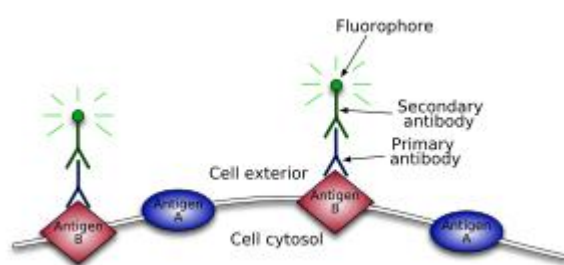
til andre seter enn de vi ønsker at den skal binde til. Dette kalles for uspesifikk binding, mens binding til ønsket reseptor kalles for spesifikk binding.

Det ble gjort metningsforsøk med radioliganden [^3H]-RX821002 for å bestemme B_{max} -verdiene av de ulike $\alpha_{2\text{C}}$ konstruktene i plasmamembranen. [^3H]-mesulergin ble brukt i forsøkene med 5-HT $_{2\text{C}}$ -konstruktene. For å måle uspesifikk binding ble det anvendt blokkere, antagonister. 2 μM methysergid ble tilsatt som blokker for 5-HT $_{2\text{C}}$, mens jeg brukte 2 μM RS 79948 som blokker for $\alpha_{2\text{C}}$. Protokollene for disse to metningsforsøkene er beskrevet i vedlegget.

5.5.1 Fiksering og innmerking

Før cellene kan sees på i fluorescensmikroskop må de merkes. Fiksering er nødvendig for å bevare og stabilisere cellene under prosessen med innmerkingen av primære (M1 og M2) og sekundært fluorescent antistoff. Det finnes ulike måter å fikse på, vi brukte fiksering via kryss-linking. Til denne metoden brukes aldehyder, i prosjektet ble en 2 % PFA-løsning (paraformaldehyd) i 1xPBS anvendt. Aldehyder danner kovalente bindinger mellom nærliggende aminogrupeer gjennom en Schiff syre-base reaksjon.

Det finnes to hovedtyper av innmerkningsmetoder for fluorescens; direkte hvor den primære antikropp er merket med en fluorescerende fluorofor, eller indirekte hvor et sekundært antistoff farget med fluorofor blir brukt til å gjenkjenne et primært antistoff som er bundet til antigenet. I forsøket ble den sistnevnte indirekte metode brukt.



Kilde: Wikipedia

Figur 5.4 Viser hvordan det primære antistoff (i lilla) binder til antigenet (i rødt). Et merket sekundært antistoff (i grønt) binder deretter til det primære antistoffet. På denne måten blir det merkede antistoffet indirekte brukt til å detektere antigenet.

Binding av antistoffet M1 til antigenet er kalsiumavhengig. M1 og M2 ble fortynnet i 5 % geiteserum løst i TBS med 1 mM CaCl_2 . Som sekundært antistoff ble Anti-Mouse IgG-FITC fra Sigma-Aldrich brukt. Det sekundære antistoffet er utvunnet fra geit ved å bruke rensed

mus IgG som immunogen. Antistoffet blir så konjugert til Fluorescein Isothiocyanate (FITC). Molekylene som blir festet til større molekyl for å gjøre det synlig direkte kalles for konjugater. Løsningen som antikroppene fortynnes i skal inneholde serum fra opphavsdiret til det sekundære antistoffet, i vårt tilfelle geitserum. Overskudd av antistoffer fjernes under vasketrinnene. Når antistoff brukes for å merke celler er det ofte nødvendig å blokkere prøven for å minske ikke-spesifikk binding. Uspesifikk binding kan også skje av flere ulike årsaker; ureagerte aldehydgrupper kan kryssbinde antistoffet, veldig ladete eller hydrofobe grupper i prøven kan "fange" antistoffene. Disse problemene kan ofte unngås ved å behandle prøven med en proteinløsning. Denne løsningen vil da bindes til ikke-spesifikke bindingssteder før prøven merkes med antistoff. Et vanlig brukt blokkeringsmiddel er BSA [45], det ble brukt en 0,2 % løsning. En 50 mM NH₄Cl-løsning ble brukt for å nøytralisere PFA i tilfelle det skulle være ureagerte aldehydgrupper igjen etter fikseringen. Begge disse to trinnene i prosedyren vil begrense bakgrunnsstøy på bildene. Hele prosedyren er beskrevet i vedlegg 12.3.7 side 70.

6. EKSPERIMENTELT

Her er det kun beskrevet et lite utvalg av de genkonstruktene som er laget. Det ville blitt for omfattende å gjøre rede for alle i detalj. Alle ble tilvirket på samme måte ved bruk av ulike primere, enzym, buffere og lignende som ble tilpasset konstruktet som skulle lages. Ved noen av konstruktene ble det brukt ett-trinns pcr, på andre to-trinns. Begge disse metodene vil bli beskrevet.

6.1 Detaljert fremstilling av $\alpha_{2C.2-8d}$, $\alpha_{2C.2-15d}$ og $\alpha_{2C.2-33d}$

6.1.1 Første pcr-kjøring

Tabell 6.1 Oversikt over reagenser brukt i forsøket

	I ($\alpha_{2C.2-8d}$)	II ($\alpha_{2C.2-15d}$)	III ($\alpha_{2C.2-33d}$)
Templat (α_{2C-1} maxi, 10xD)	0,5 μ l	→	→
Primer (F)	1,0 μ l $\alpha_{2C.2-8d.F}$	1,0 μ l $\alpha_{2C.2-15d.F}$	1,0 μ l $\alpha_{2C.2-33d.F}$
Primer (R)	1,0 μ l $\alpha_{2C.794.R}$	→	→
DMSO	1,0 μ l	→	→
PfxMix	21,5 μ l	→	→
Ønsket lengde på bånd	781 bp	760 bp	706 bp

Primerne hadde følgende sekvens:

$\alpha_{2c.2-8d.F}$: 5`-TAG GCT AGC ATG GCG CTG GCG GTG GCG GCA GCG GC-3`

$\alpha_{2c.2-15d.F}$: 5`-TAG GCT AGC ATG GCG GGC CCC AAT GCG AGC GGC GC-3`

$\alpha_{2c.2-33d.F}$: 5`-TAG GCT AGC ATG GCC TCG GGG GCT TCC TGG GGG CC-3`

$\alpha_{2c.794.R}$: 5`-CCQ GCC CGT TTT CGG TAG TCG-`3

PCR-program: 1. 96 °C 1` 30``

2. 96 °C 25``

3. 50 °C 25``

4. 70 °C 1` Trinn 2-4 repeteres 1+24 ganger

+ 4 °C ∞

Etter at programmet var ferdig ble løsningene kjørt på en 1,2 % agarosegel. Denne ble laget ved å veie opp 600 mg agarose som så ble tilsatt 50-51 ml (51 ml pga mulig fordamping under oppvarming) 1xTAE buffer. Agarosen ble smeltet i mikrobølgeovn før blandingen ble avkjølt i ca ti minutter. 4 μ l etidiumbromid ble tilsatt, det ble blandet godt og blandingen overført til beholderen hvor den fikk stå og stivne. Den valgte plast-kammen med brønner ble plassert i geleen før den stivnet. Etter ca 20 minutter ble 18 μ l av hver pcr-prøve blandet med 2-3 μ l 6x loading Dye og tilsatt til de ulike brønnene i gelen. Ca 8 μ l av en molekylvektstandard ble tilsatt til en eller flere av brønnene. Disse molekylvektstandardene gjør det enklere å kvantifisere lengden på DNA båndet ut fra hvor langt DNA-båndene har vandret. Kun konstrukt 15d og 33d viste seg å gi tydelig nok bånd til å jobbe videre med. Andre ulike måter ble da prøvd for å få frem 781 bp-båndet til 8d konstruktet. Jeg prøvde både å øke mengden DMSO til det dobbelte, tilsette 50 % mer primere, bruke et annet templat, gjøre re-pcr på det svake 781 bp-båndet og å øke temperaturen og tiden på annealing- og elongeringstrinnet (til 52 °C og 72 °C). Det som viste seg å gi et bånd var en kombinasjon av re-pcr og økning av tid og temperatur. Det viste seg etter hvert at de to første båndene ble for svake til å starte klipping på etter GeneClean. Det jeg til slutt måtte gjøre for å få sterke nok bånd på alle tre konstruktene etter GeneClean, var å kjøre re-pcr med flere paralleller på allerede rensede, svake bånd. Etter analyse på agarosegel, ble de ulike båndene klipt ut og de fra samme konstrukt ble poolet sammen før GeneClean. Dette ga sterke nok bånd til å gå videre med.

6.1.2 Klipping med restriksjonsenzym

De fremrensede båndene ble i forsøket klipt med NheI og Bpu1102I, de samme enzymene som vektoren var klipt med.

Tabell 6.2 Oversikt over reagenser brukt ved klipping av bånd

	I	II	III
NheI	0,4µl	→	→
Bpu1102I	0,4µl	→	→
Buffer Tango 1X	1,9µl	→	→
GC bånd	16,3µl (781 bp)	16,3µl (760 bp)	16,3µl (706 bp)

Klippingen ble gjort ved 37 °C natten over (ca.16 timer). Tidligere i forsøket var det prøvd med klipping i kun to timer, dette ga ingen bånd. Løsningene ble deretter kjørt på en 1,4 % agarosegel, de riktige båndene ble klipt ut og rensset ved GeneClean. Lengdene på båndene var nå 714 bp, 693 bp og det minste 639 bp.

6.1.3 Ligering av bånd inn i vektor, restriksjonsanalyse og sekvensering

Tabell 6.3 Oversikt over reagenser brukt ved ligeringen

	Vektor	I	II	III
NheI/Bpu1102I-cut	0,5µl	→	→	→
Tris 10 mM	7,5µl	1,5µl	----	3,5µl
Ligasebuffer	1,0µl	→	→	→
T ₄ DNA ligase	1,0µl	→	→	→
Innskudd	-----	6,0µl 2-8d	7,5µl 2-15d	4,0µl 2-33d

Mengden innskudd ble variert på bakgrunn av hvor sterke båndene var på agarosegelen etter klippingen.

Ligeringsprogram: 16 °C 29`
24 °C 1`

Disse temperaturene ble gjentatt i flere sykluser natten over, totalt 18 timer.

Det ble så utført en transformasjon av ligeringene med kompetente *E.coli* celler, 5 µl ligering og 100 µl *E.coli* celler. 175 µl ble strøket ut på ampisillin-skålene og inkubert natten over ved 37 °C.

Av koloniene som var vokst frem dagen etter ble det plukket tre stykker av hvert konstrukt. Plukking av kolonier ble alltid utført i en steril LAF-benk. Koloniene ble tilsatt til en Falcon tube hvor det på forhånd var 3,5 ml LB-medium og 3,5 µl ampicillin (dvs 1000x). Kulturene ble inkubert ved 37 °C i 12-16 timer under kraftig risting (225 rpm). Som regel ble koloniene plukket om ettermiddagen slik at resten av prosedyren for tillaging av miniprep kunne utføres neste morgen. For detaljert beskrivelse av protokollen og prosedyren henvises til nettsiden til Qiagen [34] eller til videopresentasjonen av prosedyren [35].

Etter at jeg hadde laget ferdig minipreper på konstruktene kjørte jeg en restriksjonsanalyse.

Tabell 6.4 Oversikt over reagenser brukt ved restriksjonsanalysen

	$\alpha_{2C.2-8d}$ (x3)	$\alpha_{2C.2-15d}$ (x3)	$\alpha_{2C.2-33d}$ (x3)
Mp	5,0 µl	→	→
NheI	0,3 µl	→	→
SacI	0,3 µl	→	→
Buffer tango 1x	1,8 µl	→	→
dH ₂ O	10,6 µl	→	→

Klippingen ble kjørt i to timer ved 37 °C og deretter ble løsningene satt på en 1,8 % agarosegel. Alle ni båndene så riktige ut, de nye konstruktene mine ble derfor gjort klare for sekvensering. Jeg laget to sekvenseringsprøver av hvert konstrukt, både med forward og revers primer; totalt ble dette tolv prøver. Av prøvene viste halvparten seg å være riktige da vi fikk de tilbake fra Seq-lab, en av hvert konstrukt hadde riktig sekvens.

Tabell 6.5 Oversikt over ingredienser brukt ved sekvensering av tre konstrukt

	WJ1	WJ2	WJ5	WJ6	WJ9	WJ10
Mp	3,0µl 2-8d-1	→	3,0µl 2-15d-1	→	3,0µl 2-33d-1	→
pCi.long.F (1µM)	1,0µl	-----	1,0µl	-----	1,0µl	-----
$\alpha_{2C.794.R}$	-----	1,0µl	-----	1,0µl	-----	1,0µl
DMSO	1,0µl	→	→	→	→	→
5xseq.buffer	0,5µl	→	→	→	→	→
BDT	3,0µl	→	→	→	→	→
dH ₂ O	1,5µl	→	→	→	→	→

Det ble gjort maxiprep på tre av konstruktene. (WJ1/WJ2, WJ5/6 og WJ9/10). Jeg brukte 0,2µl mp til 75 µl kompetente *E.coli* celler. 100 µl av hvert konstrukt ble strøket ut på ampicillinplater. Kolonier ble tatt videre til amplifisering av plasmidene i 250 ml kulturer, hvor prosedyren for maxi-preparasjon som beskrevet av Qiagen ble fulgt [37].

6.1.4 Radioligandbinding

På alle konstruktene jeg lagde ble det kjørt tre radioligandforsøk av hvert. For α_{2C} brukte jeg antagonistene [^3H]-RX821002, og RS79948 for å måle uspesifikk binding. Konstrukt A ble alltid tatt med da dette er vill-typen og det som de andre sammenlignes mot. Syv ulike konsentrasjoner av [^3H]-RX821002 ble laget i en fortynningsrekke. Det ble først tilsatt 900 μl vehikkel til rør 1 og 450 μl vehikkel til rør 2-7. 4 μl av radioliganden ble tilsatt til rør 1, det ble blandet godt og 425 μl av løsningen ble overført til rør 2. Fortynningen fortsatte på samme måte til de resterende fem rørene. Det ble brukt en 2 μM løsning RS79948, denne var fortynnet fra en utgangsløsning på 1,9 mM.

	Vehikkel							2 μM RS 79948				
33d												
15d												
8d												
A												
	7	6	5	4	3	2	1	5	4	3	2	1

Figur 6.1 Eksempel på mikrotiterplate brukt ved radioligandbindingsforsøk

Det ble brukt en mikrotiterplate bestående av 96 brønner som vist ovenfor. I hver brønn ble det tilsatt:

25 μl [^3H]-RX 821002 i fortynning (1-7)

25 μl med vehikkel eller blokker (RS79948)

100 μl av riktig membrankonstrukt.

Etter at alt var riktig tilsatt ble platen inkubert i 1 time ved romtemperatur. Suspensjonene ble deretter filtrert og vasket på Whatman glassfiber-filtre ved bruk av Brandel cell harvester. Filtrene ble plukket over i scintillasjonsrør, og tilsatt 4 ml OptiPhase scintillasjonsvæske. Det er tre viktige ingredienser som må være tilstede i en slik tellervæske; organisk løsemiddel, detergent og fluorokromer. Denne type væskescintillasjon som vi bruker her, baserer seg på

måling av radioaktivitet ved hjelp av lysutsendelse, og er en kjent metode for å måle aktiviteten av blant annet isotopen tritium [³H]. Radioaktivitet som var bundet til reseptorer i membranene ble holdt tilbake på filtrene. Radioaktivitet ble detektert/kvantifisert ved bruk av Tri-Carb 2900TR Liquid Scintillation Analyzer.

2x100 µl av membranene ble også pipettert ut for bestemmelse av proteinkonsentrasjon. Ingen av konstruktene inneholder FLAG-epitop og kan derfor ikke studeres i fluorescensmikroskopi ved bruk av M1 og M2 som mange av de andre konstruktene.

Protokollen for 5-HT_{2C} er litt mer tidkrevende enn for α_{2C}. Etter at 2x100 µl av membranpreparasjonene er tatt vekk til proteinbestemmelse etter Lowry-SDS-metoden, tilsettes det 54 µl 300 mM askorbinsyre og 107 µl 25 mg/ml BSA til de resterende 2,5 ml. Denne blandingen preinkuberes ved 30 °C i 45-60 minutter før den kan brukes. Askorbinsyren hindrer at radioliganden [³H]-mesulergin oksideres.

6.2 Fremstilling av FLAG α_{1B}.

I trinn 1 kjøres to pcr-reaksjoner. I den ene reaksjonen (I) kombineres primerne pcDNA3.F og FLAG.R. Her ble maxipreparasjonen 5-HT_{2C}-G brukt som templat. I tillegg kombineres de to primerne FLAG.α_{1B}.F og α_{1B}.246.R med maxipreparasjonen α_{1B} i pcDNA3 som templat i den andre reaksjonen (II).

Tabell 6.6 Oversikt over reagenser bruk ved fremstilling av FLAG-α_{1B}

	I	II
Templat	0,3µl 5-HT _{2C} -G (10xD)	0,3µl α _{1B} i pcDNA3 (10xD)
Primer (F)	1,0 µl pcDNA3.F	1,0µl FLAG α _{1B} .F
Primer (R)	1,0µl FLAG.R	1,0 µl α _{1B} .246.R
PfxMix	23,0 µl	→
Ønsket lengde på bånd	177 bp	270 bp

Primerne hadde følgende sekvens:

pcDNA3.F : 5`-TAA GCA GAG CTC TCT GGC TAA C-3`

FLAG. α_{1B} .F : 5`-GAC TAC AAG GAC GAT GAT GAC GCC ATG AAT CCC GAC CTG
GAC ACC GG-3` (denne primeren koder for FLAG-epitopen i sin hale)

FLAG.R : 5`-GGC GTC ATC ATC GTC CTT GTA GTC-3` (denne primeren koder
også for FLAG-epitopen, men er revers primer sammenlignet med
FLAG. α_{1B} .F)

α_{1B} .246.R : 5`-GTA GTT GGT GGG CGT CCG CAG GTG-3`

PCR-program: 1. 96 °C 1`

2. 95 °C	25``	
3. 49 °C	25``	
<u>4. 68 °C</u>	<u>35``</u>	Trinn 2-4 repeteres i 1+4 sykluser
5. 95 °C	25``	
6. 53 °C	25``	
<u>7. 68 °C</u>	<u>35``</u>	Trinn 5-7 repeteres i 1+19 sykluser
+ 4 °C ∞		

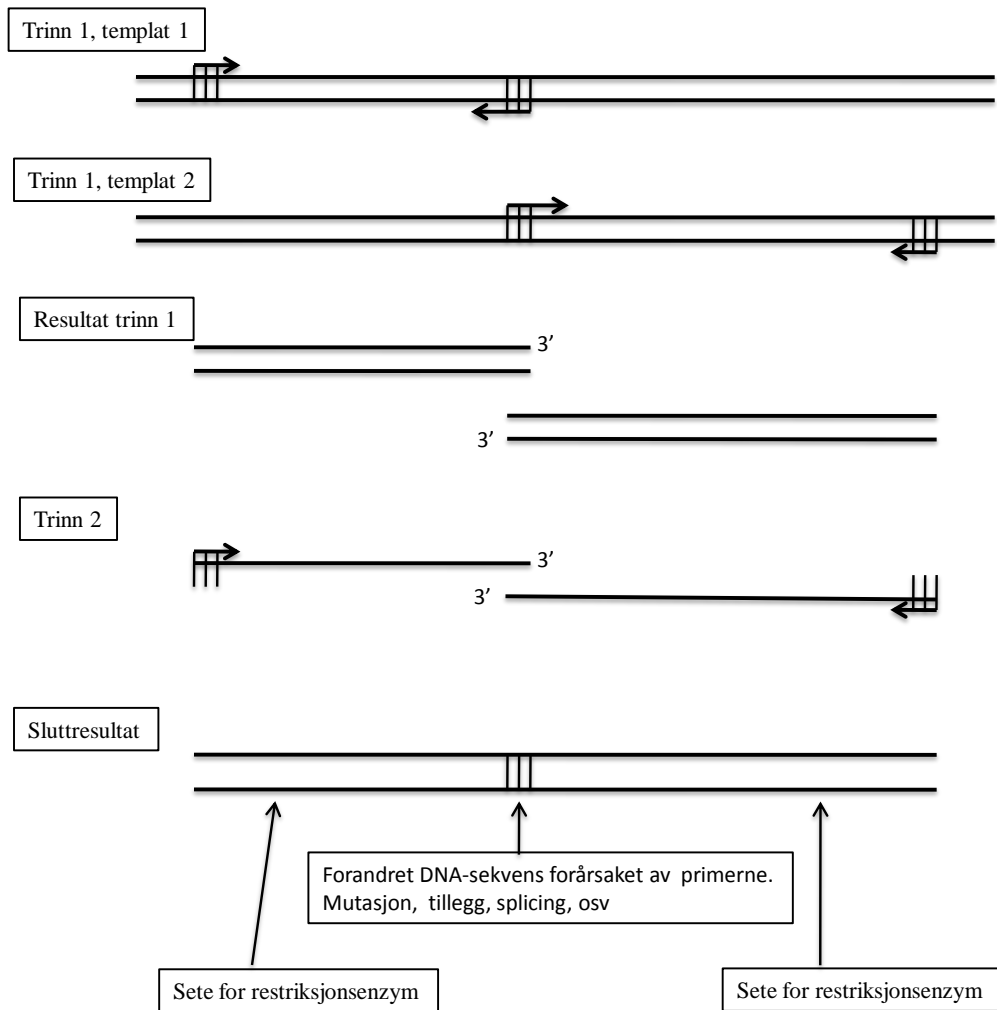
Denne pcr-prosedyren gir to bånd som overlapper hverandre med 24 basepar. Disse bareparene koder for FLAG-epitopen i konstruktet.

Etter kjøring på agarosegel, visualisering under UV-lys, utklipping av de to ønskede bånd og GeneClean, spleises disse to båndene sammen i trinn 2. Båndene vil da fungere som primere på hverandre. I tillegg benyttes det to ytre primere; pcDNA3.F og α_{1B} .246.R

Det ble brukt 3,0 μ l av hver av de rensede båndene, 1,0 μ l av hver av de to primerne og i tillegg PfxMix til totalvolum 25,0 μ l. Pcr-programmet som ble kjørt denne gangen var:

1. 96 °C	1`	

2. 95 °C	25``	
3. 53 °C	25``	
<u>4. 68 °C</u>	<u>45``</u>	Trinn 2-4 repeteres i 1+31 sykluser
+ 4 °C ∞		



Figur 6.2 Skjematisk beskrivelse av en typisk 2-trinns PCR prosedyre.

I trinn 1 får man to bånd. De to båndene gir overlappende sekvenser.

I trinn 2 spleises båndene sammen ved at hvert av båndenes ene DNA-tråd fungerer som primer på det andre båndet. Dette muliggjør elongering fra båndenes 3`-ender.

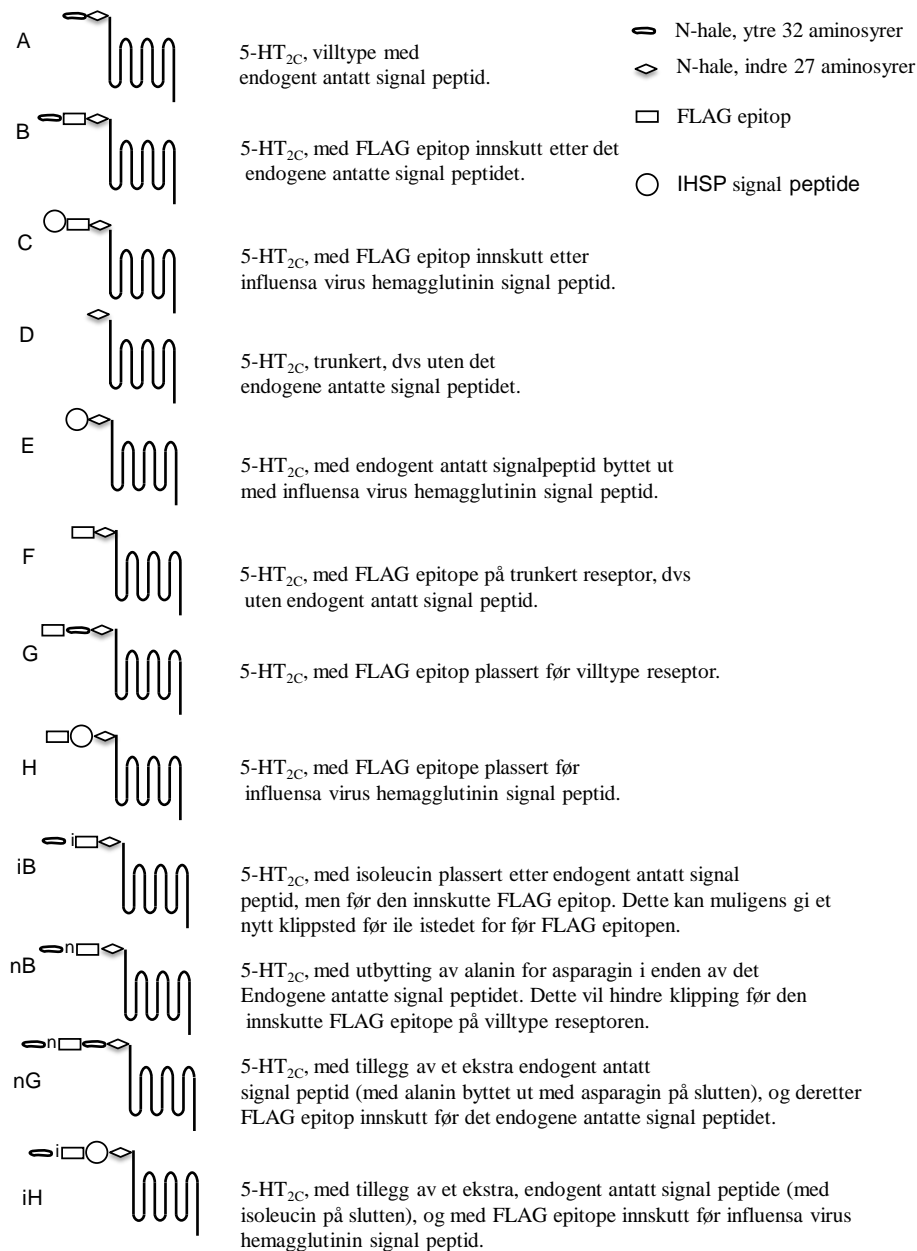
Med hjelp av de ytre primerne skjer det også en amplifisering av det spleisede båndet. Båndet kan deretter klones inn i egnet vektor, som oftest en av vektorene som er benyttet i templatet.

Denne spleisingen ga et lengre bånd (423 bp) som koder for begynnelsen av FLAG- α_{1B} -reseptoren. Båndet ble kjørt på en 1,5 % agarosegel, klipt ut og renset. 15,3 μ l av det rensede båndet ble klipt med restriksjonsenzym, 0,3 μ l Nhe1 og 0,6 μ l Xho1, i tillegg til 1,8 μ l buffer Tango 1X. Klippingen ble utført ved 37 °C i ca 1 time. Det korrekte båndet på 182 bp ble deretter utklipt av agarosegelen og renset ved GeneClean. Båndet ble deretter ligert inn i α_{1B} i pcDNA3-vektor klipt med de samme restriksjonsenzymene som båndet. Sluttresultatet etter transformasjon, miniprep, restriksjonsanalyse og sekvensering ble FLAG- α_{1B} i pcDNA3.

På mange av konstruktene jeg laget måtte jeg gjøre prosedyrer om igjen flere ganger. Det vanskeligste var ofte å få sterke nok bånd etter klippingen og den påfølgende agarose-elektroforesen fulgt av GeneClean. Dette førte til at jeg flere ganger gjorde re-pcr på bånd jeg visste var riktige. Jeg kjørte gjerne flere paralleller og poolet disse sammen etter utklippingen. Dette ga ofte bedre resultat da jeg fikk mer materiale å jobbe mer under GeneClean prosedyren.

7. RESULTATER

7.1 Presentasjon av 5-HT_{2C} genkonstrukt



Figur 7.1 Skjematisk illustrasjon over villtypen 5-HT_{2C} reseptor(=A), og i tillegg elleve ombygde genkonstrukt som alle ble transfektert inn i COS-7 celler. Oversikten er laget av Staffan Uhlen ved bruk av Power Point.

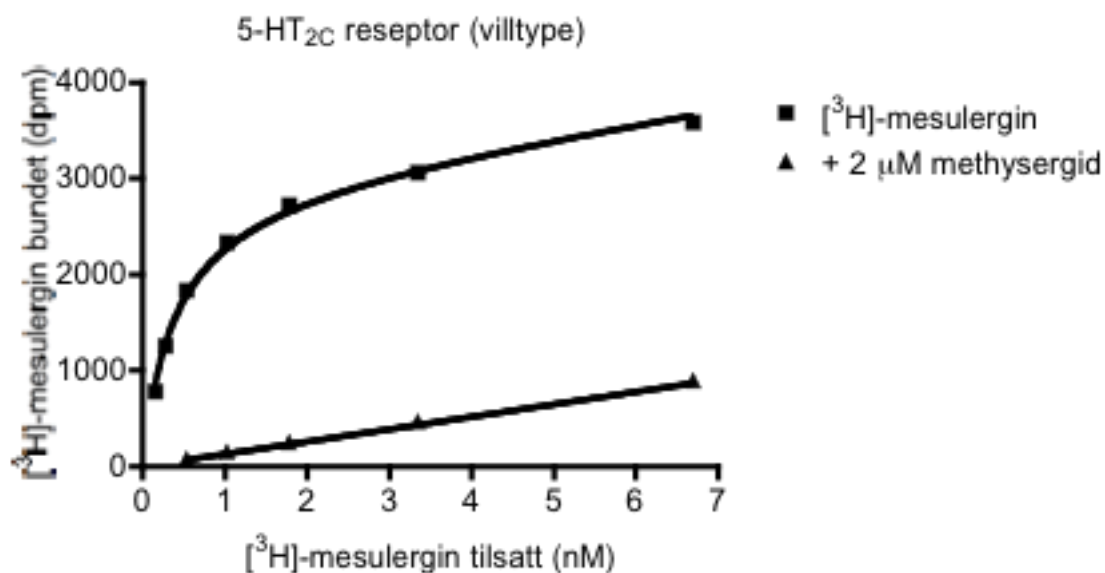
Av disse genkonstruktene har jeg laget de fire siste; iB, nB, nG og iH, men for oversikten sin skyld er det tatt med bilder av alle konstruktene som inngikk i forsøkene. (se vedlegg 12.1.1, side 58, for en detaljert beskrivelse av de ulike konstruktene N-terminalhaler).

7.2 Resultat fra radioligandbindingsforsøk 5-HT_{2C}

Tabell 7.1 B_{max}-verdier fra 5-HT_{2C} radioligandforsøk

5-HT _{2C} konstrukt	B _{max} -verdier (fmol/mg protein)	Normaliserte B _{max} -verdier (% ± s.e.m)	Antall eksperiment (n)
A	1580 ± 410	100 ± 0	8
B	3230 ± 1160	168 ± 18	6
C	1940 ± 440	175 ± 43	4
D	1440 ± 300	162 ± 23	4
E	248 ± 61	16 ± 4	4
F	2300 ± 650	191 ± 41	4
G	368 ± 63	31 ± 5	4
H	34 ± 12	2 ± 1	4
iB	2740 ± 1320	111 ± 29	4
nB	728 ± 327	31 ± 7	4
nG	6 ± 4	1 ± 0	4
iH	20 ± 5	1 ± 0	4
pcDNA3.1	0 ± 0	0 ± 0	3

7.3 Satureringskurve for 5-HT_{2C}, villtypen



Figur 7.2 Satureringskurve for [³H]-mesulergin-binding i membraner (dpm) etter transfektering i COS-7 celler med villtypen av 5-HT_{2C} konstrukt. Den uspesifikke bindingen ble målt ved tilsetting av 2 µM methysergid. Kurven er laget ved bruk av GraphPad Prism.

Konstrukt A er villtypen med det endogene antatte signalpeptid og det konstruktet som alle de andre hele tiden blir sammenlignet med. Uttrykksnivået av villtypen settes til 100 %. Tettheten av reseptorer etter transfektering i COS-7 celler ble målt med radioligandbinding med [³H]-mesulergin. Ved å dividere B_{max}-verdiene (målt i nM) med proteinkonsentrasjonen i membranene ble villtypens uttrykksnivå bestemt til 1,58 ± 0,41 picomol mg⁻¹ protein i prøvene. I konstrukt B ble en FLAG-epitop plassert etter det endogene antatte SP. Som tabell 7.2 viser, gjorde dette at tettheten av reseptorer økte sammenlignet med vill-typen (168 %). For konstrukt C ble FLAG-epitopen beholdt, mens det endogene antatte signalpeptidet ble byttet ut med IHSP. Med denne forandringen viste resultatene at også dette ga et høyt uttrykksnivå i plasmamembranen sammenlignet med villtypen (175 %). I konstrukt D ble reseptoren trunkert med 32 aminosyrer, og mangler derfor det endogene antatte signalpeptidet. Denne trunkeringen ga reseptoren veldig gode uttrykksnivåer (162 %). I konstruktet hvor IHSP ble plassert foran den trunkerte reseptoren, konstrukt E, ble det derimot svært lave nivåer av detekterte reseptorer i plasmamembranen (16 %). Når Flag-epitopen ble plassert før den trunkerte reseptoren, som i konstrukt F, ble uttrykksnivåene av reseptoren nesten det dobbelte som av villtypen (191 %). I konstrukt G ble FLAG-epitopen plassert foran villtypen, dette ga lave nivåer av reseptorer i plasmamembranen (31 %). Konstrukt H ga lave verdier (2 %). Dette er nesten samme konstrukt som H (?), forskjellen er at det endogene antatte signalpeptidet er byttet ut med IHSP. Som figur 7.1 viser, er konstrukt iB nesten identisk med konstrukt B. Det uttrykkes veldig bra (111 %). Vi brukte det som en negativ kontroll for M1 i immunofluorescensforsøkene. Konstrukt nB er også likt på B, men ved å bytte ut alanin med asparagin i enden av det endogene antatte signalpeptidet før FLAG-epitopen, skulle signalpeptidet i teorien ikke være klippbart. Dette konstruktet uttrykkes veldig mye dårligere enn konstrukt B (31 % i forhold til 168 %). De to siste konstruktene, nG og iH, uttrykkes nesten ikke i det hele tatt (1 %). Dette kan vi også tydelig se ut fra satureringskurvene for konstruktene (se tabell 7.1, og satureringskurver i vedlegg 12.1.3, side 60).

For å regne ut konsentrasjonen av radioligand i eksperimentet anvendes en f-faktor. Denne vil lineært omdanne målt radioaktivitet (dpm-verdien) til konsentrasjon (nM). For å beregne f-faktoren trenger man å vite den spesifikke radioaktiviteten i Ci/mmol til stoffene det jobbes med (dette er oppgitt på boksene). Per definisjon er 1 Ci = 2.22*10¹²dpm.

Den spesifikke radioaktiviteten for [³H]-RX821002 er 49 Ci/mmol

Det kan da beregnes:

- $2.22 \cdot 10^{12} \text{ dpm/Ci} \times 49 \text{ Ci/mmol} > 108780 \text{ dpm/nmol}$
- 1 nmol tilsvarer 1 liter av en 1 nM løøsning = 108780 dpm
- 150 μl av en 1 nM løøsning blir = 16317 dpm

F-faktoren for [^3H]-RX821002 (49 Ci/mmol) i en 150 μl løøsning (d.v.s eksperimentvolumet i mikrotiterplaten blir altså lik 16317).

For [^3H]-mesulergin er den spesifikke radioaktiviteten 91 Ci/mmol. F-faktoren for denne blir $91/49 \times 16317 = 30303$ (d.v.s $f = 30303 \text{ dpm/nM}$ i en 150 μl løøsning).

Med hjelp av f-faktoren kan man regne ut konsentrasjonen av bundet radioligand (som blir igjen på filtrene fra eksperimentvolumet i mikrotiterplaten). Denne konsentrasjonen (ofte pikomolar) kan divideres med protein-konsentrasjonen. Da fås reseptorkonsentrasjonene i pM/mg protein som er oppgitt i tabellene.

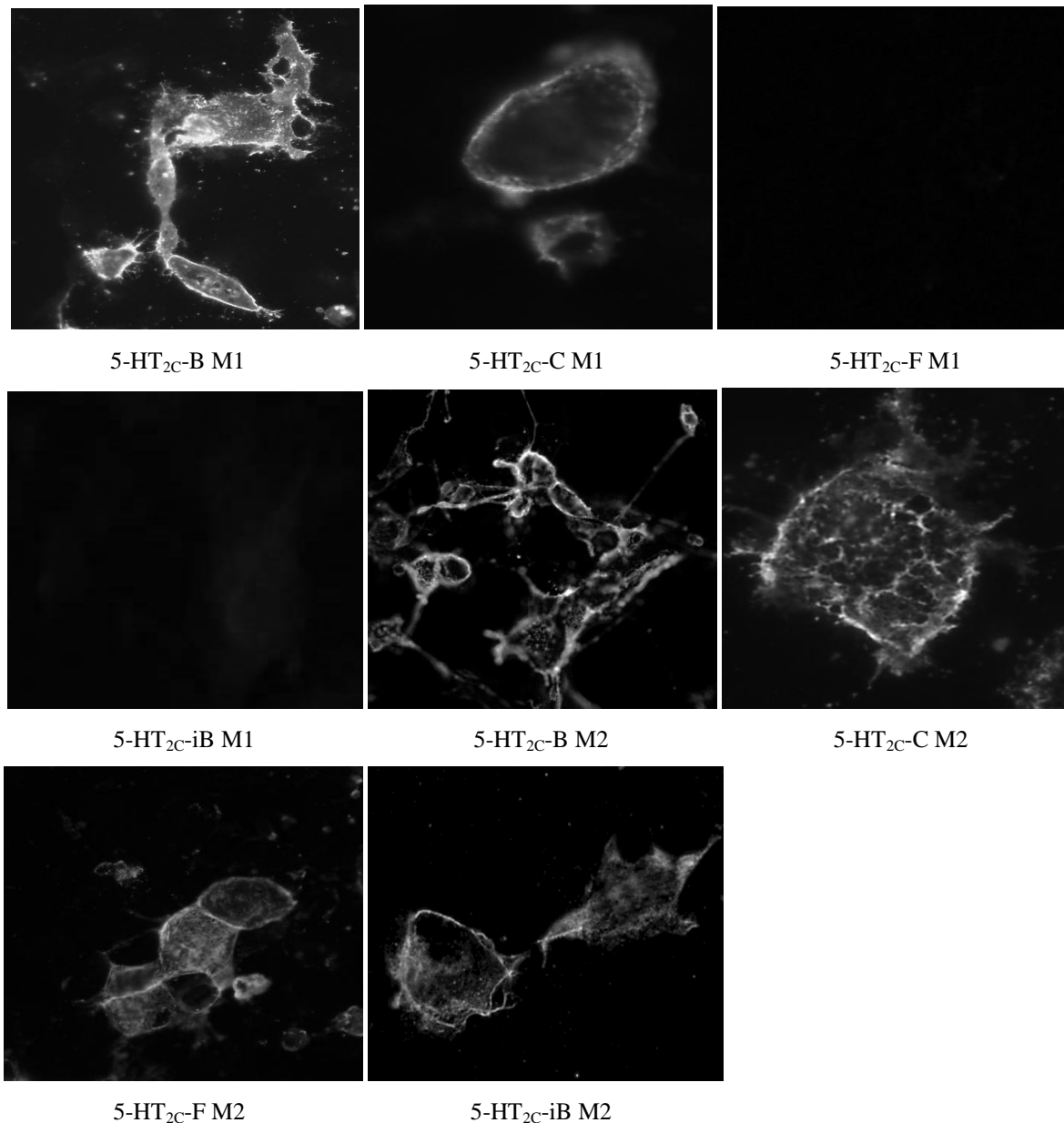
7.4 Resultat fra innmerkning med M1 og M2 hos 5-HT_{2C}-konstrukt

Tabell 7.2 Resultat innmerkning 5-HT_{2C}-konstrukt med M1 og M2

Konstrukt	M1	M2
5-HT _{2C} -B	+	+
5-HT _{2C} -C	+	+
5-HT _{2C} -F	-	+
5-HT _{2C} -iB	-	+
5-HT _{2C} -nB	-	+

Alle innmerkninger og fluorescensmikroskopianalyser ble på hvert konstrukt gjort minst fire ganger og ga hver gang samme resultat. Positiv innmerkning kunne sees, men bildene som ble tatt var ikke alltid gode nok til publisering. Det ble hele tiden gjort optimeringer av protokollen som ble brukt. Dette kunne være forhold som berørte fiksering og merking, cellenes vekst, og mer tekniske områder som mikroskop, kamera og software.

7.5 Bilder fra fluorescensmikroskopi 5-HT_{2C}

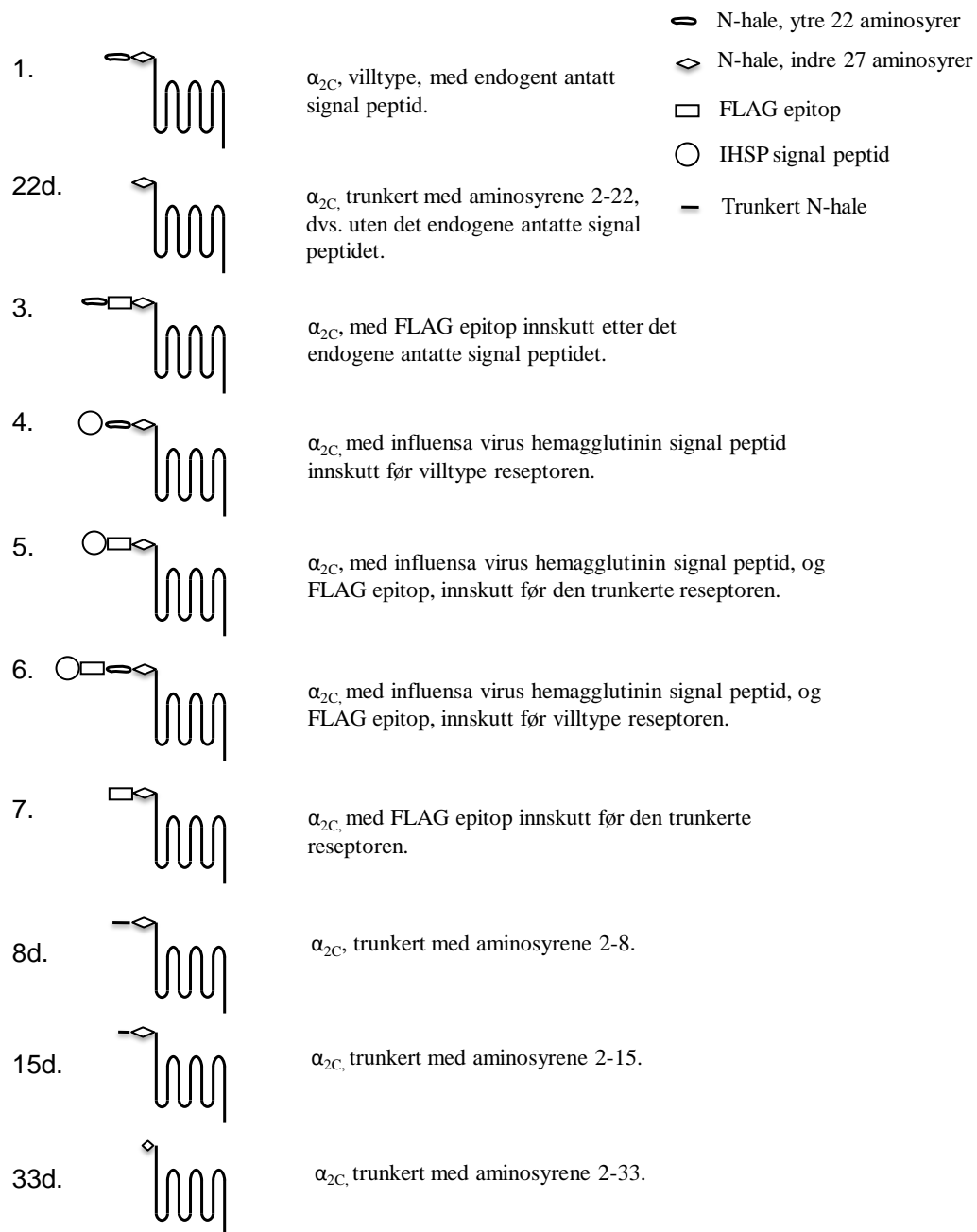


Figur 7.3 Immunostaining av utvalgte 5-HT_{2C} konstrukt inneholdende en FLAG-epitop

For 5-HT_{2C} konstruktene som inneholdt en FLAG-epitop ble konstruktene som uttrykkes godt i radioligandbindingseksperimentene testet for fluorescerende innmerking. Av tabell 7.2 og satureringskurvene kan vi se at dette gjaldt for konstrukt B, C, F, iB og nB. Alle disse ga positiv innmerking ved bruk av det primære antistoffet M2 og det sekundære fluorescerende antistoffet. Jeg har tatt med bilder av konstrukt B, C, F og iB. Disse viser tydelig at M1 sammen med det fluorescerende antistoffet gir positiv innmerking for konstrukt B, og C, og negativt resultat for F og iB. I konstrukt B har det endogene, 32 aminosyrer lange, antatte signalpeptidet fra 5-HT_{2C}-reseptoren blitt plassert foran FLAG-epitopen. Resultatene viser at

denne sekvensen klippes bort, og altså fungerer som et klippbart signalpeptid i dette konstruktet. Selv når det kjente signalpeptidet IHSP plasseres foran FLAG-epitopen (konstrukt C) så klippes dette signalpeptidet bort.

7.6 Presentasjon av α_{2C} genkonstrukt



Figur 7.4 Skjematisk illustrasjon over vill-typen α_{2C} reseptor (=1) med ni andre ombygde genkonstrukt som alle ble transfektert inn i COS-7 celler.

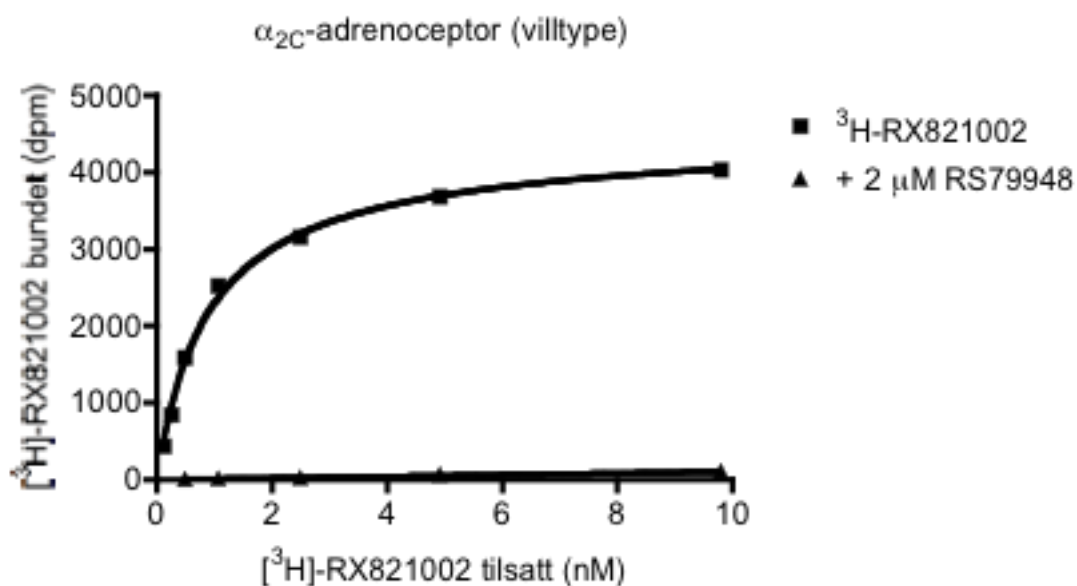
Av disse genkonstruktene har jeg laget α_{2C} -6, og de trunkerte α_{2C} .2-8d, α_{2C} .2-15d og α_{2C} .2-33d (se vedlegg 12.2.1, side 61, for en detaljert beskrivelse av de ulike konstruktens N-terminalhaler).

7.7 Resultat fra radioligandbindingsforsøk α_2C

Tabell 7.3 B_{max} -verdier fra α_2C radioligandforsøk

α_2C konstrukt	B_{max} -verdi (fmol/mg protein)	Normaliserte B_{max} -verdier (% \pm s.e.m)	Antall eksperiment (n)
1	1180 \pm 160	100 \pm 0	7
2	3 \pm 1	0,3 \pm 0,2	5
3	833 \pm 279	68 \pm 6	3
4	1110 \pm 300	96 \pm 13	3
5	728 \pm 237	60 \pm 8	3
6	1080 \pm 320	91 \pm 9	3
7	154 \pm 44	11 \pm 3	4
8d	211 \pm 22	18 \pm 1	4
15d	123 \pm 13	11 \pm 2	4
33d	81 \pm 14	7 \pm 1	4
pCi-neo	n.c.	n.c	1

7.8 Satureringskurve for α_2C , villtypen



Figur 7.5 Satureringskurve for $[^3H]$ -RX821002-binding i membraner (dpm) etter transfektering i COS-7 celler med villtypen av α_2C -AR konstrukt. Den uspesifikke bindingen ble målt ved tilsetning av 2 μ M RS79948. Kurven er laget av min veileder ved bruk av GraphPad Prism.

Konstrukt 1 er villtypen med det endogene antatte signalpeptid og det konstruktet som alle de andre hele tiden blir sammenlignet med. Tettheten av reseptorer etter transfektering i COS-7 celler ble målt med [³H]-RX821002 binding. K_d-verdiene ble de samme for alle konstruktene. Dette indikerer at reseptorenes konformasjon ikke påvirkes av de ulike N-terminale modifiseringene. Ved å dividere B_{max}-verdiene med proteinkonsentrasjon i prøven fås reseptorkonsentrasjonene i enheten pmol/mg protein. For villtypen (konstrukt 1) ble reseptorkonsentrasjonen bestemt til 1,18 ± 0,16 picomol mg⁻¹ protein. [B_{max}-verdiene blir bestemt ved å måle radioaktiviteten, og regne om denne til nM-konsentrasjonen av bundne reseptorer i prøvene]. I konstrukt 3 ble en FLAG-epitop plassert etter det endogene antatte signalpeptidet. Som tabell 7.3 side 47 viser, sank tettheten av reseptorer til 68 % sammenlignet med vill-typen. Konstrukt 4, med et kjent signalpeptid (influenza virus heagglutinin signal peptid = IHSP) tilsatt før villtype reseptoren, ble omtrent like godt uttrykt som A (96 %). I konstrukt 5, med samme FLAG-epitop som i konstrukt 3, men med det endogene antatte signalpeptid byttet ut med IHSP ble uttrykksnivået 60 %. Konstrukt 6, som jeg har laget, og der en FLAG-epitop er plassert mellom IHSP og det endogene antatte signalpeptidet, viste høyt nivå av reseptor-uttrykk (91 %). Et av konstruktene med dårligst uttrykksnivå var 7 med bare 11 %. Her er det endogene antatte signalpeptidet byttet ut med en FLAG-epitop. Fire av konstruktene er trunkerte varianter av α_{2C}-AR villtypen. Disse reseptorene har alle lave ekspresjons-nivåer, og uttrykkes altså dårlig. Konstrukt 22d var trunkert med aminosyrene 2-22. Dette tilsvarer at det endogene antatte signalpeptid er tatt vekk. Dette konstruktet uttrykkes ikke i det hele tatt. Hos to av konstruktene, α_{2C}.2-8d og α_{2C}.2-15d, ble deler av det endogene antatte signalpeptidet beholdt. Den av disse to reseptorene som uttrykkes best var 8d med 18 % i forhold til villtypen, deretter fulgte 15d med 11 %. Konstrukt α_{2C}.2-33d var trunkert med aminosyrene 2-33, og har da selvfølgelig den korteste N-terminal halen av alle konstruktene. Den uttrykkes veldig dårlig (7 %). Se tabell 7.3 side 47)

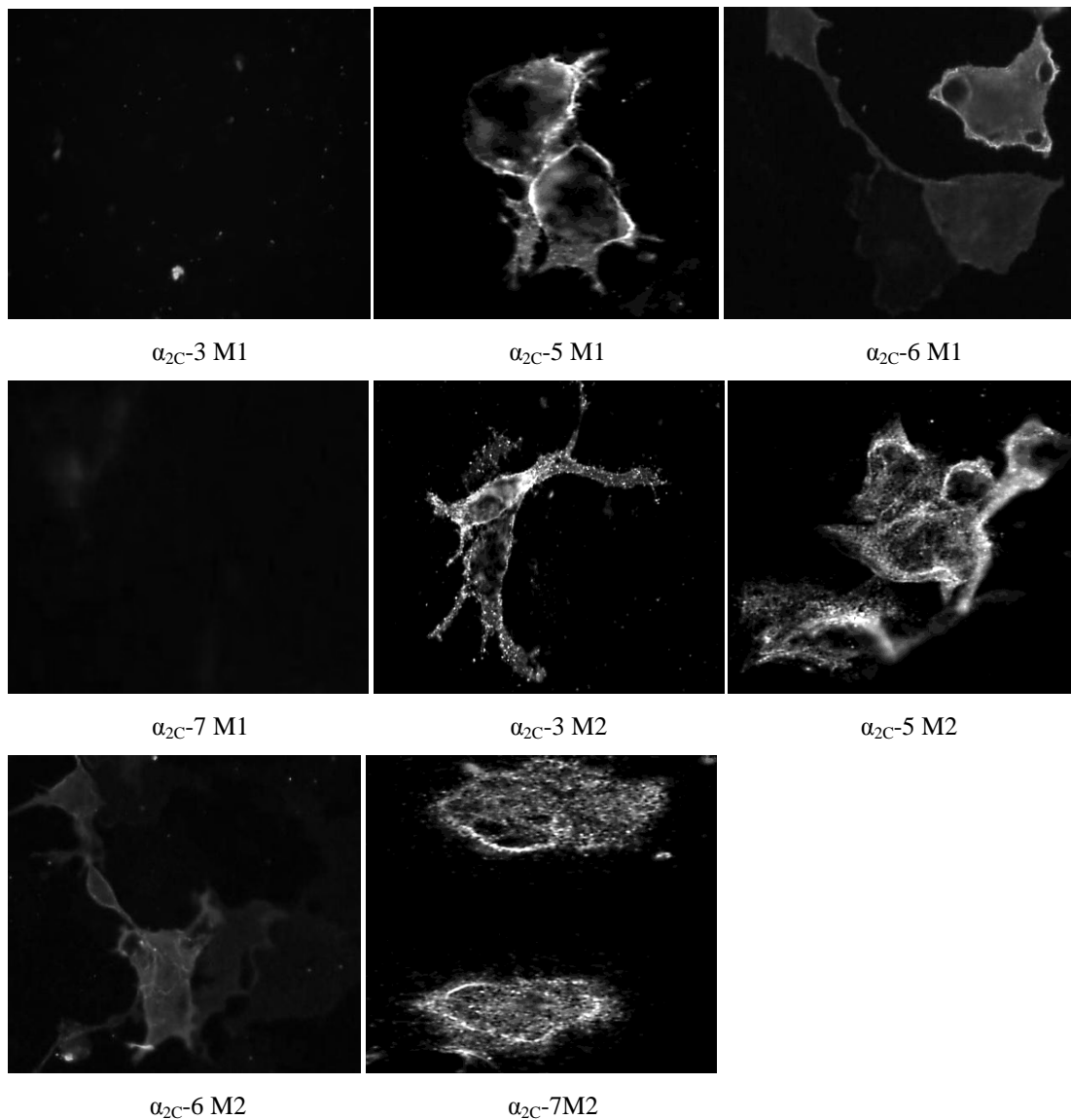
Konstruktene som inneholdt en FLAG-epitop ble testet for fluorescerende innmerkning.

7.9 Resultat fra innmerkning med M1 og M2 hos α_{2C} -konstrukt

Tabell 7.4 Resultat innmerkning α_{2C} -konstrukt med M1 og M2

Konstrukt	M1	M2
α_{2C-3}	-	+
α_{2C-5}	+	+
α_{2C-6}	+	+
α_{2C-7}	-	+

7.10 Bilder fra fluorescensmikroskopi α_{2C}



Figur 7.6 Immunostaining av utvalgte α_{2C} konstrukt inneholdende en FLAG-epitop

Genkonstrukt inneholdende en FLAG-epitop ble testet for fluorescerende innmerking. Det er i resultatdelen ikke tatt med bilder av alle. Alle disse konstruktene; 3, 5, 6 og 7 gav positivt resultat med det primære antistoffet M2 i kombinasjon med det fluorescerende sekundære antistoffet. Det primære antistoffet M1, som bare kjenner igjen FLAG-epitopen ved en fri N-terminal-ende, gav positivt resultat for konstrukt 5 og 6, og negativt resultat for konstrukt 3 og 7. α_{2C-7} M1 ble tatt med som en negativ kontroll.

8. DISKUSJON

8.1. Immunofluorescensmikroskopi og innmerking med M1 og M2

I forsøkene ble det brukt immuno-fluorescensmikroskopi, modell BX51 fra Olympus, for å se om signalpeptider hadde blitt klipt av i cellen. Immunofluorescensmikroskopi er en metode som kan brukes kvalitativt og kvantitativt for å studere antistoffers binding til cellulære komponenters, i vårt tilfelle en FLAG-epitop på reseptorer i plasmamembranen. De tekniske metodene vi brukte er tidligere beskrevet av Kallal og Benovic [46]. Vi brukte en kjent metodologisk forsøksdesign med antistoffene M1 og M2 for å teste om våre 5-HT_{2C}-og α_{2C} -reseptorer hadde klippbare signalpeptid [47]. Fra SignalP 3.0 visste vi at N-terminalhalen hos 5-HT_{2C}- reseptoren med stor sannsynlighet klippes mellom aminosyre 32 og 33. For α_{2C} reseptoren hadde tilsvarende analyse vist at α_{2C} reseptoren burde klippes mellom aminosyre 22 og 23 (se vedlegg 12.2.2 side 62). Det ble derfor først satt på en kort FLAG-epitop på begge konstruktene rett etter det angivelige klippstedet etter den endogene signalpeptidsekvensen. FLAG-epitopen bestod av åtte aminosyrer med sekvensen NH₂-DYKDDDDA (AspTyrLysAspAspAspAla). Aromatiske aminosyrer er hovedfaktoren i antigen-antistoff binding [48]. Et aromatisk tyrosin er derfor plassert i posisjon 2, flankert av ladete aminosyrer. Studier har tidligere vist at sjansen for at aromatiske aminosyrer er involvert i binding er mye større da enn i mindre polare forhold [49]. Flere antistoff med forskjellige krav til epitopbinding er kommersielt tilgjengelige. Bindingen av antistoff M1 fra Sigma-Aldrich til FLAG-epitopen er kalsiumavhengig. En aminosyrescanning har vist at antistoffet hovedsakelig binder til de fire første aminosyrene og at den krever en fri N-terminal aminogruppe [50]. Videre studier har også vist at Asp i posisjon 7 er nødvendig for bindingen til antistoffet [51]. Antistoffet M2 er mer generelt og kjenner igjen FLAG-epitopen uansett hvor den sitter i proteinet.

Bildene fra fluorescensforsøkene ga klare svar. Alle de ombygde genkonstruktene med FLAG-epitop ble testet med M1 og M2. Det er under bildepresentasjonen blitt valgt og ikke vise alle resultatene, her er kun bilder for 5-HT_{2C}-B, C, F og iB. Også dette fluorescensforsøket ga klare svar. Her er M1-innmerkingen av 5-HT_{2C} – F og iB konstruktene tatt med som negative kontroller. I konstrukt F ble metionin beholdt foran FLAG-epitopen. Som tidligere nevnt fører dette til at FLAG-epitopen ikke finnes som fri N-terminal som M1 kan binde til. En fluorescerende innmerking vil derfor ikke skje. Flere konstrukt kan brukes som positiv kontroll for M2, vi valgte å bruke konstrukt F som tydelig ga innmerking. De viktigste forsøkene var innmerkingen av konstrukt B og C med M1 og M2. På konstrukt C er IHSP, som vi vet klippes av, plassert foran FLAG-epitopen. Dette gir selvfølgelig positivt resultat både for M1 og M2. På konstrukt B er det endogene antatte signalpeptidet plassert foran FLAG-epitopen. For 5-HT_{2C}-reseptoren predikteres det i SignalP 3.0 at det endogene antatte SP skal klippes bort. Våre fluorescensmikroskopieresultat viste også dette; konstrukt B ga positiv innmerking med både M1 og M2. Hovedkonklusjonen er at ***N-terminalen hos 5-HT_{2C}-reseptorer fungerer som et klippbart signalpeptid!***

Samme type innmerking som ble gjort for 5-HT_{2C}-konstruktene ble også gjort for α_{2C} konstruktene. M1-innmerkingen av α_{2C-7} er tatt med som en negativ kontroll. I dette konstruktet beholdt vi metionin foran FLAG-epitopen. Dette gjør at det ikke finnes en fri N-terminal aminogruppe; M1 binder ikke og gir da selvfølgelig ikke fluorescerende innmerking. M2 derimot ga helt tydelig positivt resultat, dette var forventet og konstruktet ble derfor tatt med som en positiv kontroll. Vi prøvde å merke inn med både M1 og M2 på konstrukt α_{2C-3} og α_{2C-5} . Det kjente IHSP vet vi klippes av og både M1 og M2 burde derfor gi positivt resultat på konstrukt 5. Bildene viste også med stor tydelighet at IHSP blir klipt av og både M1 og M2 ga klar innmerking. Resultatene for konstrukt 3 var også veldig tydelige, M1 ble negativt og M2 positivt, det vil at det endogene SP ikke klippes av stikk i strid med hva som predikteres for α_{2C} -reseptoren i SignalP 3.0

Hovedkonklusjonen er at ***det predikerte signalpeptid i N-terminalhalen til α_{2C} -AR ikke nødvendigvis er et funksjonelt signalpeptid!***

Resultatene våre viser at modellsystemet med konstrukt B og C, med bruk av FLAG-epitop og IHSP, er et veldig godt system for å undersøke om det endogene antatte signalpeptidet virkelig fungerer som et signalpeptid eller ikke.

8.2 Radioligandbinding

I radioligandbindingsstudiene er det undersøkt hvordan ulike modifiseringer av 5-HT_{2C}- og α_{2C} -reseptorenes N-terminaler påvirker graden av translokasjon gjennom ER-membranen til plasmamembranen. Både 5-HT_{2C}- og α_{2C} -reseptoren predikteres til å ha en endogen signalpeptidsekvens i sin N-terminalhale. Selv om GPCR:er er viet mye oppmerksomhet i flere studier, vet man fortsatt lite detaljer om transportmekanismen av disse reseptorene via intracellulære membransystem til celleoverflaten [52].

Radioligandbindingsforsøkene for 5-HT_{2C} ga uventede resultat. Konstrukt D, hvor N-halen er trunkert med 32 aminosyrer, ble bedre uttrykt enn villtypen. Forsøket viste at N-terminalhalen hos 5-HT_{2C}-reseptoren ikke er nødvendig for uttrykk av reseptorer i plasmamembranen. Konstruktene jeg laget ble designet med konstrukt B som modell. I iB ble et ekstra isoleucin plassert etter det endogene antatte signalpeptidet. Hensikten var å se om dette medførte at signalsekvensen ble klippet før isoleucin i stedet før FLAG-epitopen. Dette kan ikke bedømmes ut fra radioligandforsøkene, men bildene fra fluorescensforsøkene viste at ile ikke ble klipt bort. (M1 ble negativ). Hos konstrukt nB ble aminosyren alanin på enden av det endogene signalpeptidet byttet ut med asparagin. Denne utbyttingen førte til at signalpeptidet ikke ble klipt og det ga lave uttrykksnivåer. I 5-HT_{2C}- forsøket uttryktes G og H dårlig. Får å hjelpe til med ekspresjonen ble det forsøkt å bygge om på konstruktene ved å sette på det endogene antatte signalpeptidet. Dette hjalp ikke, de nye konstruktene, nG og iH, uttryktes omtrent ikke i det hele tatt. I ettertid ble konklusjonen at dette var dårlig designete konstrukt. På grunn av det lave ekspresjonsnivået ble det heller ikke gjort fluorescensmikroskopi på disse konstruktene. Forsøkene viste også at man ikke kan gjøre hva som helst i N-terminalen og tro at dette skal hjelpe på uttrykket.

På den muntlige presentasjonen 18.juni blir det diskutert litt mer i detalj hvordan de ulike modifiseringene av N-halen påvirket reseptorenes uttrykksnivå i membranene. Mange av resultatene var veldig overraskende.

5-HT_{2C}-reseptoren syntes å ha et endogent signalpeptid som klippes av. Man skulle da tro at denne sekvensen er nødvendig, det viste den seg til ikke å være (konstrukt D uttryktes like godt som villtypen)

α_{2C} syntes ikke å ha et endogent signalpeptid. Tross dette viste resultatene at N-halen ikke kunne trunkeres om konstruktet fortsatt skulle uttrykkes godt.

9. KONKLUSJON

Vi fikk resultater i våre forsøk som tydelig viste at for 5-HT_{2C}-reseptoren fungerer det endogene antatte signalpeptid som et klippbart signalpeptid. Det var også dette som ble prediktert i SignalP 3.0 Videre viste resultatene at signalpeptidsekvensen ikke er nødvendig for uttrykk av reseptorer i plasmamembranen da konstrukt D og F ble likt uttrykt som villtypen, konstrukt A.

Vi gjorde de samme forsøkene med α_{2C} -konstruktene som med 5-HT_{2C}-konstruktene. Disse viste at det predikterte endogene SP i N-terminalhalen til α_{2C} -reseptoren ikke fungerte som et klippbart SP. Radioligandforsøkene våre med de trunkerte konstruktene viste at sekvensen imidlertid er viktig for reseptoruttrykk da den trunkerte reseptoren uttryktes 100 ganger lavere i plasmamembranen sammenlignet med villtypen.

10. OPPFØLGINGSSTUDIER

10.1 α_{2C} -AR

A

Det predikterte signalpeptidet ble ikke klipt bort, og analysen av sekvensen viste at en komponent som kreves for å gjøre N-halen til et optimalt signalpeptid manglet, nemlig en positiv ladet aminosyre i n-regionen. Et interessant prosjekt er å introdusere en lysin (K) eller arginin (R) og se om "signalpeptidet" nå vil klippes bort foran FLAG-epitopen i konstrukt 3. Samme forandring bør også tas med på villtypen (konstrukt 1) som kontroll på hvordan denne forandringen påvirker B_{max}.

Det falskt antatte signalpeptidet

MASPALAAALAVAAAAGPNASG burde forandres til

MAKSPALAAALAVAAAAGPNASG

Villtype DNA- sekvens av α_{2C} N-hale:

TAG (Nhe1) GCTAGC (startkodon M) ATG (A) GCG (fortsatt α_{2C}) TC...-3'

Begge **MAKSP**-konstruktene kan tillages med samme forward-primer (på templatet konstrukt 1, respektive konstrukt 3):

maksp.F: TAG (Nhe1) GCTAGC(startkodon M) ATG (A) GCG (insatt K) AAA (fortsatt α_{2C})
TC....-3`

B

En tidligere studie har vist at en temperatur på 28 °C fremkalte en redistribusjon av α_{2C} -AR fra Golgi til plasmamembranen i blodkar og i transfekterte HEK 293 celler [53]. En mulig oppfølgingsstudie vil da være å undersøke om det kan eksistere en forskjell i plasmamembranuttrykk for villtypen sammenlignet med de modifiserte N-terminalene ved temperaturer på 28 °C og 37 °C. Vi har en hypotese om at det hydrofobe N-terminalområdet gir α_{2C} -AR et funksjonelt kjennetegn. Uhlen og Jahnsen planlegger nå å sammenligne uttrykksnivåene av detekterbare reseptorer i plasmamembranen i dyrkede cellekulturer ved 28 °C og ved 37 °C. Konstruktene de vil teste er villtypen α_{2C} , som har et hydrofobt område i N-terminalhale, og IHSP-FLAG- α_{2C} (konstrukt 3), som har et hydrofilt område i sin N-terminalhale. Radioligandbinding med α_{2C} -antagonisten [³H]-RX821002 vil vise uttrykksnivåene. Resultatene vil kunne vise om N-terminalhalen er involvert i temperaturregulering av uttrykk/lokalisering av α_{2C} -AR i plasmamembranen.

10.2 FLAG- α_{1B}

Under arbeidet med 5-HT_{2C} og α_{2C} -prosjektet bestemte Uhlen seg for at han også ville benytte seg av de samme teknikkene i et nytt prosjekt. I det nye prosjektet skal radioligandbinding erstattes med fluorescensligandbinding, Konstruktet det skal jobbes med er FLAG- α_{1B} . Dette er laget i løpet av masterprosjektet og er beskrevet tidligere i oppgaven under eksperimentelt. Den adrenerge α_{1B} -reseptoren kan undersøkes ved bruk av radioliganden [³H]-prazosin, men også ved bruk av fluorescensliganden bodipy-prazosin. Planen er å sammenligne tre ulike deteksjonsmetoder av FLAG- α_{1B} -reseptoren;

- 1) [³H]-prazosin radioligandbinding
 - 2) fluorescensbinding med bodipy-prazosinbinding i en fluorescensplateleser
 - 3) immunofluorescens-innmerkning av en FLAG-epitop med terbium-innmerket M2-antistoff
- Dette kan muligens lede videre til FRET-applikasjoner med terbium-M2/bodipy-prazosin kombinasjonen.

11. REFERANSELISTE

1. Andersson, H., et al., *Membrane assembly of the cannabinoid receptor 1: impact of a long N-terminal tail*. Molecular pharmacology, 2003. **64**(3): p. 570-577.
2. *SignalP 3.0 Server*. 2009-03-29]; Available from: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>.
3. Dyrlov Bendtsen, J., et al., *Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0*. Journal of molecular biology, 2004. **340**(4): p. 783-795.
4. Fentress, H., et al., *Pharmacological properties of the Cys23Ser single nucleotide polymorphism in human 5-HT_{2C} receptor isoforms*. The Pharmacogenomics Journal, 2005. **5**(4): p. 244-254.
5. Jacoby, E., et al., *The 7 TM G-protein-coupled receptor target family*. ChemMedChem, 2006. **1**(8): p. 761-82.
6. Foord, S., et al., *International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list*. Pharmacological reviews, 2005. **57**(2): p. 279-288.
7. von Heijne, G., *The membrane protein universe: what's out there and why bother?* J Intern Med, 2007. **261**(6): p. 543-57.
8. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemistry*. Vol. Sixth edition. 2006. p.140-142+p.383-391.
9. Wallin, E. and G. von Heijne, *Properties of N-terminal tails in G-protein coupled receptors: a statistical study*. Protein Engineering Design and Selection, 1995. **8**(7): p. 693-698.
10. Alberts, B., et al., eds. *Essential Cell Biology*. Second edition ed. 2003. Chapter 16, page 534-569.
11. Rang, H.P., et al., *Pharmacology*. Fifth edition ed. G-Protein-Coupled Receptors. 2004. p.32-41.
12. Nielsen, H. and A. Krogh. *Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model*. 1998.
13. Petrovska, R., et al., *Addition of a signal peptide sequence to the alpha1D-adrenoceptor gene increases the density of receptors, as determined by [³H]-prazosin binding in the membranes*. Br J Pharmacol, 2005. **144**(5): p. 651-9.
14. Hoyer, D., et al., *International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin)*. Pharmacological reviews, 1994. **46**(2): p. 157-203.
15. Roth, B., et al., *5-Hydroxytryptamine₂-Family Receptors (5-Hydroxytryptamine_{2A}, 5-Hydroxytryptamine_{2B}, 5-Hydroxytryptamine_{2C}) Where Structure Meets Function*. Pharmacology and Therapeutics, 1998. **79**(3): p. 231-257.
16. Lappalainen, J., et al., *Identification, expression, and pharmacology of a Cys23-Ser23 substitution in the human 5-HT_{2c} receptor gene (HTR_{2C})*. Genomics, 1995. **27**(2): p. 274-279.
17. Rana, B.K., T. Shiina, and P.A. Insel, *Genetic variations and polymorphisms of G protein-coupled receptors: functional and therapeutic implications*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001. **41**: p. 593-624.
18. Drago, A. and A. Serretti, *Focus on HTR_{2C}: A possible suggestion for genetic studies of complex disorders*. American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics: the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics, 2008.
19. Okada, M., et al., *Modification of human 5-HT_{2C} receptor function by Cys23Ser, an abundant, naturally occurring amino-acid substitution*. Mol Psychiatry, 2004. **9**(1): p. 55-64.
20. *Adrenoceptors: Introduction*. 2008 2009-05-15]; Available from: <http://www.iuphar-db.org/GPCR/IntroductionDisplayForward?chapterID=1274>.
21. Ahlquist, R., *A study of the adrenotropic receptors*. American Journal of Physiology, 1948. **153**(3): p. 586-600.
22. Regan, J., et al., *Cloning and expression of a human kidney cDNA for an 2-adrenergic receptor subtype*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1988. **85**(17): p. 6301-6305.

23. α_2 -adrenoceptor. [cited 2009 05-15]; Available from: <http://www.iuphar-db.org/GPCR/ReceptorDisplayForward?receptorID=2185>.
24. Rang, H.P., et al., *Pharmacology*. Fifth Edition ed. Noradrenergic transmission. 2004. p.161-183.
25. Winter, P.C., *Polymerase Chain Reaction (PCR)*, in *ENCYCLOPEDIA Life Sciences*, L. John Wiley & Sons, Editor. 2005.
26. Boyle, J. and A. Lew, *An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification*. *Trends in Genetics*, 1995. **11**(1): p. 8-8.
27. *Restriction Endonucleases Overview*. [cited 2009 03-05]; Available from: http://www.neb.com/nebecomm/tech_reference/restriction_enzymes/overview.asp.
28. Sjøberg, N., *Molekylær genetik: genteknologi-humant DNA*. 1998: Vett & viten.
29. Rossi, R., et al., *Functional characterization of the T4 DNA ligase: a new insight into the mechanism of action*. *Nucleic Acids Research*, 1997. **25**(11): p. 2106.
30. Panja, S., et al., *Role of membrane potential on artificial transformation of E. coli with plasmid DNA*. *J Biotechnol*, 2006. **127**(1): p. 14-20.
31. Li, S., et al. *DNA transformation by local heat shock*. 2007.
32. Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama, *High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids*. *Gene*, 1990. **96**(1): p. 23-8.
33. Panja, S., et al., *How does plasmid DNA penetrate cell membranes in artificial transformation process of Escherichia coli?* *Mol Membr Biol*, 2008. **25**(5): p. 411-22.
34. *QIAprep Spin Miniprep Kit- Handbooks & Protocols*. 2006 [cited 2009 03-15]; Second Edition:[Available from: <http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000248>.
35. Zhang, S. and M.D. Cahalan, *Purifying plasmid DNA from bacterial colonies using the QIAGEN Miniprep Kit*. *J Vis Exp*, 2007(6): p. 247.
36. *Sequencher*. [cited 2009 03-15]; 4.8:[Available from: http://www.genecodes.com/?referrer=Google_EU-D_names&gclid=CO6UucSpZkCFYh_3godTWYPog.
37. *HiSpeed Plasmid Purification Handbook*. 2005 2009-03-19]; Available from: <http://www1.qiagen.com/Products/Plasmid/QIAGENPlasmidPurificationSystem/HiSpeedPlasmidMaxiKit.aspx#Tabs=t2>.
38. *DNA Quantification (Absorbance Mode)*. [cited 2009 03-19]; Available from: <http://www.bioresearchonline.com/article.mvc/DNA-Quantification-Absorbance-Mode-0001>.
39. Dalby, B., et al., *Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications*. *Methods*, 2004. **33**(2): p. 95-103.
40. *Mechanism of cationic lipid-mediated transfection*. [cited 2009 03-19]; Available from: http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/pdf.Par.75261.File.dat/F063727_MechCationic.pdf.
41. *Lipofectamine™ 2000*. 2006 2009-04-26]; Available from: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/lipofectamine2000_man.pdf.
42. *Metafectene™ The Highly Efficient Transfection Reagent for Mammalian Cells*. Available from: http://www.biont.com/con_4_6_4/cms/upload/pdf/Manual_METAFACTENE_en.pdf.
43. Campbell, M., *Lipofection reagents prepared by a simple ethanol injection technique*. *Biotechniques*, 1995. **18**(6): p. 1027.
44. *Introduction to radioligand binding*. 1999 [cited 2009 03-04]; Available from: <http://www.curvefit.com/introduction9e.htm>.
45. Rogers, S. *Cell Biology Applications of Fluorescence Microscopy*. 1999 2009-05-14]; Available from: http://www.ihcworld.com/_protocols/immunofluorescence/immunofluorescence.htm.
46. Kallal, L. and J. Benovic, *Fluorescence microscopy techniques for the study of G protein-coupled receptor trafficking*. *Methods in enzymology*, 2002. **343**: p. 492.

47. Guan, X., T. Kobilka, and B. Kobilka, *Enhancement of membrane insertion and function in a type IIIb membrane protein following introduction of a cleavable signal peptide*. Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(31): p. 21995-21998.
48. Sela, M. and R. Arnon, *Studies on the chemical basis of the antigenicity of proteins. 1. Antigenicity of polypeptidyl gelatins*. Biochemical Journal, 1960. **75**(1): p. 91.
49. Hopp, T., *Protein surface analysis. Methods for identifying antigenic determinants and other interaction sites*. Journal of immunological methods, 1986. **88**(1): p. 1.
50. Prickett, K., D. Amberg, and T. Hopp, *A calcium-dependent antibody for identification and purification of recombinant proteins*. Biotechniques, 1989. **7**(6): p. 580.
51. Pinilla, C., et al., *Mapping the fine specificity of a calcium-dependent monoclonal antibody through the use of soluble positional scanning combinatorial libraries: identification of potent calcium independent antigens*. Mol. Diversity, 1995. **1**: p. 21–28.
52. Edwards, S., C. Tan, and L. Limbird, *Localization of G-protein-coupled receptors in health and disease*. Trends in Pharmacological Sciences, 2000. **21**(8): p. 304-308.
53. Jeyaraj, S.C., et al., *Cooling evokes redistribution of alpha2C-adrenoceptors from Golgi to plasma membrane in transfected human embryonic kidney 293 cells*. Mol Pharmacol, 2001. **60**(6): p. 1195-200.

12. VEDLEGG

12.1 5-HT_{2C}-konstrukt

12.1.1 Presentasjon av 5-HT_{2C} N-terminalhalene

1. 5-HT_{2C}-A (villtypen = 59 aminosyrer i N-terminalhalen)

MVNLRNAVHSFLVHLIGLLVWQC~~DISVSPVAA~~-IVTDIFNTSDGGRFKFPDGVQNW~~PALS~~

2. 5-HT_{2C}-B (67 aminosyrer):

MVNLRNAVHSFLVHLIGLLVWQC~~DISVSPVAA~~-DYKDDDDA-
-IVTDIFNTSDGGRFKFPDGVQNW~~PALS~~

3. 5-HT_{2C}-C (51 aminosyrer):

MKTIIALS~~YIFCLVFA~~-DYKDDDDA-----IVTDIFNTSDGGRFKFPDGVQNW~~PALS~~

4. 5-HT_{2C}-D (28 aminosyrer)

M-----IVTDIFNTSDGGRFKFPDGVQNW~~PALS~~

5. 5-HT_{2C}-E (43 aminosyrer):

MKTIIALS~~YIFCLVFA~~-----IVTDIFNTSDGGRFKFPDGVQNW~~PALS~~

6. 5-HT_{2C}-F (36 aminosyrer):

MDYKDDDDA-----IVTDIFNTSDGGRFKFPDGVQNW~~PALS~~

7. 5-HT_{2C}-G (68 aminosyrer):

MDYKDDDDA-
MVNLRNAVHSFLVHLIGLLVWQC~~DISVSPVAA~~-IVTDIFNTSDGGRFKFPDGVQNW~~PALS~~

8. 5-HT_{2C}-H (52 aminosyrer):

MDYKDDDDA-MKTIIALS~~YIFCLVFA~~----- -IVTDIFNTSDGGRFKFPDGVQNW~~PALS~~

9. 5-HT_{2C}-iB (68 aminosyrer):

MVNLRNAVHSFLVHLIGLLVWQC~~DISVSPVAA~~-I-DYKDDDDA
-IVTDIFNTSDGGRFKFPDGVQNW~~PALS~~

10. 5-HT_{2C}-nB (67 aminosyrer):

MVNLRNAVHSFLVHLIGLLVWQC~~DISVSPVAN~~-DYKDDDDA
-IVTDIFNTSDGGRFKFPDGVQNW~~PALS~~

11. 5-HT_{2C}-nG (99 aminosyrer):

MVNLRNAVHSFLVHLIGLLVWQC~~DISVSPVAN~~-DYKDDDDA
MVNLRNAVHSFLVHLIGLLVWQC~~DISVSPVAA~~-IVTDIFNTSDGGRFKFPDGVQNW~~PALS~~

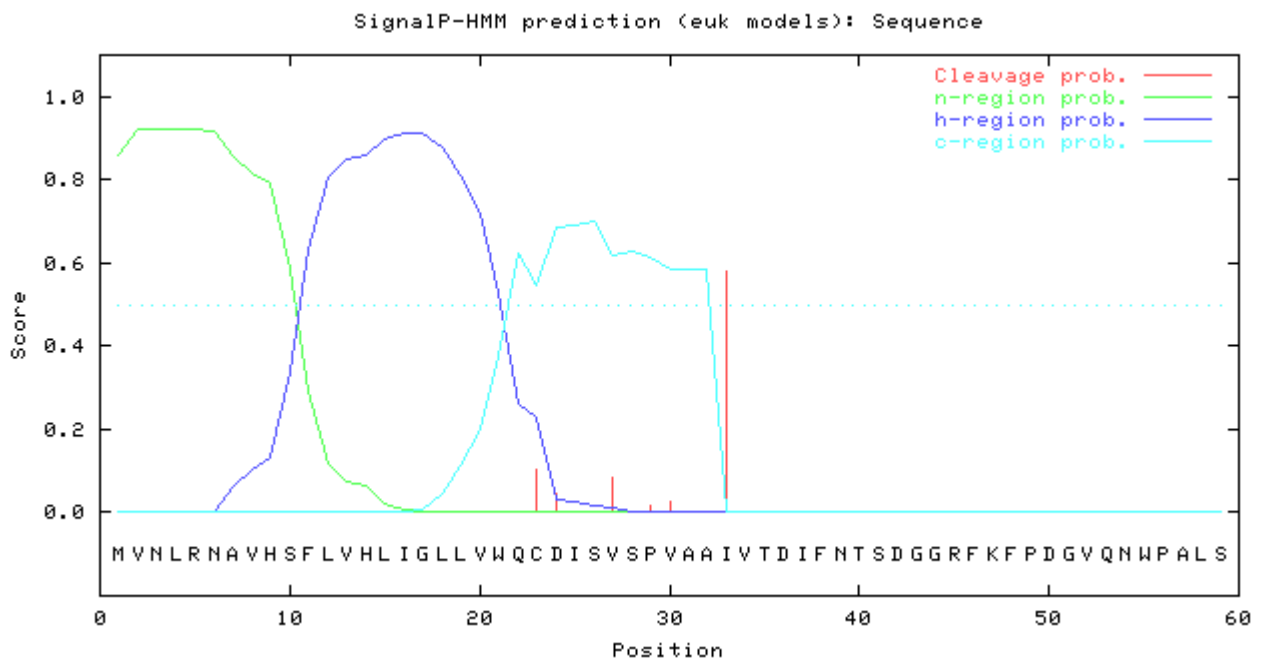
12. 5-HT_{2C}-iH (84 aminosyrer):

MVNLRNAVHSFLVHLIGLLVWQC~~DISVSPVAA~~-I-DYKDDDDA-MKTIIALS~~YIFCLVFA~~
-IVTDIFNTSDGGRFKFPDGVQNW~~PA~~

12.1.2 HMM resultat for 5-HT_{2C}, villtypen

Resultat for test av villtypen 5-HT_{2C} med aminosyresekvens:

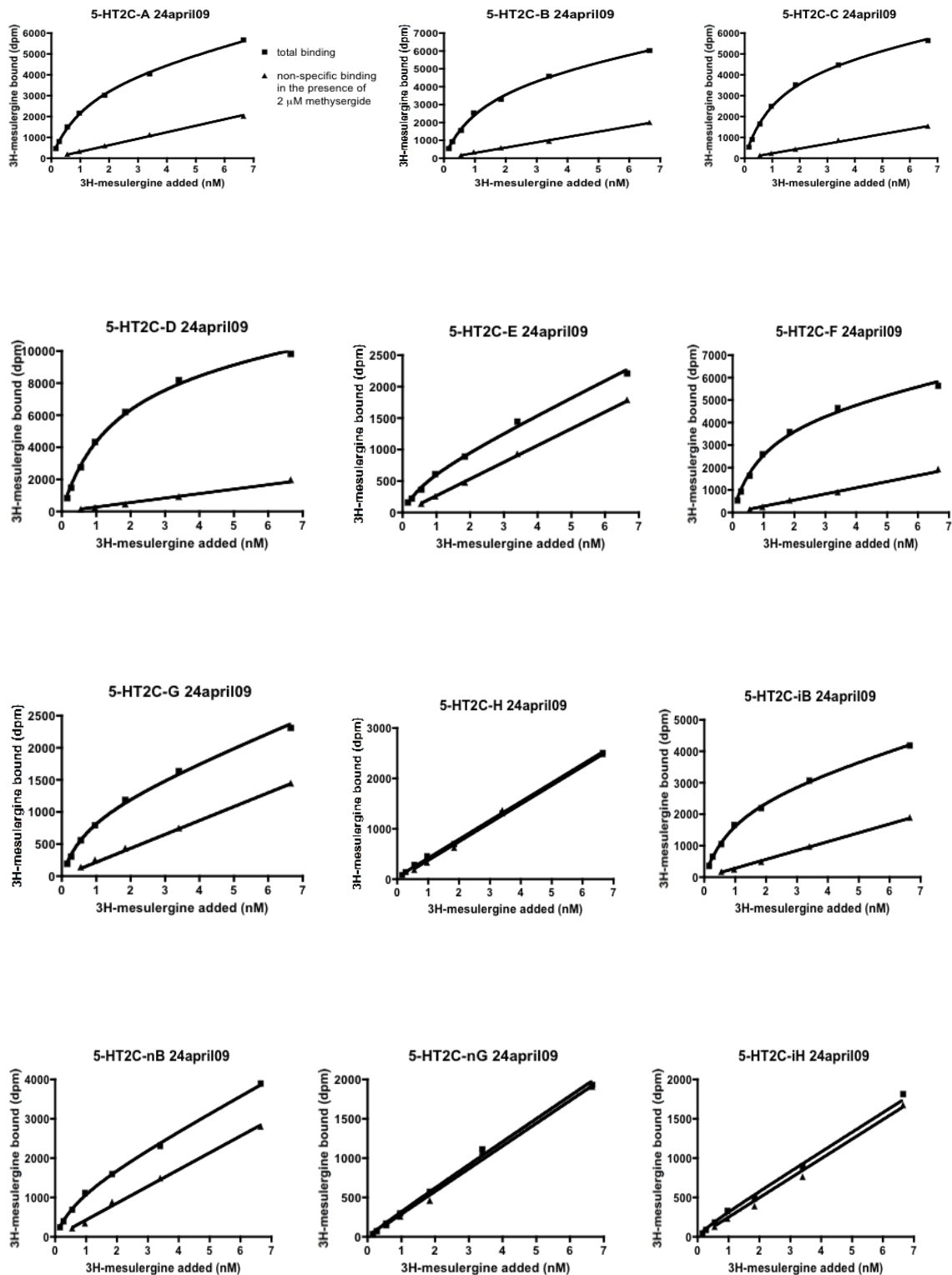
MVNLRNAVHSFLVHLIGLLVWQCDISVSPVAA-IVTDIFNTSDGGRFKFPDGVQNW PALS



Figur 12.1 Predikteringsresultat for 5-HT_{2C}, villtypen

Prediction: Signal peptide
Signal peptide probability: 0.859
Signal anchor probability: 0.064
Max cleavage site probability: 0.581 between pos. 32 and 33

12.1.3 Satureringskurver for 5-HT_{2C}-konstruktene



Figur 12.2 Satureringskurver for 5-HT_{2C} konstruktene

12.2 α_2C -konstrukt

12.2.1 Presentasjon av α_2C N-terminalhalene

1. α_2C -1 (villtypen = 49 aminosyrer i N-terminalhalen)

MASPALAAALAVAAAAGPNASG-AGERGSGGVANASGASWGPPRGQYSAG

2. α_2C . 2-22d (28 aminosyrer):

M----- AGERGSGGVANASGASWGPPRGQYSAG

3. α_2C -3 (57 aminosyrer):

MASPALAAALAVAAAAGPNASG-DYKDDDDA
- AGERGSGGVANASGASWGPPRGQYSAG

4. α_2C -4 (65 aminosyrer):

MKTIIALSYIFCLVFA-MASPALAAALAVAAAAGPNASG
-AGERGSGGVANASGASWGPPRGQYSAG

5. α_2C -5 (51 aminosyrer):

MKTIIALSYIFCLVFA-DYKDDDDA-AGERGSGGVANASGASWGPPRGQYSAG

6. α_2C -6 (73 aminosyrer):

M-KTIIALSYIFCLVFA-DYKDDDDA-
MASPALAAALAVAAAAGPNASG-AGERGSGGVANASGASWGPPRGQYSAG

7. α_2C -7 (36 aminosyrer):

M- DYKDDDDA----- AGERGSGGVANASGASWGPPRGQYSAG

8. α_2C .2-8d (42 aminosyrer):

M-----ALAVAAAAGPNASG-AGERGSGGVANASGASWGPPRGQYSAG

9. α_2C .2-15d (35 aminosyrer):

M----- AGPNASG-AGERGSGGVANASGASWGPPRGQYSAG

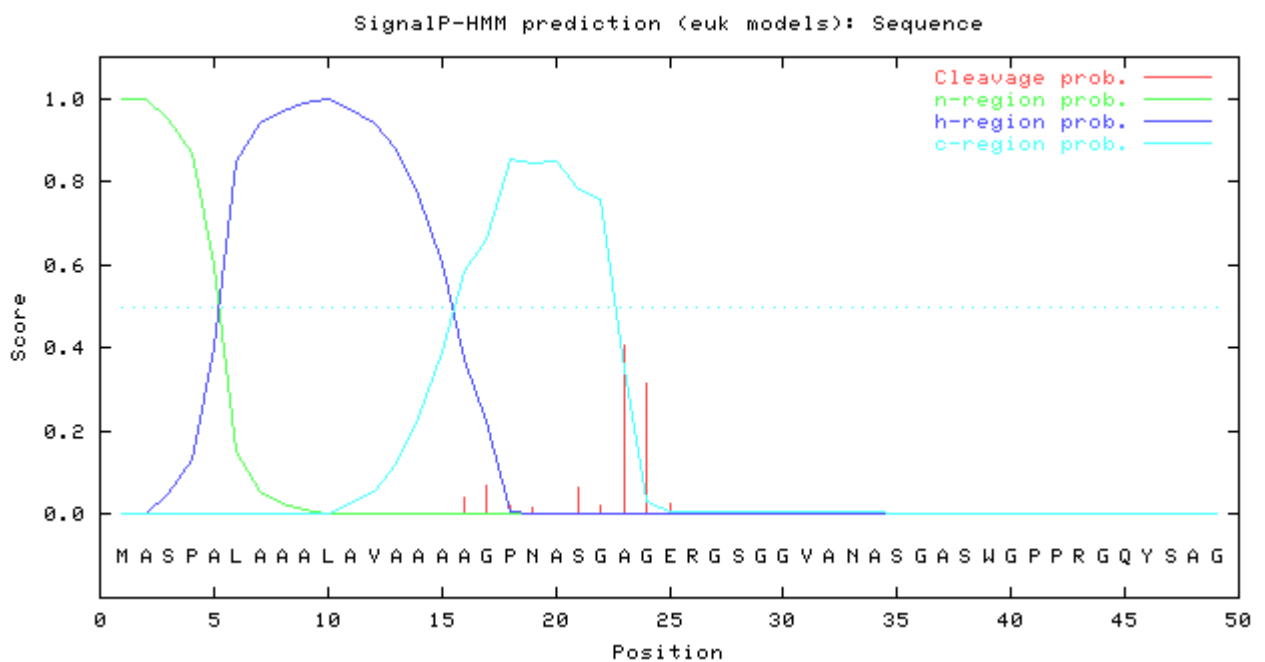
10. α_2C - 2-33d (17 aminosyrer):

M-----ASGASWGPPRGQYSAG

12.2.2 HMM resultat for α_{2C} , villtypen

Resultat for test av villtypen α_{2C} med aminosyresekvens:

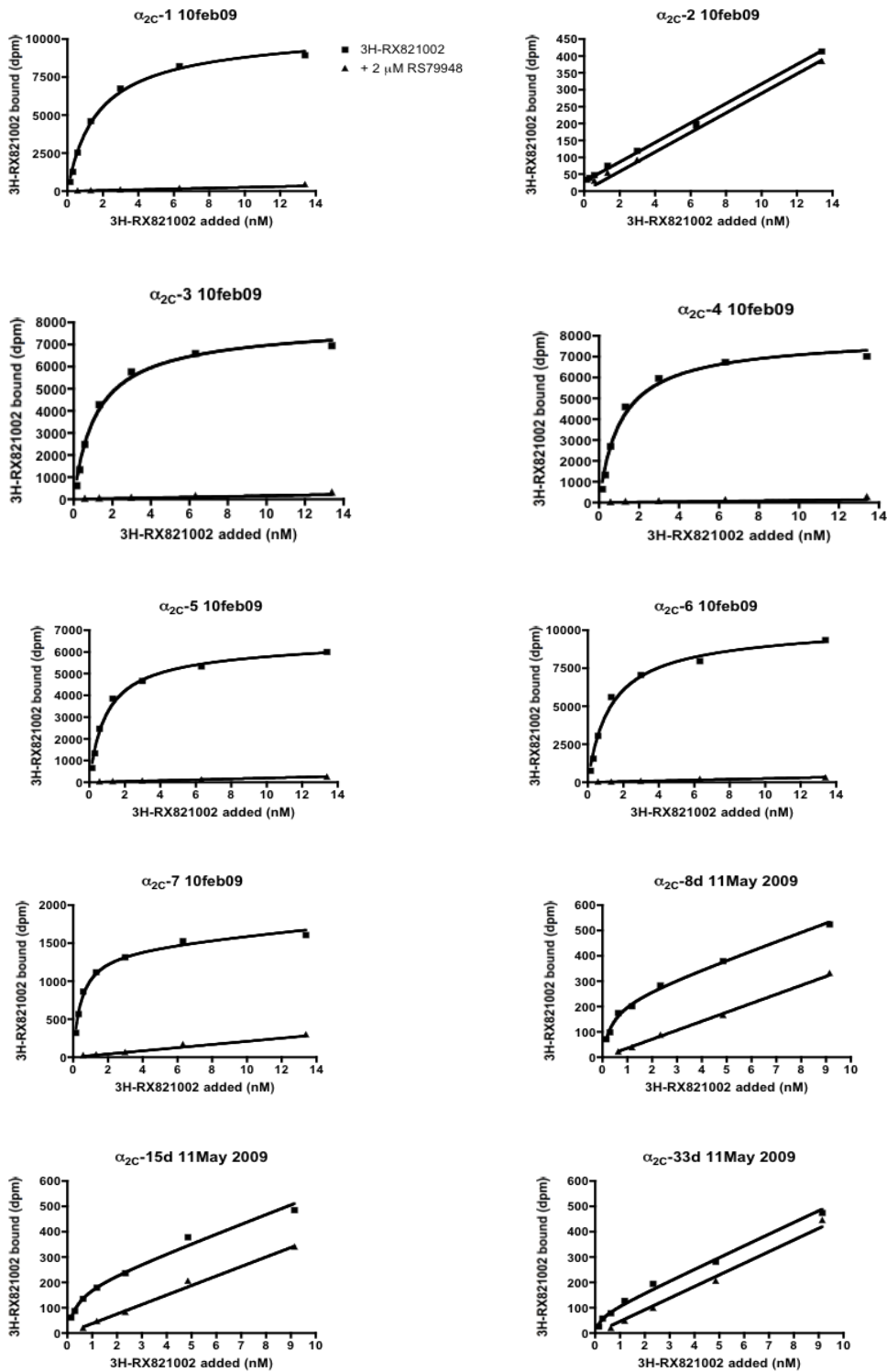
MAASPALAAALAVAAAGPNASG-AGERGSGGVANASGASWGPPRGQYSAG



Figur 12.3 Predikteringsresultat for α_{2C} , villtypen.

Prediction: Signal peptide
Signal peptide probability: 1.000
Signal anchor probability: 0.000
Max cleavage site probability: 0.408 between pos. 22 and 23

12.2.3 Satureringskurver for α_{2C} konstruktene



Figur 12.4 Satureringskurver for α_{2C} konstruktene

12.3 Protokoller brukt i forsøkene

12.3.1 GeneClean

- de utklipte agarosebitene tilsettes 500 µl 7,5 NaI og varmes i vannbad ved 45 °C i noen minutter
- 10 µl på forhånd vortexet 10 % silica-suspensjon tilsettes
- 3 µl 2,5 M NaAc/HAc pH 4,7 tilsettes
- inkubering i romtemperatur i 15 minutter
- sentrifugeres ved 5000 rpm i 1 minutt, supernatanten fjernes
- sentrifugeres ved 5000 rpm i ytterligere 5-10 sekunder og fjerner all væske
- 500 µl iskald New Wash løsning tilsettes til pelleten og det blandes til den er løst
- sentrifugeres ved 5000 rpm i 1 minutt, supernatanten fjernes
- sentrifugeres ved 5000 rpm i ytterligere 5-10 sekunder og fjerner all væske
- la pelleten tørke en stund ved romtemperatur eller 45 °C til den er blitt hvitere
- pelleten løses i 15-20 µl 10mM Tris pH 8,0 eller dH₂O
- blandingen varmes på vannbad til 65 °C i noen minutter
- sentrifugeres ved 13000 rpm i 2 minutter
- supernatanten overføres til nye, merkede eppendorfrør og lagres ved -20 °C

12.3.2 Transformasjon (Heatshock)

- kompetente celler tines på is. Det er viktig at cellene behandles med forsiktighet slik at de ikke ødelegges
- bland ligeringer (3-15 µl) og tinte *E.coli* celler (50-100 µl) og inkuber løsningen på is i 30 minutter
- varmesjokket gjøres ved å sette løsningene i vannbad ved 41,5 °C i 90 sekunder og deretter inkubere på is igjen i ytterligere 3 minutter.
- i en steril LAF-benk tilsettes hver av blandingene 300 µl LB-medium og de inkuberes i romtemperatur i 7 minutter.
- 100-300 µl tilsettes til en LB-ampicillin-skål (150 mg/l ampicillin) og løsningen strykes godt utover med en spatel
- platene inkuberes ved 37 °C i minst 16 timer

12.3.3 Transfektering tilpasset for 9 cm² petri-skål

- 2,0 µg DNA fortynnes i 100 µl PBS (serumfritt, autoklavert) med forsiktig pipettering = A
- 6,0 µl Metafectene fortynnes i 100 µl PBS med forsiktig pipettering = B
- løsning B tilsettes til merkede Falcon-rør
- løsning A tilsettes **TIL** løsning B (**NB: ingen miksing**) og inkuberes ved romtemperatur i 15-20 minutter
- fjern mediet fra skålene og vask COS-7 cellene med serumfritt OptiMem, 2ml/skål
- tilsett 2,0 ml OptiMem pr skål
- tilsett 0,2 ml Metafectene-DNA dråpevis til cellene og beveg forsiktig på skålene
- inkuberes ved 37 °C i en CO₂ inkubator

Dersom toksisitet er et problem, må transfeksjonsblandingen fjernes neste dag og erstattes med medium tilsatt serum og antibiotika.

DNA og Metafectene bør ha romtemperatur og rystes forsiktig før bruk. Det bør beregnes overskudd av mengden DNA, Metafectene og PBS. Protokollen tilpasses vekstarealet på skålene som brukes [42].

12.3.4 Membranpreparasjon

- vekstmediet på petri-skålene fjernes
- 10 ml 50 mM Tris/5mM EDTA (kald) tilsettes til hver petriskål, la stå i 5-10 min for å løsne cellene fra bunnen av platen
- væsken tilsettes til "30 ml" sentrifugerør merket for hvert konstrukt
- cellene homogeniseres i ultraturrax i ca 20 sekunder på styrke 5, kniven vaskes godt mellom hvert konstrukt
- cellene spes til ca 30 ml i rørene med 50 mM Tris/1,5 mM EDTA
- sentrifugeres ved 19000 rpm i 10-12 minutter
- supernatanten helles av
- pelleten resuspenderes i 2,7 ml 50 mM Tris/1,5 mM EDTA
- ultraturrax, hastighet 3 noen sekunder for å løse opp pelleten

- settes i kjøleskap til test er klar (test= for å se om reseptorer uttrykkes) eller fryses ved -20 °C til de skal brukes i forsøk

12.3.5 Proteinbestemmelse etter Lowry-SDS-metoden

Løsninger:

A: 2 % Na₂CO₃, 0.4% NaOH, 0.16 % Sodiumtartrate, 1% SDS

Na ₂ CO ₃ x 10 H ₂ O.....	27,0 g
NaOH.....	2,0 g
Na-tartrate x 2 H ₂ O...	0,95 g
SDS.....	5,0 g
dH ₂ O.....	til 500 ml

Stoffene løses ved bruk av en magnet-rører og løsningen varmes. La den avkjøle i minst 30 minutter før bruk.

B:

CuSO ₄ x 5 H ₂ O.....	4,0 g
dH ₂ O.....	til 100 ml

Det lages en standardkurve hvor 4 mg/ml BSA fortynnes med vann i forhold 1:1 i en fortynningsserie (200 µl til 200 µl). Serien starter med 4 mg/ml og avsluttes med kun destillert vann.

50-100 µl av standardene pipetteres over i testrør (i duplikat), det samme gjøres med prøvene som skal proteinbestemmes.

C:

Løsning C må være nylaget og tilberedes ved å blande løsning A med løsning B i forhold 100:1. Av denne blandingen tilsettes 4 ml til hvert av testrørene, de vortexes og blir stående i 10 minutter.

Folin-reagens lages ved å blande Folin-løsning og dH₂O i forhold 1:1 Av denne blandingen tilsettes det 0,3 ml til hvert testrør som umiddelbart vortexes og blir stående i 45 minutter.

Prøvene avleses i et spektrofotometer ved 750 nm, det brukes kyvetter av plast.

De avleste dataene analyseres ved hjelp av GraphPad Prism ved tillaging av standardkurve.

12.3.6 Radioligandbinding

α_2C :

På alle konstruktene ble det kjørt tre radioligandforsøk av hvert. For α_2C brukes antagonisten [³H]-RX821002, og RS79948 for å måle uspesifikk binding. Konstrukt A blir alltid tatt med da dette er villtypen og det som de andre sammenlignes mot. Som et eksempel er det vist protokollen og oppsettet for platen for fire ulike konstrukt. Tallene må justeres etter hvor mange konstrukt som det gjøres forsøk på samtidig. Syv ulike konsentrasjoner av [³H]-RX821002 lages i en fortynningsrekke. Det tilsettes først 900 μ l vehikkel til rør 1 og 450 μ l vehikkel til rør 2-7. 4 μ l av radioliganden tilsettes til rør 1, det blandes godt og 425 μ l av løsningen overføres til rør 2. Fortynningen fortsetter på samme måte til de resterende fem rørene. Det blir brukt en 12 μ M løsning RS79948, denne fortynnes fra en utgangsløsning på 1,9 mM.

	Vehikkel							2 μ M RS79948				
33d												
15d												
8d												
A												
	7	6	5	4	3	2	1	5	4	3	2	1

Figur 12.5 Plateoversikt eksemplifisert ved konstrukt A, 8d, 15d og 33d.

Det blir brukt en mikrotiterplate bestående av 96 brønner som vist på forrige side. I hver brønn tilsettes det:

25 μ l [³H]-RX821002 i fortynning (1-7)

25 μ l med vehikkel eller blokker (RS79948, 12 μ M)

100 μ l av riktig membrankonstrukt.

Etter at alt er riktig tilsatt inkuberes platen i 1 time ved romtemperatur. Suspensjonene filtreres deretter og vaskes på Whatman glassfiber-filtre ved bruk av Brandel cell harvester. Filtrene plukkes og tilsettes 4 ml OptiPhase tellevæske. Radioaktivitet som ikke går i løsning men blir holdt tilbake på filtrene blir så detektert ved bruk av Tri-Carb 2900TR Liquid Scintillation Analyser.

2x100 µl av membranene blir også pipettert ut for bestemmelse av proteinkonsentrasjon, og 25 µl av hver fortykning tilsettes til egne rør og brukes til bestemmelse av total tilsatt ^3H .

5-HT_{2C}:

Protokollen for 5-HT_{2C} er litt mer tidkrevende enn for α_{2C} . Etter at 2x100 µl av membranpreparasjonene er tatt vekk til proteinbestemmelse etter Lowry-SDS-metoden, tilsettes det 54 µl 300 mM askorbinsyre og 107 µl 25 mg/ml BSA til de resterende 2,5 ml. Denne blandingen preinkuberes ved 30 °C i 45-60 minutter før den kan brukes videre. Askorbinsyren tilsettes som antioksidant for å hindre at serotonin oksideres.

Under inkuberingen lages det til syv ulike konsentrasjoner av radioliganden [^3H]-mesulergin i en fortynningsrekke. Det tilsettes først 2800 µl 1,5 mM askorbinsyre-vehikkel til rør 1 og 1300 µl av samme vehikkel til rør 2-7. 11 µl av radioliganden tilsettes til rør 1, det blandes godt og 1500 µl av løsningen overføres til rør 2. Fortynningen fortsetter på samme måte til de resterende fem rørene. Mengdene oppgitt rekker til tolv ulike konstrukt.

25 µl av hver fortykning tilsettes til egne rør og brukes til bestemmelse av total ^3H .

	+ askorbinsyre-vehikkel							+ 2µM methysergid				
D												
C												
B												
A												
	7	6	5	4	3	2	1	5	4	3	2	1

Figur 12.6 Plateoversikt eksemplifisert ved konstrukt A, 8d, 15d og 33d.

I hver brønn i mikrotiterplaten tilsettes det:

25 μl [^3H]-mesulergin i fortyning (1-7)

25 μl askorbinsyre-vehikkel, eller blokker (12 μM methysergid)

100 μl av riktig membrankonstrukt på forhånd preinkubert med askorbinsyre

Platene inkuberes deretter igjen ved 30 °C i en time.

Som for α_{2C} filtreres suspensjonene og vaskes på Whatman glassfiber-filtre ved bruk av Brandel cell harvester. Filtrene plukkes og tilsettes 4 ml OptiPhase tellvæske. Radioaktivitet som ikke går i løsning men blir holdt tilbake på filtrene blir så detektert ved bruk av Tri-Carb 2900TR Liquid Scintillation

For å regne ut konsentrasjonen av radioligand i eksperimentet anvendes en f-faktor. Denne vil lineært omdanne målt radioaktivitet (dpm-verdien) til konsentrasjon (nM). For å beregne f-faktoren trenger man å vite den spesifikke radioaktiviteten i Ci/mmol til stoffene det jobbes med (dette er oppgitt på boksene). Per definisjon er 1 Ci = $2.22 \cdot 10^{12}$ dpm.

Den spesifikke radioaktiviteten for [^3H]-RX821002 er 49 Ci/mmol

Det kan da beregnes:

$$2,22 \cdot 10^{12} \text{ dpm/Ci} \times 49 \text{ Ci/mmol} > 108780 \text{ dpm/nmol}$$

- 1 nmol tilsvarer 1 liter av en 1 nM løsning = 108780 dpm
- 150 μl av en 1 nM løsning blir = 16317 dpm

F-faktoren for [^3H]-RX821002 (49 Ci/mmol) i en 150 μl løsning (d.v.s eksperimentvolumet i mikrotiterplaten blir altså lik 16317).

For [^3H]-mesulergin er den spesifikke radioaktiviteten 91 Ci/mmol. F-faktoren for denne blir $91/49 \times 16317 = 30303$ (d.v.s $f = 30303$ dpm/nM i en 150 μl løsning).

Med hjelp av f-faktoren kan man regne ut konsentrasjonen av bundet radioligand (som blir igjen på filtrene fra eksperimentvolumet i mikrotiterplaten). Denne konsentrasjonen (ofte pikomolar) kan divideres med proteinkonsentrasjonen. Da fås reseptorkonsentrasjonene i pM/mg protein som er oppgitt i tabellene.

12.3.7 Fiksering og innmerking

- coverglassene fjernes fra petri-skålene og overføres til nye, merkede skåler
- cellene vaskes med 3-4 ml PBS, dette trinnet gjentas ytterligere to ganger
- cellene fikseres ved inkubering i 3-4 ml 2 % PFA i PBS i 20 minutter
- PFA fjernes fra skålene
- cellene vaskes igjen med 3-4 ml PBS, vaskingen gjentas ytterligere en gang
- for å nøytralisere PFA inkuberes coverglassene i 3-4 ml 50 mM NH_4Cl i PBS i 15 minutter
- NH_4Cl i PBS fjernes fra skålene
- cellene vaskes igjen, denne gang med 3-4 ml blokkingsbuffer
- cellene inkuberes i 3-4 ml blokkingsbuffer i 30 minutter
- coverglassene med celler overføres til nye, merkede petri-skåler
- cellene inkuberes i 15 minutter med primært antistoff ($\text{M1}_{\text{Ca}^{2+}}$ eller M2_{FLAG}) i fortynning 1:80
Primært antistoff i 5 % geitserum i blokkingsbuffer (totalt 400 μl /coverglass)
- cellene vaskes med 3-4 ml blokkingsbuffer, trinnet gjentas ytterligere to ganger
- coverglassene overføres til nye, merkede petriskåler
- cellene inkuberes i 15 minutter med sekundært antistoff (fluorescein Goat-AntiMouse) i fortynning 1:80
Sekundært antistoff i 5 % geitserum i blokkingsbuffer (totalt 400 μl /coverglass)
- cellene vaskes med 3-4 ml blokkingsbuffer, trinnet gjentas ytterligere to ganger
- cellene vaskes med 3-4 ml dH_2O
- ca 8 μl mounting media tilsettes til mikroskopiplaten
- coverglassene overføres til mikroskopiplaten med celsiden ned mot "mounting media", la det tørke noen minutter
- sidene på coverglassene forsegles med neglelakk før de er klare til å undersøkes i fluorescensmikroskop

12.4 Oppskrifter på løsninger

12.4.1 Til fiksering og innmerking for fluorescensmikroskopi

1X PBS pH 7,5

NaCl.....	8000 mg
KCl.....	200 mg
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O.....	1440 mg
KH ₂ PO ₄	240 mg
dH ₂ O.....	til 800 ml, juster pH til 7,5 dråpevis.
dH ₂ O.....	til 1000 ml, flasken steriliseres så ved autoklaving.

Ved tillaging av 2xPBS tilsettes kun 450 ml destillert vann før løsningen pH-justeres og vann tilsettes til totalvolum 500 ml.

Paraformaldehyd (PFA) 4 % løsning

Paraformaldehyd.....	4000 mg
dH ₂ O.....	til 100 ml

Denne løsningen må være nylaget før bruk. Etter blanding varmes løsningen til 60-65 °C (**ikke varmere**) med samtidig lett risting. Dette gjøres i ca 5 minutter. Blandingen avkjøles litt før 1M NaOH tilsettes dråpevis. Dette fører til at løsningen blir litt klarere selv om det fortsatt vil være uløste partikler igjen i røret. For å fjerne partiklene sentrifugeres løsningen ved 1000 rpm i ca 2 minutter og den klare væsken suges av med pipette eller dekanteres.

2 % PFA i PBS, pH 7,5

Like mengder 2x PBS og 4 % PFA-løsning (v/v) blandes og justeres til riktig pH.

NH₄Cl, 50mM i PBS, pH 7,5

NH ₄ Cl.....	267,5mg
PBS.....	til 100 ml, juster pH til 7,5 dråpevis

Flasken steriliseres ved autoklaving.

Blokkings-buffer (TBS med 2mg/ml BSA og 1 mM CaCl₂, pH 7,4

Tris.....	6057 mg
NaCl.....	8766 mg
BSA.....	2000 mg
CaCl ₂ *4H ₂ O.....	183 mg
dH ₂ O.....	900 ml, juster pH til 7,4 dråpevis med koncentrert HCl
dH ₂ O.....	1000 ml

5 % geitserum i TBS m/1mM CaCl₂:

Til 4 ml løsning:

Geitserum	200 µl
TBS m/1mM CaCl ₂	3,8 ml

Primære antistoff (M1 eller M2):

Pr coverglass:

M1/M2.....	5 µl
5 % geitserum i TBS m/1mM CaCl ₂	395µl

NB! M1 antistoff/antigen bindingen er kalsiumavhengig.

Sekundært antistoff (Fluorescein Goat-Anti Mouse):

Pr coverglass:

Fluorescein Goat-Anti Mouse.....	5 µl
5 % geitserum i TBS m/1mM CaCl ₂	395 µl

12.4.2 Løsninger til radioligandbindingsforsøk

Tris-Cl 1M, pH 7,6)

Tris base..... 121,1gr
dH₂O..... til 800 ml
Konsentrert HCl (pH til 7,6).... 60 ml
dH₂O..... til 1000 ml

EDTA 0,25M

EDTA..... 9,3 gr
dH₂O..... til 80 ml, juster pH til 8,0 med NaOH
dH₂O..... til 100 ml

EDTA og vann blandes under omrøring med magnetrører samtidig som NaOH tilsettes enten som pellets (ca 2 gram) eller som sterk NaOH-løsning. Natriumsaltet av EDTA løses ikke opp før pH er justert til ca 8.

Tris-EDTA 50mM-5mM

0,25 M EDTA..... 20 ml
1,0 M Tris-Cl (pH 7,6)..... 50 ml
dH₂O..... til 1000 ml

Tris-EDTA 50mM-1,5mM

0,25 M EDTA..... 6 ml
1 M Tris-Cl (pH 7,6)..... 50 ml
dH₂O..... til 1000 ml

300 mM Askorbinsyre

Askorbinsyre..... 2642 mg
dH₂O..... til 50 ml

Vehikkel med 1,5 mM askorbinsyre

Konsentrert HCl.....	25 µl
Etanol.....	4,0 ml
300 mM askorbinsyre.....	0,5 ml

12.5 Diverse

Ampicillin (1000x)

Ampicillin.....	100 mg
EtOH.....	600 µl
dH ₂ O.....	200 µl

Ampicillin er veldig hygroskopisk og veies derfor direkte inn i et eppendorfrør. Etanol og vann tilsettes og det blandes kraftig med vortexing inntil alt pulver er løst. Deretter tilsettes destillert vann til totalvolum 1,0 ml

Løsningen lagres ved -20 °C.